

Aus dem  
Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie  
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin  
Direktor: Prof. Dr. Christian Wahl-Schott  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München



***Die Rolle des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.3 auf  
die Funktion neutrophiler Granulozyten***

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
**Tobias Sebastian Schroll**  
aus  
**Perasdorf im Bayerischen Wald**

2024

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

Erster Gutachter: *Prof. Dr. med. Markus Sperandio*

Zweiter Gutachter: *Prof. Dr. Jörg Renkawitz*

Dritter Gutachter: *Prof. Dr. Bernhard Heindl*

ggf. weitere Gutachter:

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: *Prof. Dr. Markus Rehberg*

*Dr. Roland Immler*

Dekan: *Prof. Dr. med. Thomas Gudermann*

Tag der mündlichen Prüfung: *17.07.2024*

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>7</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>9</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>12</b>
1.1 Neutrophile Granulozyten als Teil des angeborenen Immunsystems.....	12
1.2 Die Leukozyten-Rekrutierungs-Kaskade .....	13
1.2.1 E-Selektin vermittelte Kontaktaufnahme und langsames Rollen .....	14
1.2.2 Integrin Aktivierung und Arrest.....	15
1.2.3 Crawling und Transmigration .....	15
1.3 Wichtige Kaliumkanäle auf Leukozyten und ihr Einfluss auf die Ca <sup>2+</sup> -Signaltransduktion .....	16
1.3.1 K <sub>v</sub> 1.3 .....	17
1.3.2 K <sub>Ca</sub> 3.1.....	18
1.4 Das heterodimere Protein S100A8/A9.....	19
1.4.1 Aufbau und Nomenklatur .....	20
1.4.2 Funktion und klinische Bedeutung .....	20
1.4.3 Bedeutung von S100A8/A9 für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten .....	22
1.4.4 Das NLRP3 Inflammasom als Mediator für die E-Selektin vermittelte Freisetzung von S100A8/A9 durch nt-GSDMD Poren.....	24
<b>2. Zielsetzung</b> .....	<b>27</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>28</b>
3.1 Stoffe.....	28
3.1.1 Puffer und Lösungen.....	28
3.1.2 Antikörper.....	29
3.1.3 Substanzen .....	30

3.2	Mäuse .....	31
3.3	Isolation muriner neutrophiler Granulozyten .....	31
3.4	Isolation humaner neutrophiler Granulozyten .....	31
3.5	Western Blot .....	33
3.5.1	Vorbehandlung, Stimulation und Lyse der Proben .....	33
3.5.2	Proteinauftrennung und -detektion.....	33
3.5.3	Auswertung.....	34
3.6	S100A8/A9 Freisetzung <i>in vitro</i> .....	35
3.7	Immunfluoreszenzmikroskopie humaner neutrophiler Granulozyten.....	36
3.7.1	Vorbehandlung, Stimulation und nt-GSDMD Färbung.....	36
3.7.2	Konfokale Laserscanning- und STED-Mikroskopie .....	37
3.7.3	Auswertung mit Kolokalisationsanalyse.....	38
3.8	Statistik .....	39
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>40</b>
4.1	K <sub>V</sub> 1.3 und K <sub>Ca</sub> 3.1 regulieren die E-Selektin medierte Aktivierung von Caspase-1 in humanen neutrophilen Granulozyten.....	40
4.2	Die Blockade von K <sub>V</sub> 1.3 oder K <sub>Ca</sub> 3.1 verhindert den E-Selektin-abhängigen Einbau von nt-GSDMD Poren in die Zellmembran humaner neutrophiler Granulozyten.....	42
4.2.1	Nachweis mittels Western Blot .....	42
4.2.2	Nachweis mittels Immunfluoreszenz.....	43
4.3	Genetische Depletion von K <sub>V</sub> 1.3 sowie Blockade von K <sub>V</sub> 1.3 oder K <sub>Ca</sub> 3.1 verringern die Freisetzung von S100A8/A9 aus murinen neutrophilen Granulozyten <i>in vitro</i> .....	45
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>50</b>
5.1	Diskussion der Methoden .....	50
5.2	Diskussion der Ergebnisse im Kontext zur Literatur .....	52
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>60</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>70</b>
	<b>Affidavit.....</b>	<b>71</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>Fehler! Textmarke nicht definiert.</b>
	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>72</b>

## Zusammenfassung

Um das Gefäßendothel zu überwinden und ins entzündete Gewebe auszuwandern, müssen rollende neutrophile Granulozyten ihre Geschwindigkeit reduzieren und schließlich fest an das Endothel adhären. Essenzieller Bestandteil der Signalkaskade, die zur festen Adhäsion führt, ist die Aktivierung von  $\beta 2$  Integrinen (Ley et al. 2007; Kolaczowska and Kubes 2013).

Gemeinhin ist bekannt, dass die Freisetzung von S100A8/A9 für diesen Prozess bedeutsam ist (Pruenster et al. 2015; Morikis et al. 2017). Erst kürzlich konnte unsere Gruppe zeigen, dass S100A8/A9 durch rollende neutrophile Granulozyten freigesetzt wird. Dabei kommen rollende neutrophile Granulozyten zunächst mit E-Selektin, das auf der luminalen Oberfläche der entzündeten Endothelzellen exprimiert wird, in Kontakt. Dadurch wird das NLRP3 Inflammasom aktiviert, es erfolgt die Spaltung des Proteins GSDMD und schließlich der Einbau von nt-GSDMD Poren in die Zellmembran neutrophiler Granulozyten (Pruenster et al. 2023). Auch wenn von unspezifischen, auswärtsgerichteten Kaliumströmen bekannt ist, dass sie beim Prozess der NLRP3 Inflammasomaktivierung eine Rolle spielen, ist ihre exakte Funktion und Spezifität noch nicht geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es nun, zu zeigen, dass E-Selektin ausgelöste NLRP3 Inflammasomaktivierung in neutrophilen Granulozyten durch  $K_v1.3$  reguliert wird. Dieser spannungsabhängige Kaliumkanal ist bedeutend für die Funktion neutrophiler Granulozyten. So zeigen  $K_v1.3$  defiziente neutrophile Granulozyten nur eingeschränkt feste Adhäsion an Endothelzellen (Immler et al. 2022).

Mithilfe von Western Blot Analysen konnte ich nun zeigen, dass  $K_v1.3$  für die von E-Selektin ausgelöste Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms von Nöten ist. Weiterhin nutzten wir Immunfluoreszenzmikroskopie, um nachzuweisen, dass neutrophile Granulozyten ohne funktionierende  $K_v1.3$  Kanäle nach E-Selektin Stimulation keine nt-GSDMD Poren in ihrer Zellmembran aufweisen. Schließlich wurde - als funktionelle Konsequenz dessen - gezeigt, dass die Freisetzung von S100A8/A9 *in vitro* bei blockiertem  $K_v1.3$  Kanal reduziert ist.

Diese neuen Erkenntnisse belegen, dass der spannungsabhängige Kaliumkanal  $K_v1.3$  die NLRP3 Inflammasomaktivierung in neutrophilen Granulozyten reguliert

und dadurch den Einbau von nt-GSDMD Poren in die Zellmembran und die Freisetzung von S100A8/A9 ermöglicht, ohne dass Zelltodmechanismen ausgelöst werden.

## Abstract

To cross the endothelial barrier and migrate into inflamed tissue, rolling neutrophils need to slow down and adhere firmly to endothelial cells. Activation of  $\beta 2$  integrins is an integral part of the signalling cascade leading to firm adhesion (Ley et al. 2007; Kolaczkowska and Kubes 2013).

It has been described that the release of S100A8/A9 is involved in this process (Pruenster et al. 2015; Morikis et al. 2017). Recently our group could demonstrate that S100A8/A9 is released during neutrophil rolling. In this process rolling neutrophils get into contact to E-Selectin on endothelial cells at sites of inflammation. Thereafter the NLRP3 inflammasome is activated and finally causing cleavage of GSDMD, whose N-terminal fragment forms pores in the neutrophil cell membrane (Pruenster et al. 2023). Even though there are indications that potassium efflux plays a role in the process leading to NLRP3 activation, function and specificity of those channels for NLRP3 activity are still unclear.

In this work our aim was to prove that fast E-selectin induced inflammasome activation in neutrophils is regulated by  $K_v1.3$ . This voltage-dependent potassium channel is functionally relevant in neutrophils, as  $K_v1.3$  deficient neutrophils fail to perform legitimate firm adhesion (Immler et al. 2022).

Using Western Blot analysis, we could show that  $K_v1.3$  is required for E-Selectin induced NLRP3 activation. Furthermore, immunofluorescence microscopy was employed to display that neutrophils missing functional  $K_v1.3$  do not have nt-GSDMD pores on their surface after E-Selectin stimulation. Finally, in a functional approach, we could show that S100A8/A9 release was reduced *in vitro* when  $K_v1.3$  was blocked.

These new insights provide evidence that the voltage-dependent potassium channel  $K_v1.3$  regulates neutrophil NLRP3 inflammasome activation leading to nt-GSDMD pore formation and release of heterodimeric S100A8/A9 without causing cell-death.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Leukozyten-Rekrutierungs-Kaskade.....	13
Abbildung 2: Die Funktion von Kaliumkanälen auf Leukozyten. ....	16
Abbildung 3: Freisetzung von S100A8/A9 führt zur Aktivierung von $\beta$ 2-Integrinen. ....	22
Abbildung 4: S100A8/A9 Freisetzung durch das E-Selektin aktivierte NLRP3 Inflammasom. ...	24
Abbildung 5: Reinheitsgrad isolierter humaner neutrophiler Granulozyten.....	32
Abbildung 6: S100A8/A9 Freisetzung <i>in vitro</i> : Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. .....	35
Abbildung 7: Kolokalisationsanalyse zwischen nt-GSDMD- und WGA-Signal. ....	38
Abbildung 8: Caspase-1 in Zellüberständen nach Stimulation mit E-Selektin. ....	41
Abbildung 9: nt-GSDMD in Zelllysaten nach E-Selektin Stimulation.....	43
Abbildung 10: Repräsentative neutrophile Granulozyten nach nt-GSDMD-Färbung.....	44
Abbildung 11: Analyse der Kolokalisation von WGA- und nt-GSDMD-Signal.....	45
Abbildung 12: S100A8/A9 Freisetzung unstimulierter neutrophiler Granulozyten <i>in vitro</i> .....	46
Abbildung 13: S100A8/A9 Freisetzung <i>in vitro</i> nach Vorbehandlung mit PAP-1 / TRAM-34.....	47
Abbildung 14: S100A8/A9 Freisetzung <i>in vitro</i> bei $Kv1.3^{-/-}$ -neutrophilen Granulozyten. ....	48
Abbildung 15: S100A8/A9 Freisetzung <i>in vitro</i> nach Stimulation mit PMA. ....	49

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In den Experimenten verwendete Antikörper. ....	29
Tabelle 2: In den Experimenten verwendete Substanzen.....	30



## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
APC	Allophycocyanin
ASC	Apoptosis-Associated Speck-Like Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serum Albumin
BTK	Bruton-Tyrosinkinase
CAM	Core Facility Animal Models
Casp-1	Caspase-1
CASR	Calcium-sensing Receptor
CLL	Chronische Lymphatische Leukämie
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
ct-GSDMD	C-terminales Gasdermin D
DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
E-Sel	E-Selektin
ESL-1	E-Selektin Ligand-1
FA	Formaldehyd
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FSC	Forward Scatter
GAG	Glykosaminoglykan
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GLYC	Glyzerin
Gro- $\alpha$	CXC-Motiv-Chemokinligand 1
Gro- $\beta$	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 2
GSDMD	Gasdermin D
GSnP-6	Glykopeptid GSnP-6
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure

---

HMECs	Humane Mikrovaskuläre Endothelzellen
HyD	Hybrid Photo Detektor
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IL-1	Interleukin-1
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IL-8	Interleukin-8
i.p.	intraperitoneal
i.s.	intraskrotal
K <sub>Ca</sub> 3.1	Calcium-abhängiger Kaliumkanal K <sub>Ca</sub> 3.1
K <sub>V</sub> 1.3	Spannungsabhängiger Kaliumkanal K <sub>V</sub> 1.3
LC3	Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3
LEC-CAM	Lectin-EGF-complement binding-cell adhesion molecule
LFA1	$\alpha_L\beta_2$ -Integrin
LPS	Lipopolysaccharide
L-Sel	L-Selektin
MAC-1	$\alpha_M\beta_2$ -Integrin
MCC950	NLRP3 Inhibitor MCC950
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MD2	Myeloid Differentiation factor 2
MRP8	Myeloid-related Protein 8 bzw. Calgranulin A
MRP8/14	Calprotectin
MRP14	Myeloid-related Protein 14 bzw. Calgranulin B
NEK7	NIMA-related Kinase 7
NET	Neutrophil Extrazellular Trap
NLRC4	NLR Family CARD Domain-Containing Protein 4
NLRP3	NOD-, LRR- and Pyrin Domain-Containing Protein 3
nt-GSDMD	N-terminales Gasdermin D
P2X7	P2X-Purinorezeptor 7
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PAP-1	5-(4-Phenoxybutoxy) psoralen
PB450	Pacific Blue 450
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate-Buffered Saline)
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat

---

PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PMT	Photomultiplier Tube
pro-Casp-1	pro-Caspase-1
pro-IL-1 $\beta$	pro-Interleukin-1 $\beta$
P-Sel	P-Selektin
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PUVA	Psoralen plus UV-A
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAGE	Receptor for Advanced Glycosylation Endproducts
rh	Recombinant Human
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay
rm	Recombinant Murine
RM	Messwiederholungen (Repeated Measures)
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S100A8	Myeloid-related Protein 8 bzw. Calgranulin A
S100A9	Myeloid-related Protein 14 bzw. Calgranulin B
S100A8/A9	Calprotectin
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard Error of the Mean
sLe <sup>x</sup>	sialyl Lewis x
SOCE	Store Operated Calcium Entry
SSC	Sideward Scatter
STED	Stimulated Emission Depletion
TBS	Tris buffered Saline
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
TRAM-34	1-[(2-Chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazole
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
TWIK2	Zweiporiger Kaliumkanal TWIK2
Vav-1	Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 1
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VLA4	$\alpha_4\beta_1$ -Integrin
WGA	Weizenkeim-Agglutinin
WLL	White Light Laser

# 1. Einleitung

## 1.1 Neutrophile Granulozyten als Teil des angeborenen Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen - beziehungsweise von Säugetieren im Allgemeinen - funktioniert durch das Zusammenspiel von angeborenen und im Laufe des Lebens erworbenen Immunmechanismen. Leukozyten-Subpopulationen werden gewöhnlich dem angeborenen oder dem erworbenen Immunsystem zugeordnet. In der nachfolgenden Arbeit liegt das Hauptaugenmerk auf neutrophilen Granulozyten. Sie werden dem angeborenen Immunsystem zugeschrieben (Mantovani et al. 2011) und anhand ihres polymorph aussehenden, segmentierten Kerns und der Farbe ihrer Granula definiert. Beim Menschen bilden sie mit circa 50 - 70 % die mengenmäßig größte Leukozyten-Subpopulation, in Mäusen machen sie lediglich 10 - 25 % aller Leukozyten aus (Mestas and Hughes 2004). Humane neutrophile Granulozyten haben eine Halbwertszeit von 10 - 12 Stunden in der Zirkulation (Hidalgo et al. 2019). Lange ging man davon aus, dass neutrophile Granulozyten während ihrer kurzen Lebenszeit ausschließlich als Effektorzellen agieren. Ihre Aufgabe wurde demnach in der Bekämpfung von Pathogenen beziehungsweise sterilen Zelldebris gesehen. Dazu sind drei klassische Abwehrmechanismen beschrieben: (i) Neutrophile Granulozyten können zum einen Pathogene phagozytieren. (ii) Außerdem können sie sie abtöten, indem sie den Inhalt ihrer Granula freisetzen oder, (iii) indem sie Teile ihres Chromatins absondern und *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) bilden (Kolaczkowska and Kubes 2013). Seit einiger Zeit ist man sich aber auch über weitergehende Funktionen von neutrophilen Granulozyten, vor allem hinsichtlich ihrer Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem, bewusst (Nathan 2006).

Klinisch gesehen spielen neutrophile Granulozyten bei verschiedenen Krankheiten eine wichtige Rolle. Produziert der Körper zu wenige von ihnen oder ist ihre Funktion gestört, können zum Beispiel schwere Infektionszustände bis hin zur Sepsis die Folge sein. Demgegenüber können beispielsweise Autoimmunerkrankungen mit der Aktivierung neutrophiler Granulozyten einhergehen (Németh, Sperandio, and Mócsai 2020). Außerdem zeigen neueste Erkenntnisse, dass neutrophile Granulozyten auch bei verschiedenen Krebserkrankungen eine wichtige Rolle spielen. Dementsprechend sind neutrophile Granulozyten von großem

wissenschaftlichem Interesse und werden als mögliche Zielzellen für verschiedenste neue Therapien angesehen (Németh, Sperandio, and Mócsai 2020).

## 1.2 Die Leukozyten-Rekrutierungs-Kaskade

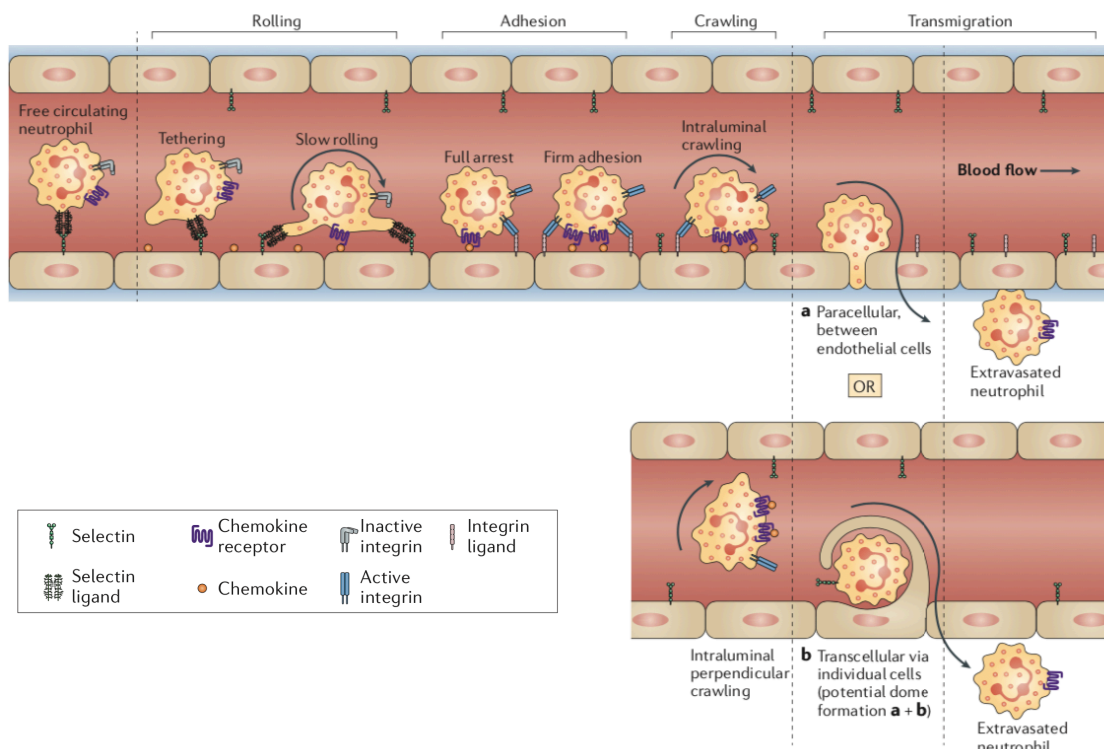


Abbildung 1: Die Leukozyten-Rekrutierungs-Kaskade.

Sie wird in die Schritte *Tethering*/Einfangen, (langsames) Rollen, feste Adhäsion, intraluminales *Crawling* und para- und transzelluläre Migration eingeteilt. Selektine, Chemokine und Integrine spielen bei den einzelnen Schritten entscheidende Rollen. Abbildung modifiziert aus (Kolaczowska and Kubes 2013).

Damit neutrophile Granulozyten ihren Effektorfunktionen nachkommen können, müssen sie erst an den Ort des inflammatorischen Geschehens gelangen. Dazu transmigrieren sie durch Gefäßwände postkapillärer Venolen und gelangen so vom intravasalen in den extravasalen Raum. Als Ursachen für das entzündliche Geschehen unterscheidet man sterile Zellschädigung von infektiösen Auslösern (Vestweber 2015). Die Schritte, wie neutrophile Granulozyten das Endothel und die Basalmembran von Gefäßen im Bereich des geschädigten Gewebes überwinden, werden in der sogenannten Leukozyten-Rekrutierungs-Kaskade zusammengefasst (Abbildung 1). Sie beinhaltet die Schritte *Tethering*/Einfangen, (langsames) Rollen, feste Adhäsion, intraluminales *Crawling* und para- und transzelluläre Migration (Ley et al. 2007).

### 1.2.1 E-Selektin vermittelte Kontaktaufnahme und langsames Rollen

Für die Initiierung der Leukozyten-Rekrutierungs-Kaskade müssen neutrophile Granulozyten zuerst mit dem entzündeten Endothel in Kontakt treten. Der erste Kontakt und das daran anschließende Rollen entlang der Endothelzellen wird unter physiologischer Schubspannung im Gefäßsystem durch Selektine vermittelt (Ley et al. 2007). Selektine weisen eine C-Typ Lectin-Bindungsdomäne auf (Sperandio, Gleissner, and Ley 2009). Während L-Selektin auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, findet man E- und P-Selektin auf der Oberfläche von Endothelzellen (Ley et al. 2007). Dort wird die Expression der Selektine durch die Entzündungsmediatoren TNF- $\alpha$ , IL-1 oder LPS induziert (McEver 2015), sodass neutrophile Granulozyten vor allem an Stellen, an denen eine lokale Immunreaktion stattfindet, ins Gewebe auswandern. Während P-Selektin, welches in Weibel-Palade Körperchen in den Endothelzellen vorrätig ist, sofort nach einem Entzündungsreiz an die Zelloberfläche transloziert werden kann und das Einfangen und Rollen in den ersten 45 Minuten nach dem Entzündungsreiz bestimmt, wird E-Selektin nach einem Entzündungsreiz erst neu synthetisiert und in die Zellmembran eingebaut (Kolaczkowska and Kubes 2013). Letztendlich führt die Präsenz eines oder beider Selektine auf der Endothelzellmembran aber dazu, dass vermehrt neutrophile Granulozyten an der Gefäßwand entlang rollen (Kolaczkowska and Kubes 2013).

Selektine binden Calcium-abhängig an spezifische Kohlenhydratstrukturen (sialyl Lewis x, sLe<sup>x</sup>) auf Selektinliganden (Foxall et al. 1992) (Hidalgo et al. 2007). Bei Mensch und Maus spielen verschiedene Selektinliganden eine Rolle. Verantwortlich dafür ist wohl die zwischen den Spezies unterschiedliche Enzymausstattung mit Fucosyltransferasen (Mondal, Buffone, and Neelamegham 2013).

Murin sind folgende E-Selektin Liganden besonders bedeutsam: (i) P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), (ii) E-Selektin Ligand-1 (ESL-1) und (iii) CD44 (Hidalgo et al. 2007). Die Funktion von PSGL-1 liegt vor allem darin, den ersten Kontakt zwischen Endothel und neutrophilem Granulozyten zu vermitteln. ESL-1 ist für die Etablierung eines gleichmäßigen langsamen Rollens entscheidend und CD44 kontrolliert die Rollgeschwindigkeit und die Formation von ligandenreichen Polen auf der Neutrophilenoberfläche (Hidalgo et al. 2007). Human fungiert L-Selektin als wohl wichtigster E-Selektin Ligand (Zöllner et al. 1997). Zudem sind

PSGL-1 und sialylierte Glykosphingolipide als humane Bindungspartner beschrieben (Nimrichter et al. 2008).

Von besonderer Bedeutung für die nachfolgende Arbeit ist die E-Selektin vermittelte Freisetzung des heterodimeren Proteins S100A8/A9 aus neutrophilen Granulozyten. Dies wurde von unserer Arbeitsgruppe kürzlich beschrieben (Pruenster et al. 2015).

### 1.2.2 Integrin Aktivierung und Arrest

Durch den Kontakt von neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin auf dem Endothel wird nicht nur die Freisetzung von S100A8/A9 ausgelöst (Pruenster et al. 2015), es werden während des Rollens auch zahlreiche andere Abläufe im Inneren des neutrophilen Granulozyten initiiert, die schließlich zur Konformationsänderung und damit zur Aktivierung von  $\beta 2$  Integrinen auf der Zelloberfläche führen (Abram and Lowell 2009). Auslöser dafür können zum einen Signalkaskaden sein, die von den Selektinen direkt angestoßen werden. Hierunter fällt auch die S100A8/A9 Freisetzung. Gemeinhin vermag E-Selektin es, effektiver als P-Selektin oder L-Selektin Integrine zu aktivieren (Chase, Magnani, and Simon 2012). Zum anderen kommen die neutrophilen Granulozyten während des Rollens aber auch mit diversen Chemokinen in Kontakt, die die schnelle Aktivierung von Integrinen verstärken (Abram and Lowell 2009; McEver 2015).

Bei den Integrinen selbst handelt es sich um  $\alpha\beta$ -Heterodimere, die sich bei der Aktivierung aus einer gebeugten über eine intermediäre in eine extendierte Form aufrichten (Vestweber 2015; Nishida et al. 2006). Dabei lagern sich die  $\beta 2$  Integrine auf der Zellmembran zu sogenannten Clustern zusammen. Dieser Prozess als Ganzes wird in der Literatur als *Inside-Out Signaling* bezeichnet und ist Grundlage dafür, dass neutrophile Granulozyten ihre Rollgeschwindigkeit vermindern und schließlich fest an einer Stelle adhären (Abram and Lowell 2009). Für das langsame Rollen ist das  $\beta 2$  Integrin LFA1 von entscheidender Bedeutung (Zarbock et al. 2007). Andere wichtige Integrine auf neutrophilen Granulozyten sind das  $\beta 2$  Integrin MAC-1 und das  $\alpha 4\beta 1$  Integrin VLA4 (Vestweber 2015).

### 1.2.3 Crawling und Transmigration

Durch die Zusammenlagerung von Integrinen (*Clustering*) und deren Aktivierung auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten werden Tyrosinkinasen aus

der Familie der Src Kinasen aktiviert (Abram and Lowell 2009). Die fest adhären-ten neutrophilen Granulozyten beginnen dabei, am Endothel entlang zu *crawlen*, um nach einer geeigneten Stelle für die Transmigration zu suchen (Ley et al. 2007). Dabei scheint MAC-1 eine wichtige Rolle zu spielen (Begandt et al. 2017). Das eigentliche Auswandern der neutrophilen Granulozyten erfolgt anschließend in der überwiegenden Mehrheit der Fälle parazellulär, also zwischen Endothelzellen hindurch (Pick, Brechtefeld, and Walzog 2013). Alternativ können neutrophile Granulozyten aber auch transzellulär, sozusagen durch eine Endothelzelle hindurch, auswandern, ehe sie final die Basalmembran und die Perizyten-schicht des Endothels überwinden (Masgrau-Alsina, Sperandio, and Rohwedder 2020) (Carman and Springer 2008).

### 1.3 Wichtige Kaliumkanäle auf Leukozyten und ihr Einfluss auf die $\text{Ca}^{2+}$ -Signaltransduktion

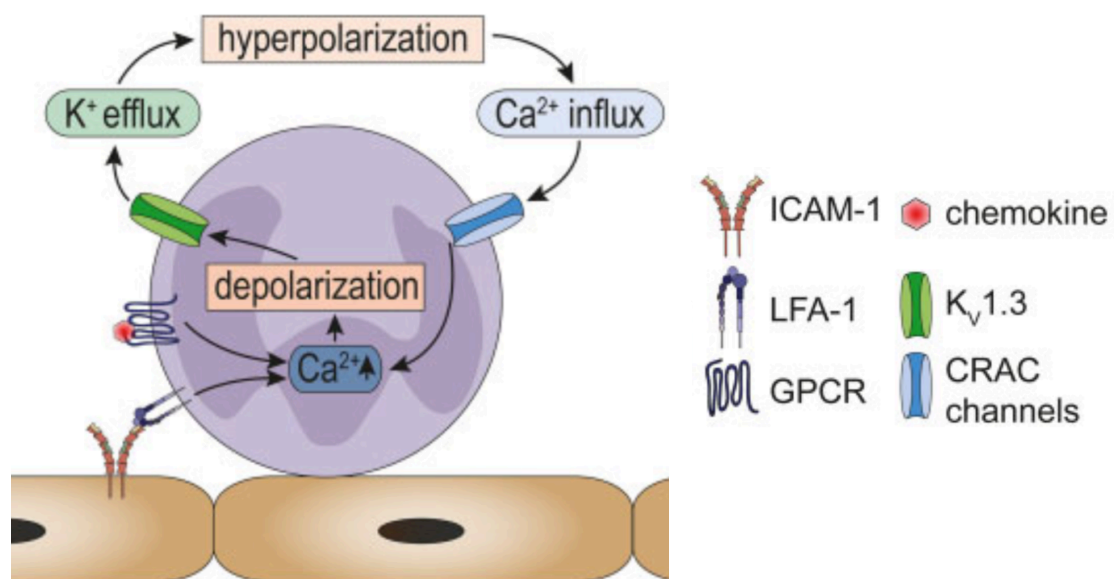


Abbildung 2: Die Funktion von Kaliumkanälen auf Leukozyten.

Kaliumkanäle bilden auf Leukozyten die treibende Kraft für den Einstrom von Calcium. Durch Kaliumausstrom wird das Membranpotential während eines Calciumeinstroms stabilisiert. Abbildung modifiziert aus (Immler et al. 2022).

Bei der Leukozyten-Rekrutierungs-Kaskade handelt es sich um einen sehr fein regulierten Prozess. Diverse Rezeptoren, Signalkaskaden und Ionenkanäle spielen dabei eine Rolle (Immler, Simon, and Sperandio 2018). Als relevante Kaliumkanäle auf Leukozyten sind vor allem der spannungsabhängige Kaliumkanal  $\text{K}_v1.3$  und der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Kaliumkanal  $\text{K}_{Ca3.1}$  beschrieben. Eine Aktivierung



von Kaliumkanälen führt zum Kaliumausstrom und zur Hyperpolarisation der Zellmembran. Diese Membranhyperpolarisation ist für viele  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Zellfunktionen essenziell, da nur mit einem stabilen negativen Membranpotential die treibende Kraft für einen Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle aufrechterhalten werden kann. Einströmendes  $\text{Ca}^{2+}$  selbst depolarisiert die Membran. Ein Calciumeinstrom ohne Kaliumausstrom ist in Immunzellen demnach ein selbstlimitierender Prozess (Abbildung 2) (Feske, Wulff, and Skolnik 2015).

Auf funktioneller Seite ist für neutrophile Granulozyten bekannt, dass Prozesse wie feste Adhäsion (Schaff et al. 2008), Migration (Schwab et al. 2012), Neuordnung des Zytoskeletts (Kruskal, Shak, and Maxfield 1986) oder auch die Effektorfunktionen Phagozytose, ROS-Produktion und Degranulation (Nunes and Demaurex 2010) mit erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen einhergehen. Es liegt also nahe, dass bei all diesen Funktionen auch auswärtsgerichtete Kaliumströme, die die Zellmembran hyperpolarisieren, von großer Bedeutung sind.

### 1.3.1 $\text{K}_v1.3$

Beim spannungsabhängigen Kaliumkanal  $\text{K}_v1.3$  handelt es sich um ein Homotetramer aus vier  $\alpha$  Untereinheiten. Jede dieser vier Untereinheiten besteht wiederum aus sechs Transmembrandomänen S1-S6 und einer P-Schleife. Der Kanal kann sich durch Änderungen in seiner Konformation öffnen und schließen. Als Spannungssensor fungieren vier hintereinanderliegende Arginine in den S4-Segmenten (Feske, Wulff, and Skolnik 2015).

$\text{K}_v1.3$  ist auf T-Zellen (Grissmer et al. 1990), auf Thrombozyten (Fan et al. 2020) und auch auf neutrophilen Granulozyten beschrieben (Immler et al. 2022).

Auf T-Zellen trägt  $\text{K}_v1.3$  maßgeblich zur Adhäsion und Migration bei. Diverse Stimuli bewirken eine Öffnung des Kanals, es kommt zur Aktivierung von  $\beta 1$ -Integrinen (Levite et al. 2000). Sowohl auf T-Zellen (Levite et al. 2000) als auch auf Melanomzellen (Artym and Petty 2002) konnte eine physische Verbindung zwischen dem Kanal und dem Integrin gezeigt werden. Außerdem korrelieren die inhibitorischen Effekte von *Substance P* auf T-Zellen mit ihrer Eigenschaft als Blocker von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Levite et al. 2000). Des Weiteren ist  $\text{K}_v1.3$  auf T-Zellen als Teil der immunologischen Synapse zwischen T-Zelle und antigenpräsentierender Zelle, sowie als Zellzyklusregulator beschrieben (Pérez-García, Ciudad, and López-López 2018). Therapeutisches Interesse an

K<sub>V</sub>1.3 entfachte aber vor allem die Beobachtung, dass aktivierte Effektor-T-Gedächtniszellen eine hohe Dichte an K<sub>V</sub>1.3 aufweisen. Auch Myelin reaktive T-Zellen von Patienten mit Multipler Sklerose zeigen diesen Phänotyp. Die Blockade von K<sub>V</sub>1.3 könnte hier also eine mögliche Therapiestrategie darstellen (Wulff et al. 2003).

Auch als Thrombozytenhemmer scheinen K<sub>V</sub>1.3-Blocker denkbar zu sein. *In vitro* konnte nämlich gezeigt werden, dass K<sub>V</sub>1.3 für die Aggregation, die Adhäsion und die Aktivierung von Plättchen von Nöten ist (Fan et al. 2020). Außerdem zeigte sich in einem entsprechenden Mausmodell *in vivo* bei K<sub>V</sub>1.3-Blockade eine herabgesetzte Thrombusformation in Mesenterialgefäßen.

Für neutrophile Granulozyten konnte unsere Gruppe zeigen, dass K<sub>V</sub>1.3 *in vitro* den Einstrom von Ca<sup>2+</sup> ins Zellinnere reguliert und *in vivo* für Ca<sup>2+</sup>-abhängige Zellfunktionen wie die Zellausbreitung, das Verfestigen der Adhäsion und das intraluminale *Crawling* von großer Bedeutung ist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von K<sub>V</sub>1.3 die Auswanderung von neutrophilen Granulozyten im Peritonitismodell und die Phagozytose von *Escherichia coli* Partikeln herabsetzt (Immler et al. 2022).

Beim aktuell gebräuchlichsten Blocker für den K<sub>V</sub>1.3-Kanal handelt es sich um das Psoralen PAP-1 (5-(4-Phenoxybutoxy) psoralen). Diese Substanz wurde ursprünglich aus *Ruta graveolens* abgeleitet und zeichnet sich dadurch aus, dass sie im Gegensatz zu anderen K<sub>V</sub>1.3-Blockern 23-fach besser K<sub>V</sub>1.3 blockiert als den am Herzen wichtigen Kaliumkanal K<sub>V</sub>1.5. Zudem zeigt PAP-1 keine zytotoxischen oder phototoxischen Effekte und ist bei einem negativen Ames-Test nicht mutagen. PAP-1 wirkt bei einer Konzentration von 10 nM, Cytochrom P450-abhängige Enzyme werden erst bei 100-fach höheren Konzentrationen beeinflusst (Schmitz et al. 2005).

### 1.3.2 K<sub>Ca</sub>3.1

Der zweite wichtige Kaliumkanal auf neutrophilen Granulozyten ist K<sub>Ca</sub>3.1. Er öffnet sich im Gegensatz zu K<sub>V</sub>1.3, sobald Ca<sup>2+</sup> an Calmodulin, das dauerhaft mit dem zytoplasmatischen, C-terminalen Ende des Kanalproteins interagiert, bindet (Feske, Wulff, and Skolnik 2015; Fanger et al. 1999).

K<sub>Ca</sub>3.1 ist auf verschiedenen Immunzellen beschrieben (Pérez-García, Ciudad, and López-López 2018), unter anderem auf T-Zellen (Grissmer et al. 1990) und auf neutrophilen Granulozyten (Henríquez et al. 2016).

Auf naiven T-Zellen und auf zentralen T-Gedächtniszellen wird  $K_{Ca3.1}$  nach Aktivierung verstärkt exprimiert. Wie  $K_V1.3$  bildet auch  $K_{Ca3.1}$  einen Teil der immunologischen Synapse (Pérez-García, Ciudad, and López-López 2018).

In neutrophilen Granulozyten beeinflusst  $K_{Ca3.1}$  Migrationsverhalten und Chemotaxis derart, dass bei einer Depletion von  $K_{Ca3.1}$  auch funktionelle Konsequenzen am Beispiel eines Mausmodells mit akuter Lungenschädigung nachgewiesen werden konnten (Henríquez et al. 2016). Diese Effekte sind damit begründet, dass eine Blockade von  $K_{Ca3.1}$  die Regulation des Zellvolumens bei neutrophilen Granulozyten verhindert (Henríquez et al. 2016). Für die Regulation der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration spielt  $K_{Ca3.1}$  mechanistisch gesehen zwar auch eine Rolle (Feske, Wulff, and Skolnik 2015), experimentell konnte aber keine signifikante Reduktion von  $Ca^{2+}$ -Strömen über die Zellmembran von neutrophilen Granulozyten durch eine Blockade von  $K_{Ca3.1}$  nachgewiesen werden (Immler et al. 2022).

Nichtsdestotrotz bildet die Hemmung von  $K_{Ca3.1}$  einen attraktiven therapeutischen Ansatzpunkt. Beispielsweise konnte durch die Blockierung des Kanals die Proliferation von chronisch lymphatischen Leukämiezellen reduziert werden (Grössinger et al. 2014).

Als Blocker ist aktuell das Pyrazol TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazole) etabliert. Es bindet mindestens 200-fach selektiver an  $K_{Ca3.1}$  als an 15 getestete andere Kaliumkanäle und zeigt bei einer Konzentration von  $5 \mu M$  *in vitro* keine Zytotoxizität, weswegen es auch als Medikament in Betracht kommen könnte (Wulff et al. 2000).

#### 1.4 Das heterodimere Protein S100A8/A9

Auch dem heterodimeren Protein S100A8/A9 kommt bei der Leukozytenrekrutierung eine wichtige regulatorische Funktion zu. Es wirkt klassisch als Alarmin und wird entweder ungerichtet zum Beispiel durch Zelltod oder gerichtet auf bestimmte Signale hin freigesetzt (Pruenster et al. 2016). Die gerichtete Freisetzung kann interessanterweise aber nicht über die klassische Route durch Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat erfolgen, da S100A8/A9 dazu die strukturellen Voraussetzungen nicht erfüllt (Rammes et al. 1997). In der Klinik dient das Protein im Moment als Biomarker für Erkrankungen des entzündlichen Formkreises (z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen), es wird aber auch

als mögliches Ziel für die Therapie entzündlicher Erkrankungen angesehen (Pruenster et al. 2016).

#### 1.4.1 Aufbau und Nomenklatur

Bei der S100 Familie handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die in Wirbeltieren vorkommen (Vogl, Gharibyan, and Morozova-Roche 2012) und deren Gene bis auf wenige Ausnahmen auf dem Lokus 1q21 identifiziert wurden (Schäfer et al. 1995).

S100A8, auch MRP8 oder Calgranulin A genannt, besteht aus 93 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 10,8 kDa. S100A9, beziehungsweise MRP14 oder Calgranulin B, kommt in zwei Isoformen vor, normal mit 113 Aminosäuren und 13,2 kDa, außerdem in einer verkürzten Form mit 110 Aminosäuren und 12,7 kDa (Pruenster et al. 2016). S100A8 und S100A9 beinhalten jeweils zwei *helix-loop-helix* EF-Hand Motive, die  $\text{Ca}^{2+}$  binden und die Bildung von Dimeren ermöglichen (Itou et al. 2002).

S100A8 und S100A9 bilden Oligomere und liegen bevorzugt als Heterodimer S100A8/A9 (auch MRP8/14 oder Calprotectin genannt) vor (Hunter and Chazin 1998). Für die Bildung des Heterodimers sind hydrophobe Aminosäuren in den Heilces I/I' von entscheidender Bedeutung.  $\text{Ca}^{2+}$  ist nicht von Nöten (Leukert, Sorg, and Roth 2005). Nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung - zum Beispiel bei der Zirkulation im Gefäßsystem - bilden sich  $(\text{S100A8/A9})_2$  Tetramere. Dabei werden die funktionell wichtigen Bindungsstellen für TLR4/MD2 (*Toll-like receptor 4/ Myeloid Differentiation factor 2*) abgeschirmt, sodass S100A8/A9 durch die Bildung eines  $(\text{S100A8/A9})_2$  Tetramers nicht mehr an TLR4/MD2 binden kann. Die proinflammatorische Wirkung des S100A8/A9 Heterodimers wird damit lokal begrenzt (Vogl et al. 2018).

#### 1.4.2 Funktion und klinische Bedeutung

S100A8/A9 macht in humanen neutrophilen Granulozyten 40%, in Monozyten 5% des zytosolischen Proteingehalts aus (Pruenster et al. 2016). Außerdem kommt es in Keratinozyten und in inflammatorisch aktivierten Endothelzellen vor (Pruenster et al. 2016).

Intrazellulär scheint die Tetramerform  $(\text{S100A8/A9})_2$  an der Ausbildung von Mikrotubuli beteiligt zu sein (Leukert et al. 2006). Extrazellulär wirkt das Hetero-

dimer S100A8/A9 proinflammatorisch auf Phagozyten, Lymphozyten und Endothelzellen, indem es an Glykosaminoglykane (GAGs), an RAGE (*Receptor for Advanced Glycosylation Endproducts*) und an TLR4 bindet (Pruenster et al. 2016). Außerdem wirkt S100A8/A9 direkt antimikrobiell, da es für Pathogene wichtige zweiwertige Kationen bindet, wie am Beispiel von *Staphylococcus aureus* gezeigt werden konnte. Dieser Mechanismus wird mit dem Begriff *nutritional immunity* beschrieben (Corbin et al. 2008). Nach Kontakt zu  $\text{Ca}^{2+}$  sind für die Tetramerform  $(\text{S100A8/A9})_2$  aber auch antiinflammatorische Effekte beschrieben. Dabei bindet  $(\text{S100A8/A9})_2$  an den Rezeptor CD69. Das lokal proinflammatorisch wirkende S100A8/A9 vermag demnach als  $(\text{S100A8/A9})_2$  die Umgebung vor einer überschießenden Entzündungsreaktion zu schützen (Russo et al. 2022).

Bei diversen inflammatorischen Erkrankungen können erhöhte Spiegel von S100A8/A9 im Serum detektiert werden. So wird das Protein zum einen als Biomarker für Sepsis, akute Lungenschädigung und Asthma verwendet. Zum anderen kann auch der Verlauf chronischer Erkrankungen wie Arthritis, Gicht oder Riesenzellarteriitis (Morbus Horton) mit S100A8/A9 kontrolliert werden. Außerdem korrelieren die S100A8/A9 Serumspiegel von Patienten mit Arteriosklerose, verschiedenen Lungenerkrankungen oder entzündlichen Muskelerkrankungen mit dem Fortschreiten der jeweiligen Erkrankung. Auch der Heilungsprozess bei Hautverletzungen kann auf diese Art und Weise überwacht werden (Chan et al. 2012). Des Weiteren kann auch die Bestimmung fäkaler Konzentrationen von S100A8/A9 in der Klinik sinnvoll sein. So eignen sie sich zur Diagnostik und Verlaufskontrolle von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa (Tibble and Bjarnason 2001). Nicht zuletzt kommt S100A8/A9 auch bei COVID-19 Erkrankungen eine Bedeutung zu. Wie jüngst gezeigt, korrelieren hohe Serumspiegel an S100A8/A9 mit einer schweren Verlaufsform (Silvin et al. 2020).

### 1.4.3 Bedeutung von S100A8/A9 für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

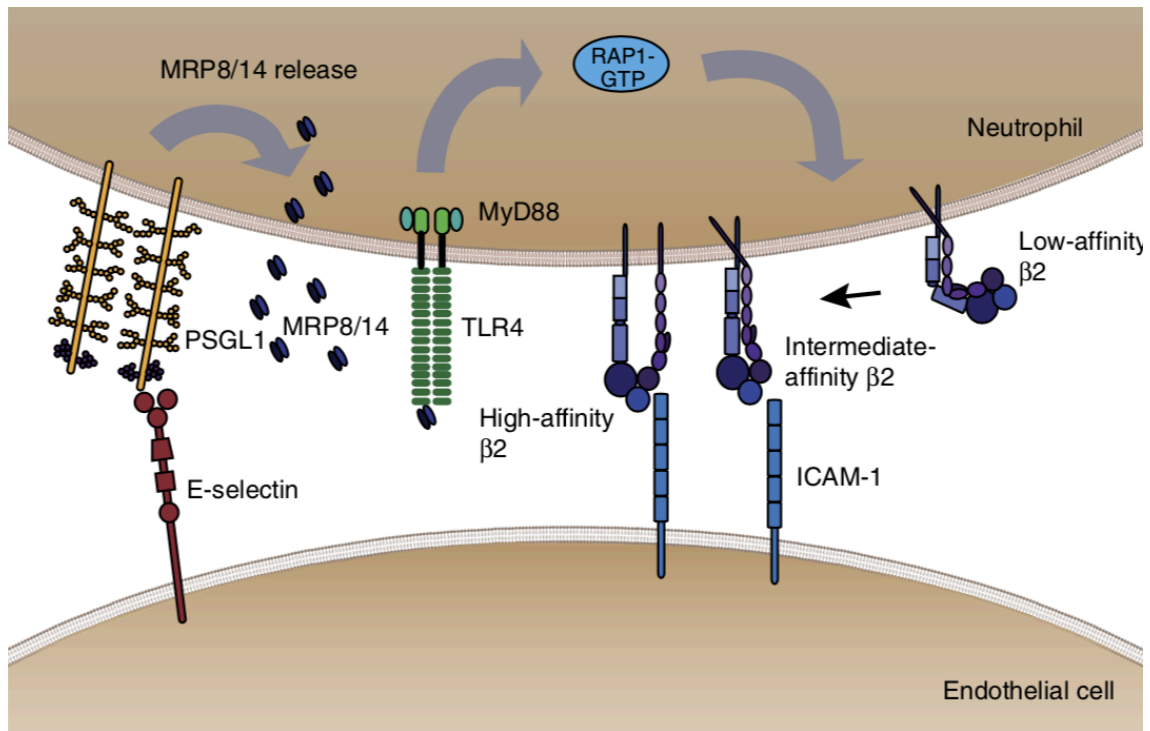


Abbildung 3: Freisetzung von S100A8/A9 führt zur Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen.

In murinen neutrophilen Granulozyten führt die Interaktion von E-Selektin und PSGL-1 zur Freisetzung von S100A8/A9 (MRP8/14), das an TLR4 bindet und so die Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen vermittelt. Abbildung modifiziert aus (Pruenster et al. 2015).

Das S100A8/A9-Heterodimer beeinflusst sowohl Endothelzellen als auch neutrophile Granulozyten und ist somit auf zweierlei Weise für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins entzündete Gewebe von Bedeutung (Pruenster et al. 2016).

Um die Effekte des Proteins auf Endothelzellen aufzudecken, wurden humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMECs) auf genetischer und auf funktioneller Ebene nach Inkubation mit S100A8/A9 untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Transkription proinflammatorischer Zytokine, wie IL-8, Gro- $\alpha$ , Gro- $\beta$  oder MCP-1, sowie der Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 nach S100A8/A9 Exposition gesteigert war. Demgegenüber wurde die Expression von Genen, die für Prozesse wie Wachstum, Differenzierung oder für die Integrität der Endothelschicht von Bedeutung sind, herabgesetzt (Viemann et al. 2005). Außerdem setzt S100A8/A9 die Integrität von Endothelzellen auch direkt herab, indem es sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängig den Tod von Endothelzellen vermittelt (Viemann et al. 2007).

Auf neutrophile Granulozyten wirkt S100A8/A9 genau gegenteilig. Hier zeigten sich bei hohen Konzentrationen des Proteins anti-apoptotische Effekte (Atallah et al. 2012). Außerdem konnte festgestellt werden, dass eine intravenöse Injektion von S100A8/A9 dazu führt, dass neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark in die Blutzirkulation freigesetzt werden (Vandal et al. 2003). Mit der Frage, wie S100A8/A9 den Prozess der Auswanderung von neutrophilen Granulozyten aus dem Gefäßsystem ins entzündete Gewebe beeinflusst, beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe. Dabei konnte in bisherigen Arbeiten gezeigt werden, dass extrazelluläres S100A8/A9  $\beta$ 2-Integrin-abhängiges langsames Rollen und feste Adhäsion fördert (Pruenster et al. 2015). Zunächst konnte nachgewiesen werden, dass eine Stimulation von murinen neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* PSGL-1-abhängig zur Freisetzung von S100A8/A9 führt. Das freigesetzte S100A8/A9 bindet anschließend an TLR-4 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und aktiviert so  $\beta$ 2-Integrine, wobei der GTPase Rap1 bei diesem Schritt eine Bedeutung zukommt (Abbildung 3). Außerdem konnte gezeigt werden, dass S100A8/A9 *in vivo* die Rollgeschwindigkeiten von neutrophilen Granulozyten reduziert und den Anteil an fest adhärennten neutrophilen Granulozyten steigert (Pruenster et al. 2015).

#### 1.4.4 Das NLRP3 Inflammasom als Mediator für die E-Selektin vermittelte Freisetzung von S100A8/A9 durch nt-GSDMD Poren

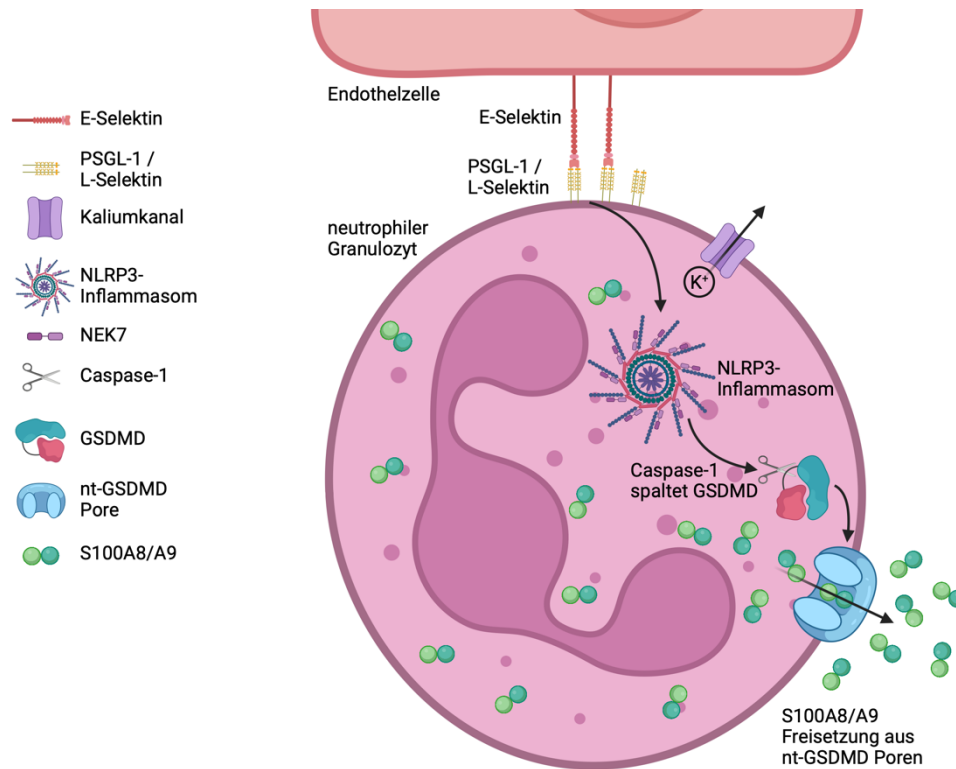


Abbildung 4: S100A8/A9 Freisetzung durch das E-Selektin aktivierte NLRP3 Inflammasom. Nach der Interaktion von E-Selektin mit PSGL-1 (murin), respektive L-Selektin (human) wird das von einem Kaliumausstrom abhängige NLRP3 Inflammasom aktiviert. Dabei lagern sich die NLRP3 Proteine mit NEK7 zusammen, woraufhin das Adapterprotein ASC oligomerisiert. Es lagern sich ASC specks zusammen. Daraufhin wird pro-Caspase-1 durch Spaltung aktiviert. Die aktive Form, Caspase-1 spaltet wiederum Gasdermin D (GSDMD). Die n-terminalen GSDMD Fragmente bilden Poren in der Zellmembran neutrophiler Granulozyten. Sie ermöglichen die Freisetzung von intrazellulär vorrätigem S100A8/A9 (Pruenster et al. 2023). *Created with BioRender.com.*

Unsere Arbeitsgruppe konnte jüngst zeigen, dass für die Freisetzung von intrazellulärem S100A8/A9 aus neutrophilen Granulozyten nach einer kurz andauernden Stimulation mit E-Selektin das NLRP3 Inflammasom und nt-Gasdermin D (nt-GSDMD) Poren verantwortlich sind (Pruenster et al. 2023). So wird dem S100A8/A9 Heterodimer, das strukturell für eine Freisetzung über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat nicht geeignet ist (Rammes et al. 1997), ermöglicht, das Zellinnere von neutrophilen Granulozyten zu verlassen. Der Inflammasomaktivierung folgt dabei kein pyroptotischer Zelltod (Pruenster et al. 2023).

Das 53 kDa schwere Protein GSDMD wurde ursprünglich als bestimmendes Protein bei der Caspase-abhängigen Pyroptose, einer lytischen Form des Zelltods,



beschrieben (Shi et al. 2015). Die kristalline Struktur von GSDMD zeigt, dass das Protein aus einem funktionellen N-terminalen (nt-GSDMD) und einem autoinhibitorischen C-terminalen Teil (ct-GSDMD) besteht. Der N-terminale Teil enthält wichtige Domänen zur Bindung von Lipiden und zur Oligomerisation (Liu et al. 2019) und hat ein Molekulargewicht von 31 kDa (Shi et al. 2015). Poren aus N-terminalen GSDMD-Fragmenten wurden bereits mit Innendurchmessern von 12-14 nm (Aglietti et al. 2016), 15 nm (Gaidt and Hornung 2016) und circa 20 nm (Sborgi et al. 2016) beschrieben. Sie kommen auf Makrophagen, auf dendritischen Zellen und auf neutrophilen Granulozyten vor. Außerdem kann GSDMD auch Cardiolipin-haltige Membranen, wie Mitochondrien- oder Bakterienmembranen permeabilisieren. Darauf lassen sich die direkt antimikrobiellen Effekte, die GSDMD zugeschrieben werden, zurückführen (Orning, Lien, and Fitzgerald 2019).

Verschiedene Signale, wie zum Beispiel extrazelluläres ATP oder verschiedene Pathogene (Broz and Dixit 2016) führen dazu, dass - einhergehend mit einem Kaliumausstrom - das Protein NEK7 an Leucin-reiche Wiederholungssequenzen am NLRP3-Protein bindet und so die Oligomerisierung von ASC Proteinen, die Bildung von ASC *specks* und die Aktivierung von NLRP3 veranlasst wird (He et al. 2016). Dieser Prozess und die daran anschließende Spaltung von pro-Caspase-1 zu Caspase-1 ist eine Voraussetzung für die Spaltung von GSDMD (Broz and Dixit 2016). Interessanterweise spaltet Caspase-1 auch pro-IL-1 $\beta$  zum aktiven Zytokin Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (Mankan et al. 2012). Für die Freisetzung von IL-1 $\beta$  aus Makrophagen wurde - analog zum oben aufgeführten Mechanismus - ein von GSDMD abhängiger Sekretionsweg beschrieben (Evavold et al. 2018).

Die meisten Prozesse, bei denen eine Inflammasomaktivierung keine Pyroptose zur Folge hat, sind in neutrophilen Granulozyten bekannt. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die vom NLRC4-Inflammasom abhängige Freisetzung von IL-1 $\beta$  aus neutrophilen Granulozyten in einem Infektionsmodell mit *Salmonella* keine Pyroptose auslöst (Chen et al. 2014). Ein von Zellmembranporen unabhängiger Autophagozytoseprozess stellt einen weiteren diesbezüglich interessanten Sekretionsmechanismus von IL-1 $\beta$  aus neutrophilen Granulozyten dar. Dabei permeabilisieren GSDMD Poren azurophile Granulae und LC3<sup>+</sup> Autophagosom-

men nach mehreren Stunden Priming und Stimulation. In der Folge wird Neutrophilenelelastase mit anderen Serinproteasen aus den Granulae freigesetzt. Das führt wiederum zu einer alternativen Spaltung von GSDMD und schließlich über Autophagozytoseprozesse zur Freisetzung von IL-1 $\beta$ . Eine Pyroptose unterbleibt auch hier (Karmakar et al. 2020).

Zusammenfassend sind NLRP3-abhängige Prozesse für viele Vorgänge in neutrophilen Granulozyten von Bedeutung. Die vor kurzem nachgewiesene Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch E-Selektin und die daran anschließende Bildung von nt-GSDMD Poren in der Zellmembran neutrophiler Granulozyten stellt hierbei einen besonders interessanten Mechanismus dar, da darüber die Freisetzung von S100A8/A9 und somit eine zusätzliche Aktivierung neutrophiler Granulozyten bewirkt wird (Pruenster et al. 2023).

## 2. Zielsetzung

Wie unsere Arbeitsgruppe gezeigt hat, ermöglichen nt-GSDMD Poren nach E-Selektin Stimulation die Freisetzung von S100A8/A9 aus neutrophilen Granulozyten. Das NLRP3 Inflammasom vermittelt diese Signalkaskade. Hohe extrazelluläre Kaliumkonzentrationen können sowohl die Spaltung von GSDMD als auch die Spaltung von Caspase-1 nach E-Selektin Stimulation verhindern (Pruenster et al. 2023).

Bislang unklar ist, wie die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms in neutrophilen Granulozyten reguliert wird und ob ein expliziter Kaliumkanal dabei eine Regulatorfunktion einnimmt.

Ziel dieser Arbeit ist es nun, die Hypothese zu testen, ob der spannungsabhängige Kaliumkanal  $K_V1.3$  in neutrophilen Granulozyten für einen nach E-Selektin Stimulation auftretenden, auswärtsgerichteten Kaliumstrom mit nachfolgender Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms verantwortlich ist und auf diese Art und Weise die Freisetzung von S100A8/A9 reguliert. Auch die Bedeutung des  $Ca^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanals  $K_{Ca}3.1$  für diesen Prozess soll untersucht werden.

Zu diesem Zwecke werden verschiedene *in vitro* Methoden unter Verwendung des  $K_V1.3$  Inhibitors PAP-1 sowie des  $K_{Ca}3.1$  Inhibitors TRAM-34 herangezogen.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

- 1) Regulieren  $K_V1.3$  und  $K_{Ca}3.1$  die E-Selektin medierte Aktivierung von Caspase-1 in humanen neutrophilen Granulozyten?
- 2) Verhindert die Blockade von  $K_V1.3$  oder  $K_{Ca}3.1$  den E-Selektin-abhängigen Einbau von nt-GSDMD Poren in die Zellmembran humaner neutrophiler Granulozyten?
- 3) Verringert die genetische Depletion von  $K_V1.3$  oder die Blockade von  $K_V1.3$  oder  $K_{Ca}3.1$  die Freisetzung von S100A8/A9 aus murinen neutrophilen Granulozyten *in vitro*?

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Stoffe

##### 3.1.1 Puffer und Lösungen

Folgende Puffer und Lösungen wurden bei den Experimenten verwendet:

Hank's balanced salt solution (HBSS)

1 mM  $\text{CaCl}_2$

1 mM  $\text{MgCl}_2$

0,1 % Glucose

10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure (HEPES)

0,25 % Bovines Serum Albumin (BSA; BSA-freies HBSS bei Western Blots)

7,4 ± 0,02 pH mit NaOH oder HCl eingestellt

Mausanästhesielösung

100 mg/kg Ketamin

20 mg/kg Xylazin

ad 0,9 % NaCl Lösung

Modifizierter RIPA Lysepuffer

150 mM NaCl

50 mM Tris-HCl, pH = 7,3

1 % Triton X-100

0,5 % Na-deoxycholat

2 mM EDTA

5x Laemmli-Puffer

300 mM Tris-HCl, pH = 6,8

0,1 % SDS

25 % Glycerin

20 %  $\beta$ -Mercaptoethanol

0,25 % Bromphenolblau

## Laufpuffer

25 mM	Tris
190 mM	Glycin
0,1 %	SDS

## Blottingpuffer

25 mM	Tris
190 mM	Glycin
2,5 %	Methanol

## TBS Waschpuffer

150 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
25 mM	Tris
7,4 ± 0,02 pH mit NaOH oder HCl eingestellt	

## Formaldehyd Fixierungspuffer

2 %	Formaldehyd
ad	Phospatgepufferte Salzlösung (PBS)

## Triton Lysepuffer

2 %	BSA
0,1 %	Triton-X
ad	Phospatgepufferte Salzlösung (PBS)

**3.1.2 Antikörper**

Tabelle 1: In den Experimenten verwendete Antikörper.

Antikörper	Reaktivität	Farbstoff	Clon	Hersteller	Bestellnummer
Caspase-1	rabbit anti-human		polyclonal	Cell Signaling	#2225

Gasdermin D	rabbit anti-human		polyclonal	Cell Signaling	#96458
nt-Gasdermin D	rabbit anti-human		rabbit monoclonal [EPR20829-408]	abcam	ab215203
GAPDH	mouse anti-human		6C5	Calbiochem	CB1001-500UG
	goat anti-rabbit	IRDye® 800CW	polyclonal	LI-COR	926-32211
	goat anti-mouse	IRDye® 680RD	polyclonal	LI-COR	926-68070
	donkey anti-rabbit	Alexa Fluor™ 488	polyclonal	invitrogen	A21206
	goat anti-rabbit	ATTO 647 N	polyclonal	Rockland Immunchemicals	611-156-122S

### 3.1.3 Substanzen

Tabelle 2: In den Experimenten verwendete Substanzen.

Substanz	IUPAC Name	Funktion	Konzentration in vitro	Konzentration in vivo	Hersteller
PAP-1 (Schmitz et al. 2005)	5-(4-Phenoxybutoxy) psoralen	Blocker Kv1.3	10nM	90 µg / Maus	Sigma Aldrich
TRAM-34 (Wulff et al. 2000)	1-[(2-Chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazole	Blocker K <sub>Ca</sub> 3.1	1µM	3,6 mg / Maus	abcam

### 3.2 Mäuse

Die in den Experimenten verwendeten C57BL/6NCrI Wildtyp-Mäuse wurden bei *Charles River Laboratories* (Sulzfeld, Deutschland) gekauft. Die  $Kcna3^{tm1Lys}$  ( $K_v1.3^{-/-}$ ) Mäuse wurden von *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, Maine, USA) erworben und in den C57BL/6NCrI Hintergrund zurückgekreuzt. Sämtliche Mäuse wurden in der *Core facility Animal Models (CAM)* am *BioMedizinischen Centrum (BMC)* der LMU München in Planegg-Martinsried gehalten. Alle Experimente wurden mit acht bis 25 Wochen alten Tieren durchgeführt. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet. Soweit möglich, wurde versucht, das Alter der Versuchs- an das Alter der Kontrolltiere anzupassen. Alle Mausexperimente wurden von der Regierung von Oberbayern (AZ.: ROB-55.2-2532.Vet\_02-18-22) geprüft und genehmigt.

### 3.3 Isolation muriner neutrophiler Granulozyten

Murine neutrophile Granulozyten wurden aus dem Knochenmark von Mäusen isoliert. Dafür wurden die Tiere getötet, ehe ihre *Ossa coxae*, ihre *Femora* und ihre *Tibiae* entnommen wurden. Anschließend wurde das Mark aus den Knochen gespült. Die so gewonnenen Zellen wurden mithilfe des *EasySep<sup>TM</sup> Mouse Neutrophil Enrichment Kit* (*Stem Cell Technologies*, Vancouver, Kanada) aufgereinigt. Dazu wird das Prinzip der negativen Selektion genutzt: alle Zellen, außer die zu isolierenden neutrophilen Granulozyten, werden mit spezifischen Antikörpern, die an magnetische Partikel gekoppelt sind, markiert und anschließend unter Zuhilfenahme eines Magneten aus der Knochenmarkssuspension entfernt. Für die Negativselektion wird die Knochenmarkssuspension mit *Rat Serum*, *EasySep<sup>TM</sup> Mouse Neutrophil Enrichment Cocktail*, *EasySep<sup>TM</sup> Biotin Selection Cocktail* und *EasySep<sup>TM</sup> D Magnetic Particles* (*Stem Cell Technologies*, Vancouver, Kanada) nach dem Protokoll des Herstellers vorinkubiert.

### 3.4 Isolation humaner neutrophiler Granulozyten

Für die Isolation humaner neutrophiler Granulozyten spendeten gesunde Freiwillige gemäß des dazugehörigen Ethikvotums der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München, München, Deutschland (Az. 611-15) Vollblut. Das Blut wurde in heparinisierten Spritzen abgenommen und auf *Polymorphprep* (*AXI-SHIELD PoC AS*, Dundee, Schottland) im Verhältnis 1 : 1 geschichtet.

Durch Dichtezentrifugation für 35 Minuten bei 500 g wurden die einzelnen Blutzellpopulationen aufgetrennt, sodass die humanen neutrophilen Granulozyten mit der Pipette abgenommen und in HBSS-Puffer (0,1 % Glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 % BSA und 10 mM HEPES (*Sigma-Aldrich*), pH = 7,4) resuspendiert werden konnten. Das Zählen der Zellen erfolgte nach Färbung in Türk'scher Lösung mithilfe einer Neubauer Zählkammer (*LO-Laboroptik GmbH*, Friedrichsdorf, Deutschland).

Die Reinheit der so isolierten neutrophilen Granulozyten wurde mehrfach stichprobenartig mittels Durchflusszytometrie an einem CytoFLEX S (*Beckman Coulter*, Brea, Kalifornien, USA) bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen farbmarkierten Antikörpern gegen CD15 und gegen CD66b angefärbt. Folgende *Gatingstrategie* wurde verwendet: durch das Auftragen von *forward scatter* gegen *sideward scatter* (Abbildung 5 links) konnten Zellen von allen anderen Suspensionsbestandteilen abgegrenzt werden, ehe die so als *Cells* definierte Population auf CD15 und CD66b (Abbildung 5 rechts, CD15 mit APC markiert, CD66b mit PB450) untersucht wurde. Neutrophile Granulozyten (polymorph-kernige Zellen, *PMNs*) wurden als CD15<sup>+</sup> / CD66b<sup>+</sup> Zellen definiert. Im Durchschnitt konnten  $97,2 \pm 0,3$  % (Mittelwert  $\pm$  SEM) der isolierten lebenden Zellen als neutrophile Granulozyten identifiziert werden.

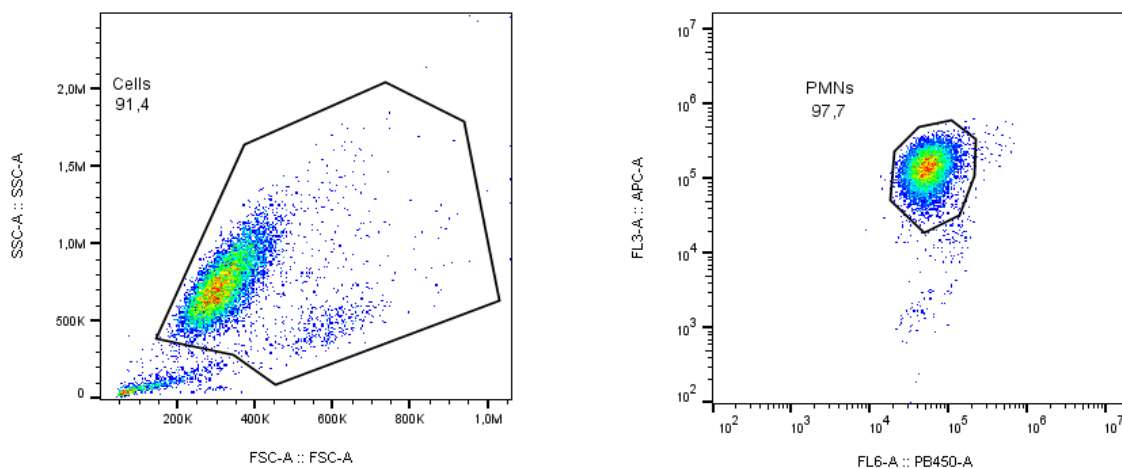


Abbildung 5: Reinheitsgrad isolierter humaner neutrophiler Granulozyten.

Stichprobenartig wurde die Reinheit, der in den Experimenten verwendeten humanen neutrophilen Granulozyten überprüft. Fertig isolierte Zellen wurden dazu mit Antikörpern gegen CD15 und CD66b markiert. Mittels Durchflusszytometrie bestimmte man anhand der oben dargestellten *Gatingstrategie* den Anteil neutrophiler Granulozyten.



## 3.5 Western Blot

### 3.5.1 Vorbehandlung, Stimulation und Lyse der Proben

Zur Western Blot Analyse wurden Proben aus isolierten humanen neutrophilen Granulozyten hergestellt. Die Zellen wurden in HBSS Puffer (ohne BSA) aufgenommen, in Türk'scher Lösung gefärbt und gezählt. Nachdem Proben mit je  $10 \times 10^6$  Zellen separiert wurden, wurden die Zellen für zehn Minuten mit PAP-1 (5-(4-Phenoxybutoxy)psoralen; *Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, USA;  $1 \mu\text{M}$ ), TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl) diphenylmethyl]-1H-pyrazole; *abcam*, Cambridge, Großbritannien;  $1 \mu\text{M}$ ) oder der Kombination aus beiden Inhibitoren vorbehandelt. Auch wenn für PAP-1 ansonsten eine Konzentration von 10 nM üblich ist, werden auch bei einer Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  noch keine anderen Kaliumkanäle in relevantem Ausmaß blockiert (Schmitz et al. 2005). Anschließend wurden die Proben zehn Minuten lang bei  $37^\circ\text{C}$  mit rekombinantem humanen E-Selektin (CD62E, ADP-1, CF; *R&D Systems*, Minneapolis, Minnesota, USA;  $1 \mu\text{gml}^{-1}$ ) stimuliert, bevor durch Zugabe von EDTA (50mM) die Aktivierung von E-Selektin unterbunden wurde (Patel, Cuvelier, and Wiehler 2002). Anschließend wurden die Proben für acht Minuten bei 300 g zentrifugiert, sodass der Zellüberstand vom -pellet getrennt werden konnte.

Proteine in den Überständen wurden für mindestens 3 Stunden bei  $-20^\circ\text{C}$  mit Aceton ausgefällt, in 20  $\mu\text{l}$  zweifach Laemmli-Puffer aufgenommen und abschließend für fünf Minuten bei  $95^\circ\text{C}$  denaturiert.

Die Zellen wurden mit modifiziertem RIPA-Puffer, supplementiert mit fünffach Laemmli-Puffer und Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (*CellSignaling*, Danvers, Massachusetts, USA) für zehn Minuten lysiert. Daraufhin wurde das Zellgemisch mit einem Ultraschallprozessor UP50H (*hielscher Ultrasound technology*, Teltow, Deutschland) sonifiziert (Cycle 1; Amplitude 60 %), um zusätzliche Proteine aus den bereits lysierten Zellmembranbestandteilen zu lösen. Durch Zentrifugation wurden die nun freien Proteine von den restlichen Zellbestandteilen getrennt und anschließend ebenfalls bei  $95^\circ\text{C}$  für fünf Minuten denaturiert.

### 3.5.2 Proteinauftrennung und -detektion

Proteine aus den Zellüberständen wurden in 15 % SDS-haltigen Acrylamidgelen aufgetrennt, bevor sie auf Immobilon®-FL (*Merck Millipore Ltd.*, Burlington, Mas-

sachusetts, USA) Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membranen mit 0,45 µm Porengröße übertragen und schließlich mit *Tris buffered Saline* (TBS) und *Odyssey® Blocking Buffer* (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) geblockt wurden. Die Membranen wurden daraufhin mit einem Primärantikörper gegen Caspase-1 (#2225, *Cell Signaling*, Danvers, Massachusetts, USA) inkubiert und mit TBS-T (TBS mit 0,1% *Tween*) gewaschen. Anschließend wurden sie mit einem Sekundärantikörper (*IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit 926-32211*, LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) gefärbt, erneut mit TBS-T und TBS gewaschen und schließlich mit einem *Odyssey® CLx Scanner* (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) gescannt.

50 µl der Zellpelletproben wurden zum Nachweis von Gasdermin D auf 12 % SDS-haltige, 20 µl zum Nachweis von pro-Caspase-1 auf 15 % SDS-haltige Acrylamidgele aufgetragen. Das weitere Vorgehen erfolgte analog zur Behandlung der Zellüberstände. Je nach Versuchsziel wurde mit dem oben beschriebenen Primärantikörper gegen Caspase-1 oder einem Antikörper gegen Gasdermin D (#96458, *Cell Signaling*, Danvers, Massachusetts, USA) gearbeitet. Um die Ergebnisse auf die geladene Proteinmenge normalisieren zu können, wurde außerdem das von allen neutrophilen Granulozyten konstitutiv exprimierte *housekeeping protein* GAPDH mit einem Primärantikörper (CB1001, *Merck Millipore Ltd.*, Burlington, Massachusetts, USA) markiert, mit einem Sekundärantikörper (*IRDye® 680RD Goat anti-Mouse 926-68070*, LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) angefärbt und schließlich detektiert.

### 3.5.3 Auswertung

Alle Proteinbanden wurden mit der Software *Image Studio* (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) unter Berücksichtigung des Hintergrundsignals mithilfe der Medianfunktion quantifiziert. Um die richtige Bande auszuwerten, wurde auf allen Gelen der Marker *Chameleon® duo pre-stained protein ladder* (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) mit aufgetragen.

### 3.6 S100A8/A9 Freisetzung *in vitro*

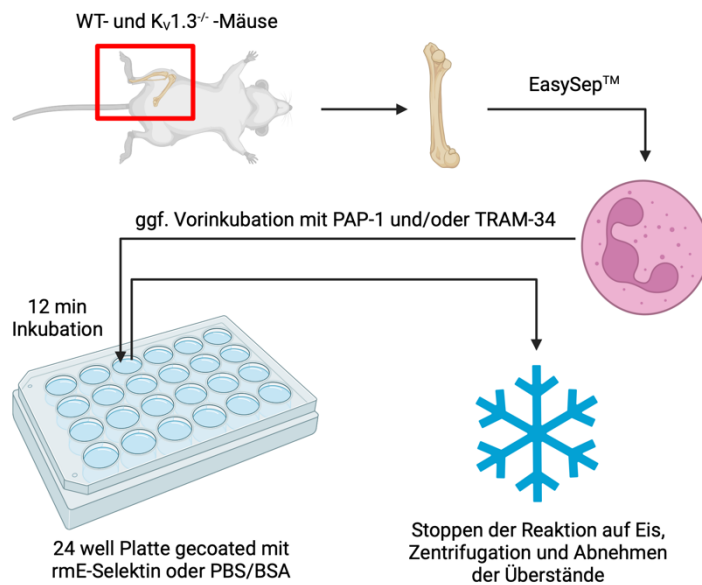


Abbildung 6: S100A8/A9 Freisetzung *in vitro*: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Created with BioRender.com.

Die Untersuchung der S100A8/A9 Freisetzung *in vitro* wird schematisch in Abbildung 6 beschrieben. Es wurden 24 well Platten über Nacht bei 4 °C mit rekombinantem murinem E-Selektin (*CD62E Fc chimera*, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA; 10 µgml<sup>-1</sup>) oder PBS / 0,1 % BSA *gecoatet*, ehe sie mit 5 % Casein (*Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, USA) für drei Stunden geblockt wurden. In die gewaschenen wells wurden daraufhin je 5 x 10<sup>5</sup> mit EasySep™ aus murinem Knochenmark isolierte und in HBSS-Puffer suspendierte neutrophile Granulozyten gegeben. Die Zellen inkubierten danach 2 Minuten lang ruhend und anschließend 10 Minuten lang schüttelnd bei 37 °C in den bereits vorher *gecoateten wells*. Als Positivkontrolle wurde zu einer Probe jeder Gruppe lösliches Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA; *Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, USA; 1 µM) gegeben. Um die Stimulationsreaktion zu stoppen, wurden die Zellen anschließend in Eppendorf Reaktionsgefäße (*Eppendorf*, Hamburg, Deutschland) überführt und auf Eis gestellt. Durch Zentrifugation bei 300 g für fünf Minuten wurden die Zellen von den Überständen getrennt. Die Überstände wurden anschließend nach Münster (Prof. Dr. T. Vogl, Institut für Immunologie, WWU Münster) geschickt. Dort wurde mittels ELISA die S100A8/A9 Konzentration ermittelt (Vogl et al. 2007). Der Versuch wurde mit Zellen von C57BL/6NCrI Wildtyp- und  $Kcna3^{tm1Lys}$  ( $K_v1.3^{-/-}$ )-Mäusen durchgeführt. Einige Zellen wurden außerdem für

zehn Minuten bei 37 °C mit PAP-1 (5-(4-Phenoxybutoxy) psoralen, *Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, USA; 10 nM), TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl) diphenylmethyl] -1H-pyrazole, *abcam*, Cambridge, Großbritannien; 1 µM) oder der Kombination aus beiden Inhibitoren vorbehandelt.

### 3.7 Immunfluoreszenzmikroskopie humaner neutrophiler Granulozyten

#### 3.7.1 Vorbehandlung, Stimulation und nt-GSDMD Färbung

Für die Mikroskopieversuche wurden unbehandelte acht- oder zwölf-well Kamern mit abziehbarem Silikon Aufsatz (*ibidi*, Martinsried, Deutschland) für 30 Minuten mit Poly-L-Lysin (*Sigma-Aldrich*, St. Louis, Missouri, USA) *gecoated*. Anschließend wurden humane neutrophile Granulozyten, zum Teil mit PAP-1 (5-(4-Phenoxybutoxy) psoralen, *Sigma Aldrich*, St. Louis, Missouri, USA; 10 nM) oder TRAM-34 (1-[(2-Chlorophenyl) diphenylmethyl] -1H-pyrazole, *abcam*, Cambridge, Großbritannien; 1 µM) versetzt, in die gewaschenen wells gegeben. Daraufhin ließ man die Zellen für 15 Minuten im Brutschrank ruhen, ehe sie zehn Minuten lang bei 37 °C mit rekombinantem humanem E-Selektin (CD62E, ADP-1, CF; *R&D Systems*, Minneapolis, Minnesota, USA; 1 µgml<sup>-1</sup>) oder PBS als Kontrolle stimuliert wurden. Nach der Stimulation wurden die nicht adhärierenden Zellen durch Waschen entfernt, die an Poly-L-Lysin haftenden neutrophilen Granulozyten wurden 15 Minuten lang mit 2 % Formaldehyd (FA) fixiert. Bevor man die Zellen anschließend mit 0,1 % Triton X-100 in 2 % BSA/PBS permeabilisierte, färbte man ihre Zellmembran mit Weizenkeim-Agglutinin (WGA; *Thermo Fisher Scientific*, Waltham, Massachusetts, USA; 5 µg/ml). Für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurde ein mit Alexa Fluor™ 680 markiertes WGA, für die *Stimulated Emission Depletion (STED)* Aufnahmen ein mit Alexa Fluor™ 594 markiertes WGA verwendet. Daraufhin wurde nt-Gasdermin D mit einem Primärantikörper (ab215203; *abcam*, Cambridge, Großbritannien) detektiert und mit einem Sekundärantikörper markiert. Als Sekundärantikörper wurde für die konfokalmikroskopischen Aufnahmen ein mit Alexa Fluor™ 488 markierter Antikörper (*Donkey anti-Rabbit IgG*, *invitrogen*, Carlsbad, Kalifornien, USA) verwendet, bei den Präparaten für die STED-Mikroskopie wurde der nt-Gasdermin D Antikörper mit

einem mit ATTO 647 N konjugierten Sekundärantikörper (#611-156-122S, *Rockland Immunochemicals, Inc.*, Gilbertsville, Pennsylvania, USA) markiert. Anschließend wurden die Kerne der fixierten und permeabilisierten Zellen mit DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol; 1  $\mu\text{gml}^{-1}$ ; *invitrogen*, Waltham, Massachusetts, USA) gefärbt. Alle beschriebenen Antikörper wurden in *Dako antibody diluent* (*Agilent Technologies*, Santa Clara, Kalifornien, USA) verdünnt. Die nun fertig angefärbten Zellen wurden schlussendlich mit *VECTASHIELD® PLUS Antifade Mounting Medium* (*Vector Laboratories, Inc.*, Burlingame, Kalifornien, USA) unter einem 170  $\mu\text{m}$  dicken Deckglas *gemountet*, ehe das Präparat von außen mit handelsüblichem klarem Nagellack versiegelt wurde.

### 3.7.2 Konfokale Laserscanning- und STED-Mikroskopie

Sowohl alle konfokalmikroskopischen als auch alle STED Aufnahmen entstanden an einem inversen Leica SP8X WLL Mikroskop in der *Core facility Bioimaging am Biomedizinischen Centrum (BMC)* der LMU München in Planegg-Martinsried. Für alle Aufnahmen wurde ein 93x / 1.30 GLYC Objektiv verwendet. Um Störsignale zwischen den einzelnen Kanälen zu verhindern, wurden alle Bilder sequenziell aufgenommen. Bei den konventionellen konfokalmikroskopischen Aufnahmen wurden *Z-Stacks* mit einer Einzelaufnahme alle 0,33  $\mu\text{m}$  in einem manuell definierten Stackbereich von etwa 6  $\mu\text{m}$  angefertigt, sodass die komplette Zelle als dreidimensionales Objekt aufgezeichnet werden konnte. Bei den STED Bildern wurde lediglich eine einzelne Ebene inmitten der Zelle mikroskopiert, die die Signalverteilung in der Zelle repräsentativ widerspiegelt.

Die DAPI Fluorophore (Exzitation 405 nm; Detektion 421 - 450 nm) wurden mit einem kontinuierlichen 405 nm Laser angeregt und mit einem konventionellen *Photomultiplier Tube (PMT)* detektiert.

Bei den herkömmlichen konfokalen Aufnahmen wurden die Farbstoffe Alexa Fluor™ 488 (Exzitation 488 nm; Detektion 500 - 590 nm) und Alexa Fluor™ 680 (Exzitation 670 nm; Detektion 690 - 750 nm) mit einem bei 80 MHz pulsierenden *White Light Laser (WLL)* angeregt. Die Signale wurden mit *Hybrid Photo Detektoren (HyDs)* aufgenommen.

Für die STED Aufnahmen wurden die Fluorophore Alexa Fluor™ 594 (Exzitation 633 nm; Detektion 605 - 640 nm) und ATTO 647 N (Exzitation 775 nm; Detektion 645 - 720 nm) mit einem bei 80 MHz pulsierenden STED Laser angeregt. Die Signale wurden mit *Hybrid Photo Detektoren* aufgenommen. Es wurden sowohl

konventionelle STED als auch FLIM-STED (Tau-STED) Aufnahmen angefertigt. Zur Kontrolle wurden alle mit STED Technik aufgenommenen Bilder mithilfe eines *White Light Lasers (WLL)* auch konventionell konfokalmikroskopisch wiederholt.

### 3.7.3 Auswertung mit Kolokalisationsanalyse

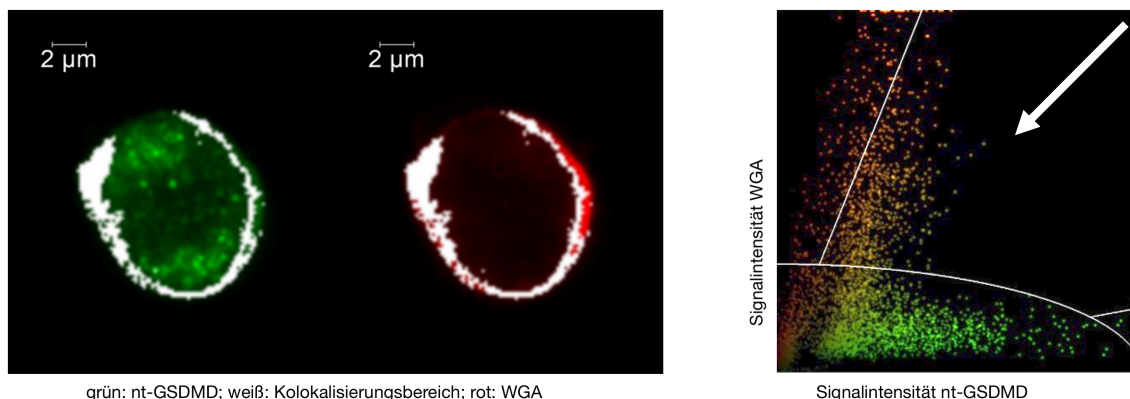


Abbildung 7: Kolokalisationsanalyse zwischen nt-GSDMD- und WGA-Signal.

Beispielhafte Veranschaulichung der Kolokalisation (weiß) zwischen nt-GSDMD- (grün) und WGA-Signal (rot) einer auszuwertenden Zelle: Im Punktdiagramm werden für jeden Pixel die Signalintensitäten beider Kanäle gegeneinander aufgetragen, die Linien markieren die *Gatingstrategie*. Der Pfeil markiert das Feld derjenigen Pixel, die sowohl ein positives nt-GSDMD- als auch ein positives WGA-Signal aufweisen.

Die Auswertung der Bilder erfolgte durch die Quantifizierung der Kolokalisierungsraten der Signale von WGA und nt-Gasdermin D. Dazu wurden die einzelnen Bilder mit der Software LASX (*Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland*) analysiert. Das Vorgehen dabei zeigt exemplarisch Abbildung 7. Zunächst wurde aus dem aufgenommenen *Z-Stack* eine Einzelaufnahme zur Analyse ausgewählt. Die Auswahl erfolgte empirisch. Ausgewählt wurde das Bild, bei dem das aufgenommene WGA-Signal einen möglichst sauberen Ring bildete. In der rechtsseitigen Grafik (Abbildung 7) sind in einem Punktdiagramm nun die Intensitäten von WGA und nt-GSDMD aller Pixel des ausgewählten Bildes gegeneinander aufgetragen. Zur Auswertung wurde der Fokus nun nur auf die Zellmembran gelegt. Hierfür wurden zunächst alle Pixel, die kein WGA Signal aufwiesen, ausgeschlossen. Von den nun verbleibenden Pixeln wurde der Anteil an Pixeln, die neben dem WGA auch ein starkes nt-Gasdermin D Signal aufweisen, bestimmt. Dieser Anteil entspricht der Kolokalisierungsrate in Prozent. Die *Gatingstrategie* - ab wann das WGA Signal eines Pixels stark genug ist, damit dieser

in die Auswertung mit eingeht und ab wann ein Pixel als nt-GSDMD positiv definiert wird - wurde anhand von Negativ- (kein Inhibitor; alle Färbungen; unstimuliert) und Positivkontrollgruppe (kein Inhibitor; alle Färbungen; mit E-Selektin stimuliert) bestimmt und immer auf alle Bilder eines Versuchstages angewendet. Eine verblindete Auswertung konnte deswegen nicht erfolgen.

Diese Art der Kollokalisationsanalyse kann über die in Abbildung 7 (linker Teil) dargestellten *merges* veranschaulicht werden. Hier wird zusätzlich zu den Signalen für nt-GSDMD (grün) und WGA (rot) auch der Bereich der in die Auswertung eingehenden Kollokalisierung (weiß) dargestellt.

Außerdem wurde das Experiment durch die Auswahl und Gegenüberstellung repräsentativer Bilder der jeweiligen Versuchskonditionen ausgewertet.

### 3.8 Statistik

Das statistische Testen der für die Arbeit erhobenen Daten erfolgte mit der Software *GraphPad PRISM 7.04* (*GraphPad Software*, San Diego, Kalifornien, USA). Die Daten wurden für die Arbeit in Säulendiagrammen abgebildet. Die Säulen geben den Mittelwert der Datengruppe an, zur Abschätzung der Abweichung der einzelnen Daten vom Mittelwert wird in den Grafiken zusätzlich jeder einzelne Datenpunkt, sowie der Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Da in der Arbeit mehr als zwei nominalskalierte Gruppen im Hinblick auf eine intervallskalierte Variable untersucht wurden, wurde mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (*one-way analysis of variance*) gearbeitet. Die verschiedenen Gruppen wurden mit multiplen Vergleichen untersucht. Der Unterschied zwischen zwei Gruppen wurde als signifikant bezeichnet, sobald eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  errechnet wurde. Signifikanzen wurden folgendermaßen mit Sternchen in den Grafiken gekennzeichnet: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,005$ .

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Kv1.3 und K<sub>Ca</sub>3.1 regulieren die E-Selektin medierte Aktivierung von Caspase-1 in humanen neutrophilen Granulozyten

In neutrophilen Granulozyten wird nach dem Kontakt mit E-Selektin intrazellulär die NLRP3 Inflammasomkaskade in Gang gesetzt (Pruenster et al. 2023). Um herauszufinden, inwieweit die Aktivierung von Caspase-1 diesen Prozess beeinflusst, wurden neutrophile Granulozyten von gesunden, erwachsenen Blutspendern mit löslichem, trägerstoff-freiem E-Selektin stimuliert. Ihre Überstände wurden anschließend mittels Western Blot auf Caspase-1 untersucht. Beim Nachweis von Caspase-1 wurde das Augenmerk auf die Zellüberstände gelegt, da die aktive, gespaltene Caspase-1 mit einem Molekulargewicht von circa 20 kDa (Karmakar et al. 2020) inflammasomabhängig in die Zellmembran eingebaute, circa 10-20 nm große nt-GSDMD Poren (Aglietti et al. 2016; Gaidt and Hornung 2016; Sborgi et al. 2016) passieren und so die stimulierte Zelle verlassen kann. Proben von Zellen, die für zehn Minuten mit E-Selektin inkubiert wurden, wiesen einen signifikant höheren Gehalt an Caspase-1 auf als mit PBS stimulierte Kontrollproben. Die Intensität der Proteinbande lag in der E-Selektin-Gruppe im Mittelwert bei  $32.3 \pm 5.7$ , in der PBS Kontrollgruppe bei  $13.8 \pm 1.3$  (Abbildung 8, links). Dies bestätigt, dass E-Selektin das NLRP3 Inflammasom in neutrophilen Granulozyten aktiviert.

Außerdem zeigte sich, dass Proben, die vor der Stimulation mit PAP-1, einem Inhibitor des spannungsabhängigen Kaliumkanals Kv1.3, oder mit TRAM-34, einem Inhibitor des Calcium-abhängigen Kaliumkanals K<sub>Ca</sub>3.1, inkubiert wurden, signifikant weniger Caspase-1 enthielten als die stimulierte Kontrollgruppe ohne Inhibitor (Abbildung 8, links). Bei den mit PAP-1 vorbehandelten Proben lag die Intensität im Mittelwert bei  $14.4 \pm 0.2$ , bei TRAM-34 bei  $18.1 \pm 1.9$ . Um mögliche additive Effekte der beiden Inhibitoren aufzudecken, wurden einige Proben auch mit der Kombination aus PAP-1 und TRAM-34 vorbehandelt. Sie erzeugten eine mittlere Intensität von  $18.7 \pm 2.0$  und damit ebenfalls signifikant weniger Signal als die E-Selektin Gruppe ohne Inhibitor. Die Kombination beider Inhibitoren verursachte aber keine zusätzliche Reduzierung des Caspase-1-Gehalts gegenüber den Proben, die mit einem einzelnen Inhibitor inkubiert worden waren.



Um ausschließen zu können, dass die beobachteten Effekte auf eine unterschiedliche Anzahl an Zellen in den Proben oder auf eine unterschiedliche Menge an geladenem Protein zurückzuführen sind, wurden auch die zu den Überständen gehörigen Zellpellets untersucht. In ihnen wurde mittels Western Blot der Gehalt an pro-Caspase-1, dem noch nicht gespaltenen Vorläuferprotein der Caspase-1, bestimmt. Es zeigte sich, dass in Bezug auf die pro-Caspase-1 - normalisiert auf das konstitutiv exprimierte Protein GAPDH - keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen auszumachen waren (Abbildung 8, rechts). Zusammenfassend lässt sich daraus ableiten, dass  $K_{V1.3}$  und  $K_{Ca3.1}$  gleichermaßen für die Spaltung von pro-Caspase-1 und damit für die Freisetzung von Caspase-1 von Bedeutung sind. Die Blockierung eines der beiden genannten Kaliumkanäle reicht aus, um die Spaltung von pro-Caspase-1 in neutrophilen Granulozyten nach E-Selektin Stimulation signifikant herabzusetzen.

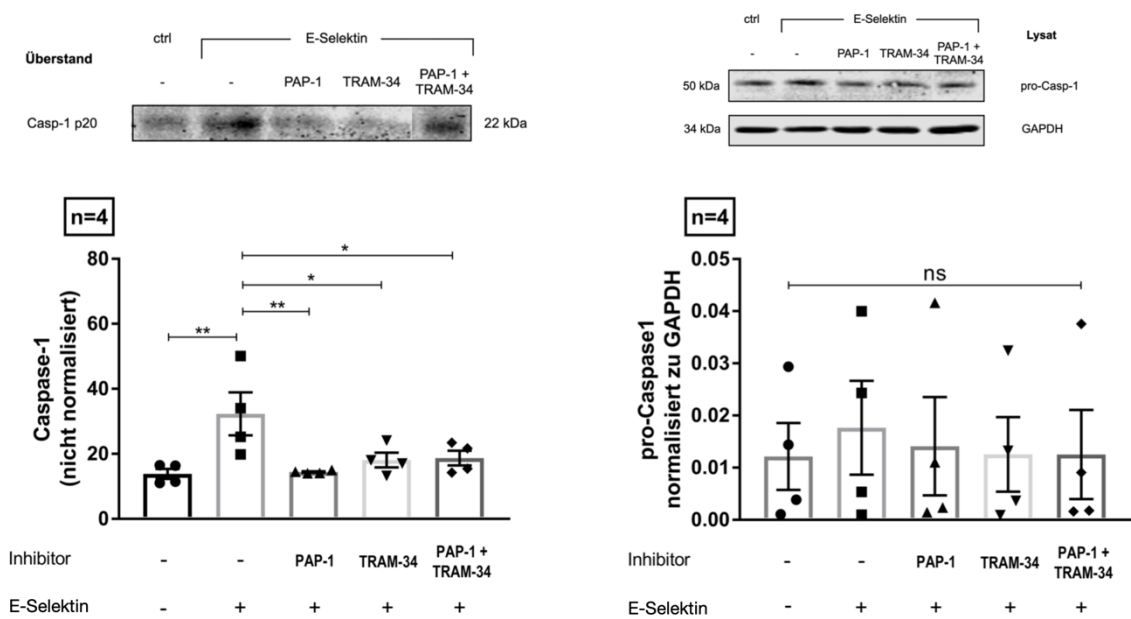


Abbildung 8: Caspase-1 in Zellüberständen nach Stimulation mit E-Selektin.

Neutrophile Granulozyten wurden mit PAP-1, TRAM-34, der Kombination aus beiden Kaliumkanalinhibitoren oder einem Vehikel vorinkubiert, ehe sie mit E-Selektin oder Vehikel stimuliert wurden. In den Überständen der Zellen wurde der Gehalt an Caspase-1 mittels Western Blot bestimmt (links) [n = 4, ANOVA, p (-/-, -/+ ) = 0,0051; p (-/+, PAP-1/+) = 0,0064; p (-/+, TRAM-34/+) = 0,0299; p (-/+, PAP-1 + TRAM-34/+) = 0,0328], in den Zellpellets der Gehalt an pro-Caspase-1 und GAPDH (rechts) [n=4, ANOVA]

## 4.2 Die Blockade von Kv1.3 oder K<sub>Ca</sub>3.1 verhindert den E-Selektin-abhängigen Einbau von nt-GSDMD Poren in die Zellmembran humaner neutrophiler Granulozyten

### 4.2.1 Nachweis mittels Western Blot

Um die funktionelle Konsequenz der Caspase-1 Aktivierung (Abbildung 8) zu untersuchen, wurden die Zellpellets derselben Proben mittels Western Blot auch auf n-terminales Gasdermin D (nt-GSDMD) untersucht. nt-GSDMD entsteht, indem sein Vorläuferprotein GSDMD von aktiver Caspase-1 gespalten wird. Die dabei entstehenden n-terminalen Fragmente bilden anschließend Poren in der Zellmembran neutrophiler Granulozyten (Broz and Dixit 2016). Um eventuelle Ungenauigkeiten beim Herstellen oder beim Laden der Proben auszumitteln, wurde die Menge an nt-GSDMD auf das konstitutiv exprimierte Protein GAPDH normalisiert.

Für zehn Minuten mit E-Selektin stimulierte Proben enthielten hierbei bei einem mittleren Signalquotienten von  $0,0018 \pm 0,0002$  signifikant mehr nt-GSDMD als mit PBS stimulierte Kontrollproben, deren mittlerer Signalquotient bei  $0,0010 \pm 0,0001$  lag (Abbildung 9). Diese Befunde bestätigen die E-Selektin-abhängige Inflammasomaktivierung in neutrophilen Granulozyten (Pruenster et al. 2023).

Bei der Untersuchung der Auswirkungen der Kaliumkanalinhibitoren PAP-1 für den spannungsabhängigen Kaliumkanal Kv1.3 und TRAM-34 für den Calcium-abhängigen Kaliumkanal K<sub>Ca</sub>3.1 zeigte sich, dass beide den Gehalt an nt-GSDMD nach E-Selektin Stimulation signifikant verringern. Der Mittelwert des Intensitätsquotienten lag bei den mit PAP-1 vorbehandelten Zellen bei  $0,0013 \pm 0,0002$ , bei mit TRAM-34 vorbehandelten bei  $0,0012 \pm 0,0002$  (Abbildung 9). Auch hier zeigten sich keine signifikanten additiven Effekte für die Kombination beider Stoffe. Zellen, die mit beiden Inhibitoren inkubiert worden waren, erzielten einen mittleren Intensitätsquotienten von  $0,0011 \pm 0,0001$  und enthielten gegenüber der E-Selektin Kontrollgruppe signifikant weniger nt-GSDMD (Abbildung 9). Signifikante Unterschiede zu den Gruppen mit je einem Inhibitor zeigten sich nicht.

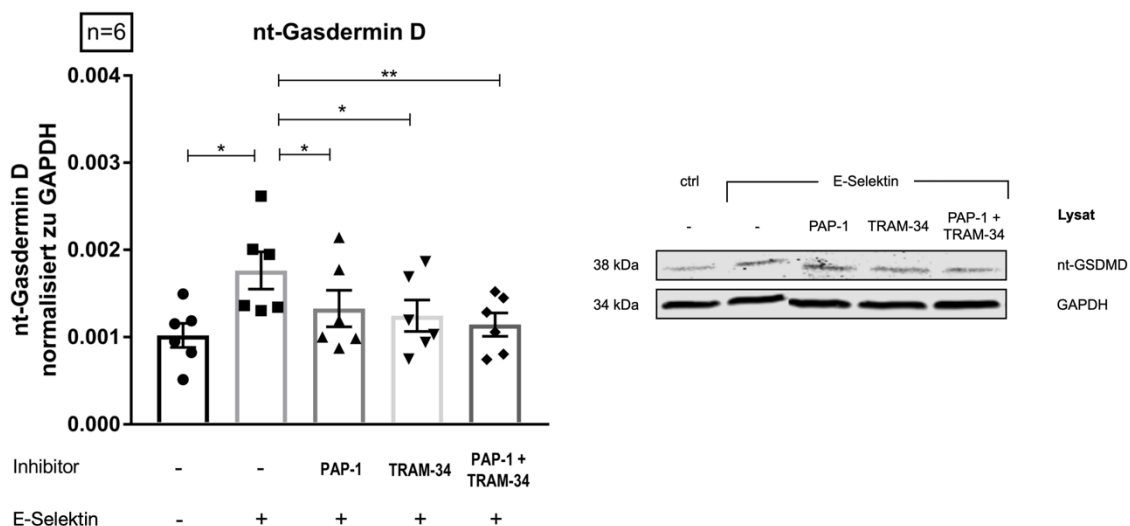


Abbildung 9: nt-GSDMD in Zelllysaten nach E-Selektin Stimulation.

Neutrophile Granulozyten wurden mit PAP-1, TRAM-34, der Kombination aus beiden Kaliumkanalinhibitoren oder einem Vehikel vorinkubiert, ehe sie mit E-Selektin oder Vehikel stimuliert wurden. Die Zellpellets dieser Proben wurden mittels Western Blot auf den Gehalt an nt-GSDMD und GAPDH untersucht [n = 6, ANOVA, p (-/-, -/+) = 0,0158; p (-/+, PAP-1/+) = 0,0127; p (-/+, TRAM-34/+) = 0,0456; p (-/+, PAP-1 + TRAM-34/+) = 0,0087].

#### 4.2.2 Nachweis mittels Immunofluoreszenz

Um nachzuweisen, dass das detektierte nt-GSDMD seiner beschriebenen Funktion als Porenbildner in der Plasmamembran auch nachkommt (Broz and Dixit 2016), wurden mit E-Selektin stimulierte neutrophile Granulozyten zudem mikroskopiert. Sowohl mit konventioneller konfokaler als auch mit STED Mikroskopie wurde dabei die Lokalisation von nt-GSDMD im Vergleich zum Membranmarker Weizenkeim-Agglutinin (WGA) dargestellt. Da WGA zugegeben wurde, bevor die Zellen permeabilisiert wurden, markiert es in diesem Fall recht spezifisch die Zellmembran. Die Membranen im Zellinneren sind kaum angefärbt.

Vor allem mit Hilfe der hochauflösenden STED Aufnahmen (Abbildung 10) konnte gezeigt werden, dass das nt-GSDMD Signal einen mit dem WGA Signal der Zellmembran kolocalisierenden Ring bildet, wenn die Zellen mit löslichem E-Selektin stimuliert wurden. Wurden die Zellen vor der E-Selektin Stimulation mit PAP-1 vorbehandelt, bleibt die beobachtete Ringbildung aus.

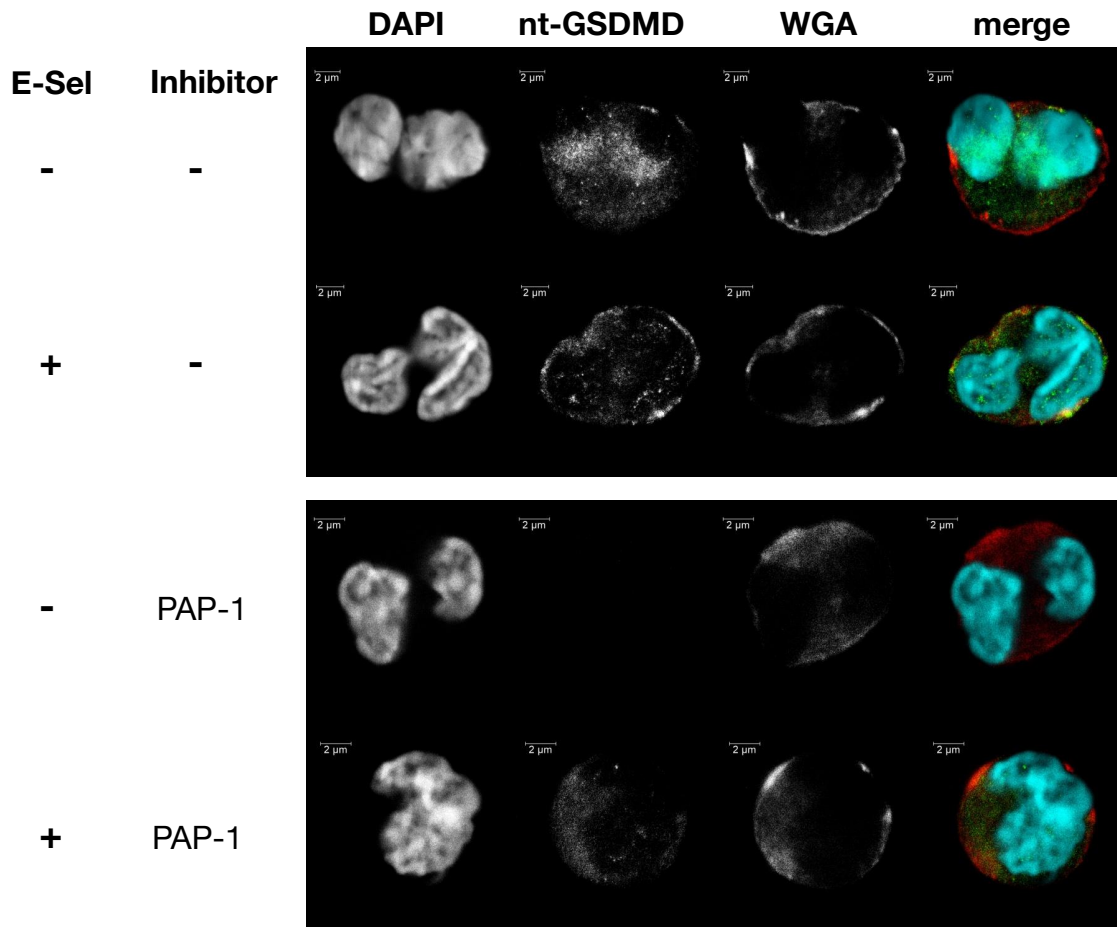


Abbildung 10: Repräsentative neutrophile Granulozyten nach nt-GSDMD-Färbung.

Neutrophile Granulozyten, die - teilweise unter spezifischer Kaliumkanalblockade mit PAP-1 - mit E-Selektin oder Vehikel stimuliert worden waren, wurden mit WGA und einem Antikörper gegen nt-GSDMD angefärbt. Hier sind repräsentative STED Aufnahmen der Zellen abgebildet. Zwei untereinanderliegende Bilderreihen vergleichen jeweils eine unstimulierte und eine mit E-Selektin stimulierte Zelle derselben Kondition. Es wird für jede Zelle das DAPI-, nt-GSDMD- und WGA-Signal, sowie ein farbiges *merge*-Bild (cyan: DAPI; grün: nt-GSDMD; rot: WGA) gezeigt. In der mit PAP-1 vorbehandelten Gruppe bleibt auch nach E-Selektin Stimulation die in der Positivkontrollgruppe beobachtete Ringbildung beim nt-GSDMD-Signal aus.

Um die Ringbildung zu quantifizieren, wurde die Kolo-kalisation zwischen nt-GSDMD Signal und WGA Signal untersucht (Abbildung 11). Dabei zeigte sich, dass in einer empirisch ausgewählten mittleren Zellebene der Anteil der WGA-positiven Pixel, deren nt-GSDMD Signal auch als positiv gewertet wird, bei den unvorbe-handelten, mit E-Selektin stimulierten Zellen signifikant höher ist als in der mit PBS stimulierten Kontrollgruppe. Bei Zellen der E-Selektin Gruppe lag die Kolo-kalisation im Mittel bei  $62,0 \pm 7,2$  % gegenüber  $47,0 \pm 6,5$  % in der PBS Gruppe. Auch Zellen, die mit PAP-1 vorbehandelt und mit E-Selektin stimuliert wurden, wiesen eine signifikant niedrigere Kolo-kalisationsrate auf als die Positivkontrollgruppe. Hier lag die mittlere Kolo-kalisationsrate bei  $49,7 \pm 7,1$  %. Und auch die

mit TRAM-34 vorbehandelten Zellen zeigten mit einer Rate von  $51,1 \pm 6,7\%$  eine im Trend verminderte Kolokalisation, wobei der Unterschied dieser Gruppe zur Positivkontrolle bei  $p = 0,0522$  nicht als signifikant einzustufen ist.

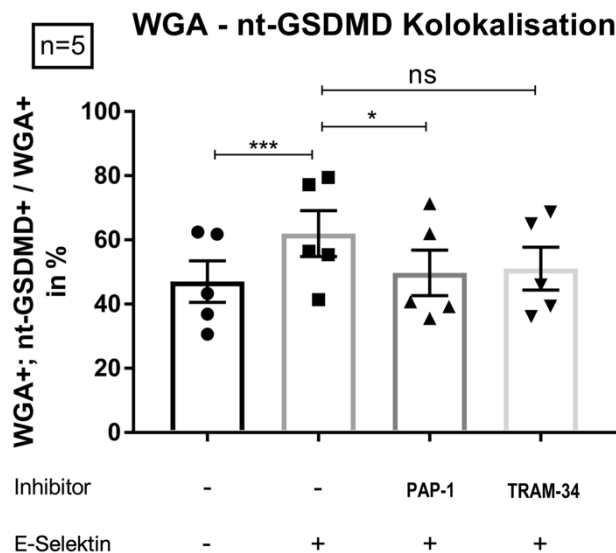


Abbildung 11: Analyse der Kolokalisation von WGA- und nt-GSDMD-Signal.

Neutrophile Granulozyten, die - teilweise unter spezifischer Kaliumkanalblockade mit PAP-1 oder TRAM-34 - mit E-Selektin oder Vehikel stimuliert worden waren, wurden mit WGA und einem Antikörper gegen nt-GSDMD angefärbt. In einer empirisch ausgewählten mittleren Zellebene wurde für die Zellen jeder Versuchsgruppe quantifiziert, welcher Anteil WGA-positiver Pixel auch ein nt-GSDMD-Signal aufweist [n = 5, ANOVA,  $p(-/-, -/+)$  = 0,0010;  $p(-/+, PAP-1/+)$  = 0,0120;  $p(-/+, TRAM-34/+)$  = 0,0522].

Die Funktion beider Kaliumkanäle scheint demnach, wie die Western Blots zeigen, für die Spaltung von GSDMD zu nt-GSDMD essenziell zu sein. Die Immunofluoreszenzbilder verdeutlichen darüber hinaus, dass  $K_v1.3$  und möglicherweise auch  $K_{Ca}3.1$  den Einbau von nt-GSDMD Poren in die Zellmembran neutrophiler Granulozyten regulieren. E-Selektin aktiviert dabei das NLRP3 Inflammasom in neutrophilen Granulozyten über einen schnell ablaufenden Mechanismus.

### 4.3 Genetische Depletion von $K_v1.3$ sowie Blockade von $K_v1.3$ oder $K_{Ca}3.1$ verringern die Freisetzung von S100A8/A9 aus murinen neutrophilen Granulozyten *in vitro*

Aufgrund von Vorbefunden unserer Arbeitsgruppe, die zeigen, dass S100A8/A9 aus neutrophilen Granulozyten nach E-Selektin Stimulation durch nt-GSDMD Poren freigesetzt wird (Pruenster et al. 2023), wurde nun untersucht, ob die Freisetzung von S100A8/A9 von  $K_v1.3$  oder  $K_{Ca}3.1$  abhängt.

Dazu wurden murine neutrophile Granulozyten mit PAP-1 beziehungsweise TRAM-34 inkubiert. Zudem kamen Zellen von  $K_V1.3^{-/-}$ -Mäusen, die teilweise auch mit TRAM-34 inkubiert wurden, zum Einsatz. Um eine Wirkung der Inhibitoren auf die basale S100A8/A9 Freisetzung unstimulierter Zellen auszuschließen, wurde die S100A8/A9 Konzentration in den Überständen von Zellen aller verwendeten Gruppen ohne E-Selektin Stimulation bestimmt. Hierbei konnte man in den Zellüberständen unabhängig davon, ob die Zellen - egal ob Wildtyp oder  $K_V1.3^{-/-}$  - zuvor mit einem Kaliumkanalblocker inkubiert worden waren oder nicht, eine S100A8/A9 Konzentration von circa 25 - 30 ng/ml detektieren. Bei der statistischen Testung konnten keinerlei signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden (Abbildung 12).

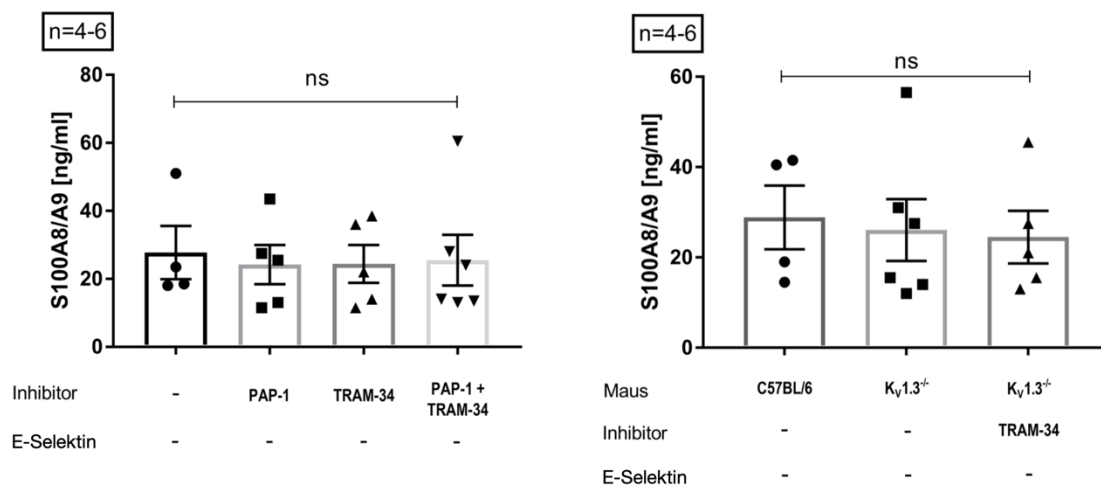


Abbildung 12: S100A8/A9 Freisetzung unstimulierter neutrophiler Granulozyten *in vitro*.

Sowohl Wildtyp- als auch  $K_V1.3^{-/-}$ -neutrophile Granulozyten wurden mit PAP-1 oder TRAM-34 vorbehandelt, anschließend aber lediglich mit einem Vehikel stimuliert. In den Zellüberständen wurde die Konzentration an freigesetztem S100A8/A9 gemessen [n = 4, ANOVA].

Nach E-Selektin Stimulation wurde bei den unvorbehandelten Zellen ( $84,5 \pm 17,1$  ng/ml) signifikant mehr S100A8/A9 in den Überständen gemessen als nach PBS Stimulation ( $27,8 \pm 7,8$  ng/ml - Daten entsprechen Abbildung 12 links). Beim Vergleich der mit E-Selektin stimulierten Proben zeigt sich, dass aus Zellen nach PAP-1 Inkubation mit einer mittleren Konzentration von  $31,5 \pm 4,8$  ng/ml signifikant weniger S100A8/A9 freigesetzt wurde als in der mit Vehikel vorinkubierten, stimulierten Kontrollgruppe. In den Überständen der Zellen, die mit TRAM-34 vorbehandelt wurden, wurde im Mittel eine S100A8/A9 Konzentration von  $55,6 \pm 16,5$  ng/ml detektiert. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe

ist hier die Konzentration nicht signifikant reduziert. Genauso verhält es sich mit der Gruppe, der beide Inhibitoren zugegeben wurden. Hier konnte eine mittlere S100A8/A9 Konzentration von  $41,1 \pm 10,0$  ng/ml in den Überständen gemessen werden. Es zeigte sich bei der statistischen Testung keine Signifikanz (Abbildung 13).

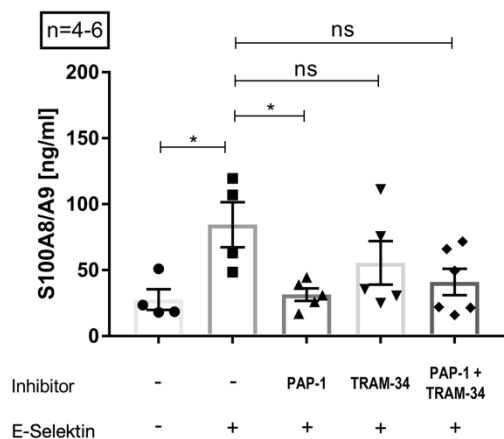


Abbildung 13: S100A8/A9 Freisetzung *in vitro* nach Vorbehandlung mit PAP-1 / TRAM-34.

Neutrophile Granulozyten wurden *in vitro* mit PAP-1, TRAM-34 oder der Kombination beider Inhibitoren inkubiert. In den Überständen der Zellen wurde die Konzentration an S100A8/A9 nach Inkubation mit E-Selektin gemessen [n = 4 - 6, ANOVA, p (-/-, -/+) = 0,0223; p (-/+, PAP-1/+) = 0,0247; p (-/+, TRAM-34/+) = 0,3207; p (-/+, PAP-1 + TRAM-34/+) = 0,0625, die Daten der Negativkontrolle (-/-) entsprechen denen in Abbildung 12 links].

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und zu überprüfen, ob der Effekt von PAP-1 tatsächlich auf eine Blockade des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $K_V1.3$  zurückzuführen ist, wurde das Experiment auch mit neutrophilen Granulozyten von  $K_V1.3^{-/-}$ -Mäusen durchgeführt. Dabei wurden unbehandelte neutrophile Granulozyten von C57BL/6NCrl Wildtyp-Mäusen mit Zellen von  $K_V1.3^{-/-}$ -Mäusen verglichen. Außerdem wurden einige der  $K_V1.3^{-/-}$ -Zellen zusätzlich mit TRAM-34 vorinkubiert.

Bei neutrophilen Granulozyten von Wildtyp-Mäusen, die mit E-Selektin stimuliert wurden, konnte eine mittlere S100A8/A9 Konzentration von  $92,8 \pm 20,8$  ng/ml und damit signifikant mehr S100A8/A9 als in den unstimulierten Kontrollen ( $28,9 \pm 7,1$  ng/ml - Daten entsprechen Abbildung 12 rechts) detektiert werden. Stimulierte  $K_V1.3^{-/-}$ -Zellen setzten mit einer mittleren Konzentration von  $43,4 \pm 10,5$  ng/ml im Überstand signifikant weniger S100A8/A9 frei als die stimulierten Wildtyp-Zellen. Bei  $K_V1.3^{-/-}$ -neutrophilen Granulozyten, die zusätzlich mit TRAM-34 inkubiert worden waren, konnte eine noch geringere mittlere Konzen-

tration des Proteins von  $28,4 \pm 6,1$  ng/ml in den Überständen gemessen werden. Sie ist gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert (Abbildung 14).

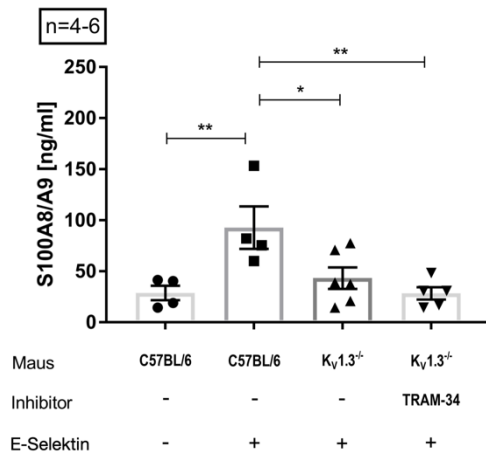


Abbildung 14: S100A8/A9 Freisetzung *in vitro* bei Kv1.3<sup>-/-</sup>-neutrophilen Granulozyten.

In den Überständen von Wildtyp- und (mit TRAM-34 vorbehandelten) Kv1.3<sup>-/-</sup>-Zellen wurde die S100A8/A9-Konzentration nach Inkubation mit E-Selektin bestimmt [n = 4 - 6, ANOVA, p (WT/-/-, WT/-/+) = 0,0081; p (WT/-/+, KO/-/+) = 0,0239; p (WT/-/+, KO/TRAM-34/+) = 0,0052, die Daten der Negativkontrolle (WT/-/-) entsprechen denen in Abbildung 12 rechts, WT: C57BL/6NCrI, KO: Kv1.3<sup>-/-</sup>].

E-Selektin ist aber nicht der einzige Stimulus, der zur Freisetzung von S100A8/A9 führt. Es ist bekannt, dass große Mengen des Proteins freigesetzt werden, wenn neutrophile Granulozyten mit PMA stimuliert werden (Tardif et al. 2015). Deshalb sollte nun zusätzlich die Frage adressiert werden, ob auch die PMA-abhängige Freisetzung von S100A9/A9 von einem der beiden untersuchten Kaliumkanäle abhängt.

Dazu wurden die beiden oben beschriebenen Experimentreihen mit PMA als Stimulus wiederholt. Es konnte sowohl bei der Experimentreihe zu den Kanalinhhibitoren (unstimulierte Zellen:  $27,8 \pm 7,8$  ng/ml [Daten entsprechen Abbildung 12 links], PMA:  $144,5 \pm 39,8$  ng/ml) als auch bei der Experimentreihe mit den Kv1.3<sup>-/-</sup>-Mäusen (unstimulierte Zellen  $28,9 \pm 7,1$  ng/ml [Daten entsprechen Abbildung 12 rechts], PMA:  $110,6 \pm 16,8$  ng/ml) gezeigt werden, dass unstimulierte Zellen von C57BL/6NCrI Wildtyp-Mäusen signifikant weniger S100A8/A9 freisetzen als mit PMA stimulierte Zellen gleichen Ursprungs. Beim Vergleich der mit PAP-1, TRAM-34 oder der Kombination aus beiden Inhibitoren vorbehandelten Zellen mit den mit PMA stimulierten, aber nicht vorbehandelten Kontrollzellen zeigte sich, dass in den Inhibitorengruppen zwar tendenziell etwas weniger S100A8/A9 freigesetzt wurde (PAP-1:  $113,8 \pm 12,5$  ng/ml, TRAM-34:



114,6 ± 18,6 ng/ml, PAP-1 + TRAM-34: 104,4 ± 21,3 ng/ml), jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bestehen (Abbildung 15 links).

Ein ähnliches Bild ergab der Vergleich der mit PMA stimulierten  $K_V1.3^{-/-}$ -neutrophilen Granulozyten - eine Gruppe wurde zusätzlich mit TRAM-34 vorinkubiert - mit den stimulierten Wildtyp-Zellen. Auch hier zeigte sich, dass  $K_V1.3^{-/-}$ -Zellen - sowohl die unvorbehandelten (89,2 ± 10,3 ng/ml) als auch die mit TRAM-34 vorinkubierten (76,0 ± 12,7 ng/ml) - nach PMA Stimulation ähnliche Mengen an S100A8/A9 freisetzen als die Kontrollzellen. Die statistische Prüfung der Ergebnisse ergab auch hier keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15 rechts).

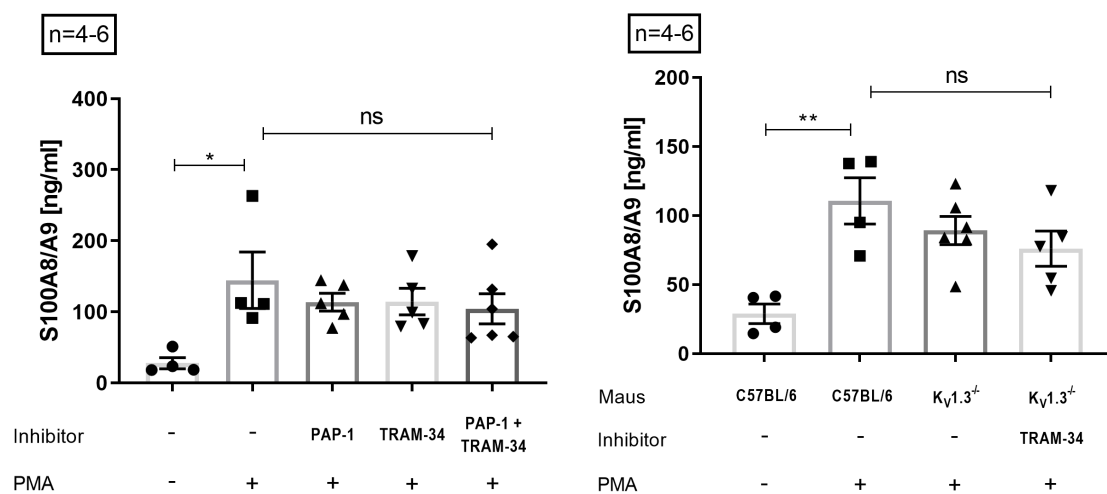


Abbildung 15: S100A8/A9 Freisetzung *in vitro* nach Stimulation mit PMA.

In den Überständen gemessene S100A8/A9 Konzentrationen nach der Stimulation mit PMA: Es wurden mit den Kaliumkanalinhitoren behandelte Zellen (links) und Zellen von Wildtyp- und  $K_V1.3^{-/-}$ -Mäusen (auch mit zusätzlicher TRAM-34 Vorinkubation; rechts) getestet [n = 4 - 6, ANOVA].

Zusammenfassend kann also davon ausgegangen werden, dass vor allem  $K_V1.3$  bei der Freisetzung von S100A8/A9 aus neutrophilen Granulozyten nach E-Selektin Stimulation eine wichtige Rolle spielt. Die Freisetzung des Proteins nach PMA Stimulation scheinen beide getesteten Kanäle nicht nennenswert zu beeinflussen. Nach E-Selektin Stimulation hingegen kann durch genetische Depletion oder Blockade des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $K_V1.3$  die S100A8/A9 Freisetzung reguliert werden.

## 5. Diskussion

Mit dieser Arbeit konnte die Rolle des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $K_V1.3$  auf die Funktion neutrophiler Granulozyten näher charakterisiert werden. Ich konnte zeigen, dass  $K_V1.3$  die zur  $\beta 2$  Integrinaktivierung wesentliche Freisetzung von S100A8/A9 aus neutrophilen Granulozyten reguliert. S100A8/A9 wird nach E-Selektin vermittelter Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch nt-GSDMD Poren freigesetzt und bewirkt durch die Aktivierung von  $\beta 2$  Integrinen den festen Arrest neutrophiler Granulozyten am entzündeten Endothel. Bei blockiertem spannungsabhängigen Kaliumkanal  $K_V1.3$  ist die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms und damit der Einbau von nt-GSDMD Poren in die Zellmembran sowie die Freisetzung von S100A8/A9 gestört (Pruenster et al. 2023). Demnach können neutrophile Granulozyten ohne funktionsfähigen spannungsabhängigen Kaliumkanal  $K_V1.3$  nur unzureichend das Gefäßendothel passieren und ihren Effektorfunktionen im Gewebe nachkommen (Immler et al. 2022).

### 5.1 Diskussion der Methoden

Um die tatsächliche Validität der in dieser Arbeit generierten Daten zu eruieren, müssen die verwendeten Methoden diskutiert werden.

Zunächst zeigen die Ergebnisse verschiedener Experimente deutlich, dass es sich bei der Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin *in vitro* um einen nicht immer absolut gleich ablaufenden Prozess handelt. So zeigen die Werte der unbehandelten, mit E-Selektin stimulierten Zellen regelhaft eine höhere Standardabweichung als die unstimulierte Kontrollgruppe.

Bei der Analyse von Proteinen mittels Western Blot handelt es sich um ein Standardverfahren. Das Besondere bei den in dieser Arbeit präsentierten Western Blot Daten liegt darin, dass teilweise mit sehr geringen Proteinmengen und sehr niedrigen Signalintensitäten gearbeitet wurde, weswegen der Normalisierung der Daten eine besondere Bedeutung zukommt. Außerdem muss darauf hingewiesen werden, dass dadurch Pipettierfehler die Ergebnisse schnell beeinflussen können. Beispielsweise könnten bei der Bestimmung des Gehalts an Caspase-1 in den Zellüberständen ganze Zellen, die nicht sauber von den Überständen getrennt worden waren, deutliche Auswirkungen auf den gemessenen Proteingehalt haben. Da die Western Blot Ergebnisse aber mehrfach reproduziert werden konnten und da die Werte der Kontrollgruppen (ohne Inhibitor, unstimuliert oder

mit E-Selektin stimuliert) die erwarteten Ergebnisse erbrachten, ist davon auszugehen, dass auch die Ergebnisse für die Inhibitorgruppen valide sind.

Interessant bei der Interpretation der Western Blot Daten ist vor allem noch die Größe des gemessenen nt-GSDMD Proteins. In den ausgewerteten Blots lag die Bande, bei der man davon ausging, dass sie das 31 kDa schwere nt-GSDMD zeigt, verglichen mit der Ladekontrolle bei circa 38 kDa. Zwar mögen die Eigenschaften des verwendeten Gels dazu führen, dass unterschiedliche Proteine der gleichen Größe nicht exakt gleich weit laufen, der Unterschied von ganzen 7 kDa würde aber nahelegen, dass Gasdermin D beim von E-Selektin ausgelösten Inflammasom möglicherweise an einer anderen Stelle gespalten wird und somit ein etwas längeres nt-Fragment entsteht. Solche etwas längeren nt-GSDMD Fragmente wurden in der Literatur bereits mehrfach beschrieben. In Monozyten wurde beispielsweise von einem 43 kDa schweren GSDMD Spaltprodukt berichtet, das nach diversen Apoptosestimuli durch die Spaltung mit Caspase-3/7 und unabhängig von Caspase-1 entsteht. Interessanterweise ist das 43 kDa schwere Fragment nicht zytotoxisch, es löst keine Pyroptose aus (Taabazuing, Okondo, and Bachovchin 2017).

Auch beim ELISA, der Methode, mit der die Proben aus den Experimenten zur S100A8/A9 Freisetzung untersucht wurden, handelt es sich um ein höchst etabliertes Verfahren. Hier werden die direkten funktionellen Konsequenzen des E-Selektin-abhängigen NLRP3 Inflammasoms *in vitro* untersucht. Auch hier gilt: Da S100A8/A9 in großen Mengen im Zellinneren von neutrophilen Granulozyten vorkommt (Edgeworth et al. 1991), könnten lytisch abgestorbene oder fehlerhaft getrennte Zellen bei der Herstellung der Proben die gemessenen Konzentrationen im Serum beziehungsweise in den Zellüberständen maßgeblich beeinflussen. Die Reproduzierbarkeit der Daten und der Vergleich mit früheren Werten bekräftigen aber auch hier die quantitative Validität der durchgeführten Experimente.

Die Aussagekraft der Mikroskopieexperimente liegt demgegenüber auf einer anderen Ebene. Es muss berücksichtigt werden, dass die Messung der Signalintensitäten und die daran anschließende Kolokalisationsanalyse mehreren subjektiven Parametern unterliegt. Dies beginnt bei den Antikörpern und Farbstoffen, die nicht immer gleiche Signalstärken liefern. Die Auswahl der Zellen, die aufge-

nommen wurden, erfolgte ebenfalls subjektiv. Insgesamt gesehen gingen vergleichsweise nur sehr wenige Zellen in die Auswertung mit ein. Außerdem muss angefügt werden, dass auch ein möglicherweise schlechtes Zellmembransignal, wenn etwa auch intrazelluläre Membranen angefärbt wurden, die Kolokalisationsrate beeinflussen kann. Des Weiteren unterscheidet sich die Kolokalisationsrate auch zwischen den einzelnen Bildern eines Z-Stacks. Da die Randbereiche der Zellen keine auswertefähigen Bilder lieferten, war es nicht möglich eine Z-Projektion zur Auswertung heranzuziehen. Gezwungenermaßen musste deswegen die Auswertung an je einem empirisch ausgewählten Bild pro Stack erfolgen. Kriterium dazu war ein möglichst gleichförmiger Ring im WGA-Signal. In Zusammenschau dieser Kritikpunkte muss festgehalten werden, dass sich dieses Experiment allein nicht dazu eignet, verlässliche quantitative Aussagen zu treffen. Im Rahmen dieser Arbeit muss es jedoch vielmehr im Kontext der GSDMD Western Blot Experimente betrachtet werden. Dabei adressieren die Daten aus den Mikroskopieversuchen eine andere Frage. Sie zeigen, dass das in den Western Blots gemessene nt-GSDMD auch seiner beschriebenen Funktion als multimeres Protein in der Zellmembran von Immunzellen nachkommt und liefern damit einen wichtigen Beitrag in der Argumentationskette. Außerdem liegt in den Mikroskopieexperimenten der Mehrwert, dass sie die abstrakten Überlegungen zu einer Signalkaskade auf Proteinebene zu visualisieren vermögen. Zusammenfassend lässt sich demnach festhalten, dass die in dieser Arbeit gebrauchten Methoden allein stehend zwar jeweils ihre Schwächen haben, dass sie aber in Zusammenschau ein stimmiges Gesamtbild ergeben, das sich zur Testung der untersuchten Hypothese eignet.

## 5.2 Diskussion der Ergebnisse im Kontext zur Literatur

Die in dieser Arbeit erlangten Ergebnisse geben Aufschluss darüber, dass der spannungsabhängige Kaliumkanal  $K_v1.3$  in neutrophilen Granulozyten in einem E-Selektin-abhängigen, schnell verlaufenden Prozess das NLRP3 Inflammasom und damit die Freisetzung von S100A8/A9 reguliert. In welchem Ausmaß der Calcium-abhängige Kaliumkanal  $K_{Ca}3.1$  diesen Prozess ebenfalls beeinflusst, ist nicht abschließend geklärt.

Entscheidend für die Adhäsion neutrophiler Granulozyten am entzündeten Endothel ist die Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen. Bisher wurde immobilisierten Chemokinen auf dem Endothel, die während des Rollens in Kontakt mit Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten treten, eine tragende Rolle zugeschrieben (Lefort and Ley 2012). In den vergangenen Jahren verdichtete sich nun zunehmend die Evidenz, dass auch das heterodimere Protein S100A8/A9 von enormer Bedeutung für die Integrinaktivierung ist (Pruenster et al. 2015).

Damit die angestrebte Immunreaktion am richtigen Ort stattfinden kann, muss die Signalübermittlung während des Rekrutierungsvorgangs mit sehr hoher Geschwindigkeit erfolgen. S100A8/A9 macht einen erheblichen Teil des Proteingehalts im Zytosol neutrophiler Granulozyten aus (Edgeworth et al. 1991). Da S100A8/A9 somit nicht zeitaufwändig *de novo* synthetisiert werden muss, eignet es sich für die Vermittlung schneller Prozesse. Vor einigen Jahren konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass während des Rollens im murinen Organismus die Interaktion von E-Selektin mit PSGL-1 (Pruenster et al. 2015), später, dass human die Interaktion von E-Selektin mit L-Selektin (Morikis et al. 2017), zur Freisetzung von S100A8/A9 führt. Die anschließende Bindung von S100A8/A9 an TLR4 auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten bewirkt über eine Rap1-GTP-abhängige Signalkaskade die Aktivierung von  $\beta$ 2-Integrinen (Pruenster et al. 2015). Vor kurzem konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass S100A8/A9 durch nt-GSDMD Poren aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt wird (Pruenster et al. 2023). Eine kurze E-Selektin Stimulation induziert hierbei die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms. Im Zuge dessen kommt es zum Einbau der nt-GSDMD Poren in die Zellmembran neutrophiler Granulozyten, eine Pyroptose oder eine andere lytische Form des Zelltods wird nicht ausgelöst (Pruenster et al. 2023).

Über die Regulation dieses Freisetzungsprozesses sind bisher noch keine Einzelheiten bekannt. Gemeinhin wird der Ausstrom von  $K^+$  als ein bei der NLRP3 Inflammasomaktivierung notwendiger Schritt angesehen (Swanson et al. 2021). So wurde zum Beispiel herausgefunden, dass allein eine Verminderung der intrazellulären Kaliumkonzentration ausreichen kann, um das NLRP3 Inflammasom zu aktivieren (Muñoz-Planillo et al. 2013). Nur wenige Gegenbeispiele, wie etwa das in der Dermatologie gebräuchliche *small molecule* Imiquimod, von dem

bekannt ist, dass es eine NLRP3 Inflammasomaktivierung anstößt, ohne dass ein Kaliumausstrom beobachtet werden kann, stehen diesem Grundsatz entgegen (Groß et al. 2016). Jedoch konnten bisher nur wenige Kaliumkanäle benannt werden, die besagten Kaliumausstrom verantworten (Swanson, Deng, and Ting 2019). Meistens ist von einem unspezifischen Ausstrom die Rede. In Makrophagen konnte beispielsweise für den Kanal TWIK2 gezeigt werden, dass er in Kooperation mit dem Kanal P2X7 das NLRP3 Inflammasom zu regulieren vermag (Di et al. 2018). In neutrophilen Granulozyten fehlt demgegenüber bisher die Benennung spezifischer Kaliumkanäle, die das NLRP3 Inflammasom steuern.

Diese Arbeit liefert nun erstmalig Evidenz über die Kontrolle des von E-Selektin ausgelösten NLRP3 Inflammasoms in neutrophilen Granulozyten durch den spannungsabhängigen Kaliumkanal  $K_v1.3$  und möglicherweise durch den Calcium-abhängigen Kaliumkanal  $K_{Ca3.1}$ .

Mit Hilfe des spezifischen Kanalinhitors PAP-1 konnte ich zeigen, dass die Spaltung von pro-Caspase-1 zu aktiver Caspase-1 und von GSDMD zu nt-GSDMD signifikant herabgesetzt ist, wenn  $K_v1.3$  blockiert wird. Beide Spaltvorgänge sind auf unterschiedlichen Ebenen Teil der Signalkaskade der E-Selektin-abhängigen NLRP3 Inflammasomaktivierung. Diese Befunde konnte ich zusätzlich ergänzen, indem ich mit Hilfe von Immunofluoreszenzmikroskopie gezeigt habe, dass bei blockiertem  $K_v1.3$ -Kanal nach E-Selektin Stimulation das Signal des angefärbten nt-GSDMD kaum mit dem Zellmembransignal kolokalisiert. Es ist also davon auszugehen, dass unter diesen Umständen kaum mehr nt-GSDMD Poren in die Zellmembran neutrophiler Granulozyten eingebaut werden. Zusätzlich konnte ich zeigen, dass *in vitro* die Freisetzung von S100A8/A9 aus murinen neutrophilen Granulozyten signifikant abnimmt, wenn  $K_v1.3$  durch PAP-1 blockiert oder genetisch depletiert wurde. Demnach wirkt  $K_v1.3$  in neutrophilen Granulozyten zusammenfassend gesehen als Regulator des E-Selektin-abhängigen NLRP3 Inflammasoms sowie der Freisetzung von S100A8/A9.

Es ist bekannt, dass ohne funktionsfähigen  $K_v1.3$  die Leukozyten-Rekrutierungskaskade gestört ist. Neutrophile Granulozyten von  $K_v1.3^{-/-}$ -Mäusen zeigen in einem Peritonitismodell im Vergleich zu Zellen von Wildtyp-Mäusen eine verminderte Extravasation (Immler et al. 2022). Im murinen Cremastermodell, das die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung adressiert, erwies sich  $K_v1.3$  im Speziellen als Regulator der festen Adhäsion (Immler et al. 2022), also des

Schrittes, für den aktivierte  $\beta$ 2-Integrine von entscheidender Bedeutung sind (Abram and Lowell 2009; Lefort and Ley 2012). Dass sich nun  $K_v1.3$  als Regulator des NLRP3 Inflammasoms und damit der S100A8/A9 Freisetzung und der daran anschließenden  $\beta$ 2-Integrinaktivierung erweist, liefert einen neuen Erklärungsansatz für diese Beobachtungen.

Klassischerweise wird die Funktion von  $K_v1.3$ , zu dessen Eigenschaften vor allem in T-Zellen geforscht wurde, dadurch erklärt, dass eine steigende intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration zu einer Depolarisation der Zellmembran und damit zu einer Öffnung dieses spannungsabhängigen Kanals führt. Durch den Ausstrom von Kalium kann nun die Zellmembran hyperpolarisiert und somit die treibende Kraft für einen Calciumeinstrom aufrechterhalten werden (Cahalan and Chandy 2009; Feske, Wulff, and Skolnik 2015). In humanen neutrophilen Granulozyten konnte unsere Arbeitsgruppe erst kürzlich nachweisen, dass  $K_v1.3$  durch diesen, das Membranpotential stabilisierenden Mechanismus die Freisetzung von Calcium aus intrazellulären Speichern (*Store Operated Calcium Entry*, SOCE) reguliert (Immler et al. 2022). Der Calcium-abhängige Kaliumkanal  $K_{Ca}3.1$  wirkt, aktiviert durch ansteigende intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen, nach demselben Prinzip (Feske, Wulff, and Skolnik 2015).

Dies wirft im Hinblick auf die Regulation des NLRP3 Inflammasoms in neutrophilen Granulozyten die Frage auf, ob  $K_v1.3$  das Inflammasom direkt beeinflusst oder ob sich das Inflammasom in die Reihe der diversen  $Ca^{2+}$ -abhängigen Funktionen neutrophiler Granulozyten einreicht und  $K_v1.3$  indirekt über die Regulation des Calciumeinstroms wirkt.

Interessanterweise ist für Makrophagen bekannt, dass  $Ca^{2+}$ -Mobilisierung in einem proximalen Schritt der Signalkaskade das NLRP3 Inflammasom reguliert (Murakami et al. 2012). Mechanistisch gesehen wurde zum einen nachgewiesen, dass auf diese Weise nach ATP Stimulation die Schädigung von Mitochondrien vermittelt wird. Dabei trägt sowohl Calcium, das aus den Speichern des endoplasmatischen Retikulums freigesetzt wird (SOCE), als auch Calcium, das von außen in die Zelle gelangt, zur Initiation des Inflammasoms bei (Murakami et al. 2012). Zum anderen wurde  $Ca^{2+}$  als Bindungspartner des murinen *Calcium-sensing Receptors* (CASR) beschrieben. Es kann demnach sogar auch in Absenz von ATP durch die Phospholipase C vermittelte Freisetzung von weiterem  $Ca^{2+}$

aus dem ER bei niedrigen intrazellulären cAMP-Konzentrationen als direkter Aktivator des NLRP3 Inflammasoms wirken (Lee et al. 2012). Außerdem ist bekannt, dass E-Selektin, das beim in dieser Arbeit untersuchten Signalweg das Inflammasom initiiert, beim *Calcium Signalling* rollender neutrophiler Granulozyten eine Rolle spielt (Chase, Magnani, and Simon 2012). Auch wenn E-Selektin allein keine Erhöhung zytosolischer Calciumspiegel - weder durch Einstrom aus intrazellulären Speichern (SOCE) noch von extrazellulär - hervorruft, verlängert es beispielweise das vom Plättchenaktivierenden Faktor (PAF) ausgelöste *Calcium Signalling* (McMeekin et al. 2006).

Demgegenüber wird trotzdem der Ausstrom von Kalium gemeinhin als der gemeinsame Auslöser vieler zum NLRP3 Inflammasom führender Signalkaskaden angesehen (Muñoz-Planillo et al. 2013) (Pétrilli et al. 2007). So wird auch die bereits beschriebene direkte Aktivierung von NLRP3 durch hohe extrazelluläre Calciumkonzentrationen (Lee et al. 2012) durch einen Ausstrom von Kalium vermittelt (Muñoz-Planillo et al. 2013). Auch die Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms durch oxydierte mitochondriale DNA kann nicht durch Inhibitoren des *Calcium Signallings* unterdrückt werden (Murakami et al. 2012). Des Weiteren aktivieren das Ionophor Nigericin oder auch ATP-abhängige P2X7 Kaliumkanäle das NLRP3 Inflammasoms in Makrophagen, ohne dabei eine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration zu benötigen. Ein Ausstrom vom Kalium spielt bei diesen beiden klassischen Mechanismen der NLRP3 Inflammasomaktivierung jeweils eine wichtige Rolle (Katsnelson et al. 2015).

In den durchgeführten Experimenten wurde nun versucht, die Frage nach der Bedeutung des Calciums zu adressieren, indem die Aktivität des E-Selektin-abhängigen NLRP3 Inflammasoms in neutrophilen Granulozyten auch bei blockiertem  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Kaliumkanal  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  untersucht wurde. Dazu wurde die Substanz TRAM-34 verwendet.

Auf Proteinebene konnte ich dabei zeigen, dass die Blockade von  $\text{K}_{\text{Ca}3.1}$  die Aktivität des E-Selektin-abhängigen NLRP3 Inflammasoms herabsetzt. Sowohl die Entstehung von Caspase-1 als auch die Spaltung von GSDMD war signifikant reduziert. Das letztere Ergebnis ließ sich durch die Analyse der Kollokalisierung zwischen nt-GSDMD- und Zellmembransignal mittels Immunofluoreszenzmikroskopie bestätigen. Zwar ergab die statistische Testung hier keine Signifikanz, ich konnte jedoch einen Trend beobachten, der in dieser Experimentreihe aber nicht



statistisch nachgewiesen werden konnte. So ist aktuell unklar, welcher Effekt von  $K_{Ca}3.1$  auf die E-Selektin-abhängige Aktivierung des NLRP3 Inflammasoms ausgeht.

In einem murinen Modell akuter Lungenschädigung erwies sich  $K_{Ca}3.1$  für die Migration neutrophiler Granulozyten als erforderlich. Die histologische Aufarbeitung der Organe ergab zudem, dass in den Lungen der  $K_{Ca}3.1^{-/-}$ -Mäuse keine zu den Endothelzellen adhärenen neutrophilen Granulozyten zu finden waren (Henríquez et al. 2016). Es liegt also nahe, dass die Leukozyten-Rekrutierung auch hier bei der Initiation der festen Adhäsion unterbrochen ist. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten geben in Zusammenschau mit den Beobachtungen von Henríquez et al. einen Hinweis darauf, dass  $K_{Ca}3.1$  in ähnlicher Weise das E-Selektin-abhängige NLRP3 Inflammasom beeinflussen könnte wie  $K_V1.3$ . Möglicherweise wirkt  $K_{Ca}3.1$  aber an einer anderen Stelle in der Signalkaskade. Auch die Beobachtung, dass PAP-1 und TRAM-34 nicht synergistisch wirken und dass keine signifikanten additiven Effekte zwischen den beiden Kanalinhhibitoren bestehen, spricht nicht gegen diese Hypothese. Für die Freisetzung von S100A8/A9 scheint jedoch nach aktuellem Wissensstand nur  $K_V1.3$  von Nöten zu sein.

Welche Rolle Calcium beim Einbau von nt-GSDMD Poren spielt, wird teilweise immer noch kontrovers diskutiert. Eine besondere Bedeutung kommt neuesten Erkenntnissen zufolge einem Calciumeinstrom durch bereits vorhandene nt-GSDMD Poren zu. Dieser Calciumeinstrom scheint, wie kürzlich gezeigt werden konnte, die Reaktionskinetik zwischen geöffneten und geschlossenen Poren durch Phosphoinositidmetabolismus zu vermitteln (Santa Cruz Garcia et al. 2022). Im Allgemeinen haben Ionenströme über die geöffneten nt-GSDMD Poren einen hohen Stellenwert. Unsere Arbeitsgruppe konnte hierzu zeigen, dass eine Änderung des Membranpotentials neutrophiler Granulozyten nach E-Selektin Stimulation durch Disulfiram, das die Formation von nt-GSDMD Poren inhibiert (Hu et al. 2020) und damit Ionenströme über nt-GSDMD Poren unterbindet, gehemmt werden konnte. Im Kontext meiner Experimente geben diese Beobachtungen Anhalt dafür, dass ein Calciumeinstrom durch nt-GSDMD Poren  $K_{Ca}3.1$  aktivieren und dadurch möglicherweise eine positive Feedbackschleife der von  $K_V1.3$  abhängigen Inflammasomaktivierung vermitteln könnte. Denkbar ist, dass  $K_V1.3$ -abhängig eingebaute nt-GSDMD Poren auch ohne  $K_{Ca}3.1$  für eine messbare

Freisetzung von S100A8/A9 ausreichen. Hier könnte auch eine durch Calcium-einstrom herbeigeführte Depolarisation zu einer zusätzlichen, spannungsabhängigen Aktivierung von  $K_v1.3$  führen.

Letztlich konnte die Frage nach der Bedeutung des Calciums in der Signalkaskade des NLRP3 Inflammasoms nach E-Selektin Stimulation im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend beantwortet werden. Hier läge in jedem Fall ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Experimente.

Nichtsdestotrotz kann auf Grundlage der erlangten Ergebnisse bereits über den möglichen klinisch-therapeutischen Nutzen der untersuchten Signalkaskade diskutiert werden.

Das NLRP3 Inflammasom selbst wird seit langem als Ziel möglicher antiinflammatorischer Medikamente angesehen. Es sind zahlreiche Substanzen beschrieben, die es im Allgemeinen - also auch bei anderen Zelltypen und nach anderen Stimuli - direkt beeinflussen. Bekannteste Substanz hierbei ist der Diarylsulfonylharnstoff MCC950 (Coll et al. 2015), der das NLRP3 Inflammasom spezifisch inhibiert und in zahlreichen Entzündungsmodellen wirkt. Jedoch bemerkte man in einer Phase II Studie zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis starke hepatotoxische Nebenwirkungen von MCC950, die sogar zum Studienabbruch führten (Mangan et al. 2018). Andere Substanzen aus dieser Kategorie wären Oridonin, ein natürlicher Wirkstoff von *Rabdosia rubescens*, das die Interaktion von NLRP3 mit NEK7 inhibiert (He et al. 2018), oder einige Inhibitoren der Bruton-Tyrosinkinase (BTK), wie zum Beispiel Ibrutinib oder Acalabrutinib. Die Tyrosinkinase BTK ist seit langem ein etabliertes pharmakologisches Ziel und wurde vor kurzem als multifunktionaler positiver Regulator des NLRP3 Inflammasoms in Immunzellen identifiziert (Bittner et al. 2021). Außerdem - und das macht die BTK im Zusammenhang mit dieser Arbeit in besonderer Weise interessant - ist sie auch nach E-Selektin Stimulation in neutrophilen Granulozyten beim Prozess der Integrinaktivierung beschrieben (Mueller et al. 2010).

Darüber hinaus bietet die Kenntnis des in dieser Arbeit beschriebenen Signalwegs im Speziellen den Vorteil, pharmakologisch gezielt auf die schnelle, initiale Immunantwort eingehen zu können. Vor allem  $K_v1.3$  bietet dazu viele Möglichkeiten. Die Tatsache, dass Psoralene - zu dieser Gruppe gehört auch PAP-1 - in der Klinik bereits seit Jahrzehnten Anwendung finden, unterstreicht das hierin liegende therapeutische Potential. So ist in der Dermatologie zum Beispiel das

---

PUVA-Schema, bestehend aus Psoralen in Kombination mit einer UV-A Therapie seit den 1970er Jahren in der Therapie der autoinflammatorischen Erkrankung Psoriasis vulgaris gebräuchlich (Reid and Griffiths 2020). Hierbei ist die Wirkung der Psoralene dadurch beschrieben, dass sie die Photosensitivität der Haut erhöhen würden. Eine direkte antiinflammatorische Wirkkomponente ist nicht ausgeschlossen. Jedenfalls wäre aber beim Einsatz von PAP-1 bei anderen Erkrankungen von phototoxischen Nebenwirkungen auszugehen (Schmitz et al. 2005). Insgesamt liegt ungeachtet der bisher bekannten möglichen Nebenwirkungen in der Blockade von  $K_V1.3$  durch PAP-1 vor allem aber immenses therapeutisches Potential für Erkrankungen mit einem Zuviel an Entzündung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies nochmals untermauert, indem das Wirkspektrum des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $K_V1.3$  um die E-Selektin-abhängige NLRP3 Inflammasomaktivierung, und damit um einen für die feste Adhäsion neutrophiler Granulozyten sehr wichtigen Prozess, erweitert werden konnte.

## Literaturverzeichnis

- Abram, Clare L., and Clifford A. Lowell. 2009. "The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling." *Annual Review of Immunology* 27: 339–62. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132554>.
- Aglietti, Robin A., Alberto Estevez, Aaron Gupta, Monica Gonzalez Ramirez, Peter S. Liu, Nobuhiko Kayagaki, Claudio Ciferri, Vishva M. Dixit, and Erin C. Dueber. 2016. "GsdmD P30 Elicited by Caspase-11 during Pyroptosis Forms Pores in Membranes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (28): 7858–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607769113>.
- Artym, Vira V., and Howard R. Petty. 2002. "Molecular Proximity of Kv1.3 Voltage-Gated Potassium Channels and B1-Integrins on the Plasma Membrane of Melanoma Cells: Effects of Cell Adherence and Channel Blockers." *Journal of General Physiology* 120 (1): 29–37. <https://doi.org/10.1085/jgp.20028607>.
- Atallah, Mizhir, Alon Krispin, Uriel Trahtemberg, Sandrine Ben-Hamron, Amir Grau, Inna Verbovetski, and Dror Mevorach. 2012. "Constitutive Neutrophil Apoptosis: Regulation by Cell Concentration via S100 A8/9 and the MEK - ERK Pathway." *PLoS ONE* 7 (2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029333>.
- Begandt, Daniela, Sarah Thome, Markus Sperandio, and Barbara Walzog. 2017. "How Neutrophils Resist Shear Stress at Blood Vessel Walls: Molecular Mechanisms, Subcellular Structures, and Cell–Cell Interactions." *Journal of Leukocyte Biology* 102 (3): 699–709. <https://doi.org/10.1189/jlb.3mr0117-026rr>.
- Bittner, Zsófia Agnes, Xiao Liu, Maria Mateo Tortola, Ana Tapia-Abellán, Sangeetha Shankar, Liudmila Andreeva, Matthew Mangan, et al. 2021. "BTK Operates a Phospho-Tyrosine Switch to Regulate NLRP3 Inflammasome Activity." *Journal of Experimental Medicine* 218 (11). <https://doi.org/10.1084/jem.20201656>.
- Broz, Petr, and Vishva M. Dixit. 2016. "Inflammasomes: Mechanism of Assembly, Regulation and Signalling." *Nature Reviews Immunology* 16 (7): 407–20. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>.
- Cahalan, Michael D., and K. George Chandy. 2009. "The Functional Network of Ion Channels in T Lymphocytes." *Immunological Reviews* 231 (1): 59–87. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00816.x>.
- Carman, Christopher V., and Timothy A. Springer. 2008. "Trans-Cellular Migration: Cell-Cell Contacts Get Intimate." *Current Opinion in Cell Biology* 20 (5): 533–40. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.05.007>.
- Chan, James K., Johannes Roth, Joost J. Oppenheim, Kevin J. Tracey, Thomas Vogl, Marc Feldmann, Nicole Horwood, and Jagdeep Nanchahal. 2012.

- “Alarmins: Awaiting a Clinical Response.” *Journal of Clinical Investigation* 122 (8): 2711–19. <https://doi.org/10.1172/JCI62423>.
- Chase, S. D., J. L. Magnani, and S. I. Simon. 2012. “E-Selectin Ligands as Mechanosensitive Receptors on Neutrophils in Health and Disease.” *Annals of Biomedical Engineering* 40 (4): 849–59. <https://doi.org/10.1007/s10439-011-0507-y>.
- Chen, Kaiwen W., Christina J. Groß, Flor Vásquez Sotomayor, Katryn J. Stacey, Jurg Tschopp, Matthew J. Sweet, and Kate Schroder. 2014. “The Neutrophil NLR4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1 $\beta$  Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge.” *Cell Reports* 8 (2): 570–82. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.06.028>.
- Coll, Rebecca C., Avril A.B. Robertson, Jae Jin Chae, Sarah C. Higgins, Raúl Muñoz-Planillo, Marco C. Inserra, Irina Vetter, et al. 2015. “A Small-Molecule Inhibitor of the NLRP3 Inflammasome for the Treatment of Inflammatory Diseases.” *Nature Medicine* 21 (3): 248–57. <https://doi.org/10.1038/nm.3806>.
- Corbin, Brian D., Erin H. Seeley, Andrea Raab, Joerg Feldmann, Michael R. Miller, Victor J. Torres, Kelsi L. Anderson, et al. 2008. “Metal Chelation and Inhibition of Bacterial Growth in Tissue Abscesses.” *Science* 319 (5865): 962–65. <https://doi.org/10.1126/science.1152449>.
- Di, Anke, Shiqin Xiong, Zhiming Ye, R. K. Subbarao Malireddi, Satoshi Kometani, Ming Zhong, Manish Mittal, et al. 2018. “The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation.” *Immunity* 49 (1): 56–65.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.04.032>.
- Edgeworth, J., M. Gorman, R. Bennett, P. Freemont, and N. Hogg. 1991. “Identification of P8,14 as a Highly Abundant Heterodimeric Calcium Binding Protein Complex of Myeloid Cells.” *Journal of Biological Chemistry* 266 (12): 7706–13. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(20\)89506-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(20)89506-4).
- Evavold, Charles L., Jianbin Ruan, Yunhao Tan, Shiyu Xia, Hao Wu, and Jonathan C. Kagan. 2018. “The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages.” *Immunity* 48 (1): 35–44.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.013>.
- Fan, Cheng, Xiaofang Yang, Wan Wendy Wang, Jue Wang, Wenzhu Li, Mengyuan Guo, Shiyuan Huang, Zhaohui Wang, and Kun Liu. 2020. “Role of Kv1.3 Channels in Platelet Functions and Thrombus Formation.” *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, no. October: 2360–75. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.120.314278>.
- Fanger, Christopher M., Sanjiv Ghanshani, Naomi J. Logsdon, Heiko Rauer, Katalin Kalman, Jianming Zhou, Kathy Beckingham, K. George Chandy, Michael D. Cahalan, and Jayashree Aiyar. 1999. “Calmodulin Mediates Calcium-Dependent Activation of the Intermediate Conductance K(Ca) Channel, IKCa1.” *Journal of Biological Chemistry* 274 (9): 5746–54.

<https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5746>.

Feske, Stefan, Heike Wulff, and Edward Y. Skolnik. 2015. *Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. Annual Review of Immunology*. Vol. 33. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032414-112212>.

Foxall, C., S. R. Watson, D. Dowbenko, C. Fennie, L. A. Lasky, M. Kiso, A. Hasegawa, D. Asa, and B. K. Brandley. 1992. "The Three Members of the Selectin Receptor Family Recognize a Common Carbohydrate Epitope, the Sialyl Lewis(x) Oligosaccharide." *Journal of Cell Biology* 117 (4): 895–902. <https://doi.org/10.1083/jcb.117.4.895>.

Gaidt, Moritz M, and Veit Hornung. 2016. "Pore Formation by GSDMD Is the Effector Mechanism of Pyroptosis ." *The EMBO Journal* 35 (20): 2167–69. <https://doi.org/10.15252/embj.201695415>.

Grissmer, Stephan, Brent Dethlefs, John J. Wasmuth, Alan L. Goldin, George A. Gutman, Michael D. Cahalan, and K. George Chandy. 1990. "Expression and Chromosomal Localization of a Lymphocyte K<sup>+</sup> Channel Gene." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (23): 9411–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.23.9411>.

Groß, Christina J., Ritu Mishra, Katharina S. Schneider, Guillaume Médard, Jennifer Wettmarshausen, Daniela C. Dittlein, Hexin Shi, et al. 2016. "K<sup>+</sup> Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria." *Immunity* 45 (4): 761–73. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.010>.

Grössinger, E. M., L. Weiss, S. Zierler, S. Rebhandl, P. W. Krenn, E. Hinterseer, J. Schmölder, et al. 2014. "Targeting Proliferation of Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) Cells through KCa3.1 Blockade." *Leukemia* 28 (4): 954–58. <https://doi.org/10.1038/leu.2014.37>.

He, Hongbin, Hua Jiang, Yun Chen, Jin Ye, Aoli Wang, Chao Wang, Qingsong Liu, et al. 2018. "Oridonin Is a Covalent NLRP3 Inhibitor with Strong Anti-Inflammasome Activity." *Nature Communications* 9 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04947-6>.

He, Yuan, Melody Y. Zeng, Dahai Yang, Benny Motro, and Gabriel Núñez. 2016. "NEK7 Is an Essential Mediator of NLRP3 Activation Downstream of Potassium Efflux." *Nature* 530 (7590): 354–57. <https://doi.org/10.1038/nature16959>.

Henríquez, C., T. T. Riquelme, D. Vera, F. Julio-Kalajzić, P. Ehrenfeld, J. E. Melvin, C. D. Figueroa, J. Sarmiento, and C. A. Flores. 2016. "The Calcium-Activated Potassium Channel KCa3.1 Plays a Central Role in the Chemotactic Response of Mammalian Neutrophils." *Acta Physiologica* 216 (1): 132–45. <https://doi.org/10.1111/apha.12548>.

Hidalgo, Andrés, Edwin R. Chilvers, Charlotte Summers, and Leo Koenderman. 2019. "The Neutrophil Life Cycle." *Trends in Immunology* 40 (7): 584–97. <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.013>.

- Hidalgo, Andrés, Anna J. Peired, Martin K. Wild, Dietmar Vestweber, and Paul S. Frenette. 2007. "Complete Identification of E-Selectin Ligands on Neutrophils Reveals Distinct Functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44." *Immunity* 26 (4): 477–89. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.011>.
- Hu, Jun Jacob, Xing Liu, Shiyu Xia, Zhibin Zhang, Ying Zhang, Jingxia Zhao, Jianbin Ruan, et al. 2020. "FDA-Approved Disulfiram Inhibits Pyroptosis by Blocking Gasdermin D Pore Formation." *Nature Immunology* 21 (7): 736–45. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0669-6>.
- Hunter, Michael J., and Walter J. Chazin. 1998. "High Level Expression and Dimer Characterization of the S100 EF-Hand Proteins, Migration Inhibitory Factor-Related Proteins 8 and 14." *Journal of Biological Chemistry* 273 (20): 12427–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.20.12427>.
- Immler, Roland, Wiebke Nadolni, Annika Bertsch, Vasilios Morikis, Ina Rohwedder, Sergi Masgrau-Alsina, Tobias Schroll, et al. 2022. "The Voltage-Gated Potassium Channel KV1.3 Regulates Neutrophil Recruitment during Inflammation." *Cardiovascular Research* 118 (5): 1289–1302. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab133>.
- Immler, Roland, Scott I. Simon, and Markus Sperandio. 2018. "Calcium Signalling and Related Ion Channels in Neutrophil Recruitment and Function." *European Journal of Clinical Investigation* 48 (February): 1–11. <https://doi.org/10.1111/eci.12964>.
- Itou, Hiroshi, Min Yao, Ikuko Fujita, Nobuhisa Watanabe, Masaki Suzuki, Jun Nishihira, and Isao Tanaka. 2002. "The Crystal Structure of Human MRP14 (S100A9), a Ca<sup>2+</sup>-Dependent Regulator Protein in Inflammatory Process." *Journal of Molecular Biology* 316 (2): 265–76. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2001.5340>.
- Karmakar, Mausita, Martin Minns, Elyse N. Greenberg, Jose Diaz-Aponte, Kersi Pestonjamas, Jennifer L. Johnson, Joseph K. Rathkey, et al. 2020. "N-GSDMD Trafficking to Neutrophil Organelles Facilitates IL-1 $\beta$  Release Independently of Plasma Membrane Pores and Pyroptosis." *Nature Communications* 11 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16043-9>.
- Katsnelson, Michael A., L. Graham Rucker, Hana M. Russo, and George R. Dubyak. 2015. "K<sup>+</sup> Efflux Agonists Induce NLRP3 Inflammasome Activation Independently of Ca<sup>2+</sup> Signaling." *The Journal of Immunology* 194 (8): 3937–52. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402658>.
- Kolaczowska, Elzbieta, and Paul Kubes. 2013. "Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation." *Nature Reviews Immunology* 13 (3): 159–75. <https://doi.org/10.1038/nri3399>.
- Kruskal, B. A., S. Shak, and F. R. Maxfield. 1986. "Spreading of Human Neutrophils Is Immediately Preceded by a Large Increase in Cytoplasmic Free Calcium." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (9): 2919–23. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2919>.

- Lee, GS., N. Subramanian, A. Kim, I. Aksentijevich, R. Goldbach-Mansky, D. Sacks, R. Germain, D. Kastner, and JJ. Chae. 2012. "The CaSR Regulates the NLRP3 Inflammasome through Calcium and CAMP." *Nature* 492 (7427): 123–27. <https://doi.org/10.1038/nature11588>.The.
- Lefort, Craig T., and Klaus Ley. 2012. "Neutrophil Arrest by LFA-1 Activation." *Frontiers in Immunology* 3 (JUN): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00157>.
- Leukert, Nadja, Clemens Sorg, and Johannes Roth. 2005. "Molecular Basis of the Complex Formation between the Two Calcium-Binding Proteins S100A8 (MRP8) and S100A9 (MRP14)." *Biological Chemistry* 386 (5): 429–34. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.051>.
- Leukert, Nadja, Thomas Vogl, Kerstin Strupat, Rudolf Reichelt, Clemens Sorg, and Johannes Roth. 2006. "Calcium-Dependent Tetramer Formation of S100A8 and S100A9 Is Essential for Biological Activity." *Journal of Molecular Biology* 359 (4): 961–72. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.04.009>.
- Levite, Mia, Liora Cahalon, Asher Peretz, Rami Hershkovich, Alex Sobko, Amiram Ariel, Rooma Desai, Bernard Attali, and Ofer Lider. 2000. "Extracellular K<sup>+</sup> and Opening of Voltage-Gated Potassium Channels Activate T Cell Integrin Function: Physical and Functional Association between Kv1.3 Channels and B1 Integrins." *Journal of Experimental Medicine* 191 (7): 1167–76. <https://doi.org/10.1084/jem.191.7.1167>.
- Ley, Klaus, Carlo Laudanna, Myron I. Cybulsky, and Sussan Nourshargh. 2007. "Getting to the Site of Inflammation: The Leukocyte Adhesion Cascade Updated." *Nature Reviews Immunology* 7 (9): 678–89. <https://doi.org/10.1038/nri2156>.
- Liu, Zhonghua, Chuanping Wang, Jie Yang, Bowen Zhou, Rui Yang, Rajesh Ramachandran, Derek W. Abbott, and Tsan Sam Xiao. 2019. "Crystal Structures of the Full-Length Murine and Human Gasdermin D Reveal Mechanisms of Autoinhibition, Lipid Binding, and Oligomerization." *Immunity* 51 (1): 43-49.e4. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.017>.
- Mangan, Matthew S.J., Edward J. Olhava, William R. Roush, H. Martin Seidel, Gary D. Glick, and Eicke Latz. 2018. "Targeting the NLRP3 Inflammasome in Inflammatory Diseases." *Nature Reviews Drug Discovery* 17 (8): 588–606. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.97>.
- Mankan, Arun K., Therese Dau, Dieter Jenne, and Veit Hornung. 2012. "The NLRP3/ASC/Caspase-1 Axis Regulates IL-1 $\beta$  Processing in Neutrophils." *European Journal of Immunology* 42 (3): 710–15. <https://doi.org/10.1002/eji.201141921>.
- Mantovani, Alberto, Marco A. Cassatella, Claudio Costantini, and Sébastien Jaillon. 2011. "Neutrophils in the Activation and Regulation of Innate and Adaptive Immunity." *Nature Reviews Immunology* 11 (8): 519–31. <https://doi.org/10.1038/nri3024>.
- Masgrau-Alsina, Sergi, Markus Sperandio, and Ina Rohwedder. 2020.



- “Neutrophil Recruitment and Intracellular Vesicle Transport: A Short Overview.” *European Journal of Clinical Investigation*, no. March: 1–8. <https://doi.org/10.1111/eci.13237>.
- McEver, Rodger P. 2015. “Selectins: Initiators of Leucocyte Adhesion and Signalling at the Vascular Wall.” *Cardiovascular Research* 107 (3): 331–39. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvv154>.
- McMeekin, Sarah R., Ian Dransfield, Adriano G. Rossi, Christopher Haslett, and Trevor R. Walker. 2006. “E-Selectin Permits Communication between PAF Receptors and TRPC Channels in Human Neutrophils.” *Blood* 107 (12): 4938–45. <https://doi.org/10.1182/blood-2005-09-3803>.
- Mestas, Javier, and Christopher C. W. Hughes. 2004. “Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology.” *The Journal of Immunology* 172 (5): 2731–38. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>.
- Mondal, Nandini, Alexander Buffone, and Sriram Neelamegham. 2013. “Distinct Glycosyltransferases Synthesize E-Selectin Ligands in Human vs. Mouse Leukocytes.” *Cell Adhesion and Migration*. <https://doi.org/10.4161/cam.24714>.
- Morikis, Vasilios A., Shannon Chase, Ted Wun, Elliot L. Chaikof, John L. Magnani, and Scott I. Simon. 2017. “Selectin Catch-Bonds Mechanotransduce Integrin Activation and Neutrophil Arrest on Inflamed Endothelium under Shear Flow.” *Blood* 130 (19): 2101–10. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-05-783027>.
- Mueller, Helena, Anika Stadtmann, Hugo Van Aken, Emilio Hirsch, Demin Wang, Klaus Ley, and Alexander Zarbock. 2010. “Tyrosine Kinase Btk Regulates E-Selectin-Mediated Integrin Activation and Neutrophil Recruitment by Controlling Phospholipase C (PLC)  $\Gamma$ 2 and PI3K $\gamma$  Pathways.” *Blood* 115 (15): 3118–27. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-11-254185>.
- Muñoz-Planillo, Raúl, Peter Kuffa, Giovanny Martínez-Colón, Brenna L. Smith, Thekkelnaycke M. Rajendiran, and Gabriel Núñez. 2013. “K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter.” *Immunity* 38 (6): 1142–53. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>.
- Murakami, Tomohiko, Johan Ockinger, Jiujiu Yu, Vanessa Byles, Aisleen McColl, Aldebaran M. Hofer, and Tiffany Horng. 2012. “Critical Role for Calcium Mobilization in Activation of the NLRP3 Inflammasome.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (28): 11282–87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117765109>.
- Nathan, Carl. 2006. “And Opportunities” 6 (March): 173–83. <https://doi.org/10.1038/nri1785>.
- Németh, Tamás, Markus Sperandio, and Attila Mócsai. 2020. “Neutrophils as Emerging Therapeutic Targets.” *Nature Reviews Drug Discovery* 19 (4): 253–75. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0054-z>.

- Nimrichter, Leonardo, Monica M. Burdick, Kazuhiro Aoki, Wouter Laroy, Mark A. Fierro, Sherry A. Hudson, Christopher E. Von Seggern, et al. 2008. "E-Selectin Receptors on Human Leukocytes." *Blood* 112 (9): 3744–52. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-149641>.
- Nishida, Noritaka, Can Xie, Motomu Shimaoka, Yifan Cheng, Thomas Walz, and Timothy A. Springer. 2006. "Activation of Leukocyte B2 Integrins by Conversion from Bent to Extended Conformations." *Immunity* 25 (4): 583–94. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.07.016>.
- Nunes, Paula, and Nicolas Demaurex. 2010. "The Role of Calcium Signaling in Phagocytosis." *Journal of Leukocyte Biology* 88 (1): 57–68. <https://doi.org/10.1189/jlb.0110028>.
- Orning, Pontus, Egil Lien, and Katherine A. Fitzgerald. 2019. "Gasdermins and Their Role in Immunity and Inflammation." *Journal of Experimental Medicine* 216 (11): 2453–65. <https://doi.org/10.1084/jem.20190545>.
- Patel, Kamala D., Susan L. Cuvelier, and Shahina Wiehler. 2002. "Selectins: Critical Mediators of Leukocyte Recruitment." *Seminars in Immunology* 14 (2): 73–81. <https://doi.org/10.1006/smim.2001.0344>.
- Pérez-García, M. Teresa, Pilar Ciudad, and José R. López-López. 2018. "The Secret Life of Ion Channels: Kv1.3 Potassium Channels and Proliferation." *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 314 (1): C27–40. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00136.2017>.
- Pétrilli, V., S. Papin, C. Dostert, A. Mayor, F. Martinon, and J. Tschopp. 2007. "Activation of the NALP3 Inflammasome Is Triggered by Low Intracellular Potassium Concentration." *Cell Death and Differentiation* 14 (9): 1583–89. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402195>.
- Pick, Robert, Doris Brechtefeld, and Barbara Walzog. 2013. "Intraluminal Crawling versus Interstitial Neutrophil Migration during Inflammation." *Molecular Immunology* 55 (1): 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.12.008>.
- Pruenster, Monika, Roland Immler, Jonas Roth, Tim Kuchler, Thomas Bromberger, Matteo Napoli, Katrin Nussbaumer, et al. 2023. "E-Selectin-Mediated Rapid NLRP3 Inflammasome Activation Regulates S100A8/S100A9 Release from Neutrophils via Transient Gasdermin D Pore Formation." *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01656-1>.
- Pruenster, Monika, Angela R.M. Kurz, Kyoung Jin Chung, Xiao Cao-Ehlker, Stephanie Bieber, Claudia F. Nussbaum, Susanne Bierschenk, et al. 2015. "Extracellular MRP8/14 Is a Regulator of B22 Integrin-Dependent Neutrophil Slow Rolling and Adhesion." *Nature Communications* 6: 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms7915>.
- Pruenster, Monika, Thomas Vogl, Johannes Roth, and Markus Sperandio. 2016. "S100A8/A9: From Basic Science to Clinical Application." *Pharmacology and Therapeutics* 167: 120–31.

<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.07.015>.

- Rammes, Anke, Johannes Roth, Matthias Goebeler, Martin Klempt, Michael Hartmann, and Clemens Sorg. 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." *Journal of Biological Chemistry* 272 (14): 9496–9502. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.14.9496>.
- Reid, Claire, and Christopher E.M. Griffiths. 2020. "Psoriasis and Treatment: Past, Present and Future Aspects." *Acta Dermato-Venereologica* 100 (100-year theme Psoriasis): 69–79. <https://doi.org/10.2340/00015555-3386>.
- Russo, Antonella, Hendrik Schürmann, Matthias Brandt, Katja Scholz, Anna Livia L. Matos, David Grill, Julian Revenstorff, et al. 2022. "Alarming and Calming: Opposing Roles of S100A8/S100A9 Dimers and Tetramers on Monocytes." *Advanced Science* 9 (36): 1–15. <https://doi.org/10.1002/advs.202201505>.
- Santa Cruz Garcia, Ana Beatriz, Kevin P. Schnur, Asrar B. Malik, and Gary C.H. Mo. 2022. "Gasdermin D Pores Are Dynamically Regulated by Local Phosphoinositide Circuitry." *Nature Communications* 13 (1): 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27692-9>.
- Sborgi, Lorenzo, Sebastian Rühl, Estefania Mulvihill, Joka Pipercevic, Rosalie Heilig, Henning Stahlberg, Christopher J Farady, Daniel J Müller, Petr Broz, and Sebastian Hiller. 2016. " GSDMD Membrane Pore Formation Constitutes the Mechanism of Pyroptotic Cell Death ." *The EMBO Journal* 35 (16): 1766–78. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694696>.
- Schäfer, Beat W., Roland Wicki, Dieter Engelkamp, Marie geneviève Mattei, and Claus W. Heizmann. 1995. "Isolation of a YAC Clone Covering a Cluster of Nine S100 Genes on Human Chromosome 1q21: Rationale for a New Nomenclature of the S100 Calcium-Binding Protein Family." *Genomics* 25 (3): 638–43. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(95\)80005-7](https://doi.org/10.1016/0888-7543(95)80005-7).
- Schaff, Ulrich Y., Itsukyo Yamayoshi, Tiffany Tse, Donald Griffin, Lilian Kibathi, and Scott I. Simon. 2008. "Calcium Flux in Neutrophils Synchronizes B2 Integrin Adhesive and Signaling Events That Guide Inflammatory Recruitment." *Annals of Biomedical Engineering* 36 (4): 632–46. <https://doi.org/10.1007/s10439-008-9453-8>.
- Schmitz, Alexander, Ananthakrishnan Sankaranarayanan, Philippe Azam, Kristina Schmidt-Lassen, Daniel Homerick, Wolfram Hänsel, and Heike Wulff. 2005. "Design of PAP-1, a Selective Small Molecule Kv1.3 Blocker, for the Suppression of Effector Memory t Cells in Autoimmune Diseases." *Molecular Pharmacology* 68 (5): 1254–70. <https://doi.org/10.1124/mol.105.015669>.
- Schwab, Albrecht, Anke Fabian, Peter J. Hanley, and Christian Stock. 2012. "Role of Ion Channels and Transporters in Cell Migration." *Physiological Reviews* 92 (4): 1865–1913. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2011>.
- Shi, Jianjin, Yue Zhao, Kun Wang, Xuyan Shi, Yue Wang, Huanwei Huang,

- Yinghua Zhuang, Tao Cai, Fengchao Wang, and Feng Shao. 2015. "Cleavage of GSDMD by Inflammatory Caspases Determines Pyroptotic Cell Death." *Nature* 526 (7575): 660–65. <https://doi.org/10.1038/nature15514>.
- Silvin, Aymeric, Nicolas Chapuis, Garrett Dunsmore, Anne Gaëlle Goubet, Agathe Dubuisson, Lisa Derosa, Carole Almire, et al. 2020. "Elevated Calprotectin and Abnormal Myeloid Cell Subsets Discriminate Severe from Mild COVID-19." *Cell* 182 (6): 1401-1418.e18. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.002>.
- Sperandio, Markus, Christian A. Gleissner, and Klaus Ley. 2009. "Glycosylation in Immune Cell Trafficking." *Immunological Reviews* 230 (1): 97–113. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00795.x>.
- Swanson, Karen V., Meng Deng, and Jenny P.Y. Ting. 2019. "The NLRP3 Inflammasome: Molecular Activation and Regulation to Therapeutics." *Nature Reviews Immunology* 19 (8): 477–89. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0>.
- Swanson, Karen V, Meng Deng, Infectious Diseases, Craniofacial Biomedicine Program, Chapel Hill, Chapel Hill, Chapel Hill, Chapel Hill, and Chapel Hill. 2021. "HHS Public Access" 19 (8): 477–89. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0165-0.The>.
- Taabazuig, Cornelius Y., Marian C. Okondo, and Daniel A. Bachovchin. 2017. "Pyroptosis and Apoptosis Pathways Engage in Bidirectional Crosstalk in Monocytes and Macrophages." *Cell Chemical Biology* 24 (4): 507-514.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2017.03.009>.
- Tardif, Mélanie R., Julie Andrea Chapeton-Montes, Alma Posvandzic, Nathalie Pagé, Caroline Gilbert, and Philippe A. Tessier. 2015. "Secretion of S100A8, S100A9, and S100A12 by Neutrophils Involves Reactive Oxygen Species and Potassium Efflux." *Journal of Immunology Research* 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/296149>.
- Tibble, J. A., and I. Bjarnason. 2001. "Non-Invasive Investigation of Inflammatory Bowel Disease." *World Journal of Gastroenterology* 7 (4): 460–65. <https://doi.org/10.3748/wjg.v7.i4.460>.
- Vandal, Karen, Pascal Rouleau, Annie Boivin, Carle Ryckman, Mariève Talbot, and Philippe A. Tessier. 2003. "Blockade of S100A8 and S100A9 Suppresses Neutrophil Migration in Response to Lipopolysaccharide." *The Journal of Immunology* 171 (5): 2602–9. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.171.5.2602>.
- Vestweber, Dietmar. 2015. "How Leukocytes Cross the Vascular Endothelium." *Nature Reviews Immunology* 15 (11): 692–704. <https://doi.org/10.1038/nri3908>.
- Viemann, Dorothee, Katarzyna Barczyk, Thomas Vogl, Ute Fischer, Cord Sunderkötter, Klaus Schulze-Osthoff, and Johannes Roth. 2007. "MRP8/MRP14 Impairs Endothelial Integrity and Induces a Caspase-Dependent and -Independent Cell Death Program." *Blood* 109 (6): 2453–60. <https://doi.org/10.1182/blood-2006-08-040444>.

- Viemann, Dorothee, Anke Strey, Annette Janning, Kerstin Jurk, Kerstin Klimmek, Thomas Vogl, Keiichi Hirono, et al. 2005. "Myeloid-Related Proteins 8 and 14 Induce a Specific Inflammatory Response in Human Microvascular Endothelial Cells." *Blood* 105 (7): 2955–62. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-07-2520>.
- Vogl, Thomas, Anna L. Gharibyan, and Ludmilla A. Morozova-Roche. 2012. "Pro-Inflammatory S100A8 and S100A9 Proteins: Self-Assembly into Multifunctional Native and Amyloid Complexes." *International Journal of Molecular Sciences* 13 (3): 2893–2917. <https://doi.org/10.3390/ijms13032893>.
- Vogl, Thomas, Athanasios Stratis, Viktor Wixler, Tom Völler, Sumita Thurainayagam, Selina K. Jorch, Stefanie Zenker, et al. 2018. "Autoinhibitory Regulation of S100A8/S100A9 Alarmin Activity Locally Restricts Sterile Inflammation." *Journal of Clinical Investigation* 128 (5): 1852–66. <https://doi.org/10.1172/JCI89867>.
- Vogl, Thomas, Klaus Tenbrock, Stephan Ludwig, Nadja Leukert, Christina Ehrhardt, Marieke A.D. Van Zoelen, Wolfgang Nacken, et al. 2007. "Mrp8 and Mrp14 Are Endogenous Activators of Toll-like Receptor 4, Promoting Lethal, Endotoxin-Induced Shock." *Nature Medicine* 13 (9): 1042–49. <https://doi.org/10.1038/nm1638>.
- Wulff, Heike, Peter A. Calabresi, Rameeza Allie, Sung Yun, Michael Pennington, Christine Beeton, and K. George Chandy. 2003. "The Voltage-Gated Kv1.3 K<sup>+</sup> Channel in Effector Memory T Cells as New Target for MS." *Journal of Clinical Investigation* 111 (11): 1703–13. <https://doi.org/10.1172/JCI16921>.
- Wulff, Heike, Mark J. Miller, Wolfram Hänsel, Stephan Grissmer, Michael D. Cahalan, and K. George Chandy. 2000. "Design of a Potent and Selective Inhibitor of the Intermediate-Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channel, IKCa1: A Potential Immunosuppressant." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (14): 8151–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.14.8151>.
- Zarbock, Alexander, Tracy L. Deem, Tracy L. Burcin, and Klaus Ley. 2007. "Gai2 Is Required for Chemokine-Induced Neutrophil Arrest." *Blood* 110 (10): 3773–79. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-06-094565>.
- Zöllner, Olaf, Martin C. Lenter, James E. Blanks, Eric Borges, Martin Steegmaier, Hans Günther Zerwes, and Dietmar Vestweber. 1997. "L-Selectin from Human, but Not from Mouse Neutrophils Binds Directly to E-Selectin." *Journal of Cell Biology* 136 (3): 707–16. <https://doi.org/10.1083/jcb.136.3.707>.

## Danksagung

Allen voran gilt mein besonderer Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Markus Sperandio, der mir es ermöglicht hat, Teil dieses Projekts und Teil seiner Arbeitsgruppe zu werden.

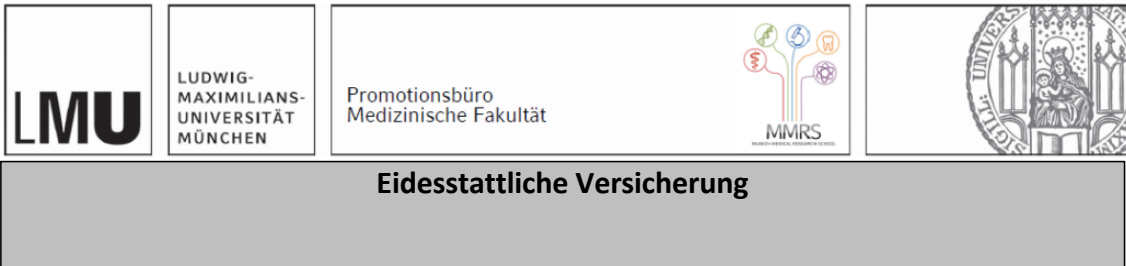
Des Weiteren möchte ich mich ganz besonders bei meinem direkten Betreuer Herrn Dr. Roland Immler bedanken. Er zeigte mir, was es bedeutet, in der experimentellen Forschung tätig zu sein und begleitete mein Projekt vom ersten bis zum letzten Tag mit höchstem Engagement. Nur dank seiner nimmermüden Unterstützung konnte dieses Dissertationsprojekt gelingen.

Letztlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die sehr lehrreiche Zeit bedanken. Besonders sei hierbei Frau Dr. Monika Prünster hervorgehoben, die mich vor allem während meiner Zeit am Institut enorm unterstützt hat.

Außerhalb der Arbeitsgruppe gilt mein besonderer Dank meinem guten Freund, Herrn Nikolas Reißig. Sowohl während meiner Zeit im Labor als auch während des Schreibens der Monografie konnte er wichtige Antworten auf viele meiner Fragen geben.

Außerdem möchte ich mich sehr herzlich bei meiner Freundin Konstanze Wiesner für die stetige Begleitung meines Projekts und die Unterstützung bedanken. Ansonsten bin ich natürlich meinen Freunden und vor allem auch meiner Familie zu großem Dank verpflichtet. Nur durch ihre bedingungslose Unterstützung war es möglich, dieses Dissertationsprojekt abzuschließen und mir damit einen Traum zu verwirklichen.

## Affidavit



**Schroll, Tobias Sebastian**

---

Name, Vorname

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

***Die Rolle des spannungsabhängigen Kaliumkanals  $K_v1.3$  auf die Funktion neutrophiler 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, 01.01.2024

Tobias Schroll

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorand

---

## Publikationsliste

- 10/2023 Pruenster, Monika, Roland Immler, Jonas Roth, Tim Kuchler, Thomas Bromberger, Matteo Napoli, Katrin Nussbaumer, Ina Rohwedder, Lou Martha Wackerbarth, Chiara Piantoni, Konstantin Hennis, Diana Fink, Sebastian Kallabis, **Tobias Schroll**, Sergi Masgrau-Alsina, Agnes Budke, Wang Liu, Dietmar Vestweber, Christian Wahl-Schott, Johannes Roth, Felix Meissner, Markus Moser, Thomas Vogl, Veit Hornung, Petr Broz, and Markus Sperandio. 2023. "E-selectin-mediated rapid NLRP3 inflammasome activation regulates S100A8/A9 release from neutrophils via transient gasdermin D pore formation." *Nature Immunology*. <https://doi.org/10.1038/s41590-023-01656-1>.
- 03/2022 Immler, Roland, Wiebke Nadolni, Annika Bertsch, Vasilios Morikis, Ina Rohwedder, Sergi Masgrau-Alsina, **Tobias Schroll**, Anna Yevtushenko, Oliver Soehnlein, Markus Moser, Thomas Gudermann, Eytan R. Barnea, Markus Rehberg, Scott I. Simon, Susanna Zierler, Monika Pruenster, and Markus Sperandio. 2022. "The Voltage-Gated Potassium Channel KV1.3 Regulates Neutrophil Recruitment during Inflammation." *Cardiovascular Research* 118 (5): 1289-1302. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab133>.