

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Christian Wahl-Schott



Die NLRP3-abhängige Freisetzung von MRP8/14

im neutrophilen Granulozyten

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Timon Maximilian Kuchler

aus Furth i. Wald

2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Bernhagen
Prof. Dr. Alexander Bartelt
Prof. Dr. Christian Schulz

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Monika Prünster

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2023

1. Inhaltsverzeichnis

1.	Inhaltsverzeichnis	1
1.1	Abbildungsverzeichnis	4
1.2	Tabellenverzeichnis	4
1.3	Abkürzungsverzeichnis	5
2.	Einleitung	8
2.1	Das angeborene und erworbenen Immunsystem	8
2.2	Neutrophile Granulozyten	10
2.3	Die Leukozyten-Rekrutierungskaskade	12
2.3.1	Erfassen und Rollen	13
2.3.2	Aktivierung und Arrest	14
2.3.3	Crawling	15
2.3.4	Transmigration	16
2.4	MRP8/14	17
2.4.1	Alarmine	17
2.4.2	Nomenklatur und Struktur von MRP8/14	18
2.4.3	Intrazelluläre und extrazelluläre Funktionen von MRP8/14	18
2.4.4	Klinische Bedeutung von MRP8/14	19
2.5	Das Inflammasom	20
2.5.1	Rezeptoren des Inflammasoms und Aktivatoren des NLRP3 Inflammasoms	20
2.5.2	Aufbau und Struktur des NLRP3 Inflammasoms	22
2.5.3	Effektorfunktionen des NLRP3 Inflammasoms und seine klinische Bedeutung	23
3.	Aufgabenstellung	25
4.	Material und Methoden	26
4.1	Material	26

Verzeichnisse

4.1.1	Isolation, Stimulation und Inhibition von Zellen.....	26
4.1.2	Western Blot.....	27
4.1.3	Flusskammern	29
4.1.4	<i>In vitro</i> und <i>in vivo</i> Freisetzungssassay	30
4.2	Methoden.....	31
4.2.1	Aufreinigung und Stimulation humaner PMN, humaner PBMC und humaner Monozyten	31
4.2.2	Aufreinigung und Maturierung muriner PMN aus dem Knochenmark mittels Percoll .	32
4.2.3	Aufreinigung muriner Bone Marrow Derived Neutrophils (BMDN) mittels EasySep™.	33
4.2.4	Western Blot.....	33
4.2.5	<i>In vitro</i> Flusskammern	35
4.2.6	Labormäuse	36
4.2.7	<i>In vitro</i> Freisetzung Assay	36
4.2.8	<i>In vivo</i> Freisetzung Assay	37
4.2.9	Statistische Analysen	37
5.	Ergebnisse	38
5.1	Die Freisetzung von MRP8/14 ist abhängig von Caspase-1 /11 und Gasdermin D <i>in vitro</i> ...	38
5.2	Die Freisetzung von MRP8/14 ist abhängig von Caspase-1 /11 und Gasdermin D <i>in vivo</i>	40
5.3	Stimulation humaner PMN mit E-Selektin führt zu einer Aktivierung von Caspase-1, die unabhängig von TLR-4 ist	41
5.4	Die Aktivierung von Caspase-1 durch E-Selektin in hPMN ist K ⁺ -Efflux abhängig	42
5.5	Das NLRP3 Inflammasom vermittelt die E-Selektin-abhängige Caspase-1 Aktivierung in hPMN	44
5.6	E-Selektin Stimulation von hPMN führt zu einer NLRP3 Inflammasom und K ⁺ -Efflux- abhängigen Aktivierung von Gasdermin D.....	45
5.7	Inhibition von NLRP3 in murinen PMN führt zu einer Erhöhung der Rollgeschwindigkeit <i>in vitro</i>	46

Verzeichnisse

5.8	Murine BMDN von <i>Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}</i> und <i>Gsdmd^{-/-}</i> Mäusen zeigen erhöhte Rollgeschwindigkeiten <i>in vitro</i>	47
6.	Diskussion.....	49
6.1.	Die Freisetzung von MPR8/14 aus neutrophilen Granulozyten.....	49
6.2	Die Expression von Proteinen des Inflammasom Komplexes auf Protein Ebene in neutrophilen Granulozyten.....	51
6.3	Die schnelle NLRP3 Inflammasom Aktivierung als kritischer Punkt der MRP8/14 Freisetzung	53
6.4	Die Rolle des K ⁺ -Efflux als Grundlage für die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms	55
6.5	Die Bildung von Gasdermin D Poren im neutrophilen Granulozyten	56
6.6	Die physiologische Bedeutung des Inflammasoms für die Funktion des Neutrophilen	59
7.	Zusammenfassung.....	61
8.	Abstract (English)	63
9.	Literaturverzeichnis.....	65
10.	Danksagung	79
11.	Affidavit	80
12.	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
13.	Publikationsliste	82

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Die Leukozyten-Rekrutierungskaskade	13
Abbildung 2.2: Aufbau und Aktivierungsmechanismen des NLRP3 Inflammasoms.....	23
Abbildung 5.1: Unterschiede der MRP8/14 Spiegel nach E-Selectin und PBS Stimulation zwischen WT, Gsdmd ^{-/-} und Casp-1 ^{-/-} Casp-11 ^{-/-} BMDN <i>in vitro</i>	39
Abbildung 5.2: Unterschiede der MRP8/14 Spiegel vor und nach TNF- α Injektion zwischen WT, Gsdmd ^{-/-} und Casp-1 ^{-/-} Casp-11 ^{-/-} BMDN <i>in vivo</i>	40
Abbildung 5.3: Vergleich der aktiven Caspase-p20 in humanen PMN (hPMN) nach E-Selektin Stimulation	42
Abbildung 5.4: Vergleich der aktiven Caspase-p20 in hPMN nach E-Selektin Stimulation in normalem und K ⁺ -reichem Medium	43
Abbildung 5.5: Vergleich der aktiven Caspase-p20 in E-Selektin stimulierten hPMN nach NLRP3 Inhibition mit MCC950	44
Abbildung 5.6: Vergleich des aktiven Gasdermin D p30 in E-Selektin-stimulierten hPMN nach NLRP3 Inflammasom und K ⁺ -Efflux Inhibition.....	45
Abbildung 5.7: Unterschied der Rollgeschwindigkeiten von murinen Neutrophilen mit inhibiertem NLRP3 Inflammasom	47
Abbildung 5.8: Unterschied der Rollgeschwindigkeiten von Casp-1 ^{-/-} Casp-11 ^{-/-} und Gsdmd ^{-/-} Neutrophiler	48
Abbildung 7.1: Die NLRP3-abhängige Freisetzung von MRP8/14 im neutrophilen Granulozyten	62
Abbildung 8.1: NLRP3-dependent release of MRP8/14 in neutrophils.	64

1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 4.1: Materialien zur Isolation und Kultur von Zellen	26
Tabelle 4.2: Substanzen zur Stimulation und Inhibition von Zellen	27
Tabelle 4.3: Medien für Western Blot	27
Tabelle 4.4: Primäre Antikörper für Western Blot	29
Tabelle 4.5: Sekundäre Antikörper für Western Blot	29
Tabelle 4.6: Materialien für Western Blot.....	29
Tabelle 4.7: Medien für Flusskammern.....	29
Tabelle 4.8: Materialien für Flusskammer.....	30
Tabelle 4.9: Substanzen für den Freisetzungssassay	30

Tabelle 4.10: Medien für den Freisetzungssassay	30
Tabelle 4.11: Materialien für den Freisetzung Assay.....	31

1.3 Abkürzungsverzeichnis

AIM2	absent in melanoma 2
APC	antigen presenting cells
APRIL	A proliferation-inducing ligand
ANOVA	analysis of variance
ASC	apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain
ATP	adenosine-triphosphate
BMDN	bone marrow derived neutrophils
CAPS	cryopyrin associated periodic syndrome
CARD	caspase recruitment domain
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
CXCL12	C-X-C motif chemokine 12
CXCR2	C-X-C Motif Chemokine Receptor 2
CD	cluster of differentiation
DAMP	danger- associated molecular patterns
DNA	deoxyribonucleic acid
DUB	deubiquitinating enzymes
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
ESCRT	endosomal sorting complexes required for transport
ESAM	endothelial-cell junctional molecule
ER	endoplasmic reticulum
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPCR	G protein-coupled receptors
GSDMD	Gasdermin D

Verzeichnisse

GTP	guanosine triphosphate
IL-1β	Interleukin-1 beta
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
INF-γ	Interferon Gamma
JAM-A	junctional adhesion molecule A
LER	low-expression regions
LFA-1	lymphocyte function-associated antigen 1
LPS	lipopolysaccharide
LRR	leucine-rich repeat
MAC-1	macrophage-1 antigen
MHC	major histocompatibility complex
MST1	macrophage-stimulating protein
ml	milliliter
μm	micrometer
MPO	myeloperoxidase
MRP8/14	myeloid related protein 8/14
NACHT	<u>N</u> AIP (neuronal apoptosis inhibitor protein), <u>C</u> 2TA (class 2 transcription activator, of the MHC), <u>H</u> ET-E (heterokaryon incompatibility) and <u>T</u> P1 (telomerase-associated protein 1)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
nm	nanometer
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
NOX 2	NADPH oxidase 2
NE	neutrophil elastase
NET	neutrophil extracellular traps
NK-Zellen	natural killer Zellen
NF-κB	nuclear factor- κB
NLR	nucleotide-binding oligomerization domain leucine-rich repeat containing protein
NLRP1	NACHT, LRR, and PYD domains-containing protein 1
NLRP3	NACHT, LRR, and PYD domains-containing protein 3
NLRC4	NLR family CARD domain-containing protein 4
PAD4	Protein arginine deiminase 4
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis

Verzeichnisse

PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphate-buffered saline
PECAM-1	platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1
PLC	phospholipase c
PMN	polymorphonuclear leukocytes
PRR	pattern-recognition receptor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
PYD	pyrin domain
p38 MAPK	p38 mitogen activated protein kinase
P2X₇	P2X Purinoreceptor ₇
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
ROS	reactive oxygen species
RAC-1	ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RAP1	ras-related protein 1
RHO	ras homolog family
rpm	rounds per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SARM-1	Sterile Alpha and TIR Motif Containing 1
SYK	spleen tyrosine kinase
Src	sarcoma and cellular
TNF-α	tumor necrosis factor- α
TLR	Toll-like-receptor
UPS	unconventional protein secretion
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VE-Cadherin	vascular endothelial cadherin
VLA	very late antigen
VVO	vesico vacuolar organel

2. Einleitung

2.1 Das angeborene und erworbenen Immunsystem

Traditionell wird das menschliche Immunsystem in zwei Bereiche unterteilt: Die angeborene Immunität und die erworbene, beziehungsweise adaptive Immunität. Obwohl diese Einteilung aufgrund neuerer Erkenntnisse wohl pauschal nicht mehr komplett aufrecht zu erhalten ist, soll in diesem Kapitel auf die unterschiedlichen und gemeinsamen Funktionen beider Systeme eingegangen werden (Lanier und Sun 2009, Vivier et al. 2011).

Der Verteidigungsmechanismus des menschlichen Körpers gegen Keime kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Grundsätzlich muss jedes Pathogen die physikalische Barriere des Körpers überwinden. Als wichtige erste Hürde sind eine intakte Hautbarriere, die mukoziläre Clearance in den Lungen, der niedrige pH der Magensäure oder die bakteriolytischen Lysozyme in Tränen, Muttermilch und anderen Körpersekreten zu nennen (Marshall et al. 2018). Ein Beispiel, wie wichtig eine intakte physikalische Barriere ist, zeigt sich anhand der Erkrankung Zystischen Fibrose. Hier führt eine Mutation des CFTR („*engl. cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*“) Gens dazu, dass das Sekret exokriner Drüsen eine veränderte Zusammensetzung aufweist. Dies hat zur Folge, dass das Bronchialsekret in den Lungen seine Funktion als Teil des mukozilären Apparates nicht mehr erfüllen kann. Die Patienten leiden aufgrund dieser gestörten Barriere an rezidivierenden Lungenentzündungen die durch Bakterien, Viren und Pilze verursacht werden können (Lyczak et al. 2002).

Das angeborene Immunsystem dient der initialen Erkennung und Eliminierung von pathogenen Keimen. Im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem reagiert das angeborene sehr viel schneller auf Mikroorganismen und benötigt zunächst keine Entwicklungsphase. Pathogene werden dabei über eine limitierte Anzahl von Rezeptoren erkannt, das bedeutet, dass verschiedene Keime an den gleichen, hoch konservierten Motiven erkannt werden müssen. Darum ist zunächst davon auszugehen, dass das angeborene Immunsystem im Gegensatz zum adaptiven Immunsystem weniger adäquat auf sich verändernde Bestandteile der Mikroben reagieren kann (Marshall et al. 2018; Vivier und Malissen 2005). In der Literatur werden drei verschiedene Strategien beschrieben, wie die angeborene Immunantwort auf eine Infektion reagiert. So können einerseits Strukturen erkannt werden, die dem eigenen Körper fremd sind. Diese werden als PAMP („*engl. pathogen associated molecular patterns*“) bezeichnet und können unter anderem durch TLR („*engl. Toll-like receptor*“), wie TLR-4 erkannt werden. Andererseits besteht eine weitere Abwehrmöglichkeit in der Erkennung von DAMP („*engl. damage associated*

molecular pattern). Als DAMP werden Moleküle bezeichnet, die im Rahmen einer Infektion und Entzündung, aber auch während einer sterilen Entzündung freigesetzt werden. Diese Moleküle werden zum Beispiel bei der Nekrose von Zellen freigesetzt und können unter anderem intrazelluläre NOD-like („*engl. nucleotide-binding and oligomerization domain*“) Rezeptoren, aber auch extrazelluläre Rezeptoren wie TLR aktivieren (Bianchi 2007). Eine weitere Strategie stellt die Detektion von Strukturen dar, die vom eigenen gesunden Zellgewebe exprimiert werden, körperfremden Pathogenen oder infizierten Zellen aber fehlt. Speziell die MHC („*engl. major histocompatibility complex*“) Klasse 1 Moleküle spielen dabei eine wichtige Rolle bei der Erkennung und Entfernung durch NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen (Medzhitov und Janeway 2002).

Die Effektorzellen des angeborenen Immunsystems sind hämatopoetischer und nicht-hämatopoetischer Herkunft. Zu den Zellen hämatopoetischer Herkunft zählen Mastzellen, dendritische Zellen, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, NK Zellen, und zytotoxische T-Zellen. Die Immunantwort wird komplettiert durch Epithelzellen, welche die luminale Oberfläche des gastrointestinalen, bronchialen und urogenitalen Traktes auskleiden, sowie Endothelzellen des Gefäßsystems (Marshall et al. 2018).

Die zelluläre Abwehr wird durch humorale Elemente verstärkt. Zu diesen zählt das Komplementsystem, dessen Faktoren über eine Opsonierung, also der Markierung durch Bindung an Pathogene zu einer Beseitigung durch Phagozyten wie neutrophile Granulozyten führt. Über den alternativen Weg des Komplementsystems können Bakterien auch nach der Bildung des sogenannten „*Membran Attack Complex*“ direkt eliminiert werden (Sarma und Ward 2011). Auch zirkulierende, anti-mikrobielle Peptide wie Defensine führen selbst zur Beseitigung von Keimen und über ihre chemotaktische Wirkung zu einer Verstärkung der zellulären Antwort (Ganz 2003).

Wie eng das angeborene und adaptive Immunsystem zusammenarbeiten zeigt sich an neutrophilen Granulozyten. Sie interagieren mit B- und T-Zellen. So konnte beispielsweise in neueren Studien gezeigt werden, dass APRIL („*engl. a proliferation-inducing ligand*“), der von Neutrophilen sezerniert wird, das Überleben und die Proliferation von Plasmazellen unterstützt (Huard et al. 2008). Zudem können Neutrophile als Antigenpräsentierende Zellen die Differenzierung von T-Helfer-Zellen in spezifische Subgruppen unterstützen (Abi Abdallah et al. 2011). Andererseits können Zytokine, die von Zellen des adaptiven Immunsystems sezerniert werden die Lebensdauer von neutrophilen Granulozyten signifikant erhöhen und somit die Bekämpfung von Pathogenen durch das angeborene Immunsystem unterstützen (Colotta et al. 1992).

2.2 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen bei Menschen mit 50-70% den größten Anteil der weißen Blutkörperchen dar. Als erste Linie der Immunabwehr sind sie unerlässlich für die Abwehr eindringender Pathogene und wandern nach Beginn einer Infektion schnell und in großer Anzahl aus dem Knochenmark über das Blutssystem in das entzündete Gewebe aus. Am Ort der Infektion töten sie die Pathogene, nach deren Erkennung durch ein Arsenal an zytotoxischen Stoffen ab (Mayadas et al. 2014). Wie wichtig Neutrophile als Teil des angeborenen Immunsystems sind, zeigt sich in Patienten, die weniger als 0.5×10^9 Neutrophile pro Liter Blut haben. Diese schwere Form der Neutropenie, die Agranulozytose, kann bei diesen Patienten dazu führen, dass sie an opportunistischen Infektionen (Infektionen, die für den gesunden Menschen völlig harmlos verlaufen) versterben (Chen et al. 2017).

Neutrophile Granulozyten werden grundsätzlich als kurzlebige Effektorzellen mit limitierter biosynthetischer Aktivität betrachtet. Sie müssen schnell und effektiv auf die große Vielfalt unterschiedlicher Pathogene reagieren, sodass ihre Faktoren größtenteils präformiert in der Zelle vorliegen. Beispielsweise können diese durch Degranulation, also der Exozytose von Granula freigesetzt werden. Dieser Mechanismus führt zu einer effektiven Eliminierung von Pathogenen ohne auf eine „*de novo*“ Synthese von Proteinen angewiesen zu sein (Sheshachalam et al. 2014). Trotz der niedrigen transkriptionellen Aktivität konnte gezeigt werden, dass Neutrophile unter anderem wichtige Entzündungsfaktoren wie, Interleukine („IL“), C-C Chemokine, C-X-C Chemokine und Angiogenese- wie Fibrogenesefaktoren exprimieren und sezernieren. Im Vergleich zu anderen Immunzellen wie Monozyten geschieht dies aber auf einem vergleichsweise niedrigen Level (Tamassia et al. 2018; Witko-Sarsat et al. 2000). Auch die Lebensdauer von Neutrophilen kann durch Zytokine wie GM-CSF („*engl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*“), IL-1 β und Interferon- γ oder durch Pathogene freigesetzte Stoffe wie LPS („*engl. lipopolysaccharide*“) signifikant verlängert werden (Colotta et al. 1992).

Neutrophile Granulozyten werden in großer Anzahl (pro Tag $0,85 \times 10^9$ Zellen pro kg Körpergewicht) im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen gebildet (Dancey et al. 1976). Während der Reifung ist vor allem die Kondensation und Entwicklung eines multilobulären Zellkerns, die Ausbildung von primären, sekundären und tertiären Granula, sowie die Bildung von sekretorischen Vesikeln im reifen Neutrophilen von Bedeutung. Der Chemokinrezeptor CXCR4 („*engl. C-X-C chemokine receptor type 4*“) führt über die Interaktion mit CXCL12 („*engl. C-X-C chemokine ligand 12*“) zu einer Retention von Stammzellen und Neutrophilen im Knochenmark. CXCR2 hingegen ist wichtig für die Freisetzung von Neutrophilen in die Blutzirkulation. Beide Rezeptoren sind zusammen ausschlaggebend für das Aufrechterhalten eines ausreichend großen Pools an Stammzellen und reifen

Neutrophilen im Knochenmark. Kommt es zu einer Infektion, führt vor allem die Hochregulierung von G-CSF zu einer erhöhten Produktion und Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark in das Blut (Borregaard 2010). Die Produktion von IL-17 durch spezielle T_H 17 Zellen, führt unter anderem über die Hochregulation von G-CSF zu einer vermehrten Bildung, einem verlängerten Überleben, einer erhöhten Rekrutierung und einer vermehrten Aktivierung von Neutrophilen. Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen im Gewebe durch Makrophagen, führt zu einer verminderten Aktivität von T_H 17 Zellen (Stark et al. 2005; Pelletier et al. 2010). Durch diese abgestimmten Prozesse kann ein Gleichgewicht an Neutrophilen in der Zirkulation, im Gewebe und im Knochenmark erreicht werden. Dies stellt sicher, dass einerseits eine suffiziente Eliminierung von Pathogen ermöglicht ist und andererseits kein Gewebeschaden durch Neutrophile entsteht.

Nach der Freisetzung von Neutrophilen aus dem Knochenmark in die Zirkulation, kommt es zu einer Veränderung des Phänotyps der Zellen. Dieser Prozess wird als Altern von Neutrophilen bezeichnet. Auch die Mikroumgebung der Neutrophilen kann über verschiedene Faktoren zu einer Veränderung des Phänotyps führen. Die Funktion der Neutrophilen kann sich somit an die jeweilige Bedingung anpassen (Adrover et al. 2016). Neutrophile verbleiben nur wenige Stunden in der Blutzirkulation und wandern anschließend in entzündetes Gewebe aus oder werden abgebaut. Der Prozess, wie Neutrophile von der Zirkulation in das Gewebe migrieren, wird mithilfe der Leukozyten-Rekrutierungskaskade beschrieben (Ley et al. 2007).

Befinden sich die Neutrophilen im Gewebe, fangen sie Pathogene ein und töten sie über eine Vielzahl von verschiedenen Mechanismen ab. Generell kann man im Neutrophilen drei charakteristische Granula und eine Gruppe sekretorischer Vesikel voneinander abgrenzen. In den primären Granula, die aufgrund des hohen Anteils an MPO („*engl. myeloperoxidase*“) auch als Peroxidase positive oder azurophile Granula bezeichnet werden, befinden sich neben der MPO auch antimikrobielle Stoffe wie Defensine und hydrolytische Enzyme wie Cathepsine. Sekundäre wie tertiäre Granula können über den relativen Anteil der Enzyme Lactoferrin und Gelatinase unterschieden werden, wobei sekundäre Granula eher einen hohen Anteil an Lactoferrin enthalten. Da sich die Proteinzusammensetzung der Granula überschneidet, ist es fraglich, ob eine Unterteilung sinnvoll ist. Dennoch ist bekannt, dass primäre Granula weniger schnell mobilisiert werden wie sekundäre und tertiäre Granula (Borregaard und Cowland 1997).

Wird ein pathogener Keim nun über PAMPs erkannt, wird dieser phagozytiert und somit in das Zytoplasma des Neutrophilen aufgenommen. Dort verschmelzen die Granula mit dem phagozytierten Mikroorganismus und reichern das Phagosom mit einer Vielzahl an antimikrobiellen Stoffen an. Das Enzym NADPH („*engl. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*“) Oxidase, NOX 2 im Neutrophilen bildet

ROS („*engl. reactive oxygen species*“), welches als Superoxid zusätzlich zur Abtötung der phagozytierten Keime führt. MPO kann dabei die Produktion von ROS vielfach verstärken. Nach der Aktivierung von Neutrophilen kommt es zur Degranulation, also der Freisetzung von Granula aus dem Zytosol der Neutrophilen. Die freigesetzten Proteine wie MPO, Defensine, Lactoferrin und hydrolytische Enzyme (Elastase, Matrix-Metalloproteasen, Proteinase-3 und Cathepsine) können einerseits selbst Pathogene töten, oder andere Effektorzellen wie Monozyten anlocken und aktivieren und somit die Immunantwort verstärken (Mayadas et al. 2014).

Ein weiterer Mechanismus zur Abtötung von Keimen ist die Bildung von NETs („*engl. neutrophil extracellular traps*“). Die DNA („*engl. deoxyribonucleic acid*“) der Neutrophilen wird dabei freigesetzt und bildet mit bakteriolytischen Molekülen der Neutrophilen einen Komplex, in dem Pathogene gefangen und abgetötet werden können. Für diesen Vorgang, der auch „NETosis“ genannt wird, werden MPO, Neutrophilen Elastase (NE), GSDMD („*Gasdermin D*“) und PAD4 („*engl. protein arginine deiminase 4*“) benötigt (Chen et al. 2018).

Unter inflammatorischen Bedingungen werden neutrophile Granulozyten am Ende ihres Lebenszyklus größtenteils durch Makrophagen, aber auch durch dendritische Zellen phagozytiert (Soehnlein und Lindbom 2010). Unter nicht-inflammatorischen Bedingungen wandern Neutrophile vor allem in die Leber, in die Milz und in das Knochenmark aus, in denen sie zum Teil abgebaut werden, aber auch im Falle des Knochenmarks noch einmal in die Zirkulation eintreten können (Suratt et al. 2001). Aufgrund dieser Balance zwischen Produktion und Eliminierung findet sich eine relativ konstante Anzahl an Neutrophilen im gesunden Körper.

2.3 Die Leukozyten-Rekrutierungskaskade

Die Rekrutierung von Neutrophilen ist ein streng kontrollierter Vorgang. Einerseits muss eine suffiziente Abwehr gegen körperfremde Eindringlinge gewährleistet werden und andererseits kann eine übermäßige Akkumulation von aktivierten Neutrophilen zu einem weitreichendem Gewebeschaden führen. So lagern sich bei der Erkrankung der Immunkomplexvaskulitis Komplexe aus körpereigenen Antikörpern an den Gefäßwänden ab. Über den Komplementfaktor C3 werden die Komplexe von Neutrophilen erkannt und an das Integrin MAC-1 („*engl. macrophage-1 antigen*“) gebunden, was zur Rekrutierung und Degranulation der Neutrophilen führt. Vor allem die Freisetzung von Proteinasen und Radikalen aus den akkumulierten Neutrophilen resultiert in einer massiven Entzündung und Thrombose der Gefäße. Unbehandelt endet die Immunkomplexvaskulitis in einem multiplen Organversagen des Patienten und stellt somit eine lebensbedrohliche Erkrankung dar (Hirahashi et al. 2006). Folglich ist es wichtig, dass die Rekrutierung von Leukozyten, die im generellen ähnlich für die

verschieden Lymphozytenpopulationen erfolgt, aus vielen einzeln kontrollierten Schritten besteht. Die Rekrutierung erfolgt unter inflammatorischen Bedingungen vor allem im Bereich der postkapillären Venolen. Hier beginnt unter niedriger hämodynamischer Schubspannung der erste Schritt der Kaskade: das Erfassen und Rollen der Leukozyten (Ley et al. 2007).

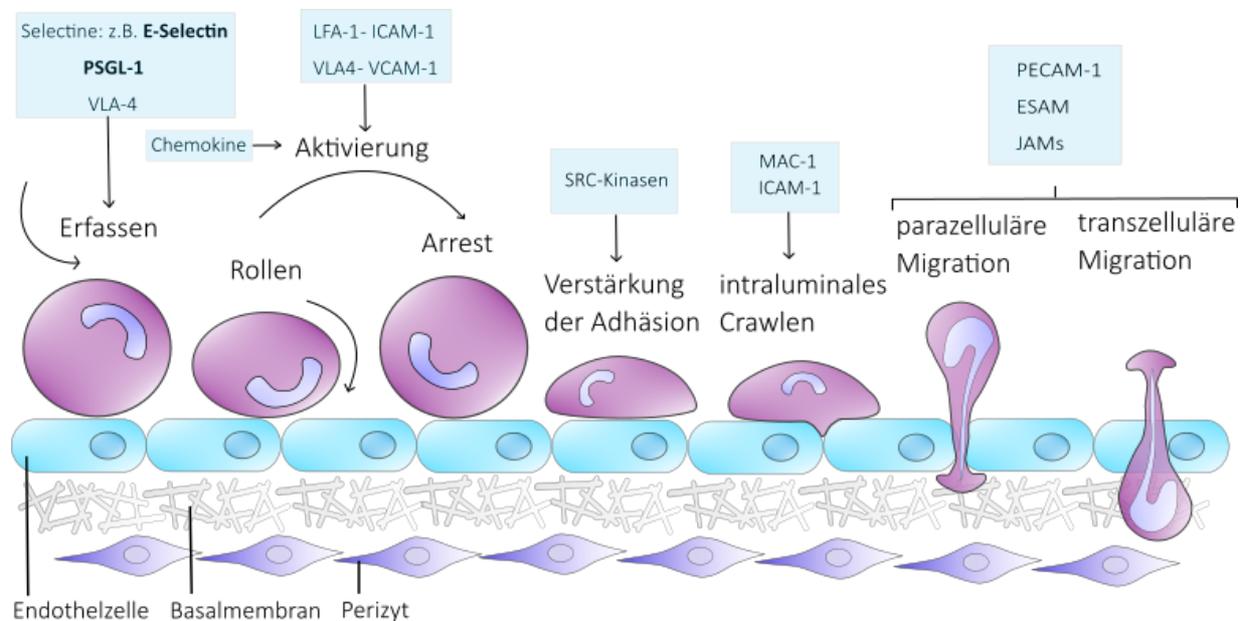


Abbildung 2.1: Die Leukozyten-Rekrutierungskaskade

Dargestellt sind die verschiedenen Schritte der Leukozyten-Rekrutierungskaskade. Der erste Schritt besteht aus einem Selektin-abhängigen Erfassen und Rollen der Immunzelle. Die Aktivierung der Neutrophilen erfolgt durch Chemokine und Selektine die schließlich zu einem Integrin-medierten Arrest der Zelle führen. Nachdem die Adhäsion verstärkt wurde, bewegt sich die Zelle intraluminal („engl. crawling“) und wandert zumeist parazellulär, aber auch transzellulär ins entzündete Gewebe aus. Schlüsselmoleküle der jeweiligen Schritte sind in den Boxen angegeben und im Fließtext erklärt. (Angelehnt an: Ley et al. Nat. Rev. Immunol. (7) 2007. 678–689.)

2.3.1 Erfassen und Rollen

Die ersten beiden Schritte der Leukozyten-Rekrutierungskaskade werden vor allem durch die Interaktion der Selektine und ihrer Liganden mediiert. Es sind drei Selektine bekannt, die alle Transmembranrezeptoren sind: E-Selektin, welches von Endothelzellen exprimiert wird, P-Selektin, welches in Thrombozyten und Endothelzellen vorkommt und L-Selektin, welches von Leukozyten exprimiert wird. E-Selektin wird durch die inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α („engl. tumor necrosis factor- α “) in Endothelzellen hochreguliert. P-Selektin ist in den α -Granula von Thrombozyten und den Weibel-Palade-Körperchen des Endothels gespeichert. L-Selektin ermöglicht es, dass Leukozyten über

hochendotheliale Venolen in sekundär lymphatische Organe auswandern können (Ley et al. 2007). Der wichtigste Selektinligand, P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) kann, falls korrekt glykosyliert, alle drei Selektine binden (Sperandio et al. 2009). Die Bindung der Selektine mit ihren Liganden ermöglicht unter Schubspannung eine adhäsive Bindung niedriger Affinität, die einen Wechsel zwischen Festhalten und Freilassen der Leukozyten erlaubt. Die Schubspannung ist die Kraft, die durch das fließende Blut auf eine bestimmte Fläche des Endothels der Kapillaren wirkt (Einheit: dyn/cm²). L-Selektin und P-Selektin benötigen eine gewisse Schubspannung, um eine Adhäsion der Leukozyten aufrechtzuhalten. Dabei bilden sich non-kovalente Bindungen aus, sogenannte „*catch bonds*“. Wird die Schubspannung erhöht, nimmt die Stärke dieser Bindung zu (Marshall et al. 2003). Die Leukozyten reduzieren durch diese non-kovalente Interaktionen ihre Geschwindigkeit und rollen entlang des entzündeten Endothels.

Die Bindung des Selektins an seinen Liganden aktiviert Signalkaskaden in der Selektin exprimierenden Zelle, sowie in der Liganden exprimierenden Zelle. In myeloischen Zellen wird nach Bindung von PSGL-1 SYK („*engl. spleen tyrosine kinase*“) phosphoryliert (Urzainqui et al. 2002). In Neutrophilen führt eine Bindung von E-Selektin an PSGL-1 zu einer Freisetzung von MRP8/14. Dieses bindet in einer extrazellulären Schleife an TLR-4. Über die TLR-4 abhängige Aktivierung von RAP1 („*engl. ras-related protein 1*“) - GTP („*engl. guanosine triphosphate*“) wird die Konformation des β 2-Integrins LFA-1 („*engl. lymphocyte function-associated antigen 1*“) von einem inaktiven Zustand in einen intermediären Zustand geändert. Dies erlaubt eine transiente Bindung von LFA-1 an seinen Liganden ICAM-1 („*engl. intercellular adhesion molecule 1*“) und zu einer weiteren Reduktion der Rollgeschwindigkeit des Neutrophilen auf dem Endothel (Chesnutt et al. 2006; Pruenster et al. 2015). β 2-Integrine sind transmembrane Oberflächenrezeptoren, die ubiquitär in Leukozyten exprimiert sind. Sie assoziieren sich über eine non-kovalente Bindung zwischen α -Untereinheiten und β -Untereinheiten zu Heterodimeren. Die große Anzahl an verschiedenen α - und β -Untereinheiten trägt zur Diversität der Integrine bei. Eine wichtige Eigenschaft der Integrine ist es, ihre Konformität zu verändern (Luo et al. 2007). Neben β 2-Integrinen wird auf Neutrophilen auch in geringen Maßen das α 4 β 1-Integrin (VLA-4) exprimiert. VLA-4 („*engl. very late antigen-4*“) interagiert mit dem Molekül VCAM-1 („*engl. vascular cell adhesion molecule 1*“) und kann unabhängig von Selektinen zum Rollen von Leukozyten auf dem Endothel mit beitragen (Berlin et al. 1995).

2.3.2 Aktivierung und Arrest

Um eine feste Bindung der Leukozyten an das entzündete Endothel zu ermöglichen, wirken Chemokin- und Integrin-abhängige Prozesse zusammen. Zytokine, die von Immunzellen während einer

Entzündung sezerniert werden, regen die Produktion von Chemokinen und Chemoattraktoren in Endothelzellen und deren Transport an die Oberfläche an. Durch das langsame Rollen der Leukozyten auf der Endothelzelloberfläche ist es möglich, dass Chemokine an die Chemokinrezeptoren der Leukozyten binden können. Auch die Expression und Präsentation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 wird durch Zytokine gefördert (Ley et al. 2007). Chemokine binden mit hoher Affinität an ihre Rezeptoren auf den Leukozyten. Viele dieser Chemokine sind an Glykosaminoglykane der Endothelzelloberfläche gebunden, welche sie vor dem proteolytischen Abbau schützen und die Interaktion mit den GPCR („*engl. G protein-coupled receptors*“) ermöglichen (Johnson et al. 2005).

Integrine, die entscheidend für den Arrest der Leukozyten sind, gehören zur Untergruppe der α 4- und β 2-Integrin Familie. Als Beispiele sind das α 4 β 1-Integrin VLA-4 und die β 2-Integrine LFA-1 und Mac-1 zu nennen, welche zu den best-untersuchtesten Integrinen gehören. Chemokine führen über die Aktivierung ihrer Rezeptoren zu einer intrazellulären Signalkaskade, die in wenigen Millisekunden die Konformität und die Avidität der Integrine ändert. Dies führt zu einem schnellen Arrest der Leukozyten. Die Integrin Aktivierung durch Chemokine wird als „Innen nach Außen Signal“ („*engl. inside-out-signaling*“) bezeichnet. In neutrophilen Granulozyten bindet beispielsweise das Chemokin CXCL1 an den G-Protein gekoppelten Rezeptor CXCR2. Über eine noch nicht vollständig verstandene intrazelluläre Signalkaskade kommt es über eine Konformationsänderung des β 2-Integrins LFA-1 zu einem hoch affinen Zustand (Shamri et al. 2005; Ley et al. 2007).

Aktivierte Integrine können selbst wieder intrazelluläre Signalketten im Leukozyten generieren, was als „Außen nach Innen Signal“ („*engl. outside-in signaling*“) bezeichnet wird und von der Bindung des Integrins an seinen Liganden abhängt. Um die Bindung des Leukozyten am Endothel in der Post-Arrest-Phase zu verstärken, muss die Zelle ihre Form verändern. Vor allem die lokale Konzentration (*engl. „clustering*“) der Integrine an der Zelloberfläche, also die Avidität ist dabei von Bedeutung. So bilden aktivierte Integrin-Cluster Signalosome aus, die über ein „Außen nach Innen Signal“ unter anderem zu einer Veränderung der Zellmobilität führen. Durch das Signalosom werden Proteintyrosinkinasen wie, SYK und Src-Kinasen (*engl. „sarcoma and cellular*“) rekrutiert, die weitere intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren. So führt ein gestörtes „Außen nach Innen Signal“ in Neutrophilen zu einem Adhäsionsdefekt und folglich zu einem beschleunigten Ablösen der Zellen unter Fluss (Manevich-Mendelson et al. 2009; Begandt et al. 2017).

2.3.3 Crawling

Vor dem letzten Schritt der Leukozyten Rekrutierungskaskade, der Transmigration, suchen sich die Leukozyten ihre bevorzugte Stelle auf dem Endothel, um in das Gewebe auszuwandern. Dabei

„crawlen“ die Zellen, zumeist abhängig von der Interaktion zwischen dem β 2-Integrin MAC-1 und ICAM-1 intraluminal entlang des Blutgefäßes (Phillipson et al. 2006).

2.3.4 Transmigration

Leukozyten können entweder parazellulär oder transzellulär in das entzündete Gewebe auswandern, wobei Neutrophile normalerweise größtenteils parazellulär auswandern. Auf dem Weg in das Gewebe muss die Immunzelle in der Regel Barrieren überwinden: die Endothelzelle und die vaskuläre Basalmembran. Unabhängig davon, ob die Migration transzellulär oder parazellulär erfolgt, bilden sich nach Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen Kupplungs-Strukturen (*engl. „docking structures“*) aus. Kupplungs-Strukturen sind Endothelzellbereiche, die reich an ICAM1, VCAM1, ERM (*Ezrin, Radixin und Moesin*) Proteinen und zytoskelettalen Proteinen, wie α -Aktinin und Talin-1 sind. Diese Strukturen unterstützen die Transmigration der Zelle (Ley et al. 2007; Nourshargh und Alon 2014).

Nach Adhäsion des Leukozyten kommt es zu molekularen Veränderungen in der Endothelzelle, die entscheidend für die parazelluläre Migration der Leukozyten sind. Beispielsweise führt eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Ca^{2+} -abhängigen Aktivierung der Myosin-Leichte-Ketten-Kinase und folglich zur Endothelzellkontraktion. Zudem wird die Konzentration an ROS und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase („p38 MAPK“) in der Endothelzelle erhöht. Die daraus resultierende erhöhte Permeabilität der Zellverbindungen der Endothelzellen erleichtert die parazelluläre Migration. Moleküle, die für die Stabilisierung der Zell-Zell Kontakte wichtig sind, werden am Ort der Transmigration destabilisiert und freigesetzt. Als ein Beispiel für solche Moleküle ist VE-Cadherin (*„engl. vascular endothelial cadherin“*) zu nennen. Über die Verschiebung von PECAM-1 (*„engl. platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1“*) und JAM-A (*„engl. junctional adhesion molecule A“*) an die Endothelzelloberfläche wird ein Gradient gebildet, der Leukozyten die parazelluläre Migration erleichtert. Weitere junctionale Moleküle sind aktiv an der parazellulären Migration von Leukozyten beteiligt (Nourshargh und Alon 2014; Muller 2011). In Neutrophilen spielt ESAM (*„engl. endothelial cell-selective adhesion molecule“*) eine entscheidende Rolle. Über die Aktivierung von RHO (*„engl. ras homolog family“*), führt ESAM zur Auflösung von VE-Cadherin Verbindungen, was die Auswanderung erleichtert (Wegmann et al. 2006).

Die transzelluläre Migration von Leukozyten spielt vor allem für Lymphozyten eine wichtige Rolle. Dabei bilden die Lymphozyten zunächst sogenannte Vorsprünge (*„engl. protrusion“*) in die Endothelzelle aus. Die Endothelzelle selbst bildet Kanäle, durch die die Zelle migrieren kann. Die Membran der Endothelzelle wird durch Aktin und Vimentin stabilisiert. In Bereichen, in denen Neutrophile am Endothel adhären, konnte die Bildung von VVO (*„engl. vesiculo-vacuolar organelle“*) beobachtet werden. VVO

sind kleine, Membran-assoziierte Strukturen, die aus einem Cluster aus Vesikeln und Vakuolen bestehen und die Permeabilität der Endothelzelle erhöhen (Carman und Springer 2008).

Nachdem die Endothelzellbarriere überwunden wurde, müssen die Leukozyten zusätzlich die vaskuläre Membran überwinden. Die Basalmembran (BM) der postkapillären Venolen besteht aus einem Netzwerk miteinander verbundener Laminine und Kollagene. Es gibt bestimmte Endothelbereiche, in denen diese, für die Stabilität der BM wichtigen Proteine weniger exprimiert werden. Zusätzlich kolo-kalisieren sie mit Stellen, an denen keine Perizyten vorhanden sind. Diese sogenannten LERs („*engl. low-expression regions*“) weisen beispielsweise weniger Laminin-511 und Typ IV Kollagen auf und eignen sich somit als ideale Passage für transmigrierende Neutrophile. Die Expression der Laminin-bindenden Integrine VLA-3 und VLA-6 auf der Oberfläche der Neutrophilen ist entscheidend für eine Migration durch die Basalmembran. Neutrophile in denen eine MST1-abhängige („*engl. macrophage-stimulating protein*“) Translokation von VLA-3 und VLA-6 zur Zelloberfläche behindert ist, können die vaskuläre Basalmembran nicht durchqueren (Nourshargh und Alon 2014; Kurz et al. 2016).

2.4 MRP8/14

2.4.1 Alarmine

Eine intakte angeborene Immunantwort ist gekoppelt an eine schnelle und ungestörte Erkennung von PAMPs und DAMPs. Durch die Kopplung solch endogener, wie exogener Gefahrenmelder an PRRs werden vermehrt Zytokine und Chemokine von Immunzellen freigesetzt, was zu einer Verstärkung der Immunantwort führt. Neben PAMPs und DAMPs sind als weitere Gefahrenmelder endogene Alarmine zu nennen, welche früher häufig als Synonym für DAMPs verwendet wurden. Nach neueren Erkenntnissen stellen diese aber vielmehr eine Untergruppe der DAMPs dar. So konnte gezeigt werden, dass beispielsweise auch antimikrobielle Proteine wie Defensine zusätzlich ein chemotaktisches und immunaktivierendes Potenzial besitzen. Da alle Alarmine konstitutiv exprimiert sind und rapide freigesetzt werden können, können diese als erste Antwort auf Pathogene das angeborenen wie erworbene Immunsystem aktivieren. Die aktivierten Immunzellen sezernieren selbst wieder Alarmine über spezialisierte Sekretionssysteme oder den Endoplasmatisches Retikulum–Golgi-Sekretionsweg (*engl. „ER-Golgi secretion pathway“*), ohne apoptotisch zu werden. Auch die Rekrutierung von Leukozyten wird von Alarminen beeinflusst. Unterschiedliche Alarmine wirken chemotaktisch auf die verschiedenen Untergruppen der Leukozyten und wirken indirekt positiv auf die Rekrutierung über die Steigerung der Produktion von CXCL Chemokinen in Leukozyten (Bianchi 2007; Yang und Oppenheim 2004; Lillard et al. 1999; Pruenster et al. 2016).

2.4.2 Nomenklatur und Struktur von MRP8/14

Als endogene Alarmine spielen zwei Mitglieder der S100 Familie, das Myeloid Verwandte Protein 8 („*engl. myeloid-related protein 8*“, *MRP8*, auch unter dem Namen *S100A8* und *Calgranulin A* bekannt) und das Myeloid Verwandte Proteine 14 („*engl. myeloid-related protein 14*“, *MRP14*, auch unter dem Namen *S100A9* und *Calgranulin B* bekannt) eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Immunantwort und der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase. S100 Proteine wurden ursprünglich aus dem Rinderhirn isoliert und haben aufgrund ihrer 100%igen Löslichkeit in Ammoniumsulfat ihren Namen erhalten (Moore 1965). Ähnlich wie alle Proteine der S100 Familie, besitzen MRP8 und MRP14 zwei Ca^{2+} -bindende Strukturen des EF-Hand-Typs, die über ein zentrales Gelenk verbunden sind. Zusätzlich können MRP8 und MRP14 Zn^{2+} -Ionen über ein HEXXH Motiv binden. Die Bindung der Ionen Ca^{2+} und Zn^{2+} beeinflusst die Stabilität und Konformität der Proteine und erlaubt es ihnen Bindungen miteinander selbst und mit anderen Proteinen einzugehen. Die Zink Bindekapazität führt zu einem zusätzlichen antimikrobiellen Effekt, da Zink für das Wachstum von Bakterien wichtig ist (Sohnle et al. 2000; Ravasi et al. 2004). MRP8 und MRP14 formen einen heterodimeren, non-kovalenten Komplex MRP8/14 (auch unter dem Namen *S100A8/A9* oder *Calprotectin* bekannt). Neben der physiologisch relevantesten, heterodimeren Form können MRP8 und MRP14 auch Homodimere und Tetramere formen. Auch diese beiden Formen erfüllen wichtige Funktionen in Leukozyten. Das Heterotetramer $(\text{MRP8/14})_2$ wird über eine non-kovalente Bindung unter dem Einfluss von Ca^{2+} -Ionen gebildet. Aufgrund der extrazellulär höheren Ca^{2+} -Konzentration findet die Tetramer Bildung vor allem nach Sekretion des Heterodimers MRP8/14 statt. Über die extrazelluläre Funktion des Tetramers konnten in den letzten Jahren einige neue Erkenntnisse gewonnen werden (Strupat et al. 2000; Korndörfer et al. 2007; Vogl et al. 2018).

2.4.3 Intrazelluläre und extrazelluläre Funktionen von MRP8/14

MRP8/14 wird vor allem in Zellen myeloischen Ursprungs exprimiert. In neutrophilen Granulozyten macht es anteilig bis zu 40 % und in Monozyten bis zu 5% der zytosolischen Proteine aus, was auf eine wichtige Rolle von MRP8/14 für die Funktion dieser Zellen schließen lässt (Edgeworth et al. 1991). MRP8/14 reguliert verschiedene intrazelluläre Funktionen, indem es Proteine des Zytoskeletts, wie Keratin-Filamente, Aktinfilamente und Mikrotubuli bindet (Vogl et al. 2004).

MRP8/14 wird unter inflammatorischen Bedingungen von myeloischen Zellen sezerniert. Beispielsweise führt die Interaktion von Monozyten und neutrophiler Granulozyten mit dem entzündeten Endothel zur Freisetzung von MRP8/14 (Frosch et al. 2000). MRP8 und MRP14 fehlen Signalstrukturen, um über den klassischen ER-Golgi-Transportweg aus der Zelle freigesetzt zu werden. Vielmehr ist von einer alternativen, nicht-klassischen Freisetzung, die entweder passiv oder aktiv erfolgt, auszugehen

(Rammes et al. 1997). Extrazelluläres MRP8/14 wirkt pro-inflammatorisch auf Endothelzellen und Phagozyten. So bindet es beispielsweise an spezifische Strukturen der Endothelzellen, wie N-Glykane und Heparansulfat-Proteoglykane, was zu einer Erhöhung der Permeabilität der Gefäße und einer gesteigerten Produktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in den Endothelzellen führt (Viemann et al. 2005). In humanen neutrophilen Granulozyten konnte unter anderem gezeigt werden, dass Stimulation mit extrazellulärem MRP14 zu einer Aktivierung des β 2-Integrins MAC-1 führt und dies die Adhäsion der Neutrophilen an Fibrinogen begünstigt (Newton und Hogg 1998). In einer weiteren Studie von Pruenster et al. konnten gezeigt werden, dass die Interaktion von PSGL-1 mit E-Selektin die rapide Freisetzung von MRP8/14 triggert. Das freigesetzte MRP8/14 bindet dann, in autokriner Weise an TLR4 des Neutrophilen und führt über eine Aktivierung von Rap-1 zur Aktivierung von β 2-Integrinen. Somit kann MRP8/14 Integrin-abhängige Schritte der Leukozyten-Rekrutierung steuern (Pruenster et al. 2015). Wie bereits erwähnt wird MRP8/14 unter dem Einfluss hoher extrazellulärer Ca^{2+} Spiegel zum Heterotetramer $(\text{MRP8/14})_2$ umgesetzt. Dies führt zu einem auto-inhibitorischen Effekt: so kann der, für die inflammatorische Wirkung des Heterodimers so wichtige Rezeptor TLR4/MD2 durch $(\text{MRP8/14})_2$ nicht gebunden werden. Das Heterotetramer zeigt somit keine pro-inflammatorische Wirkung und verhindert dadurch eine unkontrollierte, überschießende Immunantwort durch die Freisetzung von MRP8/14 (Vogl et al. 2018).

2.4.4 Klinische Bedeutung von MRP8/14

Erhöhte MRP8/14 Serumspiegel sind mit vielen verschiedenen, akuten, wie chronischen Erkrankungen assoziiert. Im Formenkreis der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), zu denen Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn gehören, spielt der Nachweis von MRP8/14 im Serum und Stuhl eine wichtige Rolle. Die CED sind gekennzeichnet durch eine chronische Entzündung der Darmschleimhaut, die zu einer massiven Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Monozyten führt. Die aktivierten Immunzellen sezernieren unter anderem MRP8/14, welches im Blut und im Stuhl zu finden ist. Diese Konstellation erlaubt, in Zusammenschau mit klinischen Symptomen und weiterer apparativer Diagnostik eine Diagnose der CED. Zusätzlich lässt sich die Aktivität der Erkrankung und das Ansprechen auf eine Therapie durch eine Überwachung der fäkalen MRP8/14 Spiegel beurteilen (Pathirana et al. 2018). Als weiteres Beispiel für die klinische Bedeutung des MRP8/14 ist die Klasse der rheumatischen Erkrankungen, zu denen unter anderem die rheumatoide Arthritis, die idiopathische juvenile Arthritis und der systemische Lupus erythematoses gehört, zu nennen. Auch hier ist der Serummarker MRP8/14 ein mögliches Werkzeug zur Diagnose, Verlaufskontrolle und Therapiesteuerung der Erkrankung (Kopeć-Mędrek et al. 2016).

Eine weitere Rolle spielen MRP8 und MRP14 in der Tumorbilogie. Erhöhte Spiegel lassen sich in Magen-, Kolon-, Pankreas-, Blasen-, Ovarial-, Schilddrüsen-, Brust-, Haut- und Prostatakrebs finden (Salama et al. 2008). MRP8 und MRP14 haben einen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Tumorprogression. In kleinen Konzentrationen beschleunigen sie, vermittelt durch den MRP8/14 Rezeptor RAGE („*engl. receptor for advanced glycation endproducts*“) das Wachstum und die Migration von Tumorzellen. In höherer Konzentration kann MRP8/14 pro-apoptotische Effekte auf Tumorzellen haben, die durch die gesteigerte Produktion von ROS vermittelt wird (Ghavami et al. 2008).

2.5 Das Inflammasom

Das Inflammasom definiert sich, als Teil der angeborenen Immunantwort, als ein hochmolekularer Komplex, der im Zytosol von Immunzellen vorkommt und die Aktivierung inflammatorischer Caspasen mediiert. Als Folge der Caspase Aktivierung werden Zytokine der Interleukin-1 Familie generiert und freigesetzt. Es gibt eine Vielzahl verschiedener Inflammasome, deren Formierung über die Erkennung einer großen Varietät an spezifischen Molekülen kontrolliert wird (Martinon et al. 2002). Obwohl die Erkennung von Pathogenen durch das Inflammasom unabdingbar für eine intakte Immunantwort ist, ist eine fehlregulierte Aktivierung des Inflammasoms mit der Entstehung von Tumor-, Autoimmun-, neurodegenerativen und metabolischen Erkrankungen assoziiert (Guo et al. 2015; Lee et al. 2019).

2.5.1 Rezeptoren des Inflammasoms und Aktivatoren des NLRP3 Inflammasoms

Es sind bisher fünf Rezeptoren bekannt, die zur Formierung des Inflammasom Komplexes führen und deren Liganden und Aktivierungsmechanismen gut beschrieben sind. Dazu gehört die Familie der NLRs („*engl. nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors*“), zu der NLRP1 („*engl. NLR family pyrin domain containing 1*“), NLRP3 und NLRC4 („*engl. NLR family CARD domain-containing protein 4*“) zählen. Im Weiteren werden auch die Proteine AIM2 („*engl. absent in melanoma 2*“) und Pyrin dazu gezählt. Neben diesen sogenannten kanonischen Inflammasomen gibt es auch das nicht kanonische Inflammasom, welches über die Erkennung von intrazellulärem LPS zur Aktivierung der Caspase-11 in Mäusen und Caspase-4 und 5 in Menschen führt (Broz und Dixit 2016). Im Folgenden wird besonders auf das NLRP3 Inflammasom eingegangen, da vor allem NLRP3 in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde.

Das NLRP3 Inflammasom, auch unter den Namen Cryopyrin bekannt, kann eine Vielzahl von Stimuli erkennen. Es wird unter anderem durch bakterielle, virale und fungale Pathogene, porenformende Toxine und DAMPs wie ATP („*engl. adenosine-triphosphate*“) aktiviert (Broz und Dixit 2016). Diese vielen Stimuli führen über verschiedene Mechanismen zur NLRP3 Inflammasom Komplex Bildung. Um die

Inflammasom Aktivität eng zu kontrollieren, ist in den meisten Fällen von einem Zwei-Stufen-Prozess der NLRP3 Aktivierung auszugehen. Dabei wird im ersten Schritt, dem sogenannten „Priming“ zunächst NLRP3, Caspase-1 und das pro-IL-1 β auf transkriptioneller Ebene hochreguliert. Durch die Interaktion von PAMPs oder DAMPs mit TLRs wie TLR4 oder durch Zytokine wie TNF- α wird zunächst NF- κ B aktiviert. Dieser nukleäre Transkriptionsfaktor führt zu einer Hochregulierung Inflammasom-spezifischer Gene und somit zur vermehrten Translation dieser (Bauernfeind et al. 2009; Franchi et al. 2009). In einem zweiten Schritt wird nun das NLRP3 Inflammasom durch verschiedene Stimuli vollständig aktiviert und kann sich als Komplex formieren. Die Fähigkeit, eine derart große Anzahl an verschiedenen Pathogenen und endogenen Gefahrenmeldern zu erkennen, lässt sich damit erklären, dass alle Stimuli zu einem zellulären Stress führen, der durch das NLRP3 Inflammasom detektiert wird. Wie genau das NLRP3 Inflammasom Zellstress erkennt, ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht vollständig geklärt (Broz und Dixit 2016). Obwohl es keinen eindeutigen Konsens über die vorgelagerten („*engl. upstream*“) Signale zur NLRP3 Aktivierung gibt, konnten einige von ihnen in mehreren Studien belegt werden und sollen kurz vorgestellt werden.

Für die vollständige NLRP3 Aktivierung ist, bis auf wenige Ausnahmen der Efflux von K⁺ Ionen notwendig. So vermitteln beispielsweise Nigericin, welches als K⁺/H⁺-Ionophor die intrazelluläre Konzentration von K⁺ verringert, sowie der ATP abhängige P2X₇ Rezeptor eine K⁺ abhängige NLRP3 Aktivierung (Di et al. 2018; Perregaux und Gabel 1994). Wird der Efflux von K⁺ durch eine erhöhte extrazelluläre K⁺-Konzentration verhindert, kann das NLRP3 Inflammasom nicht aktiviert werden. Alleine eine verminderte K⁺-Konzentration in der Zelle ist ein ausreichend starker Stimulus, um das NLRP3 Inflammasom zu aktivieren (Muñoz-Planillo et al. 2013; Pétrilli et al. 2007).

Ein weiteres wichtiges vorgelagertes Signal, welches zur NLRP3 Inflammasom Aktivierung führt, wird für den Einstrom von Ca²⁺ Ionen diskutiert. Die intrazelluläre Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration kann entweder durch die Öffnung spezifischer Plasmamembrankanäle oder durch die Freisetzung von intrazellulären Ca²⁺ Speichern, beispielsweise aus dem ER erreicht werden. Der Ausstrom von K⁺-Ionen erleichtert dabei die Mobilisierung von Ca²⁺-Ionen nach intrazellulär durch Stabilisierung des Membranpotentials (Murakami et al. 2012; Lee et al. 2012). Die Bedeutung des Ca²⁺-Influx wird jedoch kontrovers diskutiert. So zeigten Katsnelson und Kollegen, dass der Ca²⁺-Influx erst nach der NLRP3 Aktivierung erfolgt, also nicht entscheidend für dessen Komplexbildung ist (Katsnelson et al. 2015).

Die Phagozytose körpereigener Stoffe, wie Harnsäure und Cholesterinkristalle oder fremder Stoffe, wie Aluminium und Asbest führt zu einer Destabilisierung des Lysosoms und zu einer Freisetzung lysosomaler Bestandteile, wie Cathepsin B nach intrazellulär. Dieser Verlust der lysosomalen Integrität aktiviert NLRP3 direkt oder kann indirekt, über den Einstrom von Ca²⁺-Ionen und den Ausstrom von K⁺-

Ionen, NLRP3 aktivieren (Hornung et al. 2008; Katsnelson et al. 2016). Es gibt viele weitere Stimuli, die in der Literatur als NLRP3 Aktivatoren kontrovers diskutiert werden. Dazu zählen eine Dysfunktion des Mitochondriums, der Influx von Chlorid Ionen und metabolische Veränderungen (Kelley et al. 2019). Wichtig zu erwähnen ist, dass NLRP3 nicht nur durch den klassischen Zwei-Stufen-Prozess aktiviert werden kann. In einer sehr schnellen, einschrittigen Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms ist keine transkriptionelle Hochregulierung und Neusynthese von Proteinen notwendig (Lin et al. 2014). Des Weiteren kann NLRP3 auch durch das nicht-kanonische Inflammasom aktiviert werden. Die Aktivierung der Caspase-11 führt über die Bildung von GSDMD Poren zu einem Ausstrom von K^+ -Ionen. Der Efflux von K^+ kann wiederum das NLRP3 Inflammasom aktivieren (Rühl und Broz 2015).

2.5.2 Aufbau und Struktur des NLRP3 Inflammasoms

Das NLRP3 Inflammasom besteht aus einem Sensor Protein, dem NLRP3, einem Adapter Protein, das ASC („*engl. apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain*“) und einem Effektor Protein, der Caspase-1. Das Sensor Protein ist ein dreigliedriges Protein, welches aus einer Amino-terminalen Pyrin Domäne (PYD), einer zentralen NACHT Domäne und einer Carboxy-terminalen LRR („*engl. Leucin-rich repeat*“) Domäne besteht. Die jeweils unterschiedlichen Domänen erfüllen dabei wichtige Funktionen. Die NACHT Domäne besitzt eine ATPase Funktion, die LRR Domäne weist regulatorische Funktionen auf und über die zuvor phosphorylierte PYD Domäne wird das Adapter Protein gebunden (Broz und Dixit 2016). Die Aktivierung führt zu einer Oligomerisierung der NLRP3 Proteine, welche über Bindungen zwischen ihren NACHT Domänen erfolgt. Das oligomerisierte NLRP3 rekrutiert multiple ASC Moleküle, welche sich in einem Punkt vereinigen und als ASC Specks bezeichnet werden. Über CARD-CARD („*engl. caspase activation and recruitment domains*“) Interaktionen rekrutiert das ASC das Effektorprotein Caspase-1 und induziert daraufhin ihre Selbstspaltung und Aktivierung. Das aktive Fragment der Caspase-1 ist aus zwei p20 und zwei p10 Untereinheiten aufgebaut und über die CARD Domäne an das ASC gebunden. Nachdem die proteolytische Tätigkeit beendet ist, wird

das p20/p10 Heterotetramer freigesetzt und verliert, da es frei im Zytosol instabil ist seine Aktivität (Boucher et al. 2018).

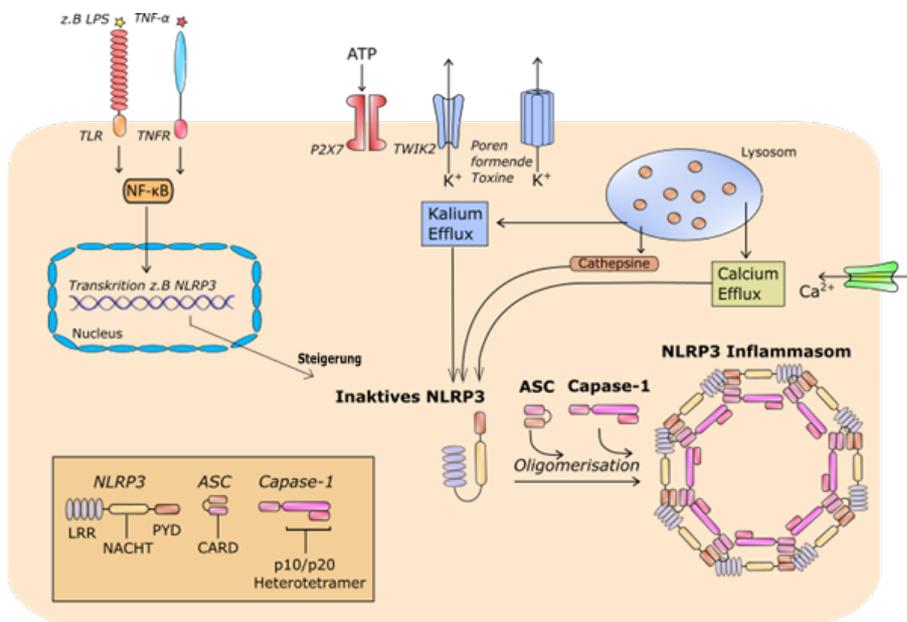


Abbildung 2.2: Aufbau und Aktivierungsmechanismen des NLRP3 Inflammasoms

Als Signal 1 fungieren proinflammatorische Moleküle wie LPS oder TNF- α und führen zu einer transkriptionellen Hochregulierung der NLRP3 Inflammasom Bestandteile. Durch ein zweites Signal kommt es zur Oligomerisierung des NLRP3 mit ASC und Caspase-1, es bildet sich der NLRP3 Inflammasom Komplex. Als wichtigste Aktivatoren sind der Efflux von K^+ , ausgelöst durch Poren formende Toxine oder die Aktivierung des P2X7 Kanals, der Influx von Ca^{2+} und die Freisetzung von Cathepsinen aus dem Lysosom zu nennen. Die Freisetzung von Cathepsinen kann selbst zum K^+ -Efflux und Ca^{2+} -Influx führen. Das NLRP3 besteht aus einer LRR, einer NACHT und einer PYD Domäne. Das ASC bindet über seine CARD Domäne an die Caspase-1, welches nach Aktivierung sein aktives p10/p20 Heterotetramer abspaltet. (Angelehnt an: Swanson et al, Nat Rev Immunol 19 2019, 477–489.)

2.5.3 Effektorfunktionen des NLRP3 Inflammasoms und seine klinische Bedeutung

Die aktivierte Caspase-1 fungiert als Protease und kann mehrere verschiedene Proteine spalten und aktivieren. So schneidet es die pro-inflammatorischen Zytokine pro-IL-1 β und pro-IL-18 und führt sie in Ihre aktive Form über (Sansonetti et al. 2000). Die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms kann, neben der Produktion dieser Zytokine auch zur Pyroptose führen. Das Wort Pyroptose leitet sich aus dem Griechischen ab und setzt sich aus den Wörtern „pyro“, wörtlich übersetzt *Feuer*, welches sich auf das, durch die Inflammation ausgelöste Fieber bezieht und „ptosis“, wörtlich übersetzt *fallen* zusammensetzt. Die Pyroptose ist ein programmierter, lytischer Zelltod. Dabei unterscheidet sich die Pyroptose morphologisch und mechanisch von anderen Formen des Zelltods, wie der Apoptose und der Nekrose.

Durch die Pyroptose kommt es zu einer massiven Freisetzung der prozessierten Zytokine IL-1 β und IL-18 aus der Immunzelle (Bergsbaken et al. 2009). Lange Zeit war unklar, welche zellulären Signalwege zur Pyroptose führen und wie genau es zur Freisetzung der Zytokine kommt. Zwei Studien im Jahre 2015 konnten GSDMD als Mediator der Pyroptose identifizieren (He et al. 2015; Shi et al. 2015). GSDMD wird durch die aktive Caspase-1 geschnitten und in ein 30 kDa großes, amino-terminales Fragment (GSDMD^{Nterm}) und in ein 20 kDa großes, carboxy-terminales Fragment (GSDMD^{Cterm}) gespalten. Nach seiner Aktivierung kommt es zu einer Translokation des GSDMD^{Nterm} zur Zellmembran. Dort bindet es Phosphatidylinositolphosphate und Phosphatidylserine an der inneren Zellmembran, oligomerisiert mit weiteren GSDMD^{Nterm} und bildet eine 10-14 nm große Pore. Durch diese Poren werden Zytokine und andere kleine Moleküle freigesetzt und die Immunzelle wird pyroptotisch. Dennoch muss der Einbau von GSDMD^{Nterm} in die Zellmembran nicht zwangsläufig zur Pyroptose führen. Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine NLRP3 Inflammasom abhängige IL-1 β Freisetzung ohne Pyroptose möglich ist und die Zelle den Einbau der Poren überleben kann (Evavold et al. 2018; Rühl et al. 2018).

Kommt es zu einer ungesteuerten Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms können diese Effektorfunktionen zu chronischen Erkrankungen führen. Vor allem die ungebremste Freisetzung der Zytokine IL-1 β und IL-18 führt zu einer konstanten Aktivierung von Immunzellen und begünstigt ein chronisch entzündliches Milieu. Die chronische Entzündung fördert unter anderem das Auftreten von metabolischen Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ 2, Atherosklerose, Gicht und Fettleibigkeit. So spielt IL-18 sehr wahrscheinlich eine wichtige Rolle in der Krankheitsentstehung und Progression der Atherosklerose. Erhöhte IL-18 Level können zur Entzündung der Gefäße führen und die Instabilität der Plaques verstärken. Zudem aktivieren phagozytierte Cholesterinkristalle das NLRP3 Inflammasom und führen wiederum zur erhöhten Freisetzung von IL-18 und IL-1 β . Auch für IL-1 β konnte gezeigt werden, dass es die Ruptur von Atheroskleroseplaques begünstigt. Wird IL-1 β durch Antikörper blockiert kann die Entstehung von Plaques in Mausmodellen verhindert werden (Guo et al. 2015).

Auch für die Entstehung von Krebs und Metastasen spielt das NLRP3 Inflammasom eine wichtige Rolle. So sezernieren Melanomzellen, NLRP3-abhängig konstitutiv IL-1 β , wodurch die Rekrutierung von Makrophagen und die Angiogenese im Tumorgewebe verstärkt wird. Wird das NLRP3 Inflammasom pharmakologisch inhibiert, kann die Metastasierungsrate in Melanomzellen gesenkt werden. Auch in Brustkrebszellen begünstigt IL-1 β das Wachstum und die Metastasierung der Tumorzellen und führt zu einer inflammatorischen Tumorumgebung (Lee et al. 2019). Dennoch kann NLRP3 auch eine protektive Rolle in der Tumorentstehung haben. Für das Colitis ulcerosa assoziierte Kolonkarzinom konnte gezeigt werden, dass NLRP3 und seine Komponenten Caspase-1 und ASC die Tumorgenese verhindern können (Allen et al. 2010).

3. Aufgabenstellung

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es herauszufinden, wie MRP8/14 aus neutrophilen Granulozyten sezerniert wird. Vor dieser Studie war bekannt, dass MRP8/14 in einem nicht-klassischen Sekretionsweg durch Interaktion zwischen PSGL-1 und E-Selektin auf dem entzündeten Endothel freigesetzt wird. Der genaue molekulare Signalweg unterhalb der PSGL-1 Aktivierung ist komplett unbekannt. Da MRP8/14 ein klinisch bedeutsamer Marker ist und erhöhte Serumspiegel in vielen inflammatorischen Erkrankungen zu finden sind, ist es wichtig zu wissen, welche Signalketten zu dessen Freisetzung führen.

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass für die Sekretion von IL-1 β im Neutrophilen Granulozyten das NLRP3 Inflammasom aktiviert werden muss. Die Freisetzung der reifen Form des IL-1 β , dessen Größe mit 17 kDa vergleichbar mit der Größe des MRP8/14 Komplexes ist, wird durch die Bildung von GSDMD Poren in der Plasmamembran ermöglicht.

Daher stellten wir die Hypothese auf, dass in neutrophile Granulozyten, die in entzündeten Mikrogefäßen rollen das NLRP3 Inflammasom aktiviert wird und MRP8/14 durch die eingebauten GSDMD Poren freigesetzt wird. Aus dieser Hypothese ergaben sich folgende Aufgabenstellungen:

- 1) Überprüfung ob die Effektorproteine des NLRP3 Inflammasoms, Caspase-1 und GSDMD wichtig für die Freisetzung von MRP8/14 sind
- 2) Aufschlüsselung des Signalwegs unterhalb der Aktivierung des PSGL-1 Rezeptors
- 3) Ermittlung der funktionellen Bedeutung des NLRP3 Inflammasoms und seiner Effektorproteine für die Leukozyten Rekrutierungskaskade *in vitro*

4. Material und Methoden

4.1 Material

Standartmäßig verwendete Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, etc. werden in diesem Kapitel nicht extra aufgeführt.

4.1.1 Isolation, Stimulation und Inhibition von Zellen

Tabelle 4.1: Materialien zur Isolation und Kultur von Zellen

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
<i>PBS</i>		Invitrogen®
<i>Stimulationsmedium</i>	100 ml Hank's Buffer Salt Solution 238 mg HEPES pH 7,4 einstellen	Sigma®
<i>Polymorphprep</i> ®		AXIS-SHIELD® / Progen®
<i>Lymphoprep</i> ®		AXIS-SHIELD® / Progen®
<i>EasySep™ Human Neutrophil Isolation Kit</i>		STEMCELL- Technologies®
<i>EasySep™ Human Monocyte Isolation Kit</i>		STEMCELL- Technologies®
<i>EasySep™ Mouse Neutrophil Isolation Kit</i>		STEMCELL- Technologies®
<i>Percoll Density gradient 1.1</i>	Wasser Percoll NaCl 1,5 M	
<i>Percoll Density gradient 0.8</i>	Wasser Percoll NaCl 1,5 M	
<i>Recommended Medium für EasySep™</i>	PBS 2 % fetal bovine serum (FBS) 1 mM EDTA	
<i>EDTA</i>	186,1 g EDTA 800 ml Wasser 20g NaOH pH 8.0 einstellen auf 1 l Wasser auffüllen	
<i>Heparin, Sodium Salt, Porcine Intestinal Mucosa</i>		Sigma®
<i>Wachstumsmedium</i>	500 ml RPMI 1640 mit Natriumbicarbonat 20 % FCS 30 % Zellüberstand von WEHI	Sigma® Sigma®

DMSO		Sigma®
Neubauer Zählkammer		

Tabelle 4.2: Substanzen zur Stimulation und Inhibition von Zellen

Substanz	Stock Solution	Working Solution	Hersteller
<i>Recombinant Human E-Selectin /CD62E ohne FC</i>	1 mg/ml	1 µg/ml	R&D Systems®
<i>LPS from E.coli Ultrapure</i>	1 mg/ml	10 µg/ml	InvivoGen®
<i>Paquinimod</i>		10 µg/ml	Active Biotech Research AB®
<i>TLR4 Inhibitor, TAK-242</i>	100 mg/ml	1 µg/ml	NovImmune SA®
<i>MCC950</i>	8.1 mg/ml (20 mM)	1 µM	InvivoGen®
<i>Recombinant Mouse E-Selectin/ CD62E Fc Chimera</i>	1 mg/mL	20 µg/ml	R&D Systems®
<i>Recombinant Mouse ICAM-1 /CD54 Fc Chimera</i>	1 µg/ml	15 µg/ml	R&D Systems®

4.1.2 Western Blot

Tabelle 4.3: Medien für Western Blot

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
<i>Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8)</i>	181.5 Tris-Base Ad 1l Aqua bidest. pH 8.8 (37% HCl) einstellen	Merck®
<i>Tris-HCl (1.0 M, pH 6.8)</i>	121.13g Tris-Base Ad 1l Aqua bidest. pH 6.8 (37% HCl) einstellen	Merck®
<i>SDS (10 %)</i>	10 g Sodium dodecyl sulfat Ad 100 ml Aqua bidest.	Sigma®
<i>RIPA-Buffer modified (pH 7.3)</i>	7.5 ml NaCl 8.3 ml Tris HCl 2.5 ml Triton X100 12.5ml SDS 1 ml EDTA Ad 250 ml Aqua bidest. Ad Phosphatase/Protease Inhibitor Cocktail (1/100) pH 7.3 einstellen	Sigma® AppliChem® CellSignaling®

Material und Methoden

<i>Laemmli Puffer (4 Fach)</i>	12.5 ml Tris-HCl (1.0 M, pH 6.8) 20 ml Glycerol (98%) 40 ml SDS (10%) 10 mg Bromphenolblau (0.02 %) 1.7 ml β -Mercaptoethanol	Merck® Roth® Sigma® Sigma®
<i>Laufpuffer</i>	3.03 g Tris-Base 14.4 g Glycin 1 g SDS ad 1 l Aqua bidest.	Merck® Sigma® Invivogen®
<i>Blottpuffer</i>	3.0275 g Tris-Base 14,41 g Glycin 25 ml Methanol ad 1 l Aqua bidest.	Merck® Sigma® Riedel-de Haen®
<i>Waschpuffer (TBS-T)</i>	100 ml TBS (10 Fach) 1 ml Tween-20 ad 900 ml Aqua bidest.	Merck®
<i>TBS (10 Fach) (pH 7.4)</i>	88.0 g NaCl 2.0 g KCl 30.0 g Tris-Base ad 1 l Aqua bidest.	Sigma® Sigma® Merck®
<i>Blockpuffer</i>	50 % Odyssey® Blocking Buffer 50 % TBS (1 Fach)	LI-COR®
<i>Sammelgel</i>	0.63 ml Tris-HCl (1 M, pH 6.8) 0.83 ml Acrylamid mix (30 %) 50 μ l SDS (10 %) 5 μ l TEMED 50 μ l Ammoniumpersulfat (10 %) 3.4 Aqua bidest.	Merck® AppliChem® Sigma® AppliChem® AppliChem®
<i>Trenngel 10%ig</i>	2.5 ml Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8) 100 μ l SDS (10 % w/v) 3.3 ml Acrylamid mix (30 %) 4 μ l TEMED 100 μ l Ammoniumpersulfat (10 %) 4.0 ml Aqua bidest.	Merck® AppliChem® Sigma® AppliChem® AppliChem®
<i>Trenngel 12%ig</i>	2.5 ml Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8) 100 μ l SDS (10 %) 4.0 ml Acrylamid mix (30 %) 4 μ l TEMED 100 μ l Ammoniumpersulfat (10 %) 3.3 ml Aqua bidest.	Merck® AppliChem® Sigma® AppliChem® AppliChem®
<i>Trenngel 15%ig</i>	2.5 ml Tris-HCl (1.5 M, pH 8.8) 100 μ l SDS (10 %) 5.0 ml Acrylamid mix (30 %) 4 μ l TEMED 100 μ l Ammoniumpersulfat (10 %) 2.3 ml Aqua bidest.	Merck® AppliChem® Sigma® AppliChem® AppliChem®
<i>Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder</i>		LI-COR®
<i>Methanol</i>		Riedel-de Haen®
<i>Chloroform</i>		Riedel-de Haen®

Tabelle 4.4: Primäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Klon	Hersteller
<i>MRP8 (S100A8)</i>	Maus	1.5 µg/ml	Polyklonal	Prof. T. Vogl
<i>MRP14 (S100A9)</i>	Maus	1.5 µg/ml	Polyklonal	Prof. T. Vogl
<i>Caspase-1</i>	Ratte	1 µl/ml	Polyklonal	Cell Signaling®
<i>GSDMD</i>	Ratte	0.5 µl /ml	Polyklonal	Cell Signaling®
<i>GAPDH</i>	Maus	0.1 µl/ml	Polyklonal	SantaCruz®

Tabelle 4.5: Sekundäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Konjugat	Hersteller
<i>Anti-Ratte-IgG-Antikörper</i>	IRDye800CW	LI-COR®
<i>Anti-Maus-IgG-Antikörper</i>	IRDye680RD	LI-COR®

Tabelle 4.6: Materialien für Western Blot

Material	Hersteller
<i>Whatman® Filter Papier</i>	Whatman International Ltd.®
<i>PVDF Membrane</i>	Amersham®
<i>Tetra Electrophoresis Module</i>	Bio-Rad®
<i>Mini-PROTEAN® Tetra cell tank</i>	Bio-Rad®
<i>Near-Infrared Western Blot Detection</i>	Odyssey®
<i>Mini-PROTEAN® Tetra cell</i>	Bio-Rad®
<i>Sonifikator</i>	Fisher Scientific®

4.1.3 Flusskammern

Tabelle 4.7: Medien für Flusskammern

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
<i>5% Casein</i>	40 ml PBS 2g Casein	Sigma®

Material und Methoden

	Bei Full Speed 10 Minuten abzentrifugieren und den Überstand verwenden	
PBS/BSA		

Tabelle 4.8: Materialien für Flusskammer

Materialien	Hersteller
IBIDI® 0.5 µm Slide VI ^{0.1}	IBIDI®
PHD ULTRA™ Syringe Pump	Harvard Apparatus®
Omnifix® Einmal-Insulinspritze	Braun®
Inverses Fluoreszenz Mikroskop Leica DMI8	Leica®
HC PL FL L 20 Fach/0.40 CORR PH1 Objektiv	Leica®
Spectra X F Lichtquelle	Lumencor®
Leica DFC364FX mit Sony IXC285 interlin CCD chip	Leica®

4.1.4 *In vitro* und *in vivo* Freisetzungssassay

Tabelle 4.9: Substanzen für den Freisetzungssassay

Substanz	Stock Solution	Working Solution	Hersteller
Recombinant murin TNF-α	100 µg/ml	500 ng/mouse	R&D Systems®
Recombinant Mouse E-Selectin/ CD62E Fc Chimera	1 mg/mL	10 µg/ml	R&D Systems®
ketamine/xylazine		125mg/12.5mg per kg body weight	

Tabelle 4.10: Medien für den Freisetzungssassay

Medium	Zusammensetzung	Hersteller
Casein 5%		Sigma®
HBSS Puffer	„Hank’s buffered salt solution“ 1mM CaCl ₂ 1mM MgCl ₂ 10mM Hepes	

	0.25% BSA 0.1% Glucose auf pH7.4 einstellen	
--	---	--

Tabelle 4.11: Materialien für den Freisetzung Assay

Materialien	Hersteller
<i>Microtainer SST Tubes columns</i>	Becton & Dickinson®

4.2 Methoden

4.2.1 Aufreinigung und Stimulation humaner PMN, humaner PBMC und humaner Monozyten

Für die Isolation humaner PMN („*engl. polymorphonuclear leukocytes*“) wurde gesunden Probanden im Alter von 20 bis 35 Jahren bis zu 50 Milliliter (ml) Blut abgenommen. Für die Blutentnahme wurde eine heparinisierte Spritze mit Butterfly verwendet und Blut aus der Vena cubiti mediana entnommen. Die Blutentnahme wurde vom Ethikkomitee der LMU München genehmigt (Az. 611-15). Das Blut wurde sofort weiterverarbeitet und für die Isolation von PMN 1:1 auf Polymorphprep geschichtet und anschließend bei 20° Celsius und 800 rpm („*engl. rounds per minute*“) für 35 Minuten zentrifugiert. PMN haben eine höhere Dichte als mononukleäre Leukozyten und eine ähnliche Dichte wie Erythrozyten. Der hoch osmolare Dichtegradient des Polymorphprep führt dazu, dass Erythrozyten Wasser verlieren, schrumpfen und ihre Dichte erhöhen. Nach der Zentrifugation findet sich ein Sediment aus Erythrozyten, die aufgrund ihrer Dichte am schnellsten durch den Dichte Gradient wandern. Danach folgt die PMN Bande und die höchste Bande enthält Monozyten und Lymphozyten. Die hohe Bande wurde mithilfe eines Vakuums Absaugers entfernt, um eine Kontamination der PMN zu verhindern. Die PMN Bande wurde in ein 50 ml Falcon übertragen und mit PBS für fünf Minuten bei Raumtemperatur und 300 rpm gewaschen. Das Zellpellet wurde anschließend in PBS resuspendiert und die Zellen manuell mithilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Dabei wurden die Zellen zunächst 1:10 in Trypanblau gefärbt und 10 µl in die Zählkammer gegeben. Es wurden vier Eckfelder unter dem Lichtmikroskop ausgezählt und anschließend gemittelt. Um die Zahl der Zellen pro ml zu berechnen, wurde die Verdünnung der resuspendierten Zellen, mal die Verdünnung der Färbung, mal die Verdünnung der Zellen in der Zählkammer (1×10^4) multipliziert. Anschließend wurden die PMN für fünf Minuten bei 300 rpm mit PBS gewaschen und das Pellet anschließend in einer Konzentration von 100 µl HBSS pro 5×10^6 Zellen resuspendiert. Nach der Isolation wurden 200 µl Zellen bei 36°Celsius mit verschiedenen Substanzen inkubiert. Zellen, die für eine Zeit von über 30 Minuten inkubiert wurden, wurden in einen

Zellinkubator bei 36° Celsius und 5% CO₂ gegeben. Nach der Stimulation wurden 200 µl 4°C kalter HBSS hinzugegeben und die Zellen bei 4°C und 300 rpm für acht Minuten zentrifugiert.

Für die Isolation humaner PBMC („*engl. peripheral blood mononuclear cells*“) wurde das abgenommene Blut 1:1 mit PBS verdünnt und dann im Verhältnis Lymphoprep zu Blut/PBS 1:2 geschichtet. Der Lymphoprep wurde für 20 Minuten bei 800 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen. Ein unteres Erythrozyten Sediment, eine mittlere Phase mit PBMC und eine obere Plasma Phase. Die obere Plasma Phase wurde abgetragen, die PBMC in ein neues Falcon transferiert und für fünf Minuten mit 300 rpm und RT mit PBS gewaschen.

Für die Isolation von Monozyten wurden die PBMC wie oben beschrieben gezählt und mithilfe des EasySep™ Human Monocyte Isolation Kit isoliert. Zunächst wurden dafür die PBMC auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen pro ml Recommended Medium eingestellt und in ein FACS („*engl. Fluorescence Activated Cell Sorting*“) Tube gegeben. Zur Probe wurden nun 50 µl/ml Isolation Cocktail und 50 µl/ml Platelet Removal Cocktail gegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Magnetiv Particles wurden 30 Sekunden gevortext und anschließend in einer Konzentration von 50 µl/ml zur Probe gegeben und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. EasySep™ Human Monocyte Isolation Kit beruht auf dem Prinzip der negativen Selektion. Dabei werden „ungewollte“ Zellen mit einem Antikörper gegen spezifische Oberflächen Marker markiert. Der, an die Zellen gebundene Antikörper wiederum bindet mit magnetischen Partikeln. Über einen starken Magneten können nun die markierten „ungewollten“ Zellen von den Monozyten separiert werden. Nach der Inkubation wurde das FACS Tube mit Recommended Medium aufgefüllt und für fünf Minuten auf Eis im Magneten inkubiert. In einer kontinuierlichen Bewegung wurde der Magnet mit FACS Tube gekippt, die aufgereinigten Monozyten in ein neues Falcon gegeben und gezählt.

4.2.2 Aufreinigung und Maturierung muriner PMN aus dem Knochenmark mittels Percoll

Die Isolation muriner PMN erfolgte aus dem Knochenmark der Mäuse. Dafür wurden die Mäuse gemäß Tierschutzverordnung euthanasiert, anschließend mit 70% Ethanol eingesprüht und Hüftknochen, Femur, Tibia und Fibula freipräpariert. Bindegewebe und Muskelgewebe am Knochen wurden komplett entfernt und die Knochen in PBS gelegt. Die Epiphyse wurde mit einer Schere vorsichtig entfernt und die Knochenmarkhöhle mit einer Spritze, gefüllt mit PBS gespült. Durch einen Filter über dem 50 ml Falcon wurde verhindert, dass grobe Bestandteile, wie Fettinseln mitisoliert werden. Die Zellen wurden im nächsten Schritt für fünf Minuten bei 300 rpm und RT gewaschen und anschließend das Zellpellet in drei ml PBS resuspendiert. Für den Percoll wurden vier ml des Density Gradient 0.8 über den Density Gradient 1.1 geschichtet. Hierfür wurde das Falcon auf Eis gestellt, um eine saubere

Trennung der Gradienten zu erreichen. Nun wurden die drei ml Zellsuspension vorsichtig über den Percoll pipettiert und für 30 Minuten bei 1000 rpm und 20° Celsius zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen: ein unteres Sediment mit Erythrozyten, eine mittlere Phase mit PMN und eine obere Phase mit Monozyten und Lymphozyten. Die mittlere Phase PMN wurde abpipettiert, nachdem die obere Phase entfernt wurde. Die PMN wurden in ein neues Falcon transferiert mit PBS aufgefüllt und für fünf Minuten bei 300 rpm und RT zentrifugiert. Um die PMN zu maturieren, wurden sechs ml Zellsuspension aus der WEHI Zellkultur abgenommen, für fünf Minuten bei 300 rpm und RT abzentrifugiert und der Überstand mithilfe eines 45 µm Filters in ein neues Falcon filtriert. Sechs ml des filtrierten WEHI wurde mit 14 ml RPMI („Roswell Park Memorial Institute“) Medium gemischt, die aufgereinigten PMN in vier ml WEHI/RPMI Gemisch resuspendiert und auf zwei Zellkultur Schalen aufgeteilt. Auf jede Schale wurde acht ml WEHI/RPMI mix gegeben und über Nacht im Inkubator bei 36° Celsius und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen aus der Zellkulturschale in ein Falcon überführt und gezählt.

4.2.3 Aufreinigung muriner Bone Marrow Derived Neutrophils (BMDN) mittels EasySep™

Zunächst wurde, wie oben beschrieben das Knochenmark der Mäuse gewonnen und die Zellen für fünf Minuten bei 300 rpm und RT mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden gezählt, in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen pro ml Recommended Medium aufgenommen und in ein FACS Tube transferiert. Zur Probe wurden 50 µl/ml EasySep™ Mouse Neutrophil Enrichment Cocktail gegeben und das für 15 Minuten auf Eis gegeben. Das FACS Tube wurde mit Recommended Medium aufgefüllt und für 10 Minuten bei 300 rpm gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in einer Konzentration von 1×10^8 Zellen pro ml Recommended Medium resuspendiert. Es wurden 50 µl/ml EasySep™ Biotin Selection Cocktail hinzugegeben und für 15 Minuten auf Eis gegeben. Anschließend wurden die EasySep™ Magnetic Particles für 30 Sekunden gevortext und in einer Konzentration von 150 µl/ml für 10 Minuten auf Eis zu den Zellen gegeben. Das FACS Tube wurde mit Recommended Medium aufgefüllt und für drei Minuten im Magneten inkubiert. In einer kontinuierlichen Bewegung wurden die murinen Neutrophilen in ein neues Falcon gekippt und anschließend gezählt.

4.2.4 Western Blot

Nach Aufreinigung und Stimulation der Zellen wurden diese bei RT und 300 rpm für acht Minuten gewaschen und der Überstand und das Zellpellet weiterverwendet. Zum Zellpellet wurden pro 1×10^6 Zellen 100 µl Lysepuffer gegeben und für 10 Minuten auf Eis gegeben. Danach wurde das Lysat für eine Minuten sonifiziert, um membranständige Proteine herauszulösen. Das Lysat wurde bei 4°Celsius und „full speed“ (18400 rpm) für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Gefäß

überführt. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 95°Celsius aufgeköcht. Um die Proteine aus dem Überstand zu fällen, wurden zu 400 µl Überstand die gleiche Menge Methanol gegeben und für 30 Sekunden gevortext. Danach wurden ¼ des Anfangsvolumens an Chloroform dazu gegeben, für 30 Sekunden gevortext und bei 12400 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen. Eine untere Chloroform-Phase, eine mittlere Schicht als Protein-Gemisch und aufgelagert das Methanol. Die obere Phase wurde abgetragen, ohne das Proteinpellet zu berühren. Es wurden 500 µl Methanol hinzugefügt für 30 Sekunden gevortext und bei „full speed“ für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Proteinpellet mit 20 µl 2× Laemmli-Puffer versetzt. Die Proben wurden bei 95° Celsius aufgeköcht. Falls die Proben nicht direkt weiterverwendet wurden, wurden diese bei -80° Celsius eingefroren, um proteolytische Degradierung durch endogene Proteasen zu verhindern.

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) wurde mit drei verschiedenen prozentigen Gelen durchgeführt. Das Prinzip der PAGE beruht auf dem Auftrennen der Proteine aufgrund ihres molekularen Gewichtes. Dabei ist die Zusammensetzung des Gels und die Größe der Poren für die Auftrennung entscheidend. Gel Poren entstehen durch das Quervernetzen von polymerisierten Acrylamid Monomeren mit dem „cross-linker“ bis-Acrylamid. Die Größe der Poren wird folglich durch zwei Parameter bestimmt. Zum einen durch die Konzentration der Acrylamid Monomere, zum anderen durch die Konzentration des „cross-linker“ bis-Acrylamid. Dabei nimmt die Poren Größe mit steigender Konzentration an Acrylamid ab, sodass höher-prozentige Gele für die Detektion großer Proteine ungeeignet sind. Umgekehrt bedeutet das, dass für die Detektion von kleinen Molekülen, wie zum Beispiel MRP8 (8 kDa) dementsprechend ein höherprozentiges Gel (15%) verwendet wurde (Bass et al. 2017).

Der Mini-PROTEAN® Tetra Cell Tank wurde mit Laufpuffer gefüllt und die Gele danach mit jeweils 20 µl Proben gefüllt. Zur Kontrolle der Proteingröße wurden 3.5 µl Chameleon Duo Pre-stained Protein Ladder verwendet. In der Einlaufphase, also bis die Proben von den Taschen in das Sammelgel gelaufen waren, wurde eine Stromstärke von 10 Milliampere pro Gel verwendet. Nach ungefähr 15 Minuten wurde diese auf 15 Milliampere pro Gel erhöht und nachdem die Proben ins Trenngel gelaufen waren auf 20 Milliampere erhöht. Nach ungefähr zwei Stunden wurde das Gel aus dem Tank entfernt und für 10 Minuten im Blottgel assimiliert. Für die Überführung der Proteine im Gel auf die PVDF-Membran wurden diese entsprechend der Herstelleranweisung in eine Blot Kassette gegeben. Dabei ist wichtig darauf zu achten, dass keine Luftblasen zwischen Membran und Gel sind. Die Kassette wurde dann in den Mini-PROTEAN® Tetra Cell Tank gegeben und ein Liter Blottpuffer hinzugegeben. Um ein Erhitzen durch zu große Spannung zu verhindern, wurde ein Kälteakku verwendet und ein Rührfisch hinzugefügt. Es wurde eine Spannung von 100 Volt verwendet. Je nachdem wie groß das zu untersuchende Protein war, wurde unterschiedlich lange geblottet. Bei kleinen Proteinen (bis zu 25 kDa), die durch

ihre geringere Masse schneller im elektrischen Feld wandern, wurde 30 Minuten geblottet. Dies sollte verhindern, dass das Protein nicht zu weit wandert und somit nicht in der Membran zu finden ist. Bei größeren Proteinen (ab 30 kDa) wurde eine Blottzeit von 1 Stunde 30 Minuten verwendet. Um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran anschließend für eine Stunde mit dem Blockpuffer inkubiert. Die Membran wurde danach mit dem passenden Antikörper über Nacht bei 4° Celsius inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran drei Mal für fünf Minuten mit einem Waschpuffer gewaschen und anschließend mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde inkubiert, der gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichtet war. Nach der Inkubation wurde die Membran weitere drei Mal gewaschen und anschließend in den Waschpuffer gegeben. Mittels des Odyssey® Near-Infrared Western Blot Detection wurde das Protein auf der Membran detektiert. Die Auswertung erfolgte mit dem Image Studio™ Lite Ver 5.2.

4.2.5 *In vitro* Flusskammern

Am Tag vor dem Versuch wurden die IBIDI Flusskammern mit den Oberflächenmolekülen beschichtet. Für die *in vitro* Flusskammern mit murinen Zellen wurde pro Flusskammer 15 µl Mastermix aus drei µl rmE-Selektin, 2.25 µl rmICAM-1 und 9.75 µl PBS/BSA erstellt. Dieser Mastermix wurde dann in die Kammer gefüllt und für 3 Stunden bei RT und 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Für das Blocken unspezifischer Bindungen wurden 50 µl Casein-Blocking pro Kammer verwendet. Außerdem wurden die Schläuche und Spritzen geblockt. Die Kammern wurden über Nacht bei 4°Celsius inkubiert und am nächsten Tag mit 75 µl PBS pro Kammer gewaschen. Für die *in vitro* Flusskammerexperimente wurden eine Konzentration von 500.000 Zellen pro ml HBSS verwendet. Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcon transferiert und über einen Schlauch mit einer ein ml Einmal-Insulinspritze aufgezogen. Die Spritze wurde dann in die Harvard Apparatus® gespannt und der Schlauch über einen Konnektor mit der IBIDI Flusskammer verbunden. Am Leica DMI8 Mikroskop wurde eine Expositionszeit von 50 Millisekunden eingestellt. Die Mikroskopie erfolgte mit einem 20er Objektiv (HCPFL 20 Fach/0.40 CORR PH1 Objektiv) mit einem Zeitintervall von einem Bild pro Sekunde unter Hellfeld. Die Pumpe lief mit einer Flussrate von 23.36 µl/min, was einer Schubspannung von 1.8 dyn/cm² in der Flusskammer entspricht. Insgesamt lief die Pumpe 10 Minuten pro Flusskammer, davon wurden vier Minuten gewartet und danach sechs Minuten mit der Kamera aufgenommen. Bei zwei zu untersuchenden Gruppen wurde für eine adäquate Randomisierung jeweils die Kontrollgruppe und die zu untersuchende Gruppe abwechselnd aufgenommen. Für die Auswertung wurde das Programm ImageJ 64-bit (Version 1.8.0) verwendet. Dabei wurde die Distanz der Pixel in Mikrometer und die Anzahl der aufgenommenen Bilder pro Sekunde im Programm festgelegt. Anschließend wurde für ein Zeitintervall von 60 Sekunden 10 Zellen getrackt. Über die zurückgelegte Strecke in µm pro Zeit errechnete das Programm eine mittlere

Rollgeschwindigkeit für jede Zelle. Für jede Maus wurden mindestens drei technische Replikate angefertigt. Um die mittlere Rollgeschwindigkeiten jeder Flusskammer zu errechnen, wurde der Wert der zehn Zellen gemittelt. Anschließend wurden die Rollgeschwindigkeiten der Flusskammern je Maus erneut gemittelt, um diese untereinander vergleichen zu können.

4.2.6 Labormäuse

C57BL/6 Wildtypmäuse (WT) wurden vom Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) akquiriert und im Tierstall des Biomedizinischen Zentrums, LMU, Planegg, Martinsried, Deutschland untergebracht. *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* wurden von Prof. Veit Hornung (München, Deutschland), *Gsdmd^{-/-}* Mäuse von Prof. Petr Broz (Lausanne, Schweiz) und *Mrp14^{-/-}* wurden von Johannes Roth (Münster, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das Mrp14-Gen kodiert für S100A9. Für die Versuche wurden zwischen 8-25 Wochen alte männliche und weibliche Mäuse verwendet. Die Tierversuche wurden durch die Regierung von Oberbayern genehmigt (AZ.: ROB-55.2-2532.Vet_02-18-22).

4.2.7 *In vitro* Freisetzung Assay

Für den *in vitro* Freisetzung Assay wurden am Vortag des Experimentes Glasplättchen zunächst mit Ethanol geputzt und anschließend entweder mit rmE-Selektin, FcR oder PBS übernacht bei 4°Celsius inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Glasplättchen in eine 24-Loch-Platte übertragen und mit 5% Casein für zwei Stunden behandelt, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach der Inkubationszeit wurden das Casein mittels des Vakuum Absaugers entfernt und die Glasplättchen mit 200 µl PBS pro Glasplättchen gewaschen. Die 24-Loch-Platte mit den Glasplättchen wurde bis zur Stimulation der Zellen in den Zellinkubator bei 36°Celsius und 5% CO₂ gegeben, um möglichst physiologische Bedingungen zu schaffen. BMDN aus dem Knochenmark von C57BL/6 WT, *Caspase-1/11^{-/-}* und *GSDMD^{-/-}* Mäusen wurden mittels EasySep™ isoliert und auf eine Konzentration von 5×10⁵ BMDN pro 200 µl HBSS Puffer eingestellt. Anschließend wurden 200 µl Zellsuspension auf die jeweiligen vorbeschichteten Glasplättchen pipettiert und für 10 Minuten im Zellinkubator bei 36°Celsius und 5% CO₂ inkubiert. Die 24-Loch-Platte wurde auf einen Schüttler gegeben, um einen möglichst gleichmäßigen Kontakt der Zellen zur beschichteten Oberfläche der Glasplättchen zu ermöglichen. Nach der Stimulation wurde 4°C kaltes HBSS zu den Zellen gegeben, um die Inkubation zu stoppen. Anschließend wurden Zellen und Zellüberstand in ein 1.5 ml Eppendorfer Gefäß übertragen und bei 300 rpm und 4°Celsius für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mittels ELISA („*engl. Enzyme-linked Immunosorbent Assay*“) die Menge an MRP8/14 analysiert. Das Zellpellet wurde für den Western Blot aufbereitet.

4.2.8 *In vivo* Freisetzung Assay

Vor den *in vivo* Experimenten wurden alle Mäuse mittels intraperitonealer Injektion einer Kombination aus dem Beruhigungsmittel Xylazin und dem Narkotikum Ketamin anästhesiert. Nach Abschluss der Versuche wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet. Für den *in vivo* Freisetzung Assay wurde rekombinantes TNF- α in das Skrotum von C57BL/6 WT, *Caspase-1/11*^{-/-} und *GSDMD*^{-/-} Mäusen injiziert. Vor und zwei Stunden nach der Injektion wurde den Mäusen Blut 100 μ l Blut abgenommen. Dafür wurde mittels einer Glaskapillare der retroorbitale Sinus punktiert und anschließend unter Verwendung von BD Microtainer[®] Röhrchen das Serum von den zellulären Blutbestandteilen getrennt. Im Serum wurde MRP8/14 vor und nach Injektion von TNF- α mittels ELISA quantifiziert.

4.2.9 Statistische Analysen

Alle Experimente wurden mindestens in drei unabhängigen Versuchen durchgeführt. Die Abbildungen bei den Western Blots repräsentieren mindestens drei unabhängige Experimente. Für die statistische Auswertung wurde das Programm Graph Pad Prism[®] verwendet. Zur Erstellung der Diagramme wurde größtenteils Adobe Illustrator[®] verwendet und zum Teil Graph Pad Prism[®]. Statistisch signifikante Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ mit einem Stern gekennzeichnet, ab $p < 0.01$ mit zwei Sternen und ab $p < 0.001$ mit drei Sternen. Die statistischen Tests erfolgten entweder mit einem zweiseitigen oder einseitigen ANOVA („*engl. analysis of variance*“) oder mittels eines gepaarten oder ungepaarten T-Tests. Die jeweils verwendeten Tests für die verschiedenen Experimente sind in den Diagrammbeschriftungen zu finden.

5. Ergebnisse

Seit einigen Jahren haben sich mehrere Studien mit der Frage beschäftigt, welche Funktion der Inflammasom-Komplex in neutrophilen Granulozyten erfüllt. Wichtige Komponenten des Inflammasoms werden nicht nur auf ähnlich hohem Level wie in Monozyten oder in Makrophagen exprimiert, sondern im Falle des NLRP3 oder NLRC4 Inflammasoms sogar höher (Bakele et al. 2014). Bisher hat sich noch keine Studie mit dem Einfluss des Inflammasoms auf die Rekrutierung von Neutrophilen beschäftigt. Besonders die Sekretion von MRP8/14 stellt einen entscheidenden Schritt in der Rekrutierungskaskade dar, wie bereits in früheren Studien gezeigt wurde (Pruenster et al. 2015).

5.1 Die Freisetzung von MRP8/14 ist abhängig von Caspase-1 /11 und Gasdermin D *in vitro*

Wie Kamakar et al. in einer Studie publizierten, zeigen Neutrophile, welche in einem Medium mit hohem extrazellulärem K⁺ stimuliert werden, eine verminderte Aktivierung des NLRP3 und eine verminderte Kapazität IL-1 β zu sezernieren (Karmakar et al. 2016).

Um nun eine mögliche Beteiligung des Inflammasoms bei der E-Selektin-abhängigen MRP8/14 Freisetzung in Neutrophilen zu studieren, wurden BMDN von C57BL/6 WT Mäusen, *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* Mäusen und *Gsdmd^{-/-}* Mäusen isoliert. Die Zellen wurden anschließend bei 37° C mit E-Selektin, Fc oder PBS zur Kontrolle inkubiert. Nach 15 Minuten wurden die Überstände abgenommen und die MRP8/14 Spiegel per ELISA gemessen. In BMDN von WT Mäusen wurde nach PBS Stimulation MRP8/14 (53,9 \pm 8,2 ng/ml) in der Zellsuspension gefunden. Wie wir bereits in früheren Studien gezeigt haben, führte die Stimulation mit E-Selektin in den WT Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der MRP8/14 Spiegel (103,3 \pm 12,1 ng/ml) (Pruenster et al. 2015). Im Gegensatz dazu war der erwartete Anstieg der MRP8/14 Spiegel nach E-Selektin Stimulation in *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* Mäusen (50,7 \pm 12,04 ng/ml) und *Gsdmd^{-/-}* Mäusen (46,3 \pm 9,5 ng/ml) im Vergleich zur WT Kontrolle signifikant reduziert (Abb. 5.1 A). Um einen Unterschied der intrazellulärer MRP8/14 Konzentrationen in verschiedenen Mäusestämmen auszuschließen, wurden die Zelllysate von WT und Knockout Mäusen im Western Blot analysiert. Als Negativkontrolle wurden Zelllysate von *Mrp14^{-/-}* BMDN verwendet, welcher als funktionaler Doppelknockout für MRP8/14 gilt (Abb. 5.1 B). Für *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}*, *Gsdmd^{-/-}* und WT Mäusen ergaben sich vergleichbare intrazelluläre MRP8/14 Spiegel in (Abb. 5.1 B). Diese Daten zeigen, dass sowohl funktionelle Caspase-1/11 als auch GSDMD unabdingbar für eine suffiziente MRP8/14 Freisetzung *in vitro* sind.

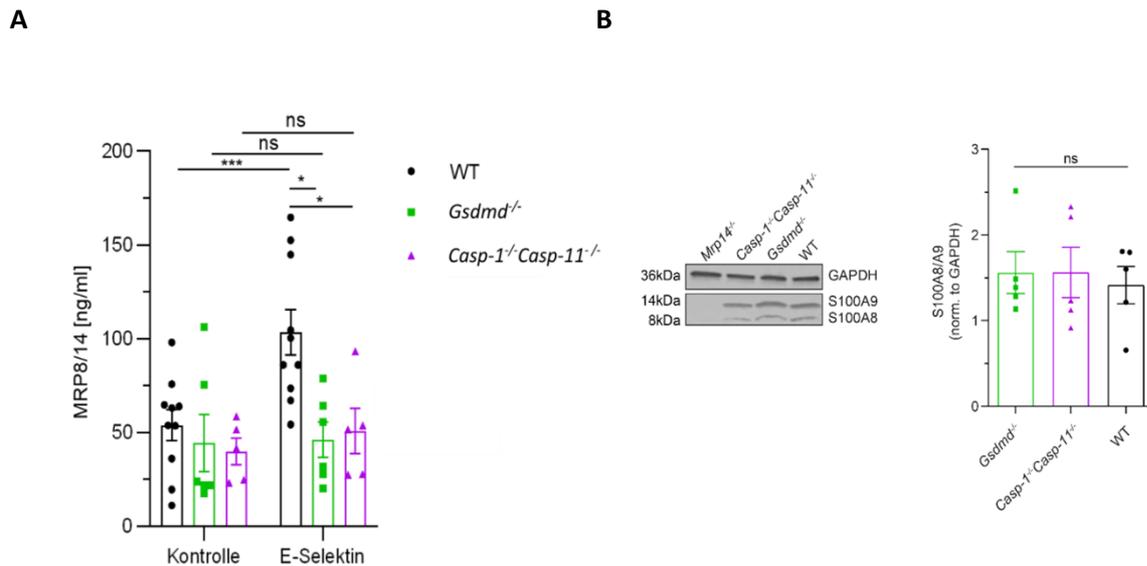


Abbildung 5.1: Unterschiede der MRP8/14 Spiegel nach E-Selectin und PBS Stimulation zwischen WT, *Gsdmd*^{-/-} und *Casp-1*^{-/-}*Casp-11*^{-/-} BMDN *in vitro*

(A) Isolierte BMDN aus WT, *Gsdmd*^{-/-} und *Casp-1*^{-/-}*Casp-11*^{-/-} wurden auf Platten, die mit E-Selectin und PBS beschichtet wurden, stimuliert. Die Menge an freigesetzten MRP8/14 wurde im Überstand per ELISA in Zusammenarbeit mit Prof. T. Vogl (Institut für Immunologie, Universitätsklinikum Münster) gemessen. MRP8/14 Spiegel sind für WT (schwarze Punkte), *Gsdmd*^{-/-} (grüne Vierecke) und *Casp-1*^{-/-}*Casp-11*^{-/-} Neutrophile (lila Dreiecke), einmal für PBS Stimulation (linke Seite) und E-Selectin Stimulation (rechte Seite) gezeigt. Die Abbildung repräsentiert n=5-10 Mäuse und zeigt jeweils die Mittelwerte ± SEM. Für die statistische Analyse wurde ein zweiseitiger ANOVA verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0.001) sind mit drei Sternen markiert, p<0.05 mit einem Stern. Nicht signifikante Unterschiede (p>0.05) sind mit ns. markiert. (B) Vor der Stimulation wurde ein Teil der isolierten BMDN aus WT, *Gsdmd*^{-/-} und *Casp-1*^{-/-}*Casp-11*^{-/-} lysiert, MRP8/14 mittels Western Blot detektiert und auf GAPDH normalisiert. BMDN aus *Mrp14*^{-/-} wurden als Negativkontrolle verwendet. Der Blot repräsentiert n=5 Experimente. Für die statistische Analyse wurde ein einseitiger ANOVA verwendet. Nicht signifikante Unterschiede (p>0.05) sind mit ns. markiert.

5.2 Die Freisetzung von MRP8/14 ist abhängig von Caspase-1 /11 und Gasdermin D *in vivo*

Um die weitere Bedeutung von Caspase-1/11 und GSDMD *in vivo* zu untersuchen, wurden MRP8/14 Spiegel im Serum von C57BL/6 WT, *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* und *Gsdmd^{-/-}* Mäusen nach TNF- α Injektion gemessen. TNF- α Applikation führt zu einer Aktivierung der Transkription von E-Selektin in Endothelzellen, die nach circa 2 Stunden ihren Peak erreicht. Rekombinantes TNF- α wurde den Mäusen intrascrotal injiziert und 2 Stunden später MRP8/14 Spiegel im arteriellen Blut via ELISA gemessen. Wie erwartet konnten wir in der Kontroll-WT-Gruppe einen signifikanten Anstieg von MRP8/14 (115,4 \pm 13,3 mg/ml) vor TNF- α Injektion, auf MRP8/14 (544,8 \pm 142,0 mg/ml) nach TNF- α Injektion beobachten. In *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* Mäusen fanden wir keinen signifikanten Anstieg der MRP8/14 Spiegel von vor (105,0 \pm 20,4 mg/ml) zu nach (184,8 \pm 45,3 mg/ml) TNF- α Injektion. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich in *Gsdmd^{-/-}* Mäuse. Die MRP8/14 Spiegel waren vor (99,4 \pm 9,8 mg/ml) und nach (164,6 \pm 32,8 mg/ml) TNF- α Injektion nicht signifikant verändert (Abb. 5.2). Somit sind Caspase-1/11 und GSDMD nicht nur *in vitro*, sondern auch in *in vivo* unabdingbar für eine suffiziente Freisetzung von MRP8/14.

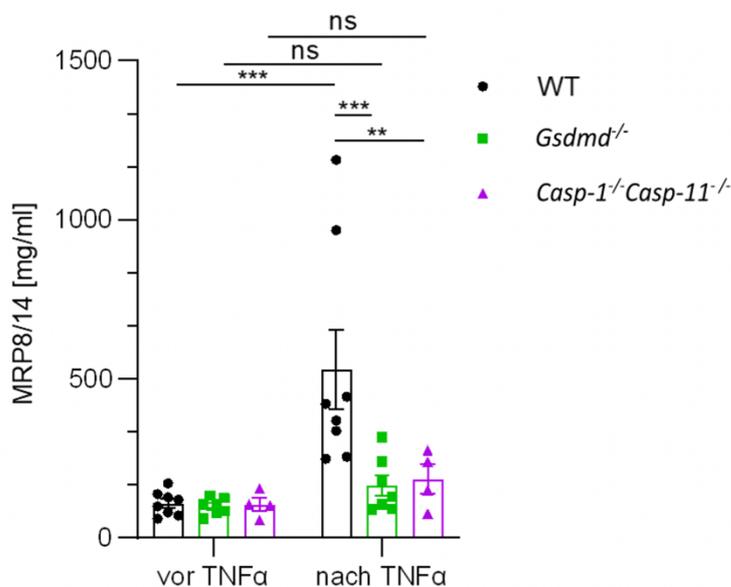


Abbildung 5.2: Unterschiede der MRP8/14 Spiegel vor und nach TNF- α Injektion zwischen WT, *Gsdmd^{-/-}* und *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* BMDN *in vivo*

WT (schwarze Punkte), *Gsdmd^{-/-}* (grüne Vierecke) und *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* (lila Dreiecke) Mäusen wurde intrascrotal TNF- α appliziert und nach 2 Stunden arteriell Blut entnommen. *In vivo* MRP8/14 Spiegel wurden vor und nach TNF- α Applikation im Blut per ELISA (Prof. T. Vogl, Münster) gemessen. Pro Gruppe wurde n=4-7 Mäuse verwendet, Balken zeigen den Mittelwert \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer zweiseitigen ANOVA. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) sind mit drei Sternen markiert, ($p < 0.01$) mit zwei Sternen. Nicht signifikante Unterschiede ($p > 0.05$) sind mit ns markiert.

5.3 Stimulation humaner PMN mit E-Selektin führt zu einer Aktivierung von Caspase-1, die unabhängig von TLR-4 ist

Zur Bestätigung unsere Hypothese, dass das Rollen von Neutrophilen auf entzündetem Endothel zur NLRP3 Inflammasom Aktivierung führt und um weitere molekularen Schritte der Inflammasom Aktivierung in Neutrophilen zu studieren, wurden humane PMN aus dem peripheren Blut gesunder Probanden isoliert. Im Anschluss wurden diese für 10 Minuten entweder mit löslichem rekombinanten humanen E-Selektin stimuliert oder mit PBS als Kontrolle. In früheren Studien konnten unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass MRP8/14 an den TLR4 Rezeptor bindet und diesen aktiviert (Pruenster et al. 2015). In Makrophagen wie Monozyten konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit TLR4 Agonisten, wie LPS, zu einer transkriptionellen Hochregulation des NLRP3 Inflammasoms über den NfκB-Weg führt. Dies bewirkt eine verstärkte Antwort der Zelle auf einen zweiten Inflammasom spezifischen Stimulus (Lamkanfi und Dixit 2012; Broz und Dixit 2016). Auch wenn davon auszugehen ist, dass nach 10 Minuten noch keine nennenswerte transkriptionelle Hochregulation des NLRP3 Inflammasoms zu erwarten ist, wollten wir ausschließen, dass die Inflammasom Aktivierung nicht aufgrund der autokrinen Bindung des extrazellulären MRP8/14 erfolgt. Um dies zu erreichen, wurde die extrazelluläre Funktion des MRP8/14 mithilfe von Paquinimod blockiert und zusätzlich der TLR4 Antagonist TAC242 verwendet. Paquinimod ist ein Immunomodulator, welcher die Aktivität von MRP14 einerseits über dessen direkte Bindung und andererseits über eine Blockade der Interaktion von MRP14 mit den Rezeptoren TLR4 und RAGE inhibiert. In Maus Modellen führt die Applikation von Paquinimod zu einer verminderten MRP14-abhängigen TNF-α Freisetzung (Björk et al. 2009). In einer Gruppe, die mit E-Selektin stimuliert wurde, wurde fünf Minuten vorher Paquinimod und TAC242 dazugegeben. In der anderen Gruppe wurde nur DMSO als „*Vehicle-Kontrolle*“ fünf Minuten vor E-Selektin Stimulation dazugegeben. Der Überstand wurde anschließend per Western Blot auf aktive Caspase-1 analysiert. In beiden, mit E-Selektin stimulierten Gruppen fand sich ein signifikanter Unterschied an aktiver Caspase-1 im Vergleich zur PBS Kontrolle. Zwischen den beiden E-Selektin Gruppen (mit oder ohne TLR4 Blockade) wurde keine signifikante Differenz an p20 Caspase-1 gefunden. Dies lässt darauf schließen, dass die Caspase-1 Aktivierung nicht vom TLR4 Rezeptor abhängig ist, sondern über die E-Selektin PSGL-1 Interaktion direkt ausgelöst wird (Abb. 5.3).

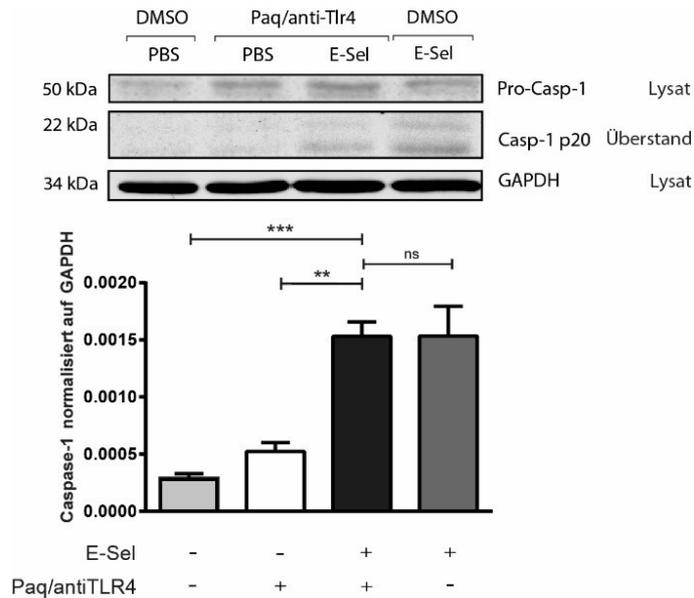


Abbildung 5.3: Vergleich der aktiven Caspase-p20 in humanen PMN (hPMN) nach E-Selektin Stimulation

Nach Isolation wurden hPMN mit E-Selektin (schwarzer und dunkelgrauer Balken) oder PBS (hellgrauer und weißer Balken) als Kontrolle für 10 Minuten stimuliert. Angegebene Gruppen wurden fünf Minuten vor Stimulation mit Paquinimod und anti-TLR4 (weißer und schwarzer Balken) oder DMSO (hell- und dunkelgrauer Balken) vorbehandelt. Die Menge an aktiver Caspase-1 p20 wurde im Überstand per Western Blot analysiert und für die Auswertung auf GAPDH im Lysat normalisiert. Der Blot repräsentiert n=4 unabhängige Experimente, der Graph zeigt den Mittelwert ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer einseitigen ANOVA. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) sind mit drei Sternen markiert, $p < 0.01$ mit einem Stern und nicht signifikante Unterschiede ($p > 0.05$) mit ns.

5.4 Die Aktivierung von Caspase-1 durch E-Selektin in hPMN ist K^+ -Efflux abhängig

Viele Stimuli des NLRP3 Inflammasoms wurden in der Literatur diskutiert und sind dafür bekannt, zu einer Aktivierung von Caspase-1 und GSDMD zu führen. Einer der potentesten und am besten untersuchtesten Aktivatoren des NLRP3 ist der Efflux von K^+ aus der Zelle (Lamkanfi und Dixit 2012). Um zu testen, ob K^+ -Efflux für die E-Selektin-abhängige Inflammasom Aktivierung von Bedeutung ist, wurden hPMN isoliert und anschließend in normalem HBSS Medium und in kaliumreichem Medium mit E-Selektin und PBS stimuliert. Durch die Erhöhung des extrazellulären K^+ , wurde verhindert, dass K^+ entlang seines chemischen Gradienten von intrazellulär nach extrazellulär transportiert wird. Um eine mögliche TLR4 MRP8/14 Interaktion auszuschließen, wurden Paquinimod und TAC242 vor der Stimulation zu jeder Gruppe hinzugegeben. Interessanterweise war die Spaltung von Caspase-1 in seine aktive p20 Form im Vergleich zu normalem HBSS Medium bei blockiertem K^+ -Efflux signifikant beeinträchtigt

(Abb. 5. 4). Dies deutet darauf hin, dass die E-Selektin vermittelte NLRP3 Aktivierung K^+ -Efflux abhängig ist.

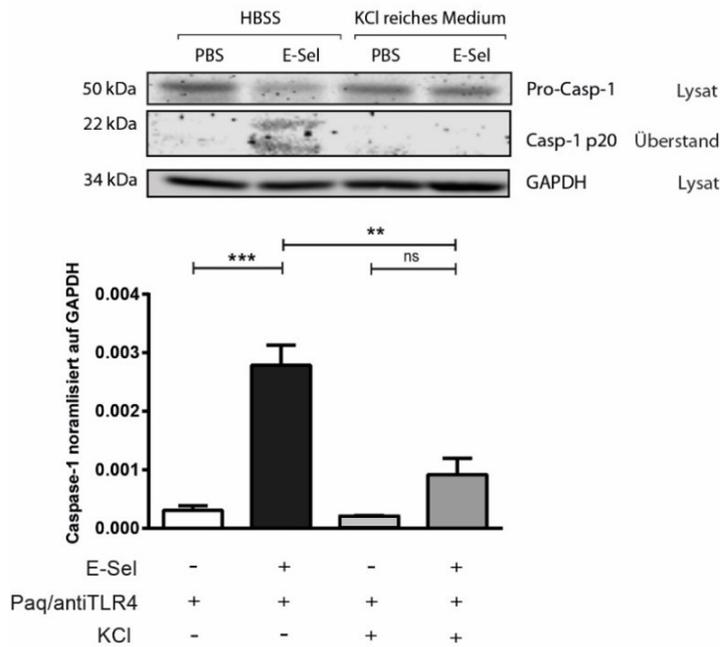


Abbildung 5.4: Vergleich der aktiven Caspase-p20 in hPMN nach E-Selektin Stimulation in normalem und K^+ -reichem Medium

hPMN wurden nach Isolation 10 Minuten entweder mit E-Selektin (schwarzer und dunkelgrauer Balken) oder PBS (weißer und hellgrauer Balken) in normalem HBSS Medium (weißer und schwarzer Balken) oder kaliumreichem Medium (hell- und dunkelgrauer Balken) stimuliert. Alle Gruppen wurden fünf Minuten vor Stimulation mit Paquinimod und anti-TLR4 vorbehandelt. Überstände wurden mittels Western Blot auf Caspase-1 analysiert und für die Auswertung auf GAPDH aus dem Lysat normalisiert. Der Blot repräsentiert n=3 unabhängige Versuche, der Graph zeigt den Mittelwert \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer einseitigen ANOVA. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) sind mit drei Sternen markiert, $p < 0.01$ mit zwei Sternen und nicht signifikante Unterschiede ($p > 0.05$) mit ns.

5.5 Das NLRP3 Inflammasom vermittelt die E-Selektin-abhängige Caspase-1 Aktivierung in hPMN

Um zu überprüfen, ob das NLRP3 Inflammasom für die E-Selektin-abhängige Caspase-1 Aktivierung in Neutrophilen verantwortlich ist, wurde ein potenter Inhibitor des NLRP3, MCC950, verwendet und isolierte hPMN 30 Minuten bei 36°C und 5% CO₂ entweder mit MCC950 oder mit DMSO zur Kontrolle vorbehandelt (Zahid et al. 2019) (Abb. 5.5 A). Anschließend wurde mit E-Selektin und PBS stimuliert. Nachfolgend wurde der Überstand der Zellen auf aktive Caspase-1 analysiert. Mit MCC950 vorbehandelte hPMN zeigten eine signifikante Reduktion an aktiver Caspase-1 im Vergleich zur DMSO Gruppe (Abb. 5.5 B). Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms unabdingbar ist für die E-Selektin-abhängige Caspase-1 Aktivierung.

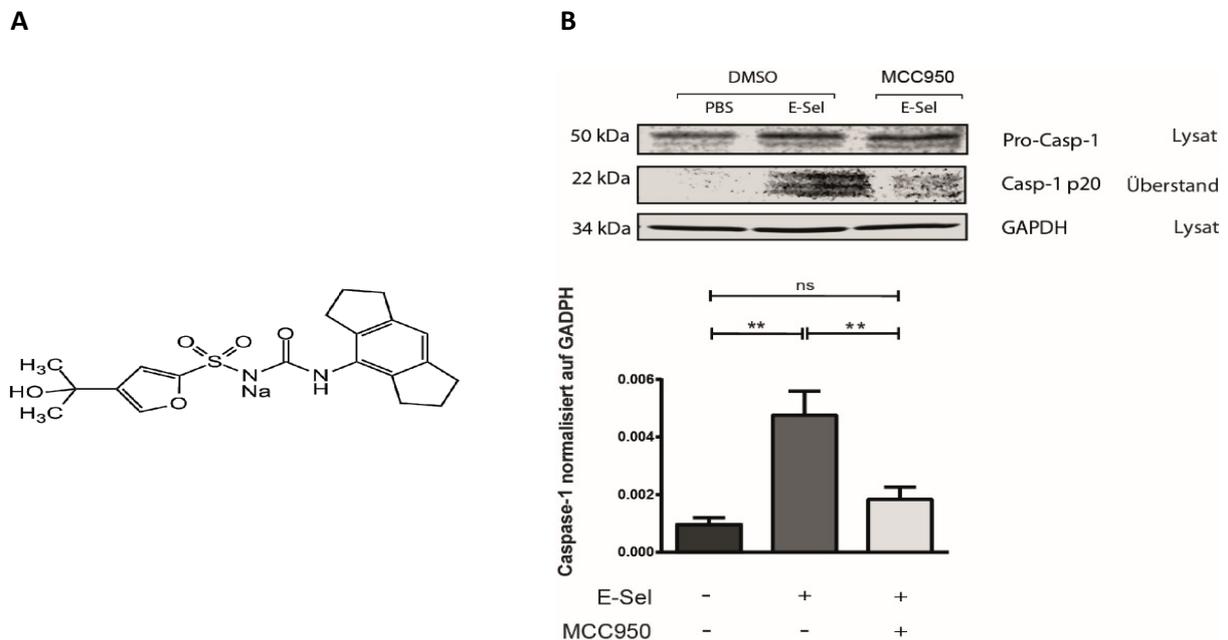


Abbildung 5.5: Vergleich der aktiven Caspase-p20 in E-Selektin stimulierten hPMN nach NLRP3 Inhibition mit MCC950

(A) Chemische Formel des NLRP3 Inhibitors MCC950. (B) Nach Isolation wurden hPMN entweder mit PBS (schwarzer Balken) oder E-Selektin (dunkel und hellgrauer Balken) für 10 Minuten stimuliert. Eine Gruppe wurde 30 Minuten vor Stimulation mit MCC950 (hellgrauer Balken) vorbehandelt, die andere mit DMSO (schwarzer und dunkel Balken). Überstände wurden mittels Western Blot auf Caspase-1 analysiert und für die Auswertung auf GAPDH aus dem Lysat normalisiert. Der Blot repräsentiert n=3 Versuche, der Graph zeigt den Mittelwert \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer einseitigen ANOVA. Statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.01$) sind mit zwei Sternen markiert und nicht signifikante Unterschiede ($p > 0.05$) mit ns.

5.6 E-Selektin Stimulation von hPMN führt zu einer NLRP3 Inflammasom und K⁺-Efflux-abhängigen Aktivierung von Gasdermin D

Mehrere Studien konnten bereits nachweisen, dass GSDMD in Neutrophilen exprimiert wird (Karmakar et al. 2020; Kambara et al. 2018). Uns stellte sich nun die Frage, ob E-Selektin Stimulation in humanen Neutrophilen nicht nur Caspase-1 aktiviert, sondern ob diese auch GSDMD in seine aktive p30 Form schneidet. Dafür wurden hPMN isoliert und jeweils für 10 Minuten mit E-Selektin oder PBS als Kontrolle stimuliert. Um zu testen, ob die GSDMD Aktivierung NLRP3 Inflammasom abhängig ist, wurde MCC950 30 Minuten vor Stimulation hinzugegeben. Außerdem wurde eine Gruppe in kaliumreichem Medium stimuliert. Die Lysate der stimulierten Zellen wurden im Western Blot analysiert. hPMN, in denen NLRP3 oder der K⁺-Efflux inhibiert wurden, konnten GSDMD nicht in seine aktive p30 Form schneiden. E-Selektin Stimulation führte zu einer signifikanten Erhöhung der aktiven GSDMD p30 Form im Vergleich zur PBS Gruppe und den beiden vorbehandelten Gruppen (Abb. 5.6). Die Ergebnisse zeigen, dass die Stimulation von hPMN mit E-Selektin zu einer GSDMD Aktivierung führt, welche abhängig von der Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und des K⁺-Efflux ist.

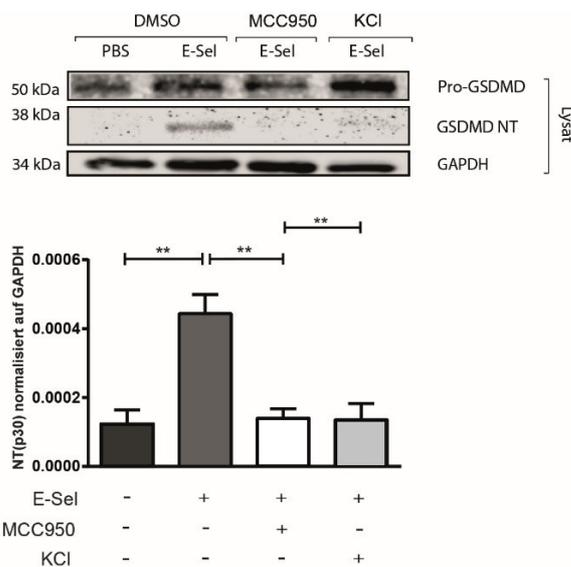


Abbildung 5.6: Vergleich des aktiven Gasdermin D p30 in E-Selektin-stimulierten hPMN nach NLRP3 Inflammasom und K⁺-Efflux Inhibition

Nach Isolation wurden hPMN mit E-Selektin (dunkelgrauer, weißer und hellgrauer Balken) und PBS (schwarzer Balken) für 10 Minuten stimuliert. Die Proben wurden zuvor 30 Minuten mit MCC950 (weißer Balken), DMSO (dunkelgrauer und schwarzer Balken) vorbehandelt oder in kaliumreichem Medium (hellgrauer Balken) stimuliert. Anschließend wurde im Lysat GSDMD per Western Blot detektiert und für die Auswertung auf GAPDH normalisiert. Der Blot repräsentiert n=4 unabhängige Experiment. Der Graph zeigt die Mittelwerte ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels einer einseitigen ANOVA. Statistisch signifikante Unterschiede (p<0.01) sind mit zwei Sternen markiert.

5.7 Inhibition von NLRP3 in murinen PMN führt zu einer Erhöhung der Rollgeschwindigkeit *in vitro*

Wie wir bereits zeigen konnten, ist die Freisetzung von MRP8/14 aus Neutrophilen von der Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und nachfolgend von Caspase-1/11 und GSDMD abhängig. Ob das NLRP3 Inflammasom jedoch auch funktionelle Auswirkungen auf die Rekrutierung von Leukozyten hat, war unklar. In früheren Studien wurde bereits gezeigt, dass die β 2-Integrin-abhängige Rollgeschwindigkeit von Leukozyten auf E-Selektin und ICAM-1 entscheidend abhängig von der Freisetzung von MRP8/14 ist (Pruenster et al. 2015). Um die *in vivo* Situation, des neutrophilen Rollens auf dem Endothel entzündeter postkapillärer Venolen *in vitro* nachzuahmen, wurden spezielle IBIDI Kammern verwendet. Die Oberfläche der Kammern wird, um eine Entzündungssituation nachzuahmen, mit E-Selektin und ICAM-1 beschichtet. BMDN wurden aus dem Knochenmark von WT Mäusen gewonnen. Anschließend wurden diese entweder mit MCC950 oder DMSO als Kontrolle vorbehandelt und über Nacht in einem Brutschrank bei 36,5°C maturiert. Am nächsten Tag wurden BMDN unter einer Wandschubspannung („*engl. shear stress*“) von 2,7 dyn/cm², was einer physiologischen Wandschubspannung in postkapillären Venolen entspricht, durch die Kapillaren der IBIDI Kammern perfundiert und die Rollgeschwindigkeiten beider Gruppen gemessen und verglichen. Neutrophile der Kontrollgruppe rollten mit einer Rollgeschwindigkeit von 0,27±0,04 $\mu\text{m/s}$. Eine Vorbehandlung der Neutrophilen mit dem Inhibitor MCC950 führte zu einer Erhöhung der Rollgeschwindigkeit auf 0,45±0,05 $\mu\text{m/s}$ (Abbildung 5. 7). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das NLRP3 Inflammasom wichtig für ein intaktes Rollen von Neutrophilen *in vitro* ist.

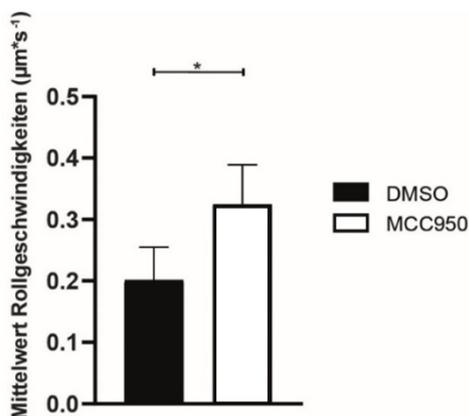


Abbildung 5.7: Unterschied der Rollgeschwindigkeiten von murinen Neutrophilen mit inhibiertem NLRP3 Inflammasom

Isolierte BMDN wurden durch rmE-Selektin/rmICAM-1 beschichtete Flusskammern perfundiert (n=3 Mäuse). Die Rollgeschwindigkeiten wurde für BMDN vorbehandelt mit MCC950 (n=57 Zellen, weißer Balken) oder DMSO (n=55 Zellen, schwarzer Balken) gemessen. Der Graph zeigt die Mittelwerte der Rollgeschwindigkeiten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels eines t-Testes. Der statistisch signifikante Unterschied ($p < 0.05$) ist mit einem Stern markiert.

5.8 Murine BMDN von *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* und *Gsdmd^{-/-}* Mäusen zeigen erhöhte Rollgeschwindigkeiten *in vitro*

In unseren Western Blot Daten konnten wir zeigen, dass die NLRP3 Aktivierung zu einer Aktivierung von Caspase-1 und GSDMD führt. Um zu bestätigen, dass Caspase-1 und GSDMD für eine intakte Rekrutierung von Neutrophilen *in vitro* benötigt werden, wurden BMDN aus WT, *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* und *Gsdmd^{-/-}* Mäusen isoliert und anschließend direkt durch eine mit E-Selektin und ICAM-1 beschichtete IBIDI-Kammer mit einer Flusskraft von $2,7 \text{ dyn/cm}^2$ perfundiert. Neutrophile aus WT Mäusen rollten mit einer Rollgeschwindigkeit von $0,17 \pm 0,005 \mu\text{m/s}$. Neutrophile, die aus *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* isoliert wurden, zeigten eine signifikante Erhöhung der Rollgeschwindigkeit auf $0,32 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zu WT (Abb. 5.8 A). Neutrophile, die aus *Gsdmd^{-/-}* Mäusen isoliert wurden, zeigten eine höhere Rollgeschwindigkeit von $0,23 \pm 0,01 \mu\text{m/s}$ im Vergleich zu WT Neutrophilen, die mit einer Geschwindigkeit von $0,15 \pm 0,005 \mu\text{m/s}$ rollten (Abb. 5.8 B). Zusammenfassend lässt sich daraus schließen, dass die Aktivierung von Caspase-1 durch das NLRP3 Inflammasom und damit die Freisetzung von MRP8/14 durch GSDMD-Poren für eine intakte Rekrutierung von Neutrophilen *in vitro* benötigt wird.

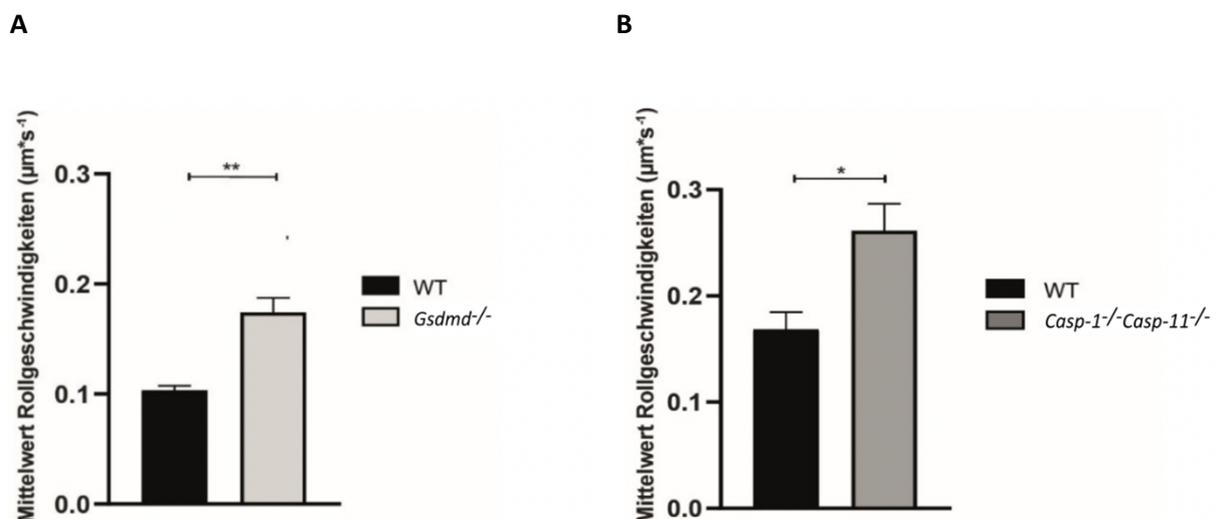


Abbildung 5.8: Unterschied der Rollgeschwindigkeiten von *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* und *Gsdmd^{-/-}* Neutrophiler

Isolierte BMDN aus WT (schwarzer Balken), *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* (dunkelgrauer Balken) und *Gsdmd^{-/-}* (hellgrauer Balken) Mäusen, wurden durch rmE-Selektin/ rmlCAM-1 beschichtete Flusskammern perfundiert (n=3-5 Mäuse pro Gruppe). (A) Die Rollgeschwindigkeiten wurde für BMDN aus WT (n=130 Zellen, schwarzer Balken) und *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* (n=118 Zellen, dunkelgrauer Balken) gemessen. (B) Die Rollgeschwindigkeiten wurde für BMDN aus WT (n=87 Zellen, schwarzer Balken) und *Gsdmd^{-/-}* (n=72 Zellen, hellgrauer Balken) gemessen. Der Graph zeigt die Mittelwerte der Rollgeschwindigkeiten ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels eines t-Testes. Statistisch signifikante Unterschiede sind mit einem Stern (p<0.05) oder zwei Sternen (p<0.01) markiert.

6. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten erstmals zeigen, dass MRP8/14 aus neutrophilen Granulozyten über einen NLRP3-abhängigen Signalweg freigesetzt wird. In ersten Versuchen konnten wir bestätigen, dass Proteine des Inflammasom Komplexes, wie GSDMD in neutrophilen Granulozyten auf Protein Ebene exprimiert werden. Unsere Western Blot Daten zeigen, dass schon eine kurze Stimulation mit E-Selektin zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und der Prozessierung von Caspase-1 und GSDMD in ihre aktiven Fragmente führt. Dabei konnten wir zudem zeigen, dass die schnelle Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms K^+ -Efflux abhängig ist. In unseren *in vitro* Freisetzungssassays konnten wir schließlich eine verminderte Sekretion von MRP8/14 in BMDN nachweisen, welche aus Caspase-1 und GSDMD Knockout Mäusen isoliert wurden und anschließend für 15 Minuten mit E-Selektin stimuliert wurden. Abschließend konnten wir durch unsere funktionellen *in vitro* Flusskammer Experimente zeigen, dass hPMN mit einem inhibierten NLRP3-Inflammasom sowie hPMN von murinen *Casp-1^{-/-}Casp-11^{-/-}* und *Gsdmd^{-/-}* Mäusen gesteigerte Rollgeschwindigkeiten auf E-Selektin/ICAM-1 beschichteten Kapillaren aufweisen.

6.1 Die Freisetzung von MPR8/14 aus neutrophilen Granulozyten

Obwohl MRP8/14 eine tragende Rolle für die Funktionen von Neutrophilen spielt, ist bisher wenig über dessen Freisetzungsmechanismus bekannt. Ähnlich zu IL-1 β weist MRP8/14 keine Signalsequenz auf (Kerkhoff et al. 1998). Die Signalsequenz ist dabei eine Abfolge von Aminosäuren, die über den Transport des Proteins innerhalb der Zelle und dessen Bestimmungsort entscheidet. Proteine mit einer Signalsequenz werden typischerweise vom Endoplasmatischen Retikulum über den Golgi Komplex und das trans-Golgi-Netzwerk in Vesikel verpackt und über die Zellmembran nach extrazellulär freigesetzt (Bonifacino und Glick 2004). Dennoch gibt es einige Proteine, die nach extrazellulär sezerniert werden, ohne eine Signalsequenz zu besitzen. Diese Proteine werden über alternative Freisetzungsmechanismen sezerniert. In den letzten Jahren ist das Verständnis für diese alternativen Freisetzungsmechanismen, auch als unkonventionelle Protein Sekretionsmechanismen (UPS) bekannt, gestiegen und es haben sich verschiedene Klassifikationen für UPS etabliert. Dabei wurde die Freisetzung von IL-1 β unter anderem als UPS Typ 1 charakterisiert, also als eine alternative Freisetzung durch Plasmamembranporen, dessen typischer Stimulus ein entzündlicher Prozess ist. Dabei wird das aktive, 17-kDa große IL-1 β über die Translokation von GSDMD^{N-Terminal} zur Zellmembran mit Formation einer Plasmamembranpore freigesetzt (Ding et al. 2016). Es ist zu erwähnen, dass verschiedene Studien die Freisetzung des

IL-1 β als UPS Typ 3 klassifiziert haben. In dieser Form der alternativen Freisetzung sind zytosolische Proteine in membran-gebundenen Zellorganellen, wie Autophagosomen, Endosomen, Exosomen und Lysosomen verpackt, die nach einem Stimulus mit der Zellmembran fusionieren und ihren Inhalt nach extrazellulär freigeben (Rabouille et al. 2012).

MRP8/14 konnte bisher nicht in Endosomen beziehungsweise in Vesikeln der Zellmembranfraktion nachgewiesen werden, was eine Freisetzung nach UPS Typ 3 unwahrscheinlich macht (Edgeworth et al. 1991). In Monozyten konnte bisher gezeigt werden, dass die Aktivierung von Proteinkinase C, eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und ein intaktes Mikrotubulus Netzwerk Voraussetzung für die Freisetzung von MPR8/14 sind (Rammes et al. 1997). Neutrophile degranulieren nach Aktivierung und setzen so eine Vielzahl an verschiedenen Proteinen frei. MRP8/14 konnte zu einem kleinen Anteil in spezifischen Granula gefunden werden, was eine Freisetzung durch Degranulierung impliziert (Stroncek et al. 2005). Eine weitere Studie beschrieb eine Freisetzung von MRP8/14 durch NETose (McCormick et al. 2010). Beide Mechanismen konnten durch eine neuere Studie widerlegt werden. So führt der starke Stimulus für die Degranulation mittels fMLP („engl. *N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin*“) nicht zu einer Erhöhung der extrazellulären MRP8/14 Spiegel. Zudem konnte der Zusammenhang zwischen NETose und der Freisetzung von MPR8/14 nicht gezeigt werden.

Die Aktivierung von Neutrophilen führt zur Translokation von Heterodimeren (MRP8/14) und Homodimeren (MRP8 und MRP14) zur Plasmamembran vor deren Sekretion. Der größte Anteil des sezernierten MRP8/14 ist dabei in seiner löslichen Form und nur ein kleiner Anteil in Vesikeln zu finden. Ähnlich wie für IL-1 β ist der alternative Freisetzungsmechanismus von MRP8/14 von der Produktion von ROS und dem Efflux von K⁺ abhängig (Tardif et al. 2015). Insgesamt lassen diese Ergebnisse darauf schließen, dass der Freisetzungsmechanismus von MPR8/14 ähnlich wie der des IL-1 β abläuft. Dabei ist zusätzlich zu erwähnen, dass die molekularen Größen der Proteine mit 17-kDa für IL-1 β , 10.8-kDa für MRP8 und 13.2-kDa für MRP14 vergleichbar sind und somit der benötigte Mindestdurchmesser der Pore in etwa gleich groß ist.

In neutrophilen Granulozyten stellt MPR8/14 mit 40% anteilig die größte Fraktion der zytosolischen Proteine dar. Dabei ist die Freisetzung von MRP8/14 unabhängig von einer Neusynthese des Proteins, da es in seiner aktiven Form im Zytosol vorliegt. Somit wäre eine schnelle, passive Freisetzung durch Poren schon aufgrund der großen Anzahl an freiem aktiven MRP8/14 zu erwarten. In unseren *in vitro* Daten können wir erstmals einen klaren Zusammenhang der Freisetzung des MRP8/14 mit der Aktivierung des Inflammasoms nachweisen. Dabei zeigt sich, dass wie bei der IL-1 β Sekretion die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms über sein Effektorproteine Caspase-1 eine signifikante Rolle in der Freisetzung des MRP8/14 spielt. Zusätzlich ist die Freisetzung abhängig von GSDMD, was darauf schließen

lässt, dass die Bildung einer Plasmamembranpore der Schlüssel zu dessen passiven Freisetzung ist. In Makrophagen und Monozyten wird GSDMD durch den kanonischen Caspase-1-abhängigen Weg, sowie den nicht-kanonischen Caspase-4/5 (human) und Caspase-11 (murin)-abhängigen Weg in sein aktives GSDMD^{n-Terminal} überführt. Da unsere Western Blot Daten zeigen, dass weder Caspase-1 noch GSDMD in die aktive Form geschnitten werden, wenn das NLRP3 Inflammasom inhibiert ist, ist davon auszugehen, dass vor allem das kanonische Inflammasom für die Freisetzung des MRP8/14 wichtig ist. Zudem zeigen unsere *in vitro* Flusskammerdaten den gleichen Phänotyp für *Caspase-1/11*^{-/-} BMDN und BMDN mit inhibierten NLRP3, was impliziert, dass eine Aktivierung des kanonischen Inflammasoms für die Funktionalität des Neutrophilen entscheidend ist.

Eine Studie konnte hingegen zeigen, dass in Neutrophilen, die mit *Aspergillus fumigatus* infiziert wurden, für eine suffiziente IL-1 β Freisetzung die Aktivierung der Caspase-11 der Aktivierung der Caspase-1 vorgelagert ist (Sun et al. 2018). Da aber die Aktivierung von Caspase-11 ausschließlich durch intrazelluläres LPS, also zum Beispiel über phagozytierte Gram-negative Bakterien erfolgt, erscheint es unwahrscheinlich, dass die Interaktion von E-Selektin mit PSGL-1 zur Aktivierung des nicht-kanonischen Inflammasoms führt und somit dem kanonischen vorgeschaltet ist. Vielmehr ist von zwei, sich ergänzenden Wegen auszugehen. So ist für die Freisetzung des MRP8/14 durch die Interaktion zwischen PSGL-1 mit E-Selektin zunächst die Aktivierung des kanonischen NLRP3 Inflammasoms und der darauffolgenden GSDMD Poren Bildung entscheidend. Phagozytiert ein neutrophiler Granulozyt nun ein Gram-negatives Bakterium, könnte die Aktivierung des nicht-kanonischen Inflammasoms einerseits zur weiteren, verstärkten Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms führen und andererseits selbst über den weiteren Einbau von GSDMD Poren die Freisetzung von MRP8/14 fördern. Welche Funktion genau das nicht-kanonische Inflammasom für den Freisetzungsmechanismus von MRP8/14 in Neutrophilen hat muss daher in weiteren Versuchen untersucht werden.

6.2 Die Expression von Proteinen des Inflammasom Komplexes auf Protein Ebene in neutrophilen Granulozyten

Seit der Entdeckung des Inflammasom Komplexes wurden eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren des Inflammasoms und deren potenziellen Aktivierungsmechanismen und Funktionen erforscht. Diese Studien konzentrierten sich dabei im Wesentlichen auf Monozyten und Makrophagen, die als Hauptproduzenten von IL-1 β gelten. Somit wurden Signalwege, die zur Prozessierung und Freisetzung dieses Interleukins führen besonders untersucht. Obwohl neutrophile Granulozyten einen Großteil der zirkulierenden Immunzellen ausmachen, sind das Vorkommen und die Funktionalität von Bestandteilen des Inflammasoms in Neutrophilen erst in neueren Studien untersucht worden. Dies lag daran, dass man

zunächst von einer Caspase-1-unabhängigen Prozessierung des IL-1 β in Neutrophilen ausging (Miwa et al. 1998). Zudem konnten frühere Studien das NLRC4 Inflammasom in Neutrophilen nicht nachweisen. Hieraus wurde geschlussfolgert, dass der Inflammasom Komplex in Neutrophilen wahrscheinlich keine physiologische Rolle spielt (Miao et al. 2010).

Diese Sicht wurde durch neuere Untersuchungen mehr und mehr infrage gestellt. In diesen konnte gezeigt werden, dass IL-1 β in signifikanter Menge von Neutrophilen sezerniert wird und dass ähnlich zu Makrophagen, die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und der Caspase-1 für dessen Freisetzung benötigt wird (Mankan et al. 2012). Bei gewissen Infektionen produzieren Neutrophile sogar den größten Anteil des freigesetzten IL-1 β , was die Bedeutung des Inflammasoms in Neutrophilen unterstreicht (Karmakar et al. 2015). Chen et al konnten zeigen, dass NLRP3 mRNA auf einem höheren Level exprimiert wird als in Makrophagen (Chen et al. 2014).

Wir konnten in unseren Daten jeweils die ungeschnittene Caspase-1 und das geschnittene aktive p20 Fragment nach zehnminütiger Stimulation mit E-Selektin nachweisen. Es ist aber zu erwähnen, dass das aktive p20 Fragment der Caspase-1 in geringeren Mengen im Western Blot nachzuweisen war, wie es nach Priming von Monozyten mit LPS für drei Stunden und anschließender Aktivierung mit Nigericin für 30 Minuten zu finden ist. Dies kann einerseits mit der deutlich geringeren Stimulationszeit erklärt werden, andererseits stimmen unsere Ergebnisse überein mit Studien, die eine geringere Expression von ASC und Caspase-1 in Neutrophilen im Vergleich zu Monozyten nachweisen konnten (Boucher et al. 2018). Insgesamt lässt sich daraus folgern, dass neutrophile Granulozyten zwar einen kleineren Inflammasom Komplex mit verringerter Caspase-1 Aktivität aufweisen, dies aber suffizient für die Freisetzung von IL-1 β ist (Chen et al. 2020). Zu Beginn meiner Arbeit hatte noch keine Studie das Vorkommen und die Funktionalität von GSDMD in Neutrophilen untersucht. Wir konnten nach Stimulation mit E-Selektin das aktive GSDMD^{N-Terminal} nachweisen, welches aber in geringeren Mengen als in zunächst geprimten und aktivierten Monozyten vorlag.

So lässt sich daraus schlussfolgern, dass trotz der verringerten Caspase-1 Aktivität zwar weniger, aber ausreichend aktives GSDMD in Neutrophilen geschnitten wird. Neuere Studien aus dem Jahr 2018 konnte die Expression von GSDMD in neutrophilen Granulozyten ebenfalls bestätigen, was unsere Hypothese bekräftigt, dass das kanonische Inflammasom eine physiologische Rolle im neutrophilen Granulozyten spielt (Kambara et al. 2018; Chen et al. 2018). Da unsere Ergebnisse vor allem auf Bestandteile des kanonischen Inflammasoms als Freisetzungsmechanismus des MRP8/14 hinwiesen, haben wir das Vorkommen von Bestandteilen des nicht-kanonischen Inflammasoms in Neutrophilen nicht untersucht. Zudem war ein verlässlicher humaner Antikörper für die Caspase-4/5 nicht verfügbar. In einer neueren Studie konnten Chen et al das Schlüsselmolekül des nicht-kanonischen Inflammasoms, die

Caspase-11 nach vier Stunden Stimulation mit LPS in seiner kompletten Länge und als geschnitten aktives Fragment in murinen neutrophilen Granulozyten nachweisen. Außerdem zeigten sie, dass GSDMD durch die rekombinante aktive Caspase-11 und etwas weniger effizient, durch die rekombinante aktive Caspase-1 geschnitten wird. Zudem zeigte sich erneut eine geringere Expression der Caspase-11 und Caspase-1 als in Makrophagen (Chen et al. 2018).

Zusammenfassend zeigen unsere Daten und neuere Studien, dass Hauptkomponenten des kanonischen und nicht-kanonischen Inflammasoms in neutrophilen Granulozyten grundsätzlich in geringerer Menge exprimiert werden, aber eine vergleichbare Funktionalität aufweisen wie in Makrophagen und Monozyten. Somit ergibt sich, dass obwohl Makrophagen, Monozyten und Neutrophile von der gleichen myeloischen Zelllinie abstammen, der Inflammasom Komplex in Neutrophilen spezifische Regulationsmechanismen aufweist. Im Gegensatz zur NLRP3 Aktivierung in Makrophagen führen in Neutrophilen nur lösliche NLRP3 Agonisten und nicht Partikel und Kristalle zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms (Chen et al. 2016). Zudem konnten wir mit der schnellen Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch E-Selektin einen bis dato im Neutrophilen unbekanntem Aktivierungsmechanismus entdecken.

6.3 Die schnelle NLRP3 Inflammasom Aktivierung als kritischer Punkt der MRP8/14 Freisetzung

Pruenster et al. konnten zeigen, dass MRP8/14 eine entscheidende Rolle in der Leukozyten-Rekrutierungskaskade einnimmt, indem es die Konformation der β 2-Integrine, wie LFA1 von einem niedrig-affinen in einen hoch-affinen Zustand ändert. Neutrophile Granulozyten müssen, als erste Abwehrlinie der Immunantwort effektiv und schnell zum Ort der Infektion rekrutiert werden. Die physiologische Voraussetzung für die schnelle Rekrutierung ist unter anderem die rapide Freisetzung von MRP8/14 aus Neutrophilen. Diese Freisetzung von MRP8/14 führt bereits nach fünf Minuten zu einer Konformationsänderung der β 2-Integrine und erreicht nach 15 Minuten ihren Peak (Pruenster et al. 2015). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass eine NLRP3-abhängige MRP8/14 Freisetzung nur dann möglich ist, wenn die Interaktion von E-Selektin mit PSGL-1 innerhalb weniger Minuten zu einer schnellen Aktivierung des Inflammasoms führt. Dies spiegelt sich in unseren Ergebnissen wider. Diese zeigen, dass in Neutrophilen bereits nach 10 Minuten Stimulation mit E-Selektin die aktiven Fragmente von Caspase-1 und GSDMD mithilfe eines Western Blots detektiert werden können. Da diese aktiven Fragmente nach Inhibition des NLRP3 Inflammasoms durch MCC950 nicht detektiert werden können, lässt sich folgern, dass diese schnelle Aktivierung NLRP3 Inflammasom abhängig ist.

Seit der Entdeckung des Inflammasoms wird von einem zwei-Stufen Prozess der NLRP3 Aktivierung ausgegangen. Dieses beinhaltet im ersten Schritt das Priming mittels TLR-4 Agonisten wie LPS mit einer NFκB-abhängigen transkriptionellen Hochregulierung von Proteinen, wie NLRP3, Caspase-1 und GSDMD. Darauf folgt die Aktivierung des Inflammasoms mit NLRP3 typischen Agonisten. Typische Stimulationszeiten betragen in Studien, die Makrophagen und Monozyten untersuchen, beispielsweise drei Stunden Priming und 30 Minuten Aktivierung. In der vorliegenden Arbeit konnte ich eindeutig eine sehr schnelle Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms nachweisen, die unabhängig von einer transkriptionellen Hochregulierung erfolgen muss. Zudem verwendeten wir Paquinimod und einen TLR4-Antagonisten vor jeder Stimulation mit E-Selektin, welches ein Priming über TLR4 verhinderte. Dies widerspricht zunächst dem Dogma, dass für eine suffiziente Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms eine transkriptionelle Hochregulierung der Proteine des Inflammasom Komplexes notwendig ist (Bauernfeind et al. 2009).

Neben dem etablierten, zweistufigen Modell der NLRP3 Inflammasom Aktivierung konnten verschiedene Studien der letzten Jahre eine Aktivierung des NLRP3 Komplexes zeigen, die unabhängig von einer transkriptionellen Hochregulierung erfolgt. In diesen Studien sind bereits kurze Stimulationszeiten von 15 Minuten ausreichend, um suffizient Caspase-1 zu aktivieren und zu einer Freisetzung von IL-1β zu führen (Lin et al. 2014).

Eine mögliche Erklärung dieser schnellen Aktivierung sind posttranslationale Modifikationen wie der Status der Ubiquitinierung von NLRP3. Wird das NLRP3 Inflammasom durch das Priming Signal oder einen NLRP3 Aktivator wie ATP aktiviert, führt dies zu einer Deubiquitinierung des NLRP3 Inflammasoms und zu dessen Komplexbildung. Dass unstimulierte Neutrophile einen höheren Anteil an NLRP3 Protein exprimieren als Makrophagen, könnte eine weitere Erklärung dafür sein, dass kurze Stimulationszeiten ausreichend sind. Denn ist das NLRP3 Protein in hohen Konzentrationen in der Zelle exprimiert, ist nur ein geringer Anteil des NLRP3 Proteins ubiquitiniert. Schon eine kurze Inkubationszeit mit einem Stimulus ist ausreichend für dessen Deubiquitinierung und der darauffolgenden Komplexbildung. Ist der NLRP3 Proteingehalt jedoch gering, ist NLRP3 an verschiedenen Domänen (bspw. Lys-48, Lys-63) durch unterschiedliche Polyubiquitin Ketten stark ubiquitiniert (Juliana et al. 2012). Es ist zu erwähnen, dass das Ubiquitinierungsmuster, also an welcher Stelle das NLRP3 mit welcher Ubiquitinkette versehen ist, einen negativen, wie positiven Effekt auf dessen Aktivierung haben kann. Somit können unterschiedliche Ubiquitin-modifizierende Enzyme entweder zur Stabilisierung oder zum Abbau des NLRP3 Inflammasoms führen (Kelley et al. 2019). Dadurch stellt die Ubiquitinmodifizierung des NLRP3 Proteins eine elegante Möglichkeit dar, das NLRP3 Inflammasom schnell und suffizient zu steuern, ohne auf eine transkriptionelle Hochregulierung der Proteine angewiesen zu sein. Leider

konnten wir bisher noch nicht untersuchen, ob „*Signaling*“ via PSGL-1 zu einer Ubiquitinmodifizierung des NLRP3 Proteins führt und falls ja, welche Art der Modifizierung genau für diesen Prozess verantwortlich ist.

6.4 Die Rolle des K⁺-Efflux als Grundlage für die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms

Das NLRP3 Inflammasom ist eines der am besten untersuchtesten Inflammasomkomponenten in Makrophagen und Monozyten. Im Laufe der Zeit konnten viele verschiedene Aktivatoren etabliert werden, die zur Oligomerisierung des NLRP3 führen und folglich zur Freisetzung von IL-1 β . Der Efflux von K⁺ aus der Zelle, der zu einer Verringerung der intrazellulären K⁺-Konzentration führt, konnte dabei als eines der wichtigsten Schlüsselsignale für die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms etabliert werden.

In Neutrophilen ist bisher wenig bekannt über die zellulären Mechanismen, die zur NLRP3 Aktivierung führen. Dennoch konnten verschiedene Studien nachweisen, dass der Efflux von K⁺ ein wichtiges Signal in der NLRP3-abhängigen Freisetzung von IL-1 β ist. Eine der Studien konnte in humanen Neutrophilen zeigen, dass eine Infektion mit *S. pneumoniae* zur Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms, der Bildung von ASC Speck, der Prozessierung von Caspase-1 und schließlich zur Freisetzung des IL-1 β führt. Pneumolysin, der Virulenz Faktor von *S. pneumoniae* führt dabei zu einem Efflux von K⁺-Ionen im Neutrophilen. Wird nun die Reduktion des intrazellulären K⁺ inhibiert, wird die Infekt-getriggerte Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms verhindert. Der Efflux von K⁺ ist dabei der NLRP3 Inflammasom Aktivierung vorgeschaltet und ist kein Resultat einer möglichen Caspase-1-abhängigen Pyroptose. Im Gegensatz zu Makrophagen ist die Pneumolysin getriggerte Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms in Neutrophilen unabhängig von lysosomaler Destabilisierung und Cathepsin (Karmakar et al. 2015).

Eine Folgestudie der Gruppe konnte die Expression des P2X₇-Rezeptors auf humanen Neutrophilen nachweisen. Zudem konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die Stimulation mit dem P2X₇-R Agonisten und NLRP3 Inflammasom Aktivator ATP, zum Efflux von K⁺ und einer Steigerung der intrazellulären Ca²⁺ Konzentration führt. Diese beiden Signale sind wiederum Grundlage für die P2X₇/ATP-abhängige Aktivierung des NLRP3 und der Freisetzung von IL-1 β (Karmakar et al. 2016).

In einer Linie mit diesen Ergebnissen konnten wir zeigen, dass die E-Selektin- abhängige NLRP3 Aktivierung K⁺-Efflux abhängig ist. Wird der Efflux durch eine erhöhte extrazelluläre K⁺-Konzentration inhibiert, führt die Stimulation mit E-Selektin nicht zur Aktivierung von GSDMD und Caspase-1. In dieser Arbeit wurde der Einfluss der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration auf die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms nicht untersucht. Dennoch gibt es mehrere Hinweise darauf, dass die Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration im Zusammenspiel mit der Verringerung der intrazellulären K⁺-Konzentration die molekulare Grundlage der E-Selektin-abhängigen NLRP3 Aktivierung ist. So führt die Interaktion zwischen E-

Selektin und PSGL-1 über die Aktivierung von SYK zu einer Phosphorylierung der PLC γ 2. Über die Bildung von IP $_3$ und dessen Bindung an den IP $_3$ Rezeptor erfolgt ein Influx von Ca $^{2+}$ aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Somit kann die Stimulation von Neutrophilen mit E-Selektin zu einer milden Erhöhung der intrazellulären Ca $^{2+}$ -Konzentration führen.

Neben dem P2X $_7$ konnten bisher zwei K $^+$ Kanäle auf Neutrophilen identifiziert werden, die den Efflux von K $^+$ gewährleisten, K $_v$ 1.3 und der K $_{ca}$ 3.1. Da funktionelle Daten zu diesen Kanälen fehlen, bleibt über eine mögliche Verbindung zum NLRP3 Inflammasom nur zu spekulieren (Immler et al. 2018). Zudem wird es schwer zu untersuchen sein, ob der Ca $^{2+}$ -Influx vor dem K $^+$ -Efflux erfolgt oder durch PSGL-1 zunächst ein Efflux von K $^+$ getriggert wird und sich dann eine Erhöhung der Ca $^{2+}$ -Konzentration einstellt. Dies zeigt sich auch an der widersprüchlichen Literatur zu der Rolle von Ca $^{2+}$ und K $^+$ in der Aktivierung des NLRP3 in Makrophagen und Monozyten (Murakami et al. 2012; Katsnelson et al. 2015).

6.5 Die Bildung von Gasdermin D Poren im neutrophilen Granulozyten

Zwei Studien aus dem Jahr 2015 konnten GSDMD und seine porenbildenden Eigenschaften als Vollstrecker der Freisetzung des IL-1 β und der Pyroptose in Monozyten und Makrophagen identifizieren (Shi et al. 2015; He et al. 2015). In diesen Zellen wird GSDMD durch Caspase-1, Caspase-11 (murin) bzw. Caspase-4/5 (human) in sein 30 kDa großes, aktives N-Terminales GSDMD^{N-Terminal} und ein 20kDa großes, C-Terminales GSDMD^{C-Terminal} geschnitten. Dabei blockiert GSDMD^{C-Terminal} durch die Bindung an GSDMD^{N-Terminal} dessen Translokation zur Membran und folglich die Poren Bildung. Nach seiner Aktivierung und Translokation an die Zellmembran bindet GSDMD^{N-Terminal} an Bestandteile der inneren Zellmembran, oligomerisiert dort und formt eine Pore, die im Durchmesser ca. 15 nm groß ist. Durch diese Poren wird IL-1 β mit einem molekularen Durchmesser von 4 nm freigesetzt. Die Freisetzung durch GSDMD Poren ist allerdings nicht spezifisch für IL- β . So konnte gezeigt werden, dass auch Proteine mit ähnlicher Größe, wie zum Beispiel IL-18 und RAC-1 („*engl. ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*“), durch die GSDMD Pore freigesetzt werden können. Die maximale Proteingröße, die wahrscheinlich noch durch die Pore freigesetzt werden kann, liegt zwischen 25 kDa und 50 kDa und damit deutlich über der Größe von MRP8/14. Zusätzlich spielt aber auch die elektrische Ladung des Proteins eine Rolle (Heilig et al. 2018).

Eine weitere wichtige Funktion von GSDMD in Makrophagen und Monozyten ist die Pyroptose. In diesen Zellen kann die Aktivierung des kanonischen, sowie des nicht-kanonischen Inflammasoms zur Pyroptose führen. Die Vielzahl an GSDMD Poren resultiert in einer gestörten Zellhomöostase und osmotischen Verschiebung zwischen dem intra- und extrazellulären Kompartiment, die zum Zelltod und zu einer massiven Erhöhung der extrazellulären IL-1 β Konzentration führt. Somit stellt die Pyroptose eine

hochinflammatorische Form des Zelltods dar. Obwohl ein großer Anteil des freigesetzten IL-1 β von pyroptotischen Zellen stammt, konnten Evavold et al. zeigen, dass lebende Makrophagen IL-1 β durch die Bildung von GSDMD Poren freisetzen (Evavold et al. 2018). Der Zustand von lebenden Zellen, die IL-1 β freisetzen, unterscheidet sich von ihren aktiven oder pyroptotischen Pendanten und wird als hyperaktiv bezeichnet. Somit kann GSDMD in Immunzellen zu zwei verschiedenen Szenarien führen. Ein Weg ist die Pyroptose der Zelle, die zu einer massiven entzündlichen Reaktion am Ort der Infektion führt, aber eine weitere Aktivität der Immunzelle durch ihren Tod verhindert. Der zweite Weg ist eine GSDMD-abhängige Hyperaktivierung des Makrophagen. Der Phagozyt kann IL-1 β sezernieren, ohne zu sterben und somit weiterhin seine immunmodulatorische Funktion erfüllen (Evavold et al. 2018).

In Neutrophilen sind die genauen Aktivierungsmechanismen des GSDMDs bisher aufgrund der geringen Datenlage noch unklar. Dennoch haben einige Studien in den letzten Jahren neuere Erkenntnisse zu dessen Funktion in Neutrophilen gefunden (Rühl et al. 2018, Kambara et al. 2018, Chen et al. 2018). Es konnte gezeigt werden, dass Caspase-11 und mit verringerter Kapazität, Caspase-1 GSDMD in sein GSDMD^{N-Terminal} schneiden können. Die Aktivierung des non-kanonischen Inflammasoms führt über die Aktivierung von GSDMD zur Ausbildung von NETs und somit zum Zelltod des Neutrophilen (Chen et al. 2018). Vergleichbar mit dieser Studie konnten wir nach kurzer Stimulation mit E-Selektin das GSDMD^{N-Terminal} in hPMN nachweisen. Nach Inhibition des NLRP3 Inflammasoms und des K⁺-Effluxes konnte kein GSDMD^{N-Terminal} detektiert werden. Daraus lässt sich schließen, dass die schnelle E-Selektin-abhängige Aktivierung des GSDMD mit der Aktivierung des NLRP3 Inflammasom und somit der Caspase-1 verknüpft ist.

Im Gegensatz dazu zeigten zwei Studien, dass nach langen Stimulationszeiten GSDMD, Caspase-unabhängig durch Neutrophilen Elastase (NE) in ein kleineres GSDMD^{eN-Terminal} geschnitten wird (Kambara et al. 2018; Sollberger et al. 2018). Des Weiteren zeigten Kambara et al. in einem *E.coli* induzierten Peritonitis Modell nach 48 Stunden einen Unterschied in der Anzahl an Neutrophilen im Peritoneum zwischen *Gsdmd*^{-/-} und WT Mäusen. Die erhöhte Anzahl von Neutrophilen in *Gsdmd*^{-/-} erklären sich die Autoren durch einen, verminderten, GSDMD medierten Zelltod der Neutrophilen. Trotzdem konnte die Autoren ein größeres GSDMD^{N-Terminal} in Abwesenheit von NE finden, was eine Caspase-abhängige GSDMD Aktivierung somit nicht ausschließt (Kambara et al. 2018). Sollberger et al. zeigte nach 6 Stunden Stimulation mit PMA eine GSDMD^{eN-Terminal}-abhängige Bildung von NETs in Neutrophilen. Auch diese Gruppe konnte eine NE-abhängige GSDMD Aktivierung in Neutrophilen bestätigen. Da aber die Bildung von NETs unabhängig von Caspasen erfolgt, wurde die Kapazität von Caspase-1, GSDMD zu schneiden, nicht untersucht (Sollberger et al. 2018).

Grundsätzlich lassen sich in Neutrophilen drei verschiedene Aktivierungsmechanismen des GSDMDs unterscheiden.

- (1) Eine schnelle, kanonische Inflammasom und Caspase-1-abhängige Aktivierung des GSDMD.
- (2) Eine langsame, nicht-kanonische Inflammasom und Caspase-11-abhängige Aktivierung des GSDMD.
- (3) Eine langsame Inflammasom-unabhängige, NE-abhängige Aktivierung von GSDMD.

Diese unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen sind aufgrund der vielfältigen Funktionen und der unterschiedlichen potenziellen Lebensdauer des Neutrophilen sinnvoll. Im ersten Schritt der Immunabwehr müssen Neutrophile schnell zum Ort der Infektion rekrutiert werden, ohne zu sterben. Da eine Abwehr und Phagozytose des Pathogens nur durch eine lebendige Immunzelle erfolgen kann, erfolgt die E-Selektin-abhängige Freisetzung von MRP8/14 zunächst über eine schwache Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms. Die damit verbundene schwächere Aktivierung der Caspase-1 induziert die Bildung einer kleineren Anzahl an GSDMD Poren, die aufgrund des hohen Anteils an reifen, intrazellulären MRP8/14 trotzdem zu einer suffizienten Freisetzung von MRP8/14 führt. Die Fähigkeit MRP8/14 freizusetzen ohne pyroptotisch zu werden, ermöglicht es dem Neutrophilen ins entzündete Gewebe auszuwandern und seine Funktion als Immunzelle zu erfüllen.

Dies spiegelt sich, neben unseren Daten in zahlreichen Studien wider, die eine Caspase-1-abhängige Freisetzung von IL-1 β in Neutrophilen ohne Pyroptose beobachten konnten. Das durch rekrutierte Neutrophile kontinuierlich freigesetzte IL-1 β kann die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Neutrophiler verstärken und die Lebensspanne dieser verlängern (Chen et al. 2014; Karmakar et al. 2015; Karmakar et al. 2016). Dies hat zum Vorteil, dass Neutrophile IL-1 β und MRP8/14 freisetzen können, ohne dafür ihre weiteren wichtigen, immunmodulatorischen Funktionen im Gewebe durch den Zelltod zu verlieren. Die Frage stellt sich, wie Neutrophile den Einbau von GSDMD Poren in ihre Zellmembran überleben können, ohne pyroptotisch zu werden. Eine Erklärung findet sich in der deutlich schwächeren Expression von Inflammasom Bestandteilen, wie sie in Kapitel 3.2 bereits diskutiert wurde. Dadurch ist es wahrscheinlich, dass in Neutrophilen Caspase-1 eine sublytische Anzahl von GSDMD Poren generiert.

In Makrophagen konnte gezeigt werden, dass GSDMD Poren, die in die Plasmamembran eingebaut wurden durch den ESCRT-III („*engl. endosomal sorting complexes required for transport*“) Reparatur Mechanismus entfernt werden und dadurch die Pyroptose der Zelle gestoppt wird (Rühl et al. 2018). Zusätzlich ist die Expression von SARM-1 („*engl. Sterile Alpha and TIR Motif Containing 1*“) für die Caspase-1 vermittelte Pyroptose des Makrophagen von Bedeutung. Makrophagen mit einem Knock-out für SARM-1 können, ähnlich wie Neutrophile IL-1 β völlig ohne Pyroptose freisetzen. Man könnte

spekulieren, dass Neutrophile die Expression von SARM-1 unterdrücken, um somit die Pyroptose zu unterdrücken (Chen et al. 2020).

In Neutrophilen, die sowohl über einen langen Zeitraum stimuliert und mit einer hohen Anzahl an Pathogen konfrontiert werden können, aber auch rasch im Rahmen der Rekrutierung aktiviert werden müssen ist es wahrscheinlich, dass die Aktivierung des Inflammasoms beziehungsweise von GSDMD über verschiedene Wege möglich ist. Diese verschiedenen Möglichkeiten in weiteren Experimenten zu untersuchen, wird ein wichtiger Schlüssel sein, um die Bedeutung des Inflammasoms im Neutrophilen weiter zu verstehen.

6.6 Die physiologische Bedeutung des Inflammasoms für die Funktion des Neutrophilen

Das Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrom (CAPS) bezeichnet eine Gruppe seltener vererbter, autoinflammatorischer Erkrankungen, die alle mit einer Gain-of-Function Mutation im NLRP3 Genlokus assoziiert sind. Durch eine Überfunktion des NLRP3 Inflammasoms zeigen diese Patienten erhöhte Spiegel an IL-1 β und IL-18, die sich im Patienten klinisch mit einer chronischen oder rezidivierenden, systemischen Entzündung präsentiert (Booshehri und Hoffman 2019). Das Muckle Wells Syndrom (MWS) ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte Erkrankung und Teil des CAPs Formenkreises. Die Erkrankung manifestiert sich in der Kindheit, meistens mit rezidivierenden Fieberschüben und chronischen oder rezidivierenden Schüben gekennzeichnet durch Urtikaria, Arthralgien, Myalgien und in schweren Fällen einer Konjunktivitis und Episkleritis. Eine schwerwiegende Komplikation ist, infolge der erhöhten Bildung von Akut-Phase Proteinen die AA-Amyloidose, die im Verlauf zu einem nephrotischen Syndrom und einer Niereninsuffizienz führt (Tran 2017; Fingerhutová et al. 2019).

Patienten mit MWS weisen eine verstärkte Aktivität von Neutrophilen auf. In histologischen Untersuchungen lassen sich große Infiltrate von Neutrophilen im Gewebe finden (Kagami et al. 2006). Das klinische Bild lässt sich zum Teil durch die erhöhte Freisetzung von IL-1 β erklären und die damit verbundene Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen. Patienten mit MWS weisen erhöhte Spiegel an MRP8/14 auf, die nach Behandlung mit IL-1 β Antagonisten sinken. Dennoch können IL-1 β Antagonisten die Aktivierung von Neutrophilen nicht vollständig unterdrücken und ein Teil der Patienten weist nach Behandlung immer noch erhöhte Spiegel von MRP8/14 im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf (Wittkowski et al. 2011). Die erhöhten MRP8/14 Spiegel könnte man durch die Überaktivität des NLRP3 Inflammasoms und die damit verbundene potenziell erhöhte Freisetzung von MRP8/14 durch GSDMD Poren aus Neutrophilen erklären.

Die Abhängigkeit der Neutrophilen-Funktion vom Inflammasom können wir in unseren funktionellen Flusskammer Daten zum Teil bestätigen. Die *in vitro* Daten zeigen, dass Neutrophile, in denen NLRP3,

Caspase-1 und GSDMD inhibiert beziehungsweise genetisch ausgeschaltet wurden, nicht mit ihrer physiologischen Rollgeschwindigkeit rollen können. Das Rollen von Neutrophilen ist abhängig von einer Änderung der Konformation der β 2-Integrine, die nach Interaktion von extrazellulärem MRP8/14 mit TLR4 erfolgt. Folglich wäre eine Erklärung der erhöhten Rollgeschwindigkeit, dass eine verminderte Freisetzung von MRP8/14 als Konsequenz der fehlenden Inflammasom Bestandteile zu einer verminderten Aktivierung der β 2-Intgerine führt.

Diese funktionellen Daten könnten zusammen mit den *in vitro* Freisetzungsassay eine Erklärung für die abnormal erhöhten MRP8/14 Spiegel und die damit verbundene erhöhte Rekrutierung von Neutrophilen in Patienten mit MWS liefern. Weitere Studien werden nötig sein, um den direkten Effekt der NLRP3 Überfunktion auf Neutrophile zu untersuchen. Johnson et al. konnten bereits eine gesteigerte Sekretion von azurophilen Granula in stimulierten MWS-Neutrophilen nachweisen (Johnson et al. 2017). Es wird sich zeigen, ob Medikamente wie MCC90 in der klinischen Behandlung von Patienten mit MWS einen zusätzlichen positiven Effekt erreichen können. Unsere *in vitro* Daten weisen darauf hin, dass durch die Blockade des NLRP3 Inflammasoms die zusätzliche Infiltration von Neutrophilen ins Gewebe vermindert werden könnte, was zu weniger Gewebeschaden und einem besseren klinischen Outcome der Patienten führen könnte.

7. Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten haben in der Immunabwehr eine unerlässliche Funktion für die Bekämpfung von Pathogenen. Die Regulation der Leukozyten-Rekrutierungskaskade und somit die Transmigration des Neutrophilen ins entzündete Gewebe stellt dabei einen kritischen Punkt dar. In dieser fein-abgestimmten Kaskade spielt wiederum MRP8/14 als β 2-Integrin Aktivator eine entscheidende Rolle. Lange Zeit wurde über den Freisetzungsmechanismus von MRP8/14 aus neutrophilen Granulozyten spekuliert. Mit dieser Arbeit wird erstmals eine Inflammasom-abhängige Freisetzung von MRP8/14 aus dem Neutrophilen beschrieben. Bisherige Studien konzentrierten sich vor allem auf die Untersuchung der Funktionalität des Inflammasoms in Makrophagen und Monozyten. Hier konnten wir erstmals zeigen, dass die E-Selektin PSGL-1 Interaktion während des Neutrophilen Rollens zu einer rapiden Caspase-1 Aktivierung führt. Diese ist unabhängig von TLR4, da Vorbehandlung der Neutrophilen mit Paquinimod und anti-TLR4 vor E-Selektin Stimulation nicht zu einer verringerten Caspase-1 Aktivierung führt. In einem darauffolgenden NLRP3-abhängigen Schritt wird GSDMD geschnitten und führt nach seiner Translokation zur Plasmamembran zur Freisetzung von MRP8/14 über die gebildeten GSDMD Poren. Genetische Deletion in neutrophilen Granulozyten von GSDMD und Caspase-1/11 führten zur Inhibition der E-Selektin-abhängigen MRP8/14 Freisetzung *in vitro* und *in vivo*. In Monozyten und Makrophagen ist eine zweistufige NLRP3 Aktivierung zur ausreichenden Freisetzung von IL-1 β vonnöten. Dabei kommt es zunächst zur NF κ B-abhängigen transkriptionellen Hochregulierung von Proteinen. Im Gegensatz dazu scheint die schnelle NLRP3 Aktivierung in Neutrophilen unabhängig von einer transkriptionellen Hochregulierung der Inflammasombestandteile zu sein und geschieht innerhalb weniger Minuten. Die aktiven Fragmente von Caspase-1 und GSDMD konnten bereits nach 10 Minuten Stimulation mit E-Selektin im Überstand nachgewiesen werden. Ähnlich wie in der vorbeschriebenen Literatur, konnten wir als zelluläres Signal, dass nach E-Selektin PSGL-1 Interaktion zur NLRP3 Aktivierung führt, den Efflux von K⁺ identifizieren. Die physiologische Rolle des Inflammasoms in Neutrophilen konnte mithilfe der *in vitro* Flusskammerdaten belegt werden. So führt die Inhibition von NLRP3, beziehungsweise der Knockout von Caspase-1/11 und GSDMD zu einer erhöhten Rollgeschwindigkeit der Neutrophilen. Damit werden wichtige Bestandteile des Inflammasoms in Neutrophilen nicht nur exprimiert, sondern sind essenziell für die Funktion des Neutrophilen als Immunzelle. Weitere Studien sind

nötig, um die genauen molekularen Schlüsselsignale der NLRP3 Aktivierung im Neutrophilen zu identifizieren und die Rolle des NLRP3 Inflammasoms für die Funktion von Neutrophilen aufzuklären.

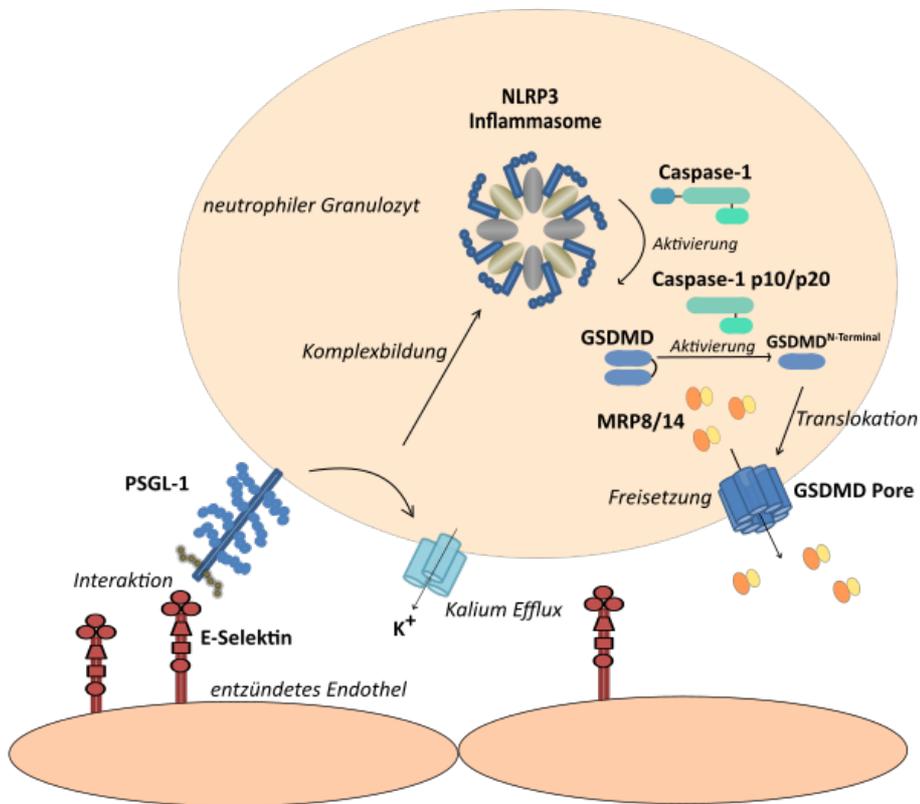


Abbildung 7.1: Die NLRP3-abhängige Freisetzung von MRP8/14 im neutrophilen Granulozyten

Während der neutrophile Granulozyt über das entzündete Gewebe rollt, kommt es zur Interaktion zwischen E-Selektin und PSGL-1. Diese Interaktion führt über den Efflux von K⁺ zur NLRP3 Inflammasom Komplexbildung. Nachfolgend wird zunächst Caspase-1 in sein aktives Caspase-1 p10/p20 Fragment und GSDMD in sein GSDMDN-Terminal geschnitten. Durch eine Translokation der GSDMDN-Terminal Fragmente kommt es zur GSDMD Porenbildung. Über diese Poren findet schließlich die Freisetzung von MRP8/14 statt.

8. Abstract (English)

Neutrophilic granulocytes are the first line of immune defense and therefore have an indispensable function in combating pathogens. The regulation of the leukocyte recruitment cascade and thus transmigration of the neutrophil into inflamed tissue represents a critical point. In this fine-tuned cascade, MRP8/14 plays a crucial role as a β 2 integrin activator. For a long time, the release mechanism of MRP8/14 from neutrophilic granulocytes remained unknown. This work is the first to describe an inflammasome-dependent release of MRP8/14 from neutrophils. Previous studies have focused primarily on examining the functionality of the inflammasome in macrophages and monocytes. Here, we demonstrate that E-selectin PSGL-1 interaction leads to rapid caspase-1 activation. This is independent of TLR4, as pretreatment of neutrophils with paquinimod and anti-TLR4 before E-selectin stimulation does not lead to reduced caspase-1 activation. Following a NLRP3-dependent step, GSDMD is cleaved, translocates to the plasma membrane and subsequently leads to the release of MRP8/14 via pores. Genetic deletion of GSDMD and caspase-1/11 in neutrophils abolishes E-selectin-dependent MRP8/14 release *in vitro* and *in vivo*. In monocytes and macrophages, priming of and subsequent activation of NLRP3 is required for sufficient release of IL-1 β . This initially results in a NF κ B-dependent transcriptional upregulation of proteins. In contrast, rapid NLRP3 activation in neutrophils appears to be independent of transcriptional upregulation and occurs within minutes. The active fragments of caspase-1 and GSDMD could be detected in the supernatant after only 10 minutes of stimulation with E-selectin. Similar to recent findings we identified potassium efflux as the cellular signal leading to NLRP3 activation after E-selectin PSGL-1 interaction. In our *in vitro* flow chamber data we could show the physiological role of the inflammasome in neutrophils. Inhibition of NLRP3 or knockout of caspase-1/11 or GSDMD, respectively, leads to increased neutrophil rolling velocity *in vitro*. Thus, important components of the inflammasome are not only expressed in neutrophils but are essential for neutrophil function as immune cell. Further studies are needed to identify the precise molecular key signals of NLRP3 activation in neutrophils and to certify the role of the NLRP3 inflammasome in neutrophil function.

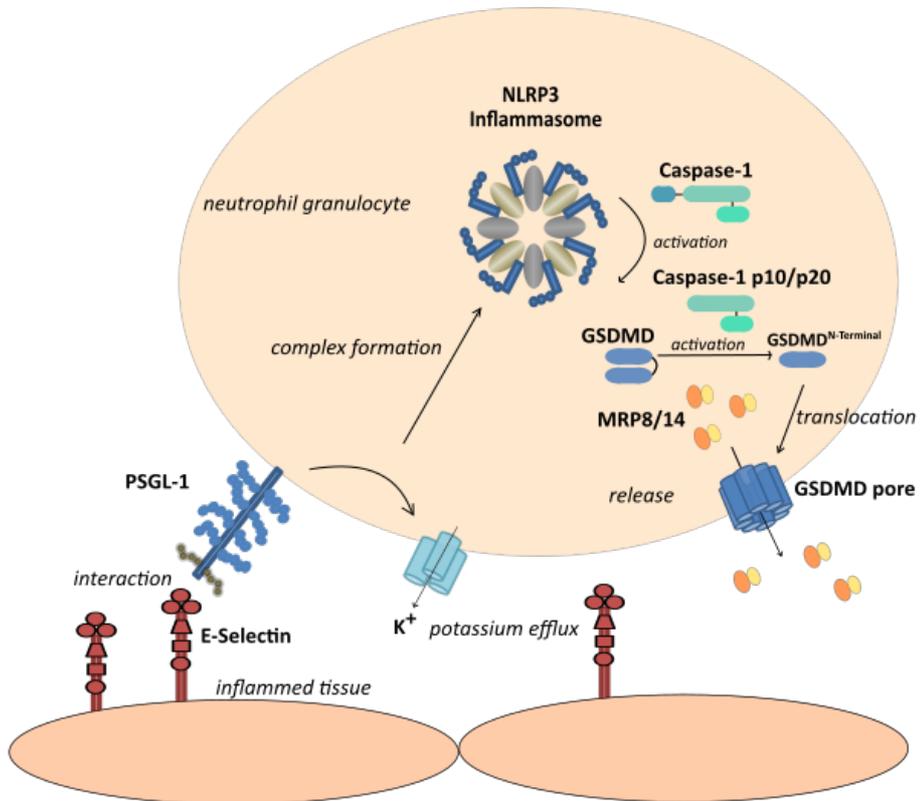


Abbildung 8.1: NLRP3-dependent release of MRP8/14 in neutrophils.

E-Selectin dependent-rolling of neutrophils on inflamed tissue leads to rapid, potassium efflux-dependent NLRP3 activation. NLRP3 activation leads to Caspase-1 cleavage followed by the cleavage of GSDMD into the active GSDMD^{N-Terminal} subunit. GSDMD^{N-Terminal} translocates to the plasma membrane subsequently leading to MRP8/14 release via GSDMD pores.

9. Literaturverzeichnis

Abi Abdallah, Delbert S.; Egan, Charlotte E.; Butcher, Barbara A.; Denkers, Eric Y. (2011): Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. In: *International immunology* 23 (5), S. 317–326. DOI: 10.1093/intimm/dxr007.

Adrover, José M.; Nicolás-Ávila, José A.; Hidalgo, Andrés (2016): Aging: A Temporal Dimension for Neutrophils. In: *Trends in immunology* 37 (5), S. 334–345. DOI: 10.1016/j.it.2016.03.005.

Allen, Irving C.; TeKippe, Erin McElvania; Woodford, Rita-Marie T.; Uronis, Joshua M.; Holl, Eda K.; Rogers, Arlin B. et al. (2010): The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. In: *The Journal of experimental medicine* 207 (5), S. 1045–1056. DOI: 10.1084/jem.20100050.

Bakele, Martina; Joos, Melanie; Burdi, Sofia; Allgaier, Nicolas; Pöschel, Simone; Fehrenbacher, Birgit et al. (2014): Localization and functionality of the inflammasome in neutrophils. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (8), S. 5320–5329. DOI: 10.1074/jbc.M113.505636.

Bass, J. J.; Wilkinson, D. J.; Rankin, D.; Phillips, B. E.; Szewczyk, N. J.; Smith, K.; Atherton, P. J. (2017): An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. In: *Scandinavian journal of medicine & science in sports* 27 (1), S. 4–25. DOI: 10.1111/sms.12702.

Bauernfeind, Franz G.; Horvath, Gabor; Stutz, Andrea; Alnemri, Emad S.; MacDonald, Kelly; Speert, David et al. (2009): Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (2), S. 787–791. DOI: 10.4049/jimmunol.0901363.

Begandt, Daniela; Thome, Sarah; Sperandio, Markus; Walzog, Barbara (2017): How neutrophils resist shear stress at blood vessel walls: molecular mechanisms, subcellular structures, and cell-cell interactions. In: *Journal of leukocyte biology* 102 (3), S. 699–709. DOI: 10.1189/jlb.3MR0117-026RR.

Bergsbaken, Tessa; Fink, Susan L.; Cookson, Brad T. (2009): Pyroptosis: host cell death and inflammation. In: *Nature reviews. Microbiology* 7 (2), S. 99–109. DOI: 10.1038/nrmicro2070.

Berlin, C.; Bargatze, R.F; Campbell, J.J; Andrian, U.H von; Szabo, M.C; Hasslen, S.R et al. (1995): $\alpha 4$ integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. In: *Cell* 80 (3), S. 413–422. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90491-3.

Bianchi, Marco E. (2007): DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. In: *Journal of leukocyte biology* 81 (1), S. 1–5. DOI: 10.1189/jlb.0306164.

- Björk, Per; Björk, Anders; Vogl, Thomas; Stenström, Martin; Liberg, David; Olsson, Anders et al. (2009): Identification of human S100A9 as a novel target for treatment of autoimmune disease via binding to quinoline-3-carboxamides. In: *PLoS biology* 7 (4), e97. DOI: 10.1371/journal.pbio.1000097.
- Bonifacino, Juan S.; Glick, Benjamin S. (2004): The Mechanisms of Vesicle Budding and Fusion. In: *Cell* 116 (2), S. 153–166. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)01079-1.
- Bonilla, Francisco A.; Oettgen, Hans C. (2010): Adaptive immunity. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S33-40. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.09.017.
- Booshehri, Laela M.; Hoffman, Hal M. (2019): CAPS and NLRP3. In: *Journal of clinical immunology* 39 (3), S. 277–286. DOI: 10.1007/s10875-019-00638-z.
- Borregaard, N.; Cowland, J. B. (1997): Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. In: *Blood* 89 (10), S. 3503–3521.
- Borregaard, Niels (2010): Neutrophils, from marrow to microbes. In: *Immunity* 33 (5), S. 657–670. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.11.011.
- Boucher, Dave; Monteleone, Mercedes; Coll, Rebecca C.; Chen, Kaiwen W.; Ross, Connie M.; Teo, Jessica L. et al. (2018): Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. In: *The Journal of experimental medicine* 215 (3), S. 827–840. DOI: 10.1084/jem.20172222.
- Broz, Petr; Dixit, Vishva M. (2016): Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. In: *Nature reviews. Immunology* 16 (7), S. 407–420. DOI: 10.1038/nri.2016.58.
- Carman, Christopher V.; Springer, Timothy A. (2008): Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. In: *Current opinion in cell biology* 20 (5), S. 533–540. DOI: 10.1016/j.ceb.2008.05.007.
- Chaplin, David D. (2010): Overview of the immune response. In: *The Journal of allergy and clinical immunology* 125 (2 Suppl 2), S3-23. DOI: 10.1016/j.jaci.2009.12.980.
- Chen, Juerong; Zhong, Bing; Wang, Yong (2017): Agranulocytosis Induced by Sinomenine Hydrochloride. In: *The American journal of case reports* 18, S. 959–962. DOI: 10.12659/ajcr.904519.
- Chen, Kaiwen W.; Bezbradica, Jelena S.; Groß, Christina J.; Wall, Adam A.; Sweet, Matthew J.; Stow, Jennifer L.; Schroder, Kate (2016): The murine neutrophil NLRP3 inflammasome is activated by soluble but not particulate or crystalline agonists. In: *European journal of immunology* 46 (4), S. 1004–1010. DOI: 10.1002/eji.201545943.

Chen, Kaiwen W.; Demarco, Benjamin; Broz, Petr (2020): Beyond inflammasomes: emerging function of gasdermins during apoptosis and NETosis. In: *The EMBO journal* 39 (2), e103397. DOI: 10.15252/embj.2019103397.

Chen, Kaiwen W.; Groß, Christina J.; Sotomayor, Flor Vásquez; Stacey, Katryn J.; Tschopp, Jurg; Sweet, Matthew J.; Schroder, Kate (2014): The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1 β maturation without pyroptosis during acute Salmonella challenge. In: *Cell reports* 8 (2), S. 570–582. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.06.028.

Chen, Kaiwen W.; Monteleone, Mercedes; Boucher, Dave; Sollberger, Gabriel; Ramnath, Divya; Condon, Nicholas D. et al. (2018): Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. In: *Science immunology* 3 (26). DOI: 10.1126/sciimmunol.aar6676.

Chesnutt, Betsy C.; Smith, David F.; Raffler, Nikolai A.; Smith, Michael L.; White, E. J.; Ley, Klaus (2006): Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. In: *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 13 (2), S. 99–109. DOI: 10.1080/10739680500466376.

Colotta, F.; Re, F.; Polentarutti, N.; Sozzani, S.; Mantovani, A. (1992): Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. In: *Blood* 80 (8), S. 2012–2020. DOI: 10.1182/blood.V80.8.2012.2012.

Dancey, J. T.; Deubelbeiss, K. A.; Harker, L. A.; Finch, C. A. (1976): Neutrophil kinetics in man. In: *The Journal of clinical investigation* 58 (3), S. 705–715. DOI: 10.1172/JCI108517.

Dempsey, P. W.; Allison, M. E.; Akkaraju, S.; Goodnow, C. C.; Fearon, D. T. (1996): C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 271 (5247), S. 348–350. DOI: 10.1126/science.271.5247.348.

Di, Anke; Xiong, Shiqin; Ye, Zhiming; Malireddi, R. K. Subbarao; Kometani, Satoshi; Zhong, Ming et al. (2018): The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. In: *Immunity* 49 (1), 56–65.e4. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.04.032.

Ding, Jingjin; Wang, Kun; Liu, Wang; She, Yang; Sun, Qi; Shi, Jianjin et al. (2016): Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. In: *Nature* 535 (7610), S. 111–116. DOI: 10.1038/nature18590.

Edgeworth, J.; Gorman, M.; Bennett, R.; Freemont, P.; Hogg, N. (1991): Identification of p8,14 as a highly abundant heterodimeric calcium binding protein complex of myeloid cells. In: *The Journal of biological chemistry* 266 (12), S. 7706–7713.

-
- Evavold, Charles L.; Ruan, Jianbin; Tan, Yunhao; Xia, Shiyu; Wu, Hao; Kagan, Jonathan C. (2018): The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. In: *Immunity* 48 (1), 35–44.e6. DOI: 10.1016/j.immuni.2017.11.013.
- Fingerhutová, Šárka; Fráňová, Jana; Hlaváčková, Eva; Jančová, Eva; Procházková, Leona; Beránková, Kamila et al. (2019): Muckle-Wells Syndrome Across Four Generations in One Czech Family: Natural Course of the Disease. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 802. DOI: 10.3389/fimmu.2019.00802.
- Franchi, Luigi; Eigenbrod, Tatjana; Núñez, Gabriel (2009): Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183 (2), S. 792–796. DOI: 10.4049/jimmunol.0900173.
- Frosch, Michael; Strey, Anke; Vogl, Thomas; Wulffraat, Nico M.; Kuis, Wietse; Sunderkötter, Cord et al. (2000): Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. In: *Arthritis & Rheumatism* 43 (3), S. 628. DOI: 10.1002/1529-0131(200003)43:3<628::AID-ANR20>3.0.CO;2-X.
- Ganz, Tomas (2003): Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. In: *Nature reviews. Immunology* 3 (9), S. 710–720. DOI: 10.1038/nri1180.
- Ghavami, Saeid; Rashedi, Iran; Dattilo, Brian M.; Eshraghi, Mehdi; Chazin, Walter J.; Hashemi, Mohammad et al. (2008): S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. In: *Journal of leukocyte biology* 83 (6), S. 1484–1492. DOI: 10.1189/jlb.0607397.
- Guo, Haitao; Callaway, Justin B.; Ting, Jenny P-Y (2015): Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. In: *Nature medicine* 21 (7), S. 677–687. DOI: 10.1038/nm.3893.
- He, Wan-ting; Wan, Haoqiang; Hu, Lichen; Chen, Pengda; Wang, Xin; Huang, Zhe et al. (2015): Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. In: *Cell research* 25 (12), S. 1285–1298. DOI: 10.1038/cr.2015.139.
- Heilig, Rosalie; Dick, Mathias S.; Sborgi, Lorenzo; Meunier, Etienne; Hiller, Sebastian; Broz, Petr (2018): The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. In: *European journal of immunology* 48 (4), S. 584–592. DOI: 10.1002/eji.201747404.

Hirahashi, Junichi; Mekala, Divya; van Ziffle, Jessica; Xiao, Ling; Saffaripour, Simin; Wagner, Denisa D. et al. (2006): Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombo-hemorrhagic vasculopathy. In: *Immunity* 25 (2), S. 271–283. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.05.014.

Hornung, Veit; Bauernfeind, Franz; Halle, Annett; Samstad, Eivind O.; Kono, Hajime; Rock, Kenneth L. et al. (2008): Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. In: *Nature immunology* 9 (8), S. 847–856. DOI: 10.1038/ni.1631.

Huard, Bertrand; McKee, Thomas; Bosshard, Carine; Durual, Stéphane; Matthes, Thomas; Myit, Samir et al. (2008): APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (8), S. 2887–2895. DOI: 10.1172/JCI33760.

Immler, Roland; Simon, Scott I.; Sperandio, Markus (2018): Calcium signalling and related ion channels in neutrophil recruitment and function. In: *European journal of clinical investigation* 48 Suppl 2, e12964. DOI: 10.1111/eci.12964.

Johnson, Jennifer L.; Ramadass, Mahalakshmi; Haimovich, Ariela; McGeough, Matthew D.; Zhang, Jinzhong; Hoffman, Hal M.; Catz, Sergio D. (2017): Increased Neutrophil Secretion Induced by NLRP3 Mutation Links the Inflammasome to Azurophilic Granule Exocytosis. In: *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, S. 507. DOI: 10.3389/fcimb.2017.00507.

Johnson, Z.; Proudfoot, A. E.; Handel, T. M. (2005): Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. In: *Cytokine & growth factor reviews* 16 (6), S. 625–636. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2005.04.006.

Juliana, Christine; Fernandes-Alnemri, Teresa; Kang, Seokwon; Farias, Andrew; Qin, Fengsong; Alnemri, Emad S. (2012): Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (43), S. 36617–36622. DOI: 10.1074/jbc.M112.407130.

Kagami, Shinji; Saeki, Hidehisa; Kuwano, Yoshihiro; Imakado, Sumihisa; Tamaki, Kunihiko (2006): A probable case of Muckle-Wells syndrome. In: *The Journal of dermatology* 33 (2), S. 118–121. DOI: 10.1111/j.1346-8138.2006.00025.x.

Kambara, Hiroto; Liu, Fei; Zhang, Xiaoyu; Liu, Peng; Bajrami, Besnik; Teng, Yan et al. (2018): Gasdermin D Exerts Anti-inflammatory Effects by Promoting Neutrophil Death. In: *Cell reports* 22 (11), S. 2924–2936. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.02.067.

Karmakar, Mausita; Katsnelson, Michael; Malak, Hesham A.; Greene, Neil G.; Howell, Scott J.; Hise, Amy G. et al. (2015): Neutrophil IL-1 β processing induced by pneumolysin is mediated by the NLRP3/ASC inflammasome and caspase-1 activation and is dependent on K⁺ efflux. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (4), S. 1763–1775. DOI: 10.4049/jimmunol.1401624.

Karmakar, Mausita; Katsnelson, Michael A.; Dubyak, George R.; Pearlman, Eric (2016): Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. In: *Nature communications* 7, S. 10555. DOI: 10.1038/ncomms10555.

Karmakar, Mausita; Minns, Martin; Greenberg, Elyse N.; Diaz-Aponte, Jose; Pestonjamas, Kersi; Johnson, Jennifer L. et al. (2020): N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1 β release independently of plasma membrane pores and pyroptosis. In: *Nature communications* 11 (1), S. 2212. DOI: 10.1038/s41467-020-16043-9.

Katsnelson, Michael A.; Lozada-Soto, Kristen M.; Russo, Hana M.; Miller, Barbara A.; Dubyak, George R. (2016): NLRP3 inflammasome signaling is activated by low-level lysosome disruption but inhibited by extensive lysosome disruption: roles for K⁺ efflux and Ca²⁺ influx. In: *American journal of physiology. Cell physiology* 311 (1), C83-C100. DOI: 10.1152/ajpcell.00298.2015.

Katsnelson, Michael A.; Rucker, L. Graham; Russo, Hana M.; Dubyak, George R. (2015): K⁺ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca²⁺ signaling. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 194 (8), S. 3937–3952. DOI: 10.4049/jimmunol.1402658.

Kelley, Nathan; Jeltema, Devon; Duan, Yanhui; He, Yuan (2019): The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. In: *International Journal of Molecular Sciences* 20 (13). DOI: 10.3390/ijms20133328.

Kerkhoff, Claus; Klempt, Martin; Sorg, Clemens (1998): Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1448 (2), S. 200–211. DOI: 10.1016/s0167-4889(98)00144-x.

Kopeć-Mędrek, Magdalena; Widuchowska, Małgorzata; Kucharz, Eugeniusz J. (2016): Calprotectin in rheumatic diseases: a review. In: *Reumatologia* 54 (6), S. 306–309. DOI: 10.5114/reum.2016.64907.

Korndörfer, Ingo P.; Brueckner, Florian; Skerra, Arne (2007): The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. In: *Journal of molecular biology* 370 (5), S. 887–898. DOI: 10.1016/j.jmb.2007.04.065.

Kurz, Angela R. M.; Pruenster, Monika; Rohwedder, Ina; Ramadass, Mahalakshmi; Schäfer, Kerstin; Harrison, Ute et al. (2016): MST1-dependent vesicle trafficking regulates neutrophil transmigration through the vascular basement membrane. In: *The Journal of clinical investigation* 126 (11), S. 4125–4139. DOI: 10.1172/JCI87043.

Lamkanfi, Mohamed; Dixit, Vishva M. (2012): Inflammasomes and their roles in health and disease. In: *Annual review of cell and developmental biology* 28, S. 137–161. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101011-155745.

Lanier, Lewis L.; Sun, Joseph C. (2009): Do the terms innate and adaptive immunity create conceptual barriers? In: *Nature reviews. Immunology* 9 (5), S. 302–303. DOI: 10.1038/nri2547.

Lee, Geun-Shik; Subramanian, Naeha; Kim, Andrew I.; Aksentijevich, Ivona; Goldbach-Mansky, Raphaela; Sacks, David B. et al. (2012): The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca²⁺ and cAMP. In: *Nature* 492 (7427), S. 123–127. DOI: 10.1038/nature11588.

Lee, Hye Eun; Lee, Jin Young; Yang, Gabsik; Kang, Han Chang; Cho, Yong-Yeon; Lee, Hye Suk; Lee, Joo Young (2019): Inhibition of NLRP3 inflammasome in tumor microenvironment leads to suppression of metastatic potential of cancer cells. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 12277. DOI: 10.1038/s41598-019-48794-x.

Ley, Klaus; Laudanna, Carlo; Cybulsky, Myron I.; Nourshargh, Sussan (2007): Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. In: *Nature reviews. Immunology* 7 (9), S. 678–689. DOI: 10.1038/nri2156.

Lillard, J. W.; Boyaka, P. N.; Chertov, O.; Oppenheim, J. J.; McGhee, J. R. (1999): Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (2), S. 651–656. DOI: 10.1073/pnas.96.2.651.

Lin, Keng-Mean; Hu, Wei; Troutman, Ty Dale; Jennings, Michelle; Brewer, Travis; Li, Xiaoxia et al. (2014): IRAK-1 bypasses priming and directly links TLRs to rapid NLRP3 inflammasome activation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (2), S. 775–780. DOI: 10.1073/pnas.1320294111.

Lokuta, Mary A.; Cooper, Kate M.; Aksentijevich, Ivona; Kastner, Daniel L.; Huttenlocher, Anna (2005): Neutrophil chemotaxis in a patient with neonatal-onset multisystem inflammatory disease and Muckle-Wells syndrome. In: *Annals of allergy, asthma & immunology : official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology* 95 (4), S. 394–399. DOI: 10.1016/S1081-1206(10)61159-3.

Luo, Bing-Hao; Carman, Christopher V.; Springer, Timothy A. (2007): Structural basis of integrin regulation and signaling. In: *Annual review of immunology* 25, S. 619–647. DOI: 10.1146/annurev.immunol.25.022106.141618.

Lyczak, Jeffrey B.; Cannon, Carolyn L.; Pier, Gerald B. (2002): Lung infections associated with cystic fibrosis. In: *Clinical microbiology reviews* 15 (2), S. 194–222. DOI: 10.1128/CMR.15.2.194-222.2002.

Manevich-Mendelson, Eugenia; Feigelson, Sara W.; Pasvolsky, Ronit; Aker, Memet; Grabovsky, Valentin; Shulman, Ziv et al. (2009): Loss of Kindlin-3 in LAD-III eliminates LFA-1 but not VLA-4 adhesiveness developed under shear flow conditions. In: *Blood* 114 (11), S. 2344–2353. DOI: 10.1182/blood-2009-04-218636.

Mankan, Arun K.; Dau, Therese; Jenne, Dieter; Hornung, Veit (2012): The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 β processing in neutrophils. In: *European journal of immunology* 42 (3), S. 710–715. DOI: 10.1002/eji.201141921.

Marshall, Bryan T.; Long, Mian; Piper, James W.; Yago, Tadayuki; McEver, Rodger P.; Zhu, Cheng (2003): Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. In: *Nature* 423 (6936), S. 190–193. DOI: 10.1038/nature01605.

Marshall, Jean S.; Warrington, Richard; Watson, Wade; Kim, Harold L. (2018): An introduction to immunology and immunopathology. In: *Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology* 14 (Suppl 2), S. 49. DOI: 10.1186/s13223-018-0278-1.

Martinon, Fabio; Burns, Kimberly; Tschopp, Jürg (2002): The Inflammasome. In: *Molecular Cell* 10 (2), S. 417–426. DOI: 10.1016/S1097-2765(02)00599-3.

Mayadas, Tanya N.; Cullere, Xavier; Lowell, Clifford A. (2014): The multifaceted functions of neutrophils. In: *Annual review of pathology* 9, S. 181–218. DOI: 10.1146/annurev-pathol-020712-164023.

McCormick, Allison; Heesemann, Leonie; Wagener, Johannes; Marcos, Veronica; Hartl, Dominik; Loeffler, Jürgen et al. (2010): NETs formed by human neutrophils inhibit growth of the pathogenic mold *Aspergillus fumigatus*. In: *Microbes and infection* 12 (12-13), S. 928–936. DOI: 10.1016/j.micinf.2010.06.009.

Medzhitov, Ruslan; Janeway, Charles A. (2002): Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. In: *Science (New York, N.Y.)* 296 (5566), S. 298–300. DOI: 10.1126/science.1068883.

- Miao, Edward A.; Leaf, Irina A.; Treuting, Piper M.; Mao, Dat P.; Dors, Monica; Sarkar, Anasuya et al. (2010): Caspase-1-induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. In: *Nature immunology* 11 (12), S. 1136–1142. DOI: 10.1038/ni.1960.
- Miwa, K.; Asano, M.; Horai, R.; Iwakura, Y.; Nagata, S.; Suda, T. (1998): Caspase 1-independent IL-1beta release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. In: *Nature medicine* 4 (11), S. 1287–1292. DOI: 10.1038/3276.
- Moore, Blake W. (1965): A soluble protein characteristic of the nervous system. In: *Biochemical and Biophysical Research Communications* 19 (6), S. 739–744. DOI: 10.1016/0006-291X(65)90320-7.
- Muller, William A. (2011): Mechanisms of leukocyte transendothelial migration. In: *Annual review of pathology* 6, S. 323–344. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130224.
- Muñoz-Planillo, Raúl; Kuffa, Peter; Martínez-Colón, Giovanny; Smith, Brenna L.; Rajendiran, Thekkelnaycke M.; Núñez, Gabriel (2013): K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. In: *Immunity* 38 (6), S. 1142–1153. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.05.016.
- Murakami, Tomohiko; Ockinger, Johan; Yu, Jiujiu; Byles, Vanessa; McColl, Aisleen; Hofer, Aldebaran M.; Horng, Tiffany (2012): Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (28), S. 11282–11287. DOI: 10.1073/pnas.1117765109.
- Newton, R. A.; Hogg, N. (1998): The human S100 protein MRP-14 is a novel activator of the beta 2 integrin Mac-1 on neutrophils. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 160 (3), S. 1427–1435.
- Nourshargh, Sussan; Alon, Ronen (2014): Leukocyte migration into inflamed tissues. In: *Immunity* 41 (5), S. 694–707. DOI: 10.1016/j.immuni.2014.10.008.
- Pathirana, Wpn Ganga W.; Chubb, Sa Paul; Gillett, Melissa J.; Vasikaran, Samuel D. (2018): Faecal Calprotectin. In: *The Clinical Biochemist Reviews* 39 (3), S. 77–90.
- Pelletier, Martin; Maggi, Laura; Micheletti, Alessandra; Lazzeri, Elena; Tamassia, Nicola; Costantini, Claudio et al. (2010): Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. In: *Blood* 115 (2), S. 335–343. DOI: 10.1182/blood-2009-04-216085.

Perregaux, D.; Gabel, C. A. (1994): Interleukin-1 beta maturation and release in response to ATP and nigericin. Evidence that potassium depletion mediated by these agents is a necessary and common feature of their activity. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (21), S. 15195–15203.

Pétrilli, V.; Papin, S.; Dostert, C.; Mayor, A.; Martinon, F.; Tschopp, J. (2007): Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. In: *Cell death and differentiation* 14 (9), S. 1583–1589. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402195.

Phillipson, Mia; Heit, Bryan; Colarusso, Pina; Liu, Lixin; Ballantyne, Christie M.; Kubes, Paul (2006): Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (12), S. 2569–2575. DOI: 10.1084/jem.20060925.

Pruenster, Monika; Kurz, Angela R. M.; Chung, Kyoung-Jin; Cao-Ehlker, Xiao; Bieber, Stephanie; Nussbaum, Claudia F. et al. (2015): Extracellular MRP8/14 is a regulator of β 2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. In: *Nature communications* 6, S. 6915. DOI: 10.1038/ncomms7915.

Pruenster, Monika; Vogl, Thomas; Roth, Johannes; Sperandio, Markus (2016): S100A8/A9: From basic science to clinical application. In: *Pharmacology & therapeutics* 167, S. 120–131. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2016.07.015.

Rabouille, Catherine; Malhotra, Vivek; Nickel, Walter (2012): Diversity in unconventional protein secretion. In: *Journal of cell science* 125 (Pt 22), S. 5251–5255. DOI: 10.1242/jcs.103630.

Rammes, A.; Roth, J.; Goebeler, M.; Klempt, M.; Hartmann, M.; Sorg, C. (1997): Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (14), S. 9496–9502. DOI: 10.1074/jbc.272.14.9496.

Ravasi, Timothy; Hsu, Kenneth; Goyette, Jesse; Schroder, Kate; Yang, Zheng; Rahimi, Farid et al. (2004): Probing the S100 protein family through genomic and functional analysis. In: *Genomics* 84 (1), S. 10–22. DOI: 10.1016/j.ygeno.2004.02.002.

Rühl, Sebastian; Broz, Petr (2015): Caspase-11 activates a canonical NLRP3 inflammasome by promoting K(+) efflux. In: *European journal of immunology* 45 (10), S. 2927–2936. DOI: 10.1002/eji.201545772.

Rühl, Sebastian; Shkarina, Kateryna; Demarco, Benjamin; Heilig, Rosalie; Santos, José Carlos; Broz, Petr (2018): ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. In: *Science (New York, N.Y.)* 362 (6417), S. 956–960. DOI: 10.1126/science.aar7607.

- Salama, I.; Malone, P. S.; Mihaimeed, F.; Jones, J. L. (2008): A review of the S100 proteins in cancer. In: *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology* 34 (4), S. 357–364. DOI: 10.1016/j.ejso.2007.04.009.
- Sansonetti, Philippe J.; Phalipon, Armelle; Arondel, Josette; Thirumalai, Kavitha; Banerjee, Subhashis; Akira, Shizuo et al. (2000): Caspase-1 Activation of IL-1 β and IL-18 Are Essential for Shigella flexneri–Induced Inflammation. In: *Immunity* 12 (5), S. 581–590. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80209-5.
- Sarma, J. Vidya; Ward, Peter A. (2011): The complement system. In: *Cell and tissue research* 343 (1), S. 227–235. DOI: 10.1007/s00441-010-1034-0.
- Shamri, Revital; Grabovsky, Valentin; Gauguet, Jean-Marc; Feigelson, Sara; Manevich, Eugenia; Kolanus, Waldemar et al. (2005): Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. In: *Nature immunology* 6 (5), S. 497–506. DOI: 10.1038/ni1194.
- Sheshachalam, Avinash; Srivastava, Nutan; Mitchell, Troy; Lacy, Paige; Eitzen, Gary (2014): Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. In: *Frontiers in immunology* 5, S. 448. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00448.
- Shi, Jianjin; Zhao, Yue; Wang, Kun; Shi, Xuyan; Wang, Yue; Huang, Huanwei et al. (2015): Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. In: *Nature* 526 (7575), S. 660–665. DOI: 10.1038/nature15514.
- Soehnlein, Oliver; Lindbom, Lennart (2010): Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. In: *Nature reviews. Immunology* 10 (6), S. 427–439. DOI: 10.1038/nri2779.
- Sohnle, P. G.; Hunter, M. J.; Hahn, B.; Chazin, W. J. (2000): Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). In: *The Journal of infectious diseases* 182 (4), S. 1272–1275. DOI: 10.1086/315810.
- Sollberger, Gabriel; Choidas, Axel; Burn, Garth Lawrence; Habenberger, Peter; Di Lucrezia, Raffaella; Kordes, Susanne et al. (2018): Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. In: *Science immunology* 3 (26). DOI: 10.1126/sciimmunol.aar6689.
- Sperandio, Markus; Gleissner, Christian A.; Ley, Klaus (2009): Glycosylation in immune cell trafficking. In: *Immunological reviews* 230 (1), S. 97–113. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2009.00795.x.

Stark, Matthew A.; Huo, Yuqing; Burcin, Tracy L.; Morris, Margaret A.; Olson, Timothy S.; Ley, Klaus (2005): Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. In: *Immunity* 22 (3), S. 285–294. DOI: 10.1016/j.immuni.2005.01.011.

Stroncek, David F.; Shankar, Raji A.; Skubitz, Keith M. (2005): The subcellular distribution of myeloid-related protein 8 (MRP8) and MRP14 in human neutrophils. In: *Journal of translational medicine* 3, S. 36. DOI: 10.1186/1479-5876-3-36.

Strupat, Kerstin; Rogniaux, H el ene; van Dorsselaer, Alain; Roth, Johannes; Vogl, Thomas (2000): Calcium-induced noncovalently linked tetramers of MRP8 and MRP14 are confirmed by electrospray ionization-mass analysis. In: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 11 (9), S. 780–788. DOI: 10.1016/S1044-0305(00)00150-1.

Sun, Yan; Abbondante, Serena; Karmakar, Mausita; Jesus Carrion, Steven de; Che, Chengye; Hise, Amy G.; Pearlman, Eric (2018): Neutrophil Caspase-11 Is Required for Cleavage of Caspase-1 and Secretion of IL-1 β in *Aspergillus fumigatus* Infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 201 (9), S. 2767–2775. DOI: 10.4049/jimmunol.1701195.

Suratt, B. T.; Young, S. K.; Lieber, J.; Nick, J. A.; Henson, P. M.; Worthen, G. S. (2001): Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. In: *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 281 (4), L913-21. DOI: 10.1152/ajplung.2001.281.4.L913.

Swanson, K.V., Deng, M. & Ting, J.PY. (2019): The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. In: *Nat Rev Immunol* 19, 477–489 DOI: 10.1038/s41577-019-0165-0

Calzetti, Federica; Cassatella, Marco A. (2018): Cytokine production by human neutrophils: Revisiting the "dark side of the moon". In: *European journal of clinical investigation* 48 Suppl 2, e12952. DOI: 10.1111/eci.12952.

Tardif, M elanie R.; Chapeton-Montes, Julie Andrea; Posvanzdic, Alma; Pag e, Nathalie; Gilbert, Caroline; Tessier, Philippe A. (2015): Secretion of S100A8, S100A9, and S100A12 by Neutrophils Involves Reactive Oxygen Species and Potassium Efflux. In: *Journal of immunology research* 2015, S. 296149. DOI: 10.1155/2015/296149.

Tran, Tu-Anh (2017): Muckle-Wells syndrome: clinical perspectives. In: *Open access rheumatology : research and reviews* 9, S. 123–129. DOI: 10.2147/OARRR.S114447.

Urzainqui, Ana; Serrador, Juan M.; Viedma, Fernando; Yáñez-Mó, María; Rodríguez, Antonio; Corbí, Angel L. et al. (2002): ITAM-Based Interaction of ERM Proteins with Syk Mediates Signaling by the Leukocyte Adhesion Receptor PSGL-1. In: *Immunity* 17 (4), S. 401–412. DOI: 10.1016/S1074-7613(02)00420-X.

Viemann, Dorothee; Strey, Anke; Janning, Annette; Jurk, Kerstin; Klimmek, Kerstin; Vogl, Thomas et al. (2005): Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. In: *Blood* 105 (7), S. 2955–2962. DOI: 10.1182/blood-2004-07-2520.

Vivier, Eric; Malissen, Bernard (2005): Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. In: *Nature immunology* 6 (1), S. 17–21. DOI: 10.1038/ni1153.

Vivier, Eric; Raulet, David H.; Moretta, Alessandro; Caligiuri, Michael A.; Zitvogel, Laurence; Lanier, Lewis L. et al. (2011): Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 331 (6013), S. 44–49. DOI: 10.1126/science.1198687.

Vogl, Thomas; Ludwig, Stephan; Goebeler, Matthias; Strey, Anke; Thorey, Irmgard S.; Reichelt, Rudolf et al. (2004): MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. In: *Blood* 104 (13), S. 4260–4268. DOI: 10.1182/blood-2004-02-0446.

Vogl, Thomas; Stratis, Athanasios; Wixler, Viktor; Völler, Tom; Thurainayagam, Sumita; Jorch, Selina K. et al. (2018): Autoinhibitory regulation of S100A8/S100A9 alarmin activity locally restricts sterile inflammation. In: *The Journal of clinical investigation* 128 (5), S. 1852–1866. DOI: 10.1172/JCI89867.

Wegmann, Frank; Petri, Björn; Khandoga, Alexander Georg; Moser, Christian; Khandoga, Andrej; Volkery, Stefan et al. (2006): ESAM supports neutrophil extravasation, activation of Rho, and VEGF-induced vascular permeability. In: *The Journal of experimental medicine* 203 (7), S. 1671–1677. DOI: 10.1084/jem.20060565.

Witko-Sarsat, V.; Rieu, P.; Descamps-Latscha, B.; Lesavre, P.; Halbwachs-Mecarelli, L. (2000): Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80 (5), S. 617–653. DOI: 10.1038/labinvest.3780067.

Wittkowski, Helmut; Kuemmerle-Deschner, Jasmin B.; Austermann, Judith; Holzinger, Dirk; Goldbach-Mansky, Raphaela; Gramlich, Katharina et al. (2011): MRP8 and MRP14, phagocyte-specific danger signals, are sensitive biomarkers of disease activity in cryopyrin-associated periodic syndromes. In: *Annals of the rheumatic diseases* 70 (12), S. 2075–2081. DOI: 10.1136/ard.2011.152496.

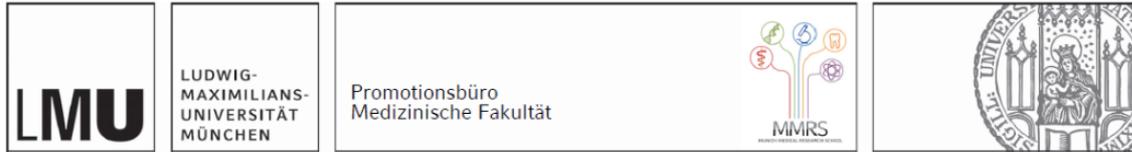
de Yang; Oppenheim, Joost J. (2004): Antimicrobial proteins act as "alarmins" in joint immune defense. In: *Arthritis and rheumatism* 50 (11), S. 3401–3403. DOI: 10.1002/art.20604.

Zahid, Ayesha; Li, Bofeng; Kombe, Arnaud John Kombe; Jin, Tengchuan; Tao, Jinhui (2019): Pharmacological Inhibitors of the NLRP3 Inflammasome. In: *Frontiers in immunology* 10, S. 2538. DOI: 10.3389/fimmu.2019.02538.

10. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle Prof. Dr. Markus Sperandio für die einmalige Möglichkeit an diesem Projekt mitzuwirken. Des Weiteren möchte ich mich bei meiner direkten Betreuerin Dr. rer. nat. Monika Prünster für die aufgebrachte Geduld und die großartige Betreuung bedanken. Zudem bedanke ich mich bei allen Labormitgliedern für eine sehr lehrreiche, aber oft auch lustige Zeit. Dabei möchte ich insbesondere Dr. rer. nat. Roland Immler und Dr. rer. nat. Ina Rohwedder erwähnen, für den oft sehr hilfreichen Input bei der Auswertung und den Methoden. Mein Dank gilt auch unseren Kooperationspartnern Prof. Dr. Petr Broz, Prof. Dr. Veit Hornung und Prof. Dr. Thomas Vogl, welche einen großen Anteil am Erfolg dieses Projektes tragen. Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, insbesondere aber bei meinem Großvater für die frühe naturwissenschaftliche Ausbildung.

11. Affidavit



Eidesstattliche Versicherung

Kuchler, Timon

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

Die NLRP3-abhängige Freisetzung von MRP8/14 im neutrophilen Granulozyten

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 30.3.23

Ort, Datum

Kuchler

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand

Lebenslauf

12. Publikationsliste

Transient gasdermin D pores control S100A8/A9 release from rolling neutrophils (currently under revision)