

Aus dem
Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Professor Dr. med. Christian Wahl-Schott

**Endogene Entzündungsmediatoren: neue Aspekte ihrer Freisetzung
und ihrer Rolle bei der Auslösung und Amplifizierung von
Entzündungsreaktionen**



Kumulative Habilitationsschrift

Zum Erlangen der Lehrbefugnis (venia legendi)

für das Fach Physiologie

vorgelegt von

Dr. rer. nat. Monika Prünster

(2024)

Fachmentorat

Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen

Prof. Dr. rer. nat. Jörg Renkawitz

Inhaltsverzeichnis

1. Vorwort.....	- 3 -
2. Einleitung	- 4 -
3. Zielsetzung.....	- 8 -
4. Verzeichnis der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen	- 9 -
5. Ergebnisse und Diskussion.....	- 10 -
5.1 Die E-Selektin induzierte Freisetzung von S100A8/A9 und dessen pro- entzündlicher Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung	- 10 -
5.2 Uromodulin als endogener Entzündungsmediator	- 18 -
5.3 Die Rolle von ACKR1/DARC beim trans-endothelialen Transport von endogenen Entzündungsmediatoren/Chemokinen	- 20 -
6. Zusammenfassung und Ausblick	- 23 -
7. Literaturverzeichnis	- 25 -
8. Abkürzungsverzeichnis	- 30 -
9. Danksagung.....	- 32 -

1. Vorwort

Im Rahmen der hier vorliegenden kumulativen Habilitation wurde untersucht, auf welchen Anreiz hin endogene Entzündungsmediatoren freigesetzt werden, welche Wirkung sie auf das Endothel und Zellen der angeborenen Immunität haben und wie deren Inhibition therapeutisch von Nutzen sein könnte. Die experimentellen Untersuchungen wurden am Institut für kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie (Direktor Prof. Dr. med. Christian Wahl Schott, ehemaliger Direktor Prof. Dr. med. Ulrich Pohl) an der LMU München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Markus Sperandio, in der eigenen Arbeitsgruppe, sowie am Novartis Institut für Biomedizinische Forschung Wien in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Antal Rot durchgeführt.

2. Einleitung

Entzündliche Veränderungen im Gewebe, welche durch Pathogene, aber auch in Folge einer sogenannten sterilen Inflammation, z.B. infolge eines Traumas entstehen können, bewirken immer auch eine entzündliche Veränderung des umliegenden vaskulären Endothels. Diese Veränderungen gehen mit einer Hochregulation von Selektinen (P-, und E-Selektin) und anderen Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 („Intercellular Adhesion Molecule-1“) und VCAM-1 („Vascular Adhesion Molecule-1“) einher und erlauben die Interaktion von Immunzellen des Blutes mit dem Endothel (Schmidt, Moser, & Sperandio, 2013). Neutrophile Granulozyten sind unter den ersten Zellen, die im Rahmen einer angeborenen Immunantwort aus postkapillären Venolen in entzündetes Gewebe auswandern, mit dem Ziel, Pathogene bzw. den entzündlichen Trigger zu eliminieren und das Gewebe in seiner ursprünglichen Form wiederherzustellen. Dieser sogenannte Rekrutierungsprozess von neutrophilen Granulozyten, der in ähnlicher Weise auch für Monozyten und andere Immunzellen vonstattengeht, findet in einer kaskadenartigen Weise statt, in der die einzelnen Schritte sequentiell ablaufen (Nourshargh & Alon, 2014; Reutershan et al., 2007; Schmidt et al., 2013). In einem ersten Schritt rollt dabei der neutrophile Granulozyt durch die Interaktion von PSGL-1 („P-Selectin Glycoprotein Ligand-1“, in der Maus) oder L-Selektin (im humanen System) mit P-und/oder E-Selektin am entzündeten Endothel entlang (**Abbildung 1**, Einfangen und Rollen, A) Dieses Rollen wiederum ermöglicht den Kontakt zwischen Chemokinrezeptoren (z.B. CXCR2) und dem entsprechenden entzündlichen Chemokin (z.B. CXCL1), das von Endothelzellen präsentiert wird (Rot & von Andrian, 2004) (**Abbildung 1**, Einfangen und Rollen, B). Im Zuge der Bindung eines Chemokins an den entsprechenden Chemokinrezeptor wird in der Immunzelle ein Signal initiiert, welches das sogenannte „inside-out signaling“ auslöst und zu einer Aktivierung von Integrinen führt (**Abbildung 1**, Einfangen und Rollen, B). Bei neutrophilen Granulozyten spielen hierbei vor allem $\beta 2$ Integrine eine zentrale Rolle. Diese gehen dabei von einer inaktiven Konformationsform („low bent state“) in eine aktive Form („extended state“) über, was wiederum eine optimale Bindung des Integrins an Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1) am Endothel ermöglicht (**Abbildung 1**, Adhäsion und Kriechen, C) und in der Folge in der festen Adhäsion der Immunzelle an das Endothel mündet. Diese Bindung wiederum initiiert das sogenannte „outside-in signaling“. Dieser Signalweg beinhaltet

einen kontinuierlichen Calciumeinstrom, welcher zwingend erforderlich ist für die darauffolgenden „Post-Arrest-Modifikationen“. Diese Modifikationen gehen einher mit einer Neuordnung des Zytoskelettes, die Zelle flacht ab („flattening“), bildet Pseudopodien aus („spreading“) und haftet fest am entzündeten Endothel, um im nächsten Schritt mittels des sogenannten „crawlings“, einem langsamen Kriechen entlang der Gefäßwand, eine geeignete Transmigrationsstelle zu suchen und dort auszuwandern. Durch das Abflachen der Zelle und dem Ausbilden der Pseudopodien wird verhindert, dass die im Gefäß herrschende Schubspannung die Zelle wieder in die Zirkulation „mitreißt“ (**Abbildung 1**, Adhäsion und Kriechen). Durch das Entlangkriechen am Endothel sucht sich der neutrophile Granulozyt schlussendlich eine geeignete Stelle, die Endothelschicht und nachfolgend die vaskuläre Basalmembran zu durchdringen, um dadurch an den Ort der Entzündung zu gelangen (**Abbildung 1**, Transmigration).

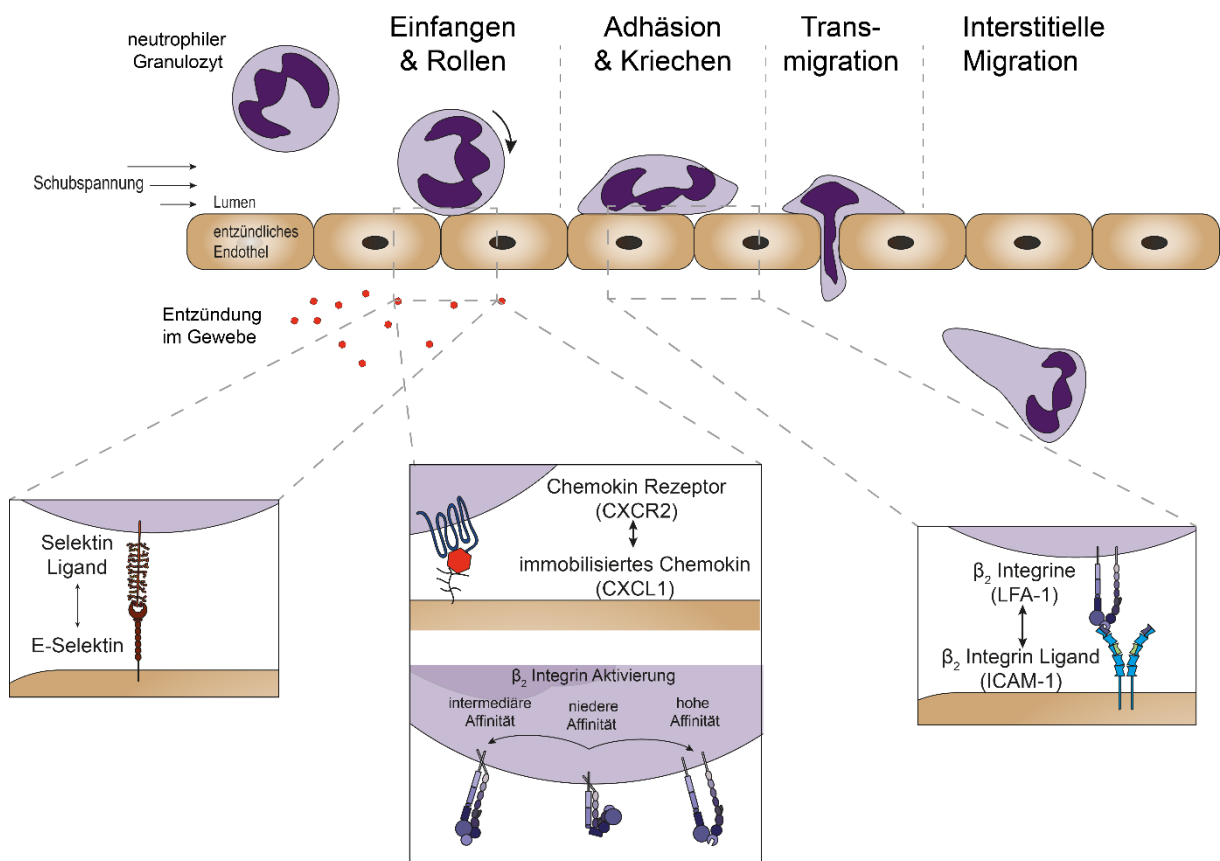


Abbildung 1: Darstellung der Leukozytenrekretion, Abbildung modifiziert nach Immler (Immler, 2019).

Im Zuge der angeborenen Immunantwort spielen während der frühen Entzündungsreaktion zum einen PAMP („Pathogen Associated Molecular Pattern“)

Moleküle, welche von Pathogenen freigesetzt werden, zum anderen endogen freigesetzte Entzündungsmediatoren, sogenannte DAMPs („Damage/Danger Associated Molecular Pattern) eine zentrale Rolle. Unter homöostatischen Bedingungen befinden sich DAMPs im Inneren der Zelle. So findet man sie im Kern, im Zytosol und/oder in den Mitochondrien. Als Beispiel von kernlokalisierten DAMPs wären HMGB1 („High-mobility group protein B1“) oder Histone zu nennen, zu den mitochondrialen DAMPs gehört z.B. Cytochrom C und zur Gruppe der zytosolischen DAMPs gehören pro-entzündliche S100 Proteine, HSPs („Heat-Shock Proteine“) oder auch ATP („Adenosintriphosphat“) (Zindel & Kubes, 2020). Im Zuge einer sterilen (mechanischen, chemischen oder thermischen) Entzündung werden DAMPs aktiv oder als Folge von Zelltod passiv freigesetzt und bewirken über eine Bindung an den entsprechenden Pattern Recognition Rezeptor (PRR), wie z.B. TLRs („Toll-like Rezeptoren“) oder zytoplasmatische NLRs („Nod-like Rezeptoren“), eine Verstärkung der Entzündungsreaktion (Murao, Aziz, Wang, Brenner, & Wang, 2021; Zindel & Kubes, 2020). Zusätzlich können DAMPs auch an andere Rezeptoren, die als NICHT-PRRs bezeichnet werden, binden. Zu diesen gehören RAGE („Receptor for Advanced Glycation End Products“), sogenannte TREMs („Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells“), verschiedene G-protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) oder auch Ionenkanäle (Gong, Liu, Jiang, & Zhou, 2020).

Die Bindung von DAMPs an den entsprechenden Rezeptor kann zum einen Immunzellen wie Mastzellen, Monozyten, NK Zellen, dendritische Zellen oder neutrophile Granulozyten direkt aktivieren, und dabei z.B. die Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren, wie Zytokine und Chemokine vermitteln (Gong et al., 2020). Zum anderen können DAMPs auch auf Nicht-Immunzellen, wie Epithelzellen, Endothelzellen und Fibroblasten einwirken und so z.B. entzündliche Veränderungen des Endothels hervorrufen. Dies hat wiederum einen pro-entzündlichen Einfluss, da als Folge der Veränderung am Endothel die Rekrutierung von Immunzellen ins entzündete Gewebe verstärkt wird. Die Menge der im Serum, im Stuhl oder in diversen Geweben befindlichen extrazellulären DAMPs korreliert aufgrund der pro-entzündlichen Wirkung häufig mit der Aktivität einer Erkrankung, weswegen DAMPs auch als Biomarker bei verschiedenen akuten und chronischen Erkrankungen verwendet werden (Barichello, Generoso, Singer, & Dal-Pizzol, 2022; Pruenster, Vogl, Roth, & Sperandio, 2016; Roh & Sohn, 2018). So weiß man z.B., dass es eine direkte Korrelation der im Serum befindlichen S100A8/A9 Mengen und der Schwere einer

Covid-19 Erkrankung gibt (Silvin et al., 2020). Die Hemmung der Freisetzung und/oder die Hemmung der Bindung an den jeweiligen Rezeptor wirkt sich in vielen Fällen positiv auf den Krankheitsverlauf aus (Pruenster et al., 2016; Roh & Sohn, 2018), weswegen es diverse klinischen Studien gab und gibt, welche die Interaktion von DAMPs mit den entsprechenden Rezeptoren zu inhibieren versuchen. In einer klinischen Phase III Studie wird die potentiell positive Auswirkung einer TLR4 Inhibition (mit dem TLR4 Inhibitor EB05) auf die Entwicklung von ARDS („Acute Respiratory Distress Syndrome) im Zuge einer Covid-19 Infektion untersucht (ClinicalTrials.gov; Identifier: NCT04401475). Auf der anderen Seite stellen DAMPs natürlich auch eine interessante Möglichkeit zur Aktivierung und Amplifizierung von Immunreaktionen dar. In einer klinischen Phase II Studie wird derzeit die Immunantwort auf das HS Protein gp96 zur Therapie von Glioblastom untersucht, mit dem Ziel, die Immunantwort zu fördern und Tumorzellen effektiver zu eliminieren (ClinicalTrials.gov; Identifier: NCT03650257).

Ein detailliertes Verständnis über die Freisetzung von endogenen Entzündungsmediatoren, von DAMPs und deren Wirkweise stellt somit einen wichtigen Beitrag zur Erforschung neuer Therapiemöglichkeiten bei akuten und chronischen Entzündungsreaktionen, bei Autoimmunerkrankungen, sowie bei Tumorerkrankungen dar.

3. Zielsetzung

Im Rahmen der vorliegenden Habilitationsschrift wurde untersucht, auf welche Anreize hin endogene Entzündungsmediatoren freigesetzt werden können, welche Ionenkanäle und intrazellulären Signalwege dabei essentiell sind, welche Wirkung die endogenen Entzündungsmediatoren und DAMP Moleküle S100A8/A9 und polymerisiertes Uromodulin auf Zellen der angeborenen Immunität haben und wie sie die Rekrutierung von Immunzellen direkt beeinflussen.

Des Weiteren wurde untersucht, wie Chemokine vom Ort der Entzündung durch das Endothel an die apikale Seite der Endothelzelle ins Blut transportiert werden können und somit Entzündungsreaktionen verstärken und wie der Ionenkanal $K_v1.3$ nicht nur die Freisetzung von DAMPs, sondern auch direkt die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten beeinflussen kann.

Die vorliegende Habilitationsschrift beschreibt Forschungsarbeiten aus dem Gebiet der Grundlagenforschung. Im Detail wurden folgende Themenschwerpunkte behandelt:

- Die E-Selektin induzierte Freisetzung von S100A8/A9 und deren pro-entzündlicher Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung
- Polymerisiertes Uromodulin als endogener Entzündungsmediator
- Die Rolle von ACKR1/DARC beim trans-endothelialen Transport von endogenen Entzündungsmediatoren/Chemokinen

4. Verzeichnis der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen

Pruenster M, Mudde L, Bombosi P, Dimitrova S, Zsak M, Middleton J, Richmond A, Graham GJ, Segerer S, Nibbs RJ and Rot A. "The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity," *Nat. Immunol.*, 2009. 1: 101-108. DOI: 10.1038/NI.1675

Pruenster M, Kurz AR, Chung KJ, Cao-Ehlker X, Bieber S, Nussbaum CF, Bierschenk S, Eggersmann TK, Rohwedder I, Heinig K, Immler R, Moser M, Koedel U, Gran S, McEver RP, Vestweber D, Verschoor A, Leanderson T, Chavakis T, Roth J, Vogl T, and Sperandio M. "Extracellular MRP8/14 is a regulator of β 2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion", *Nat. Commun.*, 2015. 6: 6915. DOI: 10.1038/NCOMMS7915

Immler R, Lange-Sperandio B, Steffen T, Beck H, Roth J, Hupel G, Pfister F, Popper B, Uhl B, Mannell H, Reichel CA, Vielhauer V, Scherberich J, Sperandio M and **Pruenster M**. "Extratubular polymerized uromodulin induces leukocyte recruitment and inflammation *in vivo*", 2020, *Front Immunol.*, 11:588245. DOI: 10.3389/fimmu.2020.588245

Immler R, Nadolni W, Bertsch A, Morikis V, Rohwedder I, Schroll T, Yevtushenko A, Soehnlein O, Moser M, Gudermann T, Barnea E, Rehberg M, Simon SI, Zierler S, **Pruenster M*** and Sperandio M*. "The voltage-gated potassium channel $K_v1.3$ regulates neutrophil recruitment during inflammation", *Cardiovasc. Res.*, 2022, cvab133. ***equal contribution**. DOI: 10.1093/cvr/cvab133

M. Pruenster*, R. Immler*, J. Roth, T. Kuchler, T. Bromberger, M. Napoli, K. Nussbaumer, I. Rohwedder, L.M. Wackerbarth, C. Piantoni, K. Hennis, D. Fink, S. Kallabis, T. Schroll, S. Masgrau-Alsina, A. Budke, W. Liu, D. Vestweber, C. Wahl-Schott, J. Roth, F.Meissner, M. Moser, T. Vogl, V. Hornung, P. Broz and M. Sperandio. "E-selectin-mediated rapid NLRP3 inflammasome activation regulates S100A8/A9 release from neutrophils via transient gasdermin D pore formation", *Nat. Immunol.*, 2023, ***equal contribution** DOI: 10.1038/s41590-023-01656-1

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1 Die E-Selektin induzierte Freisetzung von S100A8/A9 und dessen pro-entzündlicher Einfluss auf die Leukozytenrekrutierung

Das Heterodimer S100A8/A9 (auch bekannt als MRP8/14 oder Calprotectin) gehört zur Familie der Calcium-bindenden S100 Proteine und zur Gruppe der zytosolischen kleinen DAMP Moleküle. Seine pro-entzündliche Wirkung auf Zellen des Immunsystems, sowie auf Endothelzellen wurde bereits in früheren Studien untersucht. So wurde gezeigt, dass S100A8/A9 in Endothelzellen einen thrombogenen Phänotyp induziert, welcher mit einem Verlust der Zellintegrität einhergeht und zu einer erhöhten Permeabilität der Endothelzellschicht führt (Viemann et al., 2005; Wang, Luo, Chen, Jiang, & Huang, 2014). Des Weiteren war bekannt, dass S100A8/A9 die Zytokinproduktion in neutrophilen Granulozyten und die Abspaltung von L-Selektin von der Oberfläche (ein klassischer Vorgang während der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten) fördert (Ryckman, Vandal, Rouleau, Talbot, & Tessier, 2003) und in Makrophagen die Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 3 und MMP9 hochreguliert, welche unter anderem entscheidend an der Knorpelzerstörung bei rheumatoider Arthritis beteiligt sind (van Lent et al., 2008). Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden DAMP Moleküle bei diversen akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen als Biomarker verwendet. So werden die Serum und/oder fäkalen Spiegel von S100A8/A9 klinisch zur Einstufung der Krankheitsaktivität, sowie als therapeutische Verlaufskontrollen von Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa, rheumatoider Arthritis und Psoriasis herangezogen (Pruenster et al., 2016). Dennoch war lange Zeit unklar, welche Signale die hohen Serumspiegel hervorrufen und wie genau die Freisetzung von S100A8/A9 während einer Entzündung induziert wird.

Unsere Arbeitsgruppe konnte vor einiger Zeit zeigen, dass die Interaktion von PSGL-1 auf neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin auf dem entzündlich veränderten Endothel während des Leukozytenrollens zur Freisetzung von S100A8/A9 aus neutrophilen Granulozyten führt (Pruenster et al., 2015). Das so freigesetzte S100A8/A9 führt dann seine Funktion als DAMP Molekül aus, indem es autokrin an TLR4 bindet und eine intrazelluläre pro-entzündliche Signaltransduktionskaskade in Gang setzt. Dabei wird über MyD88 die kleine Rap-1 („Ras-Associated Protein 1“) GTPase aktiviert und im Zuge dessen β 2 Integrine in einen hoch-affinen

Konformationsstatus überführt. In Folge der $\beta 2$ Integrin-Aktivierung interagieren diese mit ICAM-1 auf dem entzündlich veränderten Endothel, die Rollgeschwindigkeit der Zelle reduziert sich und die Zelle kann fest am Endothel adhären und in einem zweiten Schritt ins Gewebe auswandern, was die Entzündung aufrechterhält und befeuert (**Abbildung 2**).

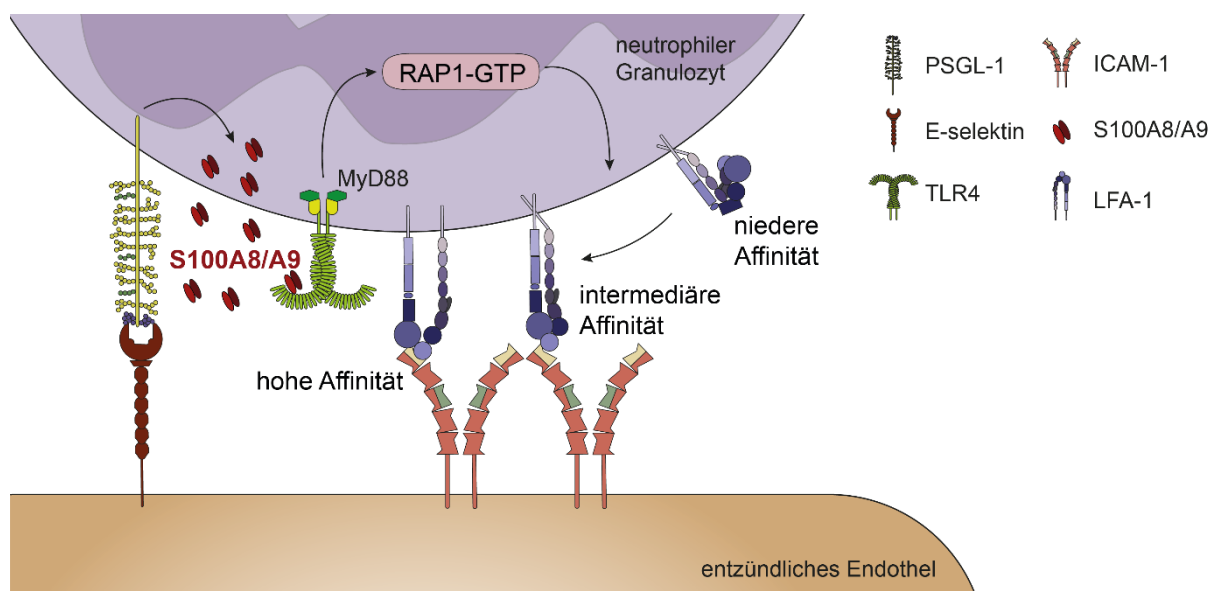


Abbildung 2: Die Interaktion von E-Selektin mit Liganden auf den neutrophilen Granulozyten führt zur S100A8/A9 Freisetzung. Über die autokrine Bindung von S100A8/A9 an TLR4 werden $\beta 2$ Integrinen aktiviert, was zu einer erhöhten Leukozytenrekretion führt. Abbildung modifiziert aus Pruenster et. al (Pruenster et al., 2015).

Diese Arbeit konnte nicht nur die Frage beantworten, welches intraluminale Signal die Freisetzung von S100A8/A9 triggert, sondern zudem auch zeigen, dass es neben dem klassischen Chemokin-induzierten „inside-out signaling“ eine weitere (bis dato unbekannt) Möglichkeit gibt, $\beta 2$ Integrine (über eine TLR4 Rezeptor vermittelte Signaltransduktionskaskade) zu aktivieren.

In weiterführenden Studien konnten von uns, sowie auch von anderen Arbeitsgruppen, weitere Signalwege ermittelt werden, die zu einer $\beta 2$ Integrin Aktivierung führen und so die Entzündungsreaktion befeuern. So ist in der Zwischenzeit bekannt, dass auch TNF- α (Bromberger, Klapproth, Sperandio, & Moser, 2022), amyloid- β (Zenaro et al., 2015), sowie TLR2 und TLR5 Agonisten (Chung et al., 2014) $\beta 2$ Integrine aktivieren und somit die Leukozytenrekretion positiv beeinflussen können.

In einer neueren Studie konnten wir nun zeigen, welche intrazellulären Signalwege an der Freisetzung von S100A8/A9 beteiligt sind (Pruenster et al., 2023). S100A8/A9 besitzt nicht die strukturellen Voraussetzungen für eine Freisetzung über den klassischen Golgi-Apparat. Auch IL1 β erfüllt diese strukturellen Voraussetzungen nicht: Daher war der genaue intrazelluläre Signalweg, der zur IL1 β Freisetzung führt, für viele Jahre völlig unbekannt. Im Jahr 2015 wurde dann in mehreren Studien gezeigt, dass die IL1 β Freisetzung ein Gasdermin D (GSDMD) abhängiger Prozess ist (He et al., 2015; Kayagaki et al., 2015; Shi et al., 2015). GSDMD wird im Zuge der klassischen NLRP3 („NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3“) Inflammation Aktivierung von Caspase-1 gespalten und als GSDMD-NT Pore in die Zellmembran eingebaut (**Abbildung 3**).

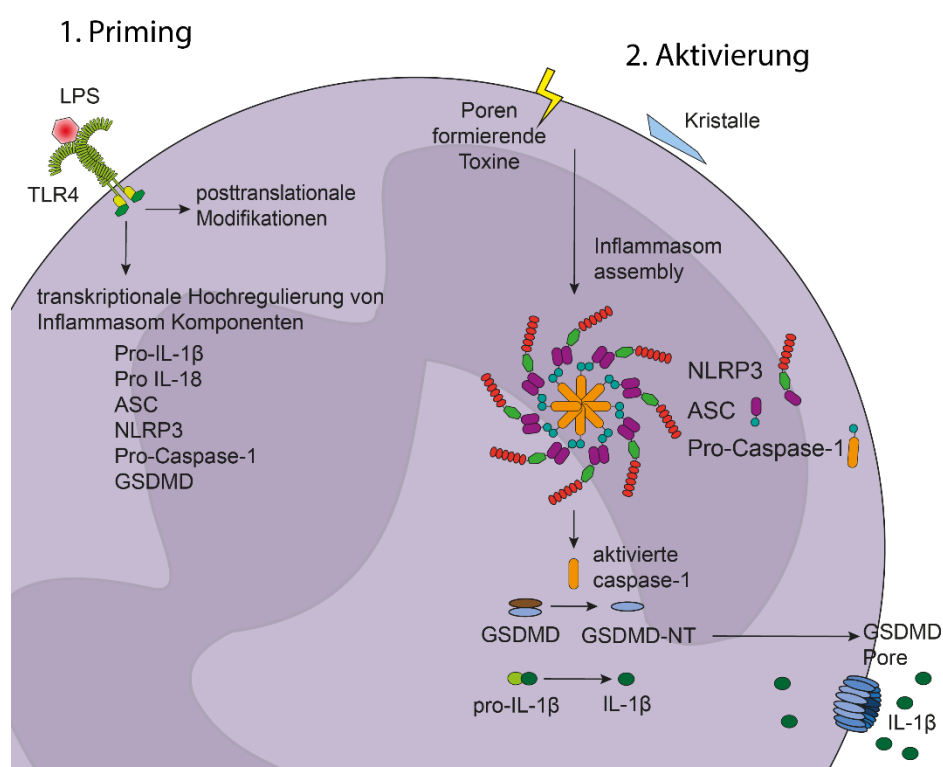


Abbildung 3: Darstellung der klassischen Inflammation Aktivierung. In einem ersten Schritt erfolgt das sogenannte Priming, gefolgt von einem Aktivierungsschritt, welcher zur Spaltung von GSDMD und von pro-IL1 β , zur Porenbildung und schließlich zur IL1 β Freisetzung führt. Abbildung modifiziert nach Immler

Die klassische Inflammation Aktivierung verläuft in 2 Schritten. Im ersten Schritt werden über die Bindung eines sogenannten Priming Moleküls, z.B. LPS, an den entsprechenden Rezeptor, z.B. TLR4, Inflammation Komponenten wie NLRP3 und pro-entzündliche Zytokine wie pro-IL1 β transkriptionell hochreguliert und eventuell auch

posttranslational modifiziert, z.B. über Phosphorylierung. Diesem Schritt folgt der sogenannte Aktivierungsschritt, der von bakteriellen oder viralen Bestandteilen, zellulärem Stress oder einer sterilen Inflammation ausgelöst werden kann und klassischer Weise mit einem Kaliumausstrom einhergeht. Dieser zweite Schritt führt zum sogenannten „inflammasome assembly“, wobei NLRP3 mit dem Adaptorprotein ASC („apoptosis-associated speck-like protein containing CARD“) und der pro-Caspase-1 einen Multiprotein Komplex bildet, und durch eine proteolytische Spaltung die pro-Caspase-1 zur aktiven Caspase-1 umsetzt. Die aktivierte Caspase-1 katalysiert nun die Spaltung von pro-IL-1 β und pro-IL-18 und spaltet des weiteren GSDMD (Swanson, Deng, & Ting, 2019). Das gespaltene GSDMD-NT wird daraufhin als Pore in die Zellmembran eingebaut und pro-entzündliche Zytokine wie IL-1 β und IL-18 können über die Poren sezerniert werden (He et al., 2015; Swanson et al., 2019). Diese Porenbildung führt in Zellen der angeborenen Immunität normalerweise zur Pyroptose, einer pro-entzündlichen Form des lytischen Zelltods (Chauhan et al., 2022; Swanson et al., 2019).

Aufgrund dieser Befunde zur IL-1 β Freisetzung beschloss unsere Arbeitsgruppe zu untersuchen, ob auch die E-Selektin induzierte S100A8/A9 Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten ein NLRP3 Inflammasom/GSDMD abhängiger Prozess sein könnte. Was gegen diese Hypothese sprach war allerdings zum einen die Tatsache, dass aus der vorangegangenen Studie (Pruenster et al., 2015) klar war, dass die S100A8/A9 Freisetzung nur wenige Minuten - und nicht wie bei IL-1 β mehrere Stunden - in Anspruch nimmt. Zum anderen sollten neutrophile Granulozyten im Gefäßsystem während der Rekrutierungskaskade auch nicht dem Zelltod unterliegen. Dennoch begann die Arbeitsgruppe mit den Untersuchungen und konnte in diesem Jahr nun zeigen, dass die E-Selektin induzierte Freisetzung von S100A8/A9 tatsächlich ein NLRP3 Inflammasom/GSDMD abhängiger Prozess ist, welcher sehr schnell von statten geht und auch nicht mit dem Zelltod endet (Pruenster et al., 2023) (**Abbildung 4**).

Bei der E-Selektin induzierten Inflammasom Aktivierung kommt es über die Bindung von E-Selektin an den entsprechenden Liganden auf den neutrophilen Granulozyten (L-Selektin im humanen System, PSGL-1 in der Maus) zu einer Bruton's Tyrosin Kinase (Btk) abhängigen Tyrosin-Phosphorylierung von NLRP3. Gleichzeitig wird der spannungsabhängige Kaliumkanal K_v1.3 geöffnet. Wie genau diese Öffnung von statten geht, ob es z.B. auch hier zu einer Phosphorylierung kommt und der Kanal

deswegen aufgrund der veränderten Konformation öffnet, ist Gegenstand weiterführender Studien, welche derzeit im Rahmen des TRR332 durchgeführt werden. Der Ausstrom von Kalium über $K_v1.3$ und die Phosphorylierung von NLRP3 führen dann zum „Inflammasom assembly“, zur Spaltung der pro-Caspase-1 und in einem darauffolgenden Schritt zur Spaltung von GSDMD, welches dann als GSDMD-NT Komplex in Form einer Pore (analog zur klassischen NLRP3 Inflammasom Aktivierung) in die Zellmembran eingebaut wird.

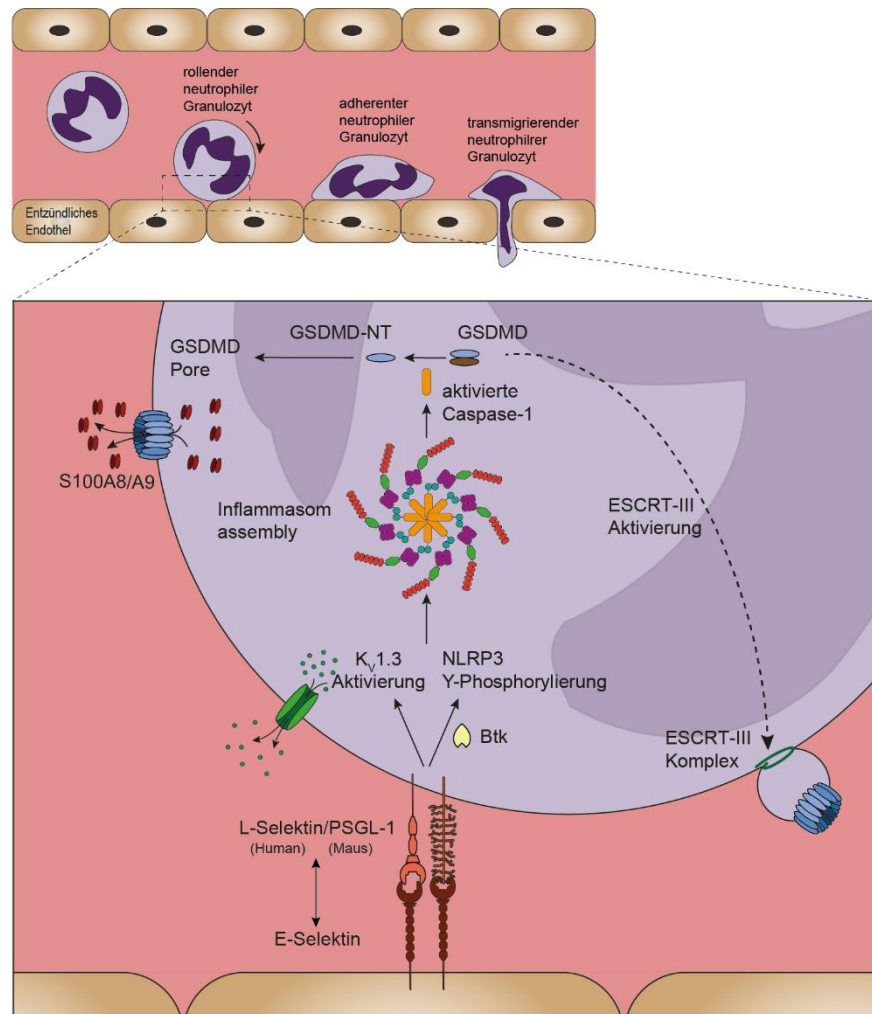


Abbildung 4: Darstellung der E-Selektin induzierten Inflammasom Aktivierung. Die Bindung von E-Selektin an die entsprechenden Rezeptoren führt zur schnellen NLRP3/GSDMD anhängigen Freisetzung von S100A8/A9. Die Zelle unterliegt nicht der Pyroptose, sondern wird über einen ESCRT abhängigen Mechanismus vor dem Zelltod geschützt. Abbildung modifiziert nach Immler

Dieser Prozess ist selektiv für E-Selektin und wird nicht von anderen PSGL-1/L-Selektin Liganden wie P-Selektin oder Endoglycan initiiert. Zudem ist diese Aktivierung sehr schnell und dauert nur wenige Minuten. Zumal S100A8/A9 im Gegensatz zu IL-1 β in großen Mengen im Zytosol vorhanden ist (ohne vorher transkribiert oder

translatiert werden zu müssen), kann S100A8/A9 sofort über die Poren in die Umgebung/Zirkulation abgegeben werden. Mit Hilfe von Massenspektrometrie (Sekretomanalyse) konnten wir auch zeigen, dass neben S100A8/A9 weitere kleine zytosolische pro-entzündliche DAMPs, wie S100A12 und Macrophage migration inhibitory factor (MIF), sezerniert werden. Große zytosolische DAMPs, wie HSPs werden nicht sezerniert. Außerdem ist der Prozess reversibel und führt nicht zum Zelltod, sondern ist zeitlich eng begrenzt. Dies wird durch die Aktivierung der ESCRT („endosomal complexes required for transport“) Maschinerie, die zum Ausbau der GSDMD Poren führt, bewerkstelligt. Auch in anderen Studien wurde in den letzten Jahren immer öfter berichtet, dass die Inflammasom Aktivierung und GSDMD abhängige Porenbildung nicht zwangsweise mit dem Zelltod einhergehen muss (Chen et al., 2014; Ruhl et al., 2018). Da die Zelle nicht dem Zelltod unterliegt und auch keine Poren in den Zellkern eingebaut werden, konnten wir auch keine kernlokalisierten DAMPs im Sekretom nachweisen.

Das sezernierte S100A8/A9 aber kann dann seine Rolle als DAMP ausüben und wirkt als pro-entzündliches Molekül. Es beeinflusst die Rollgeschwindigkeit und die Adhäsion der vital gebliebene neutrophilen Granulozyten, ihre Auswanderung in entzündetes Gewebe wird verstärkt und im Gewebe können sie ihre Effektor-Funktionen ausführen.

Wie erwähnt, spielt der spannungsabhängige Kaliumkanal $K_v1.3$ eine zentrale Rolle bei der schnellen E-Selektin anhängigen NLRP3 Inflammasom Aktivierung, da er den für die Inflammasom Aktivierung notwendigen Kaliumausstrom garantiert. Das Vorhandensein dieses Kanals auf neutrophilen Granulozyten und dessen Funktionen während der Leukozytenrekrutierung wurde in einer früheren Studie der Arbeitsgruppe erstmals beschrieben und detailliert untersucht (Immler et al., 2021). So konnte gezeigt werden, dass $K_v1.3$ essentiell für den kontinuierlichen Calciumeinstrom während der Leukozytenadhäsion ist (**Abbildung 5**).

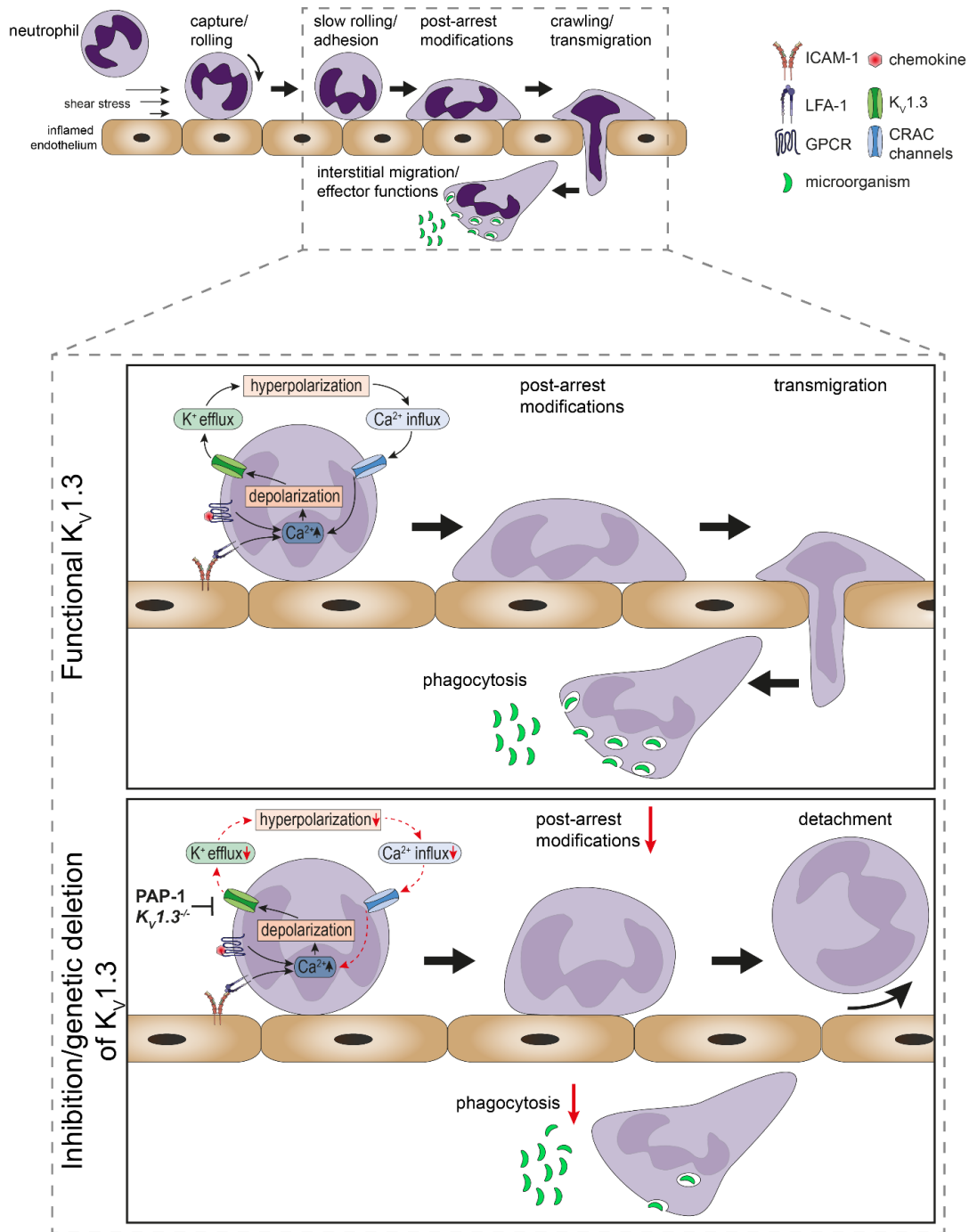


Abbildung 5: Der spannungsabhängige Kaliumkanal $K_v1.3$ spielt eine zentrale Rolle beim kontinuierlichen Calciumeinstrom in neutrophilen Granulozyten und ist somit notwendig für eine feste Adhäsion der Zelle im Zuge der Leukozytenrekrutierung. Abbildung aus Immler et.al (Immler et al., 2021).

Der Einstrom von Calcium in die Zelle beginnt während der Interaktion des neutrophilen Granulozyten mit dem entzündeten Endothel, vor allem während der Interaktion von pro-entzündlichen Chemokinen, welche am Endothel präsentiert werden, mit den entsprechenden GPCRs. Dies führt zur Aktivierung der

Phospholipase C- β (PLC- β) und zur Produktion von IP3 (Inositol-1,4,5-triphosphat), welches daraufhin an den IP3-Rezeptor im endoplasmatischen Retikulum (ER) bindet und eine schnelle Calciumfreisetzung aus den ER-Speichern in das Zytoplasma bewerkstelligt. Die Abnahme der Calciumkonzentration im ER aktiviert wiederum die Calciumsensoren STIM1 und STIM2 („stromal interaction molecules“), welche dann für einen Einstrom von extrazellulärem Calcium über sogenannte CRAC („calcium-release-activated-channels“) Kanäle, z.B. ORAI-1 („calcium-release-activated calcium modulator-1“) sorgen (Immler, Simon, & Sperandio, 2018). Diesen Prozess nennt man SOCE („store operated calcium entry“) und er sorgt für lokal hohe Calciumspiegel an der „inflammatorischen Synapse“. Diese hohen Spiegel sind unabdingbar für die Signalweiterleitung und Kommunikation von den in der Plasmamembran lokalisierten Adhäsionsmolekülen mit dem Zytoskelett und ermöglichen so den Beginn der Post-Arrest-Modifikationen (Abflachen, Pseudopodienbildung).

Ein anhaltender Calcium Einstrom erfordert allerdings einen kompensatorischen Kaliumausstrom, um das negative Membranpotential der Zelle aufrecht zu erhalten (Immler et al., 2018). Die Arbeitsgruppe konnte nun zeigen, dass dieser Kalium Ausstrom von $K_v1.3$ bewerkstelligt wird (Immler et al., 2021) (**Abbildung 5**).

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Studien in diesem ersten Teil der Habilitationsschrift einen wichtigen Beitrag für ein besseres Verständnis über den Zusammenhang hoher S100A8/A9 Spiegel und der Initiierung und Aufrechterhaltung entzündlicher Prozesse leisten. Die Modulation der S100A8/A9 Freisetzung (und anderer kleiner zytosolischer DAMPs) über den E-Selektin/NLRP3-Inflammasom/GSDMD-abhängigen Aktivierungswegs in neutrophilen Granulozyten stellt somit einen interessanten therapeutischen Ansatz zur Behandlung akuter und chronisch entzündlicher Erkrankungen dar.

5.2 Uromodulin als endogener Entzündungsmediator

In einer weiteren Studie, welche im Zuge der Habilitation durchgeführt wurde, konnte gezeigt werden, dass auch Uromodulin (Tamm-Horsfall-Protein, THP), ein Nieren spezifisches Glycoprotein, als endogener Entzündungsmediator (DAMP Molekül) fungieren kann. Unter physiologischen Bedingungen kommt Uromodulin vor allem als verankertes Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Protein auf der apikalen Seite der Plasmamembran auf Epithelzellen im aufsteigenden Ast der Henle Schleife vor, wo es durch proteolytische Spaltung in das tubuläre Lumen freigesetzt wird. Gespaltenes Uromodulin polymerisiert (pUMOD) und stellt mit einer Sekretionsrate von 50–150 mg/Tag das am häufigsten vorkommende Urinprotein bei gesunden Menschen dar (Devuyst, Olinger, & Rampoldi, 2017). Im Lumen spielt pUMOD über die Bindung an den Na⁺-K⁺-2Cl⁻ Cotransporter NKCC2 und den Kaliumkanal ROMK („Renal Outer Medullary Potassium channel“) eine wichtige Rolle im Wasser-, und Elektrolythaushalt der Nieren und reguliert so die Nierenfunktion. Darüber hinaus blockiert pUMOD die Bindung von *Escherichia coli* an Uroplakin auf dem Urothel und schützt so vor Harnwegsinfektionen. Die polymerisierte und negativ geladene Struktur des Proteins hemmt zudem die Bildung von Kalziumkristallen, verhindert die Bildung von Nierensteinen und reguliert die renale Calcium-, und Magnesiumhomöostase (Devuyst et al., 2017; Schaeffer, Devuyst, & Rampoldi, 2021). Ein geringerer Anteil von Uromodulin wird auch basolateral ins Interstitium freigesetzt und eine monomere Form von UMOD (mUMOD) ist im Serum nachweisbar (Schaeffer et al., 2021). Unter pathologischen Veränderungen, z.B. wenn die Integrität des Nierenepithels im Zuge einer Entzündung beschädigt ist, können auch größere Mengen von pUMOD ins Interstitium des Nierengewebes gelangen. Bereits in früheren Studien wurde vermutet, dass pUMOD außerhalb des Lumens eine pro-entzündliche Wirkung zeigen und als DAMP Molekül agieren könnte. So ist/war bereits bekannt, dass pUMOD auf isolierten Monozyten *in vitro* zu einer NLRP3 Aktivierung und IL1 β Freisetzung führt (Darisipudi et al., 2012). Wir konnten im Rahmen unserer Studie nun nachweisen, dass interstitiell angereichertes pUMOD auch *in vivo* eine pro-entzündliche Wirkung entfaltet, indem es zum einen F4/80 positive Makrophagen stimuliert und die Produktion von TNF- α induziert (Immler et al., 2020). Dies wiederum beeinflusst die Leukozytenrekrutierung in einem positiven Maße. Zum anderen erhöht pUMOD direkt die Permeabilität und Transmigrationskapazität von Endothelzellen,

was in Summe zu einer massiven Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und inflammatorischer Monozyten in das betroffene Nierengewebe führt (Immler et al., 2020) (**Abbildung 6**).

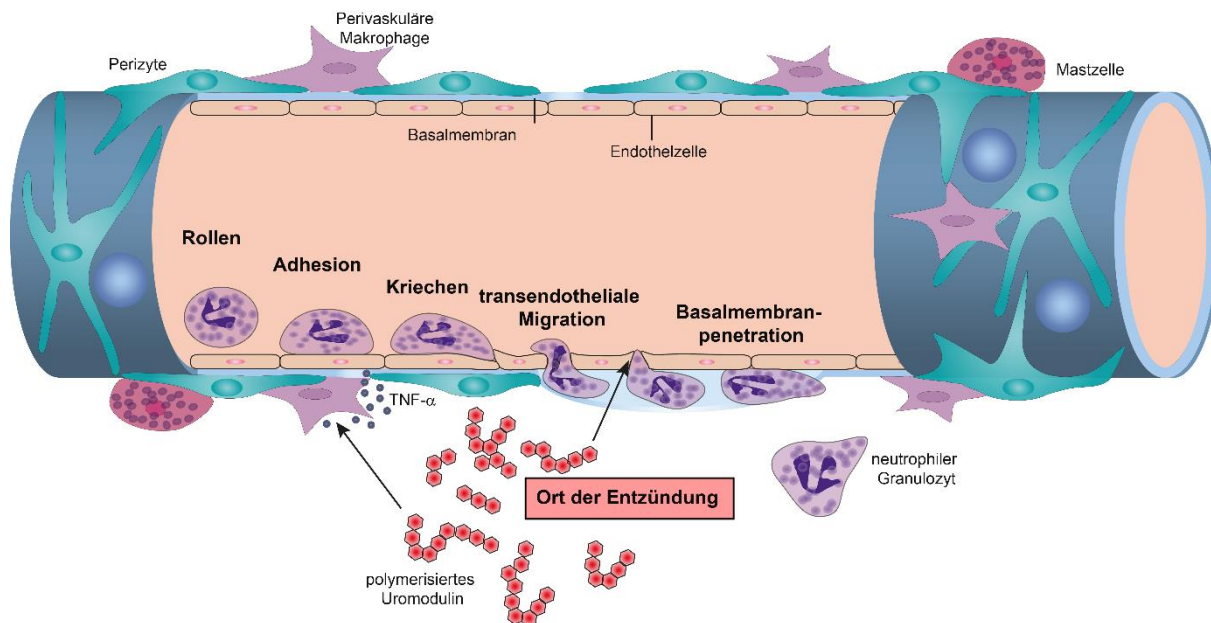


Abbildung 6: pUMOD induziert die Freisetzung von TNF- α aus F4/80 positiven Makrophagen und beeinflusst so das Leukozytenrollen, die Leukozytenadhäsion, sowie die Extravasation von Zellen des angeborenen Immunsystems. Gleichzeitig modifiziert pUMOD auch die Permeabilität der Gefäßendothelschicht und führt somit zu einer erhöhten Transmigration von Immunzellen ins entzündete Gewebe. Abbildung modifiziert nach A. Kurz (Kurz, 2016).

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Studie gezeigt, dass polymerisiertes UMOD, welches sich während einer pathologischen Veränderung extratubulär anreichern kann, als DAMP Molekül fungieren und somit eine Entzündungsreaktion in Gang setzen/verstärken kann. Dies unterstützt die Reparatur von beschädigtem Gewebe und die Wiederherstellung der Gewebshomöostase.

5.3 Die Rolle von ACKR1/DARC beim trans-endothelialen Transport von endogenen Entzündungsmediatoren/Chemokinen

Chemokine (chemotaktische Zytokine) sind endogene Entzündungsmediatoren, welche eine Schlüsselrolle bei der Leukozytenrekrutierung spielen. Zum einen haben sie chemotaktische Eigenschaften und sorgen somit für die gezielte Anlockung von Immunzellen an den Ort der Entzündung (Rot & von Andrian, 2004). Des Weiteren vermitteln sie – neben anderen pro-entzündlichen Molekülen, wie S100A8/A9 (Pruenster et al., 2015) – die Aktivierung von β 2 Integrinen und spielen somit eine zentrale Rolle beim Übergang des Leukozytenrollens zur festen Adhäsion (Rot & von Andrian, 2004). Schlussendlich sind Chemokine auch bei der Durchdringung der Basalmembran unabdingbar (Kurz et al., 2016). Die Einflussnahme von Chemokinen an verschiedenen Schritten der Leukozytenrekrutierung und die pro-entzündliche Wirkung erfordert deren klare Eingrenzung in räumlich und zeitlich begrenzter Dimension. Diese Eingrenzung der Wirkung von Chemokinen wird unter anderem durch sogenannte atypische Chemokinrezeptoren (ACKR, „atypical chemokine receptor“) bewerkstelligt, welche Chemokine zwar binden und internalisieren können, aber anders als klassische Chemokinrezeptoren koppeln ACKRs nicht an G-Proteine und führen somit zu keiner intrazellulären Signalweiterleitung/keiner Migration. Anders als klassische Chemokinrezeptoren sind ACKRs meist auch nicht auf Leukozyten, sondern eher auf Erythrozyten und/oder lymphatischen und vaskulären Endothelzellen exprimiert, wobei ACKR2 (früher auch als D6 bezeichnet) und ACKR3 (CXCR7) auch auf Leukozyten zu finden sind (Bonecchi & Graham, 2016). ACKR2 und ACKR3 sind vor allem für den lysosomalen Abbau von diversen Chemokinen zuständig und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Begrenzung und Auflösung von Entzündungsreaktionen.

ACKR1 (DARC, „Duffy-Antigen-Rezeptor for Chemokines“) kann über 20 pro-entzündlichen Chemokine binden und wird einerseits von Erythrozyten, als auch von Endothelzellen in postkapillären Venolen exprimiert (Pruenster & Rot, 2006). Auf Erythrozyten reguliert ACKR1 die Konzentrationen von frei im Blut zirkulierenden pro-entzündlichen Chemokinen und kann somit als „Chemokin-Senker“, aber gleichzeitig auch als „Chemokin-Reservoir“ fungieren (Novitzky-Basso & Rot, 2012; Pruenster & Rot, 2006). Außerdem spielt auf Erythrozyten befindliches ACKR1 eine wichtige Rolle bei der Hämatopoese von Immunzellen und der Auswanderung von Immunzellen aus

dem Knochenmark (Duchene et al., 2017) und stellt aufgrund seiner Bindungskapazität an *Plasmodium vivax* und *Plasmodium knowlesi* die Eintrittspforte/den Rezeptor für diese beiden Malariaerreger dar (Pruenster & Rot, 2006).

In einer am Novartis Institut für Biomedizinische Forschung durchgeführten Studie konnte die Habilitandin zeigen, dass ACKR1 auf Endothelzellen pro-inflammatorische Chemokine bindet und internalisiert (Pruenster et al., 2009). Anders als ACKR2 und ACKR3 baut ACKR1 diese Chemokine aber nicht ab, sondern transportiert sie in Caveolin positiven Vesikeln unidirektional (von basolateral nach apikal) durch die Endothelzelle und bewerkstelligt somit deren Präsentation auf der luminalen Seite des Endothels (**Abbildung 7**). Dies wiederum führt zu einer erhöhten Transmigration von Zellen des angeborenen Immunsystems ins entzündetes Gewebe (Pruenster et al., 2009).

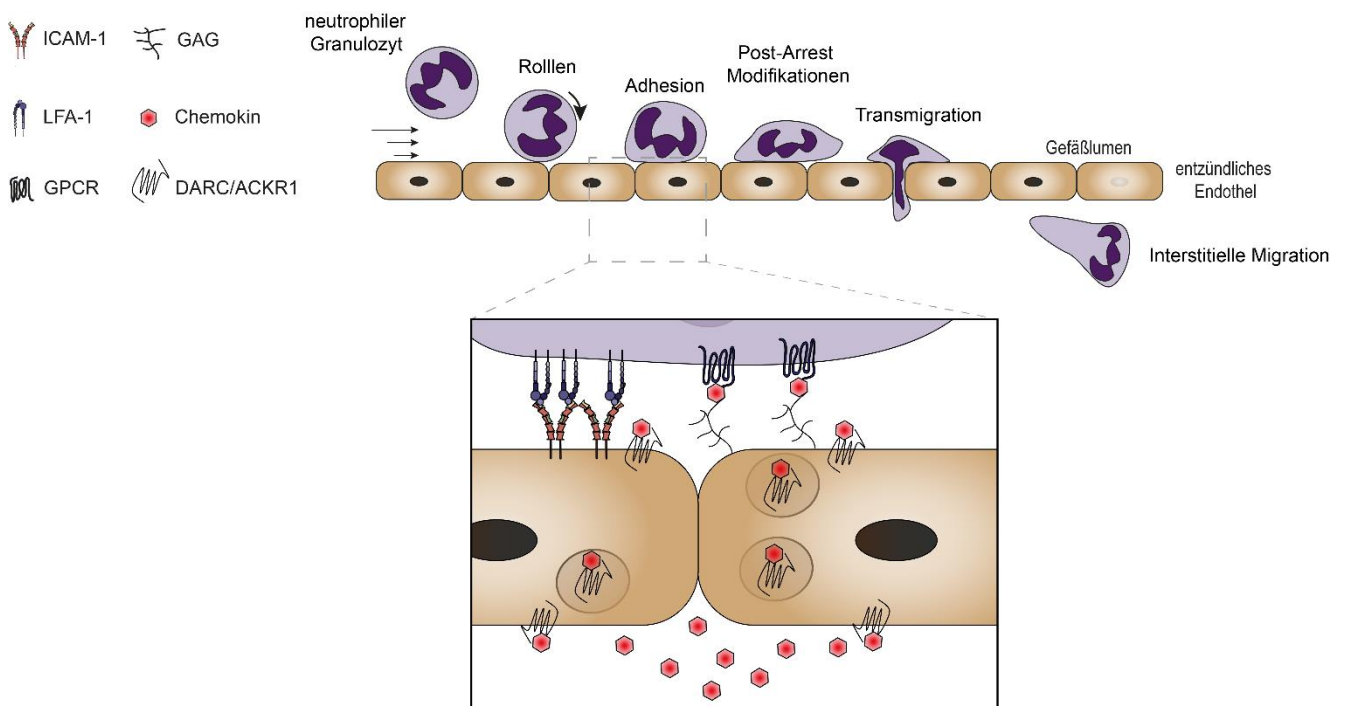


Abbildung 7: ACKR1 bindet pro-entzündliche Chemokine an der abluminalen Seite und transportiert diese in Caveolin positiven Vesikeln an die apikale Seite, ohne das Chemokin abzubauen. Dort werden die pro-entzündlichen Chemokine den vorbeihrollenden Leukozyten präsentiert und über „inside-out signaling“ wird die feste Adhäsion initiiert. Abbildung modifiziert nach Immler (Immler, 2019).

In einer weiterführenden Studie konnte schließlich gezeigt werden, dass ACKR1 pro-entzündliche Chemokine während neurologischer Entzündungen auch durch die Blut-

Hirn-Schranke transportieren kann und somit einen wesentlichen Einfluss auf die Schwere der Erkrankung und deren Verlauf nimmt (Minten et al., 2014). Die Tatsache, dass ACKR1 von Endothelzellen der Peripherie, als auch im ZNS exprimiert wird und so viele verschiedene pro-entzündliche Chemokine, wie z.B. CXCL2, CCL2, CCL5 binden und transportieren kann, macht diesen Rezeptor zu einem interessanten therapeutischen Angriffspunkt bei der Behandlung von akuten und chronischen Erkrankungen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Wie im Rahmen der Arbeiten dieser Habilitation gezeigt wurde, spielen endogene Entzündungsmediatoren und sogenannte DAMPs eine zentrale Rolle bei der Initiierung und der Aufrechterhaltung von Immunantworten. Ein besseres Verständnis über deren Freisetzung, die Wirkweise und Lokalisation von endogenen Entzündungsmediatoren stellt somit einen interessanten therapeutischen Ansatz für die Behandlung unterschiedlichster akuter und chronisch entzündlicher Erkrankungen dar. So konnte im Rahmen dieser Habilitationsstudien gezeigt werden, dass DARC eine zentrale Rolle bei dem Transport von Chemokinen durch die Endothelschicht von basolateral nach apikal spielt und so pro-entzündliche Chemokine effizient an vorbeirollende Leukozyten präsentiert werden können (Pruenster et al., 2009). Des Weiteren konnte erstmals beschrieben werden, dass das pro-entzündliche Protein S100A8/A9 schon während der Leukozytenrollens durch die Interaktion von E-Selektin mit neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird (Pruenster et al., 2015). Dies geschieht über GSDMD Poren und einem Prozess der NLRP3 Inflammasom Aktivierung, bei dem auch der spannungsabhängige Kaliumkanal $K_v1.3$ eine zentrale Rolle spielt (Immler et al., 2021; Pruenster et al., 2023). Neben S100A8/A9 werden weitere kleine zytosolische pro-entzündliche DAMPs, wie S100A12 und MIF freigesetzt. Schließlich wurde im Zuge der Habilitation gezeigt, dass auch das nierenspezifische Protein Uromodulin in seiner polymerisierten Form unter pathologischen Bedingungen als DAMP fungieren kann (Immler et al., 2020).

In weiterführenden Studien beschäftigt sich die Habilitandin nun vor allem mit der Funktion von intrazellulärem S100A8/A9. Diese Studie wurde von der DFG im Rahmen der SFB914 unterstützt und ist nun mit der Habilitandin als Letztautorin zur Publikation eingereicht. Die Daten dieser Studie zeigen, dass intrazelluläres S100A8/A9, das bis zu 40% der zytosolischen Proteinkonzentration in neutrophilen Granulozyten ausmacht, eine zentrale Funktion im Calcium-abhängigen Zusammenspiel von Molekülen der Plasmamembran mit dem Zytoskelett einnimmt und somit essentiell für Post-Arrest-Modifikationen während der Adhäsion ist. In verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von intrazellulärem S100A8/A9 der Calciumsignalweg gestört ist und somit auch Prozesse wie das Abflachen der Zelle, das Ausbilden von Pseudopodien, sowie das „crawling“ entlang des Endothels nicht ausreichend stattfinden können. Dies führt unter entzündlichen Bedingungen zu stark reduzierten Adhäsionszahlen in der S100A9 knock-out Maus

(einer funktionellen S100A8/S100A9 doppel-knock-out Maus), da sich die Zellen unter Flussbedingungen sehr leicht vom Endothel ablösen lassen. Auch die Anzahl der ausgewanderten Zellen in entzündetes Endothel ist in den S100A9 knock-out Tieren im Vergleich zu Wild-Typ Mäusen drastisch reduziert.

Im Rahmen einer Kooperation mit Dompé Farmaceutici-SpA untersucht die Habilitandin schließlich wie der duale CXCR1/CXCR2 Inhibitor Ladarixin die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten beeinflusst. Ladarixin wirkt als allosterischer Inhibitor an beiden Chemokinrezeptoren (Garau et al., 2006). Es ist schon länger bekannt, dass Ladarixin die Leukozytenrekrutierung reduzieren kann und somit den Krankheitsverlauf von Diabetes mellitus Typ-1 und einer Entzündung der Lungen in Mausmodellen positiv beeinflusst (Citro et al., 2015; Mattos et al., 2020). Die Substanz befindet sich auch bereits in einer Phase III Studie für die Therapie von Diabetes mellitus Typ-1 (ClinicalTrials.gov; Identifier: NCT04628481). Erstaunlicherweise ist der genaue Wirkmechanismus von Ladarixin trotzdem noch unklar. Wir konnten nun zeigen, dass neutrophile Granulozyten in Anwesenheit von Ladarixin zwar weiterhin am Endothel adhärieren und auch die Endothelschicht durchwandern können, allerdings verhindert Ladarixin selektiv die von IL-8/CXCL-1 induzierte Translokation von NE („Neutrophilen-Elastase“) aus intrazellulären Vesikeln an die Oberfläche der Zellmembran. Ohne diese Translokation können neutrophile Granulozyten die Basalmembran nicht durchdringen und bleiben nahe am Endothel stecken (Kurz et al., 2016). Dieser Befund ist in zweierlei Hinsicht interessant. Zum einen beschreibt er erstmals den genauen Wirkmechanismus von Ladarixin während der Leukozytenrekrutierung. Zum anderen eröffnet der Befund auch neue Perspektiven auf mögliche unterschiedliche intrazelluläre Signalwege, welche auf die Interaktion von Chemokinen mit ihren Rezeptoren folgen können.

7. Literaturverzeichnis

- Barichello, T., Generoso, J. S., Singer, M., & Dal-Pizzol, F. (2022). Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis-a narrative review. *Crit Care*, 26(1), 14. doi:10.1186/s13054-021-03862-5
- Bonecchi, R., & Graham, G. J. (2016). Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the Inflammatory Response. *Front Immunol*, 7, 224. doi:10.3389/fimmu.2016.00224
- Bromberger, T., Klapproth, S., Sperandio, M., & Moser, M. (2022). Humanized beta2 Integrin-Expressing Hoxb8 Cells Serve as Model to Study Integrin Activation. *Cells*, 11(9). doi:10.3390/cells11091532
- Chauhan, D., Demon, D., Vande Walle, L., Paerewijck, O., Zecchin, A., Bosseler, L., . . . Lamkanfi, M. (2022). GSDMD drives canonical inflammasome-induced neutrophil pyroptosis and is dispensable for NETosis. *EMBO Rep*, 23(10), e54277. doi:10.15252/embr.202154277
- Chen, K. W., Gross, C. J., Sotomayor, F. V., Stacey, K. J., Tschopp, J., Sweet, M. J., & Schroder, K. (2014). The neutrophil NLRC4 inflammasome selectively promotes IL-1beta maturation without pyroptosis during acute Salmonella challenge. *Cell Rep*, 8(2), 570-582. doi:10.1016/j.celrep.2014.06.028
- Chung, K. J., Mitroulis, I., Wiessner, J. R., Zheng, Y. Y., Siegert, G., Sperandio, M., & Chavakis, T. (2014). A novel pathway of rapid TLR-triggered activation of integrin-dependent leukocyte adhesion that requires Rap1 GTPase. *Mol Biol Cell*, 25(19), 2948-2955. doi:10.1091/mbc.E14-04-0867
- Citro, A., Valle, A., Cantarelli, E., Mercalli, A., Pellegrini, S., Liberati, D., . . . Piemonti, L. (2015). CXCR1/2 inhibition blocks and reverses type 1 diabetes in mice. *Diabetes*, 64(4), 1329-1340. doi:10.2337/db14-0443
- Darisipudi, M. N., Thomasova, D., Mulay, S. R., Brech, D., Noessner, E., Liapis, H., & Anders, H. J. (2012). Uromodulin triggers IL-1beta-dependent innate immunity via the NLRP3 inflammasome. *J Am Soc Nephrol*, 23(11), 1783-1789. doi:10.1681/ASN.2012040338
- Devuyst, O., Olinger, E., & Rampoldi, L. (2017). Uromodulin: from physiology to rare and complex kidney disorders. *Nat Rev Nephrol*, 13(9), 525-544. doi:10.1038/nrneph.2017.101
- Duchene, J., Novitzky-Basso, I., Thiriou, A., Casanova-Acebes, M., Bianchini, M., Etheridge, S. L., . . . Rot, A. (2017). Atypical chemokine receptor 1 on nucleated

- erythroid cells regulates hematopoiesis. *Nat Immunol*, 18(7), 753-761. doi:10.1038/ni.3763
- Garau, A., Bertini, R., Mosca, M., Bizzarri, C., Anacardio, R., Triulzi, S., . . . Villa, P. (2006). Development of a systemically-active dual CXCR1/CXCR2 allosteric inhibitor and its efficacy in a model of transient cerebral ischemia in the rat. *Eur Cytokine Netw*, 17(1), 35-41.
- Gong, T., Liu, L., Jiang, W., & Zhou, R. (2020). DAMP-sensing receptors in sterile inflammation and inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*, 20(2), 95-112. doi:10.1038/s41577-019-0215-7
- He, W. T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Huang, Z., . . . Han, J. (2015). Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1beta secretion. *Cell Res*, 25(12), 1285-1298. doi:10.1038/cr.2015.139
- Immler, R. (2019). The role of Preimplantation Factor (PIF) on leukocyte recruitment in vivo. *Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät*.
- Immler, R., Lange-Sperandio, B., Steffen, T., Beck, H., Rohwedder, I., Roth, J., . . . Pruenster, M. (2020). Extratubular Polymerized Uromodulin Induces Leukocyte Recruitment and Inflammation In Vivo. *Front Immunol*, 11, 588245. doi:10.3389/fimmu.2020.588245
- Immler, R., Nadolni, W., Bertsch, A., Morikis, V., Rohwedder, I., Masgrau-Alsina, S., . . . Sperandio, M. (2021). The voltage-gated potassium channel KV1.3 regulates neutrophil recruitment during inflammation. *Cardiovasc Res*. doi:10.1093/cvr/cvab133
- Immler, R., Simon, S. I., & Sperandio, M. (2018). Calcium signalling and related ion channels in neutrophil recruitment and function. *Eur J Clin Invest*, 48 Suppl 2(Suppl 2), e12964. doi:10.1111/eci.12964
- Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., . . . Dixit, V. M. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526(7575), 666-671. doi:10.1038/nature15541
- Kurz, A. R. (2016). MST1 kinase is critical for neutrophil transmigration through the vascular basement membrane. *Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät*,

- Kurz, A. R., Pruenster, M., Rohwedder, I., Ramadass, M., Schafer, K., Harrison, U., . . . Sperandio, M. (2016). MST1-dependent vesicle trafficking regulates neutrophil transmigration through the vascular basement membrane. *J Clin Invest*, 126(11), 4125-4139. doi:10.1172/JCI87043
- Mattos, M. S., Ferrero, M. R., Kraemer, L., Lopes, G. A. O., Reis, D. C., Cassali, G. D., . . . Russo, R. C. (2020). CXCR1 and CXCR2 Inhibition by Ladarixin Improves Neutrophil-Dependent Airway Inflammation in Mice. *Front Immunol*, 11, 566953. doi:10.3389/fimmu.2020.566953
- Minten, C., Alt, C., Gentner, M., Frei, E., Deutsch, U., Lyck, R., . . . Engelhardt, B. (2014). DARC shuttles inflammatory chemokines across the blood-brain barrier during autoimmune central nervous system inflammation. *Brain*, 137(Pt 5), 1454-1469. doi:10.1093/brain/awu045
- Murao, A., Aziz, M., Wang, H., Brenner, M., & Wang, P. (2021). Release mechanisms of major DAMPs. *Apoptosis*, 26(3-4), 152-162. doi:10.1007/s10495-021-01663-3
- Nourshargh, S., & Alon, R. (2014). Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, 41(5), 694-707. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.008
- Novitzky-Basso, I., & Rot, A. (2012). Duffy antigen receptor for chemokines and its involvement in patterning and control of inflammatory chemokines. *Front Immunol*, 3, 266. doi:10.3389/fimmu.2012.00266
- Pruenster, M., Immler, R., Roth, J., Kuchler, T., Bromberger, T., Napoli, M., . . . Sperandio, M. (2023). E-selectin-mediated rapid NLRP3 inflammasome activation regulates S100A8/S100A9 release from neutrophils via transient gasdermin D pore formation. *Nat Immunol*. doi:10.1038/s41590-023-01656-1
- Pruenster, M., Kurz, A. R., Chung, K. J., Cao-Ehlker, X., Bieber, S., Nussbaum, C. F., . . . Sperandio, M. (2015). Extracellular MRP8/14 is a regulator of beta2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. *Nat Commun*, 6, 6915. doi:10.1038/ncomms7915
- Pruenster, M., Mudde, L., Bombosi, P., Dimitrova, S., Zsak, M., Middleton, J., . . . Rot, A. (2009). The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol*, 10(1), 101-108. doi:10.1038/ni.1675
- Pruenster, M., & Rot, A. (2006). Throwing light on DARC. *Biochem Soc Trans*, 34(Pt 6), 1005-1008. doi:10.1042/BST0341005

- Pruenster, M., Vogl, T., Roth, J., & Sperandio, M. (2016). S100A8/A9: From basic science to clinical application. *Pharmacol Ther*, 167, 120-131. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.07.015
- Reutershan, J., Stockton, R., Zarbock, A., Sullivan, G. W., Chang, D., Scott, D., . . . Ley, K. (2007). Blocking p21-activated kinase reduces lipopolysaccharide-induced acute lung injury by preventing polymorphonuclear leukocyte infiltration. *Am J Respir Crit Care Med*, 175(10), 1027-1035. doi:10.1164/rccm.200612-1822OC
- Roh, J. S., & Sohn, D. H. (2018). Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Netw*, 18(4), e27. doi:10.4110/in.2018.18.e27
- Rot, A., & von Andrian, U. H. (2004). Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol*, 22, 891-928. doi:10.1146/annurev.immunol.22.012703.104543
- Ruhl, S., Shkarina, K., Demarco, B., Heilig, R., Santos, J. C., & Broz, P. (2018). ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science*, 362(6417), 956-960. doi:10.1126/science.aar7607
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M., & Tessier, P. A. (2003). Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol*, 170(6), 3233-3242. doi:10.4049/jimmunol.170.6.3233
- Schaeffer, C., Devuyst, O., & Rampoldi, L. (2021). Uromodulin: Roles in Health and Disease. *Annu Rev Physiol*, 83, 477-501. doi:10.1146/annurev-physiol-031620-092817
- Schmidt, S., Moser, M., & Sperandio, M. (2013). The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol Immunol*, 55(1), 49-58. doi:10.1016/j.molimm.2012.11.006
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., . . . Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526(7575), 660-665. doi:10.1038/nature15514
- Silvin, A., Chapuis, N., Dunsmore, G., Goubet, A. G., Dubuisson, A., Derosa, L., . . . Solary, E. (2020). Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19. *Cell*, 182(6), 1401-1418 e1418. doi:10.1016/j.cell.2020.08.002

- Swanson, K. V., Deng, M., & Ting, J. P. (2019). The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol*, 19(8), 477-489. doi:10.1038/s41577-019-0165-0
- van Lent, P. L., Grevers, L., Blom, A. B., Sloetjes, A., Mort, J. S., Vogl, T., . . . Roth, J. (2008). Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis*, 67(12), 1750-1758. doi:10.1136/ard.2007.077800
- Viemann, D., Strey, A., Janning, A., Jurk, K., Klimmek, K., Vogl, T., . . . Roth, J. (2005). Myeloid-related proteins 8 and 14 induce a specific inflammatory response in human microvascular endothelial cells. *Blood*, 105(7), 2955-2962. doi:10.1182/blood-2004-07-2520
- Wang, L., Luo, H., Chen, X., Jiang, Y., & Huang, Q. (2014). Functional characterization of S100A8 and S100A9 in altering monolayer permeability of human umbilical endothelial cells. *PLoS One*, 9(3), e90472. doi:10.1371/journal.pone.0090472
- Zenaro, E., Pietronigro, E., Della Bianca, V., Piacentino, G., Marongiu, L., Budui, S., . . . Constantin, G. (2015). Neutrophils promote Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline via LFA-1 integrin. *Nat Med*, 21(8), 880-886. doi:10.1038/nm.3913
- Zindel, J., & Kubes, P. (2020). DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol*, 15, 493-518. doi:10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847

8. Abkürzungsverzeichnis

ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1
VCAM-1	Vascular Adhesion Molecule-1
PSGL-1	P-Selectin Glycoprotein Ligand-1
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
DAMP	Damage/Danger Associated Molecular Pattern
HMGB1	High-mobility group protein B1
HSP	Heat-Shock Protein
ATP	Adenosintriphosphat
PRR	Pattern Recognition Rezeptor
TLR	Toll-like Rezeptor
NLR	Nod-like Rezeptor
RAGE	Receptor for Advanced Glycation End Products
TREM	Triggering Receptors Expressed on Myeloid Cells
GPCR	G-protein coupled receptor
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
Kv Kanal	voltage-activated potassium Kanal
MMP	Matrix-Metalloproteinase
Rap-1	Ras-associated protein 1
GTP	Guanosintriphosphat
TNF	Tumor Nekrose Faktor
IL1 β	Interleukin 1 β
GSDMD	Gasdermin D
NLRP3	NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
LPS	Lipopolysaccharid
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing CARD
IL-18	Interleukin 18
Btk	Bruton's Tyrosin Kinase
ESCRT	endosomal complexes required for transport
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
PLC- β	Phospholipase C- β
IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat

ER	endoplasmatisches Retikulum
STIM	stromal interaction molecules
CRAC	calcium-release-activated-channels
ORAI-1	calcium-release-activated calcium modulator-1
SOCE	store operated calcium entry
THP	Tamm-Horsfall-Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
UMOD	Uromodulin
pUMOD	polymerisiertes Uromodulin
mUMOD	monomeres Uromodulin
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium channel
ACKR	atypical chemokine receptor
DARC	Duffy-Antigen-Rezeptor for Chemokines
NE	Neutrophilen Elastase

9. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meiner Familie, meinem Ehemann Martin und unseren wunderbaren Kindern Matilda und Frida Valentina. Ihr habt mich all die Jahre unterstützt und an mich geglaubt. Das Leben mit euch macht unheimlich viel Spaß und Freude.

Ich möchte mich auch bei meiner Familie in Südtirol, besonders bei meinen Eltern Martin und Christine bedanken, ihr habt mir wichtige Eigenschaften fürs Leben mitgegeben, Bodenständigkeit, Ehrlichkeit und Durchhaltevermögen. Danke auch an meine Geschwister Peter und Elisabeth, meine Nichten und Neffen, meine Schwiegereltern, meine Schwägerinnen und Schwager fürs Mut machen in schwierigen Momenten, fürs Zuhören und für die gemeinsamen Momente, die das Leben so viel schöner machen.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Markus Sperandio, der mir die Möglichkeit gegeben hat, viele Jahre in einem hervorragenden wissenschaftlichen Umfeld zu arbeiten und zu forschen und dessen Tür immer offenstand. Sein Vertrauen in meine Fähigkeiten haben es mir ermöglicht, meine eigenen wissenschaftlichen Interessen und Ideen zu entwickeln und zu verfolgen.

Darüber hinaus möchte ich bei meinen Freunden und Kollegen Maria Hinterberger, Claudia Nussbaum, Ina Rohwedder und Roland Immler bedanken, mit denen gemeinsam ich die vielen Hochs und Tiefs des wissenschaftlichen Lebens geteilt habe und teile. Es tut gut, Freunde zu haben, mit denen man sich gemeinsam über Erfolge freuen, die aber auch ohne viele Worte verstehen, was manchmal belastend und sehr mühsam sein kann.

Ein weiterer Dank gilt Matteo Napoli, Lou Martha Wackerbarth, Verena Kochan, Angela Kurz, Myriam Rippahn und Katrin Nussbaumer und den vielen anderen Menschen in München und Wien, die mich in den letzten Jahren im Labor begleitet haben. Ohne eure Hilfe wäre diese Arbeit niemals zustande gekommen und ich hätte niemals eine so produktive, gute, lustige und vor allem auch glückliche Zeit gehabt.

Abschließend möchte ich mich noch bei Prof. Dr. med. Antal Rot bedanken, der mich durch meine Post-doc Zeit in Wien begleitet hat. Er hat mich das wissenschaftliche Denken und vor allem das wissenschaftliche Schreiben gelehrt und davon habe ich sehr profitiert.