

Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin

Institut für kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Christian Wahl-Schott

**Die NLRP3-abhängige Bildung transient auftretender
GSDMD-Poren in neutrophilen Granulozyten**

Dissertation

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

vorgelegt von

Jonas Roth

aus

Landshut

2024

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Anne Krug

Prof. Dr. Heiko Adler

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Monika Pruenster

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2024

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	I
1.1	Abbildungsverzeichnis	III
1.2	Tabellenverzeichnis:	IV
1.3	Abkürzungsverzeichnis	V
2	<i>Einleitung</i>	1
2.1	Neutrophile Granulozyten	1
2.1.1	Allgemeines und Lebenszyklus	1
2.1.2	Biologische Funktion	1
2.2	Diapedese der neutrophilen Granulozyten	2
2.2.1	Rollvorgang bei neutrophilen Granulozyten.....	3
2.2.2	Kriech- und Auswanderungsprozess neutrophiler Granulozyten.....	4
2.3	Calprotektin	5
2.3.1	Allgemeines.....	5
2.3.2	Funktionen des Calprotektins	5
2.3.2.1	Intrazelluläre Funktionen	6
2.3.2.2	Extrazelluläre Funktionen.....	6
2.3.3	Klinische Bedeutung des Calprotektins	7
2.3.3.1	Calprotektin als Marker bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen	8
2.3.3.2	Calprotektin und COVID-19	8
2.3.4	Sekretion des Calprotektins	9
2.4	Inflammasom-abhängige Proteinsekretion	10
2.4.1	Aufbau und Struktur des NLRP3-Inflammasoms	10
2.4.2	Signalkaskade des NLRP3-Inflammasoms	11
2.4.3	Pyroptose	12
3	<i>Hypothese und Zielsetzung</i>	14
4	<i>Materialien und Methoden</i>	16
4.1	Materialien	16
4.1.1	Isolation und Kultivierung der Zellen	16
4.1.2	Stimulation und Inhibition der Zellen	16

4.1.3	PI-Uptake.....	17
4.1.4	LDH-Assay.....	17
4.1.5	nt-GSDMD- und CHMP4B-Färbung.....	17
4.1.6	Flusskammern.....	18
4.1.7	Giemsa-Färbung.....	18
4.1.8	Software.....	18
4.1.9	Geräte.....	19
4.1.10	Spender.....	19
4.1.11	Versuchstiere.....	19
4.2	Methoden und Versuchsablauf.....	20
4.2.1	Verfahren zur Zellisolation und Zellzahlbestimmung.....	20
4.2.1.1	Isolation humaner neutrophiler Granulozyten.....	20
4.2.1.2	Isolation humaner Monozyten.....	20
4.2.1.3	Isolation muriner neutrophiler Granulozyten.....	21
4.2.1.4	Zellzahlbestimmung.....	22
4.2.2	Konfokalmikroskopie.....	22
4.2.2.1	Zellfärbung.....	22
4.2.2.2	Bestimmung des Verteilungsindex.....	23
4.2.3	Lebendzellmikroskopie: PI-Aufnahme.....	23
4.2.3.1	Basisexperiment.....	23
4.2.3.2	EDTA.....	24
4.2.3.3	Zeitverlauf.....	25
4.2.4	LDH-Assay.....	25
4.2.5	Flusskammer.....	26
4.2.6	Cremastermuskelfärbung mittels Giemsa.....	27
4.2.7	Statistik.....	27
5	Ergebnisse.....	28
5.1	Stimulation mit E-Selektin und Propidiumiodidaufnahme in neutrophile Granulozyten.....	28
5.1.1	Humane neutrophile Granulozyten.....	29
5.1.2	Murine neutrophile Granulozyten.....	31
5.2	Stimulation neutrophiler Granulozyten und Pyroptose.....	32
5.3	Stimulation mit E-Selektin und Translokation von nt-GSDMD an die Zellmembran humaner neutrophiler Granulozyten.....	36
5.4	Transientes Auftreten von GSDMD-Poren in neutrophilen Granulozyten.....	38

5.5	ESCRT-III als möglicher Reparaturmechanismus der Zellmembran humaner neutrophiler Granulozyten.....	40
5.6	Blockade des NLRP3-Inflammasoms und Änderung der Rollgeschwindigkeit von neutrophilen Granulozyten	42
5.6.1	Verlust von GSDMD und Auswirkung auf die Auswanderung von neutrophilen Granulozyten	43
6	<i>Diskussion</i>	44
6.1	Unkonventionelle Sekretion von Calprotektin aus neutrophilen Granulozyten	44
6.2	Stimulation neutrophiler Granulozyten mit E-Selektin und schnelle NLRP3-abhängige Freisetzung von Calprotektin	45
6.3	Stimulation mit E-Selektin und schneller Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran neutrophiler Granulozyten.....	47
6.4	Neutrophile Granulozyten und Induktion von Pyroptose	48
6.5	Stimulation neutrophiler Granulozyten mit E-Selektin und transientes Auftreten von GSDMD-Poren in der Zellmembran	51
6.6	Bedeutung von NLRP3 und GSDMD für die Neutrophilen Rekrutierung	52
6.7	Ausblick	53
7	<i>Zusammenfassung</i>	55
8	<i>Anhang</i>	57
8.1	Literaturverzeichnis	57
8.2	Danksagung.....	70
8.3	Publikationen	70
8.4	Eidesstattliche Versicherung	71

1.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Leukozyten-Rekrutierungskaskade	5
Abbildung 2 – Struktur des NLRP3-Inflammasoms und Sekretion von Interleukin-1beta aus neutrophilen Granulozyten	13
Abbildung 3 – Aufnahme von Propidiumiodid in neutrophile Granulozyten bei Stimulation mit E-Selektin	30

Abbildung 4 – Aufnahme von Propidiumiodid in murine neutrophile Granulozyten bei Stimulation mit E-Selektin	32
Abbildung 5 – Pyroptose neutrophiler Granulozyten bei Stimulation mit E-Selektin ...	34
Abbildung 6 – Pyroptose von Monozyten bei Stimulation mit LPS und Nigericin	35
Abbildung 7 – Pyroptose neutrophiler Granulozyten bei Stimulation mit E-Selektin oder LPS und Nigericin	36
Abbildung 8 – Verteilung und Gesamtintensität des n-terminalen GSDMD bei Stimulation mit E-Selektin in humanen neutrophilen Granulozyten.....	37
Abbildung 9 – Propidiumiodid Aufnahme nach Stimulation mit E-Selektin mit anschließender Entfernung des Stimulus oder Dauerstimulation mit E-Selektin.....	39
Abbildung 10 – Aufnahme von Propidiumiodid in neutrophile Granulozyten bei Dauerstimulation mit E-Selektin nach unterschiedlichen Zeitintervallen	40
Abbildung 11 – Verteilungsindex von CHMP4B in mit E-Selektin stimulierten und unstimulierten humanen neutrophilen Granulozyten	41
Abbildung 12 – Rollgeschwindigkeiten neutrophiler Granulozyten mit und ohne vorherige Inkubation mit MCC950	42
Abbildung 13 – Anzahl perivaskulärer Zellen in Wildtyp- und GSDMD ^{-/-} -Mäusen.....	43
Abbildung 14 - NLRP3-abhängige Freisetzung von Calprotektin durch transient auftretende GSDMD-Poren	54

1.2 Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1.1: Materialien zur Isolation und Kultivierung von Zellen	16
Tabelle 1.2: Substanzen zur Stimulation und Inhibition der Zellen	16
Tabelle 1.3: Materialien für den PI-Uptake	17
Tabelle 1.4: Materialien für den LDH-Assay	17
Tabelle 1.5: Materialien für die nt-GSDMD- und CHMP4B-Färbung	17
Tabelle 1.6: Medien für Flusskammern	18
Tabelle 1.7: Materialien für Flusskammern	18
Tabelle 1.8: Materialien für die Giemsa-Färbung	18
Tabelle 1.9: Verwendete Software	18

1.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AIM2	Absent in Melanoma 2
ASC	apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain
CARD	Caspase activation and recruitment domain
DAMP	damage-associated molecular pattern
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	fluorescence activated cell sorting
G-CSF	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
GAG	Glykosaminglykan
GSDMD	Gasdermin-D
ICAM-1	intercellular cell adhesion molecul 1
IL-1β	Interleukin-1 β
LDH	Laktatdehydrogenase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1
MAC-1	Macrophage-1 Antigen
NETs	Neutrophil Extracellular Traps
NLR	NOD-like Rezeptor
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PMN	polymorphonuclear neutrophils
PSGL1	P-selectin glycoprotein ligand 1
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
RLR	RIG-I-like Rezeptoren
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	rounds per minute
TNF-alpha	Tumor Necrosis Factor-alpha

2 Einleitung

2.1 Neutrophile Granulozyten

2.1.1 Allgemeines und Lebenszyklus

Neutrophile Granulozyten repräsentieren bei Menschen mit einem Anteil von 50-70% die größte Gruppe der Leukozyten im peripheren Blut (Schaff 2008; Ivetic 2019). Sie sind entscheidend für das Überleben der Menschen, denn Defekte in der Funktionsweise dieser Zellen führen durch Infektionen mit Bakterien oder Pilzen zu verkürzten Lebenszeiten (Stadtmann 2013). Neutrophile Granulozyten entstehen kontinuierlich im Knochenmark. Die Bildung wird durch den Faktor G-CSF („*engl. für Granulocyte Colony-Stimulating Factor*“) gesteuert, das unter anderem von Endothelzellen synthetisiert wird. Dieser Vorgang ist wiederum von Interleukin-23 abhängig, welches von gewebeständigen Makrophagen produziert wird (Kolaczowska 2013). Freigesetztes Interleukin-23 stimuliert wiederum die Differenzierung und Freisetzung von Interleukin-17 aus T_H17-Zellen. Interleukin-17 stimuliert dann die Sekretion von G-CSF vor allem aus Endothelzellen (Stark 2005; Ley 2018). Im Knochenmark werden pro Tag eine Milliarde Neutrophile pro Kilogramm Körpergewicht gebildet. Im Falle einer Entzündungsreaktion kann diese Zahl auf bis zu zehn Milliarden Zellen ansteigen (Ley 2018). Nach der Reifung im Knochenmark werden die Zellen in die Zirkulation freigesetzt. In Bereichen von Infektionen können die Zellen lokal rasch auswandern (Rosales 2020). Die Überlebensdauer der neutrophilen Granulozyten wird mit 10-12 Stunden angenommen. Am Ende ihres Lebens werden die Zellen durch Leber, Milz und Knochenmark wieder aus der Zirkulation entfernt (Aroca-Crevillén 2024). Sterben sie allerdings bereits im Gewebe oder in der Zirkulation durch Apoptose ab, dann werden sie hier durch Makrophagen entfernt (Rosales 2020).

2.1.2 Biologische Funktion

Neutrophile Granulozyten stellen die erste Linie der Immunabwehr gegenüber eindringenden Bakterien, Protozoen, Viren und Pilzen dar (Mócsai 2013; Ley 2018; Németh 2020). Neutrophile besitzen die Fähigkeit schnell aus dem Gefäßsystem auswandern zu können und sind deshalb die ersten Zellen, die an einen Ort einer akuten Entzündung gelangen (Pruenster 2016). Hier übernehmen neutrophile Granulozyten wichtige Aufgaben in Bezug auf die Koordination der Immunantwort und sind einer der wichtigsten Akteure während akuter und chronischer Entzündungsreaktionen (Kolaczowska 2013; Németh 2020). Als Bestandteil des angeborenen Immunsystems

sind neutrophile Granulozyten mit einer Vielzahl an Abwehrmechanismen ausgestattet (Mantovani 2011). Pathogene können durch Phagozytose in das Innere von Neutrophilen aufgenommen werden. Im Anschluss daran werden Pathogene intrazellulär durch ROS („*engl. für Reactive Oxygen Species*“) oder antibakterielle Proteine abgetötet. Eine andere Möglichkeit ist eine extrazelluläre Freisetzung dieser antibakteriellen Proteine aus den Granula der neutrophilen Granulozyten, wodurch Eindringlinge abgetötet werden können (Kolaczkowska 2013; Rosales 2020). Aktivierte neutrophile Granulozyten können zudem extrazelluläre Pathogene durch die Bildung von NETs („*engl. für Neutrophil Extracellular Traps*“) abtöten. Hierbei wird die DNA zusammen mit Histonen, verschiedenen Proteinen und Enzymen aus der Zelle freigesetzt, um Angreifer entweder zu immobilisieren und sie damit Phagozyten zu präsentieren oder sie direkt abzutöten (Kolaczkowska 2013; Mócsai 2013; Németh 2020). Neutrophile Granulozyten übernehmen nicht nur antimikrobielle Funktionen des angeborenen Immunsystems, sondern auch immunmodulatorische Aufgaben. Damit stellen sie eine wichtige Schnittstelle zwischen dem innaten und adaptiven Immunsystem dar (Kolaczkowska 2013; Rosales 2020; Németh 2020). Durch die Produktion und Ausschüttung von Chemokinen, Zytokinen und angiogenen Stoffen rekrutieren neutrophile Granulozyten weitere Neutrophile, aber auch Makrophagen, dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und T-Zellen zum Ort der Entzündung (Mantovani 2011; Tecchioa 2016). Neutrophile koordinieren somit eine Verstärkung der Immunantwort sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems und ermöglichen eine Interaktion zwischen den unterschiedlichen Immunzellen am Ort der Entzündung (Tecchioa 2016). Zudem wird in jüngerer Zeit diskutiert, dass es ihnen möglich ist vom Ort der Infektion in sekundäre lymphatische Organe auszuwandern, wo sie dann als Antigen-präsentierende Zellen mit Lymphozyten interagieren und somit auch Teil der spezifischen Immunabwehr sind (Yao 2015; Rosales 2020). Die vielfältigen und wichtigen Funktionen der Neutrophilen erklären zum einen weshalb ein Mangel an diesen Zellen zu einer Immundefizienz und damit bis hin zum Tod führen und zum anderen warum eine überschießende Aktivierung der Neutrophilen zu signifikanten Gewebeschäden führen kann, zum Beispiel im Rahmen von Ischämie-Reperfusionsvorgängen bei Herzinfarkten oder Schlaganfällen, aber auch bei Autoimmunerkrankungen (Kolaczkowska 2013).

2.2 Diapedese der neutrophilen Granulozyten

Damit neutrophile Granulozyten ihre vielfältigen Funktionen im Gewebe erfüllen können, ist eine rasche Auswanderung aus dem Gefäßsystem an den Ort der

Entzündungsreaktion entscheidend (Pruenster 2016). Dieser Vorgang ist ein stark regulierter Prozess, der aus vielen, nacheinander ablaufenden Schritten besteht (Ley 2007; Xu 2008; Schmidt 2013). Die einzelnen Schritte umfassen das Rollen, das langsame Rollen, das Stärken der Adhäsion, das Kriechen, die transendotheliale Migration und schließlich die Überwindung der Basalmembran (siehe Abb.1; Ley 2007). Die Auswanderung der neutrophilen Granulozyten findet aufgrund der günstigen physikalischen Eigenschaften vor allem in postkapillären Venolen statt (Schmidt 2013).

2.2.1 Rollvorgang bei neutrophilen Granulozyten

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Gefäßsystem beginnt mit Veränderungen auf der Zelloberfläche der Endothelzellen der Gefäßwände. Hierbei werden durch Entzündungsmediatoren, die aus gewebeständigen dendritischen Zellen, Makrophagen und Stromazellen im Gewebe bei Kontakt mit Pathogenen freigesetzt werden, Adhäsionsmoleküle wie beispielsweise Selektine auf der Endotheloberfläche exprimiert. Vor allem P-Selektin aus den sogenannten Weibel-Palade-Körperchen und neu-synthetisiertes E-Selektin werden als Folge der Endothelzellaktivierung auf der Zelloberfläche des Endothels präsentiert (Phillipson 2011; Kolaczowska 2013). Sobald P- und E-Selektin auf der Oberfläche auftreten, können sie mit ihren Bindungspartnern auf den neutrophilen Granulozyten interagieren. Diese sind PSGL-1, L-Selektin, glykosyliertes CD44 und der E-Selektin-Ligand ESL-1 (Sperandio 2009). Die Interaktionen zwischen den Selektinen auf dem Endothel und ihren Liganden auf der Oberfläche der Granulozyten führen zu kurzen Kontakten zwischen den Zellen und der Gefäßwand. Diese kurzen Kontakte bedingen das Rollen der Zellen entlang der Gefäßwand (Sperandio 2009). Im Verlauf nimmt die Rollgeschwindigkeit der Zellen ab, was zum langsamen Rollen der Zellen entlang des Endothels führt (Phillipson 2011). Durch Selektin-vermitteltes Rollen werden die β 2-Integrine wie beispielweise LFA-1 („*engl. für Lymphocyte function-associated antigen 1*“) aktiviert (Stadtman 2013; Morikis 2017). Dieses Inside-Out-Signalling bewirkt die Bindung von aktivierten β 2-Integrinen an ICAM-1 („*engl. für intercellular adhesion molecul 1*“) auf dem entzündeten Endothel, was zum langsamen Rollen der neutrophilen Granulozyten führt (Morikis 2017).

Zusätzlich binden Chemokine wie CXCL1 an ihren jeweiligen G-Protein-gekoppelten Chemokin-Rezeptor (u.a. CXCR2) auf neutrophilen Granulozyten. Die dadurch ausgelösten intrazellulären Signalkaskaden überführen die β 2-Integrine schließlich in ihren hochaffinen Zustand. Die Interaktionen und Bindungen zwischen den hochaffinen

β 2-Integrinen und ICAM-1 auf dem Endothel bringen die rollende Zelle schließlich zum Stehenbleiben und zur festen Adhäsion am Endothel trotz des weiterhin regulär bestehenden Blutflusses (Phillipson 2011; Morikis 2017).

Eine weitere Möglichkeit der beta2-Integrin-Aktivierung erfolgt über eine autokrine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten. Durch die Stimulation der Granulozyten mit E-Selektin auf dem entzündeten Endothel wird Calprotektin aus den Zellen freigesetzt. Das freigesetzte Protein bindet extrazellulär an den TLR4-Rezeptor („*engl. für Toll-like receptor 4*“). Dies aktiviert wiederum die schnelle intrazelluläre ablaufende Signalkaskade MyD88 und Rap-1-GTP, die zu einer Aktivierung der beta2-Integrine führt. Die beta2-Integrine werden auf diese Weise ebenfalls in ihre intermediär- bzw. hochaffine Form überführt (Pruenster 2015). Dieser Vorgang unterstützt ebenfalls das langsame Rollen und Stehenbleiben der Granulozyten (Morikis 2017).

2.2.2 Kriech- und Auswanderungsprozess neutrophiler Granulozyten

Der Kriechvorgang der Granulozyten entlang des Endothels dient dazu, einen optimalen Ort zu finden, um die Zirkulation verlassen zu können. Vor allem Bereiche eines Zell-Zell-Kontakts am Endothel eignen sich besonders gut, um aus dem Gefäßsystem auszuwandern (Kolaczowska 2013). Während des Fortbewegungsprozesses entlang der Gefäßwand ist es notwendig, dass ständig neue Bindungen zwischen dem auf dem Endothel exprimierten ICAM-1 und MAC-1 („*engl. für Macrophage-1 Antigen*“) auf den neutrophilen Granulozyten gebildet werden. Bereits vorhandene Bindungen müssen wiederum aufgelöst werden. (Ley 2007).

Im Rahmen der Transmigration müssen die auswandernden Zellen noch drei Barrieren überwinden. Hierzu zählen die Endothelzellen, die Basalmembran und die das Gefäß umgebenden Perizyten. Besonders anspruchsvoll ist hierbei die Passage der Basalmembran (Ley 2007). Die Zellen können sowohl trans- als auch parazellulär aus dem Gefäßsystem auswandern. Bevorzugt wird von Neutrophilen allerdings die parazelluläre Route (80%). Hierbei unterstützen die Endothelzellen die auswandernden Leukozyten durch eine aktive Anpassung der Zellstruktur über Veränderungen des Zytoskeletts sowie der entsprechenden Oberflächenstrukturen (Phillipson 2011; Parsons 2012; Kolaczowska 2013). Bei der Durchwanderung der Basalmembran spielen mehrere Faktoren eine Rolle. Zum einen die aktive Loslösung der extrazellulären Matrix von den Endothelzellen, wodurch Lücken geschaffen werden und zum anderen die Freisetzung von Proteasen aus den neutrophilen Granulozyten, um sich einen Weg durch die Matrix „schneiden“ zu können (Kolaczowska 2013).

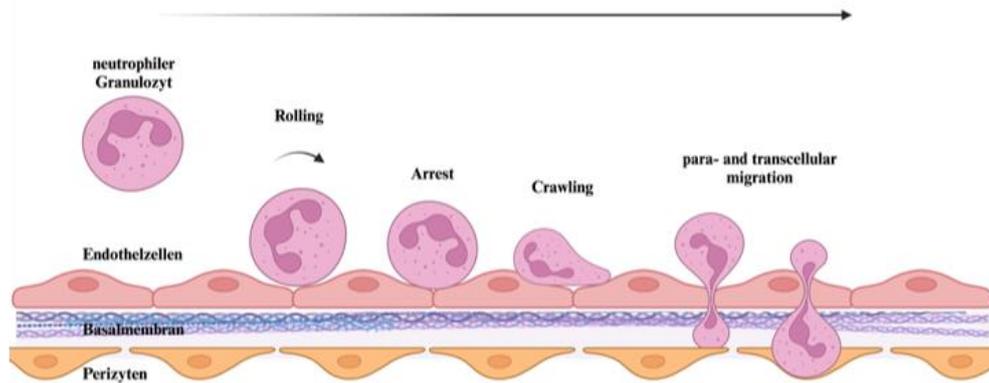


Abbildung 1 – Leukozyten-Rekrutierungskaskade

Die Auswanderung neutrophiler Granulozyten stellt einen stark regulierten Prozess dar, der aus mehreren nacheinander ablaufenden Schritten besteht. Die einzelnen Phasen der Diapedese umfassen das Rollen, das langsame Rollen, das Anhaften, das Kriechen, die transendotheliale Migration und schließlich die Überwindung der Basalmembran.

(Abbildung basierend auf: Ley 2007; Schmidt 2013; Filippi 2019; erstellt mit Biorender.com)

2.3 Calprotektin

2.3.1 Allgemeines

Calprotektin – auch MRP 8/14 oder S100 A8/A9 genannt – gehört zur Familie der S100-Proteine. Diese Gruppe besteht aus 22 Mitgliedern und bildet die größte Gruppe an Proteinen, die eine Kalzium-bindende Helix-Loop-Helix-Struktur aufweisen (Vogl 2012). Sowohl S100A8 mit einem molekularen Gewicht von 10,8 kDa als auch S100A9 mit einem Gewicht von 13,2 kDa können jeweils zwei Calcium-Ionen binden (van den Bos 1996; Vogl 1999; Vogl 2012). Calprotektin wird insbesondere in Zellen der myeloiden Reihe exprimiert (Pruenster 2016; Vernia 2019). In neutrophilen Granulozyten macht es bis zu 45% der zytosolischen Proteine aus, wohingegen das Protein in Monozyten unter physiologischen Bedingungen einen Anteil von circa 5% ausmacht (Edgeworth 1991; Newton 1998). Zudem führt eine weitere Differenzierung von Monozyten hin zu Makrophagen zu einem Verlust der S100A8/9-Expression (Lagasse 1992).

2.3.2 Funktionen des Calprotektins

S100A8 und A9 können als Homo- oder Heterodimere und als Heterotetramere auftreten (Foell 2004; Vogl 2012; Pruenster 2016). Für jede dieser Konfigurationen sind unterschiedliche biologische Funktionen beschrieben, allerdings ist die Relevanz der Homodimere in vivo noch nicht abschließend geklärt (Pruenster 2016). Unter physiologischen Umständen spielen insbesondere die Heterodimere eine wichtige Rolle (Foell 2004; Vogl 2012). Eine Freisetzung von Calprotektin aus neutrophilen

Granulozyten erfolgt entweder über eine passive Freisetzung aus den Zellen im Rahmen einer Zellyse oder über eine aktive Sekretion. Dies tritt insbesondere während akuter oder chronischer Entzündungsprozesse auf. Hier fungiert Calprotektin als Warn- und Gefahrensignal (Pruenster 2016). Das Protein gehört zur Gruppe der DAMPs („*engl. damage-associated molecular pattern*“) (Pruenster 2016; Jarlborg 2020). Charakteristisch für diese Proteine ist eine Doppelfunktion. Intrazellulär leisten sie einen wichtigen Beitrag zur Zellhomöostase (Bianchi 2007; van Lent 2008; Chan 2012), wohingegen sie extrazellulär durch die Aktivierung und Rekrutierung von Immunzellen eine Immunantwort auslösen können (Foell 2004; Foell 2007). Im Folgenden soll ein Überblick über die intra- und extrazellulären Funktionen des Proteins gegeben werden.

2.3.2.1 Intrazelluläre Funktionen

Die intrazelluläre Funktion von Calprotektin ist immer noch nicht ausreichend verstanden, aufgrund der Kalzium-bindenden-Eigenschaft von Calprotektin wird jedoch vermutet, dass das Protein Kalzium-vermittelte Signale an andere Strukturen der Zelle übertragen kann (Vogl 2012). So kommt es in neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu einer Kalzium-abhängigen Verlagerung von Calprotektin an die Zellmembran. Hier übernimmt das Protein eine wichtige Funktion in der Interaktion zwischen dem Zytoskelett und der Zellmembran (Roth 1993). Insbesondere ein Einfluss auf Mikrotubuli, Vimentin, Keratin und Actin konnte nachgewiesen werden (Goebeler 1995; Rammes 1997; Vogl 2004). Die direkte Interaktion von Calprotektin und Tubulin führt zu einer Polymerisation der Mikrotubuli. In diesem Prozess dient S100A9 als regulierende Untereinheit, denn eine Phosphorylierung durch die p38-MAP-Kinase verhindert die Interaktion mit Tubulin und somit auch die Polymerisation der Mikrotubuli (Vogl 2004; Lominadze 2005). Die Polymerisation und die Reorganisation des Zytoskeletts sind essenziell für die Fortbewegung der Phagozyten im Gewebe (Vogl 2004). Zudem konnte zwischen dem Auftreten von heterotetrameren Calprotektin-Komplexen und der Polymerisation des Mikrotubulussystems ein positiver Zusammenhang festgestellt werden (Leukert 2006).

2.3.2.2 Extrazelluläre Funktionen

Als DAMP trägt Calprotektin extrazellulär zu einer Verstärkung der inflammatorischen Antwort bei (Bianchi 2007; Vogl 2012). Die Bindung von Calprotektin an GAG- („*Glykosaminykan*“), RAGE- („*engl. für receptor for advanced glycation endproducts*“) und TLR4-Rezeptoren führt zu einer Stimulation von Endothelzellen und

Leukozyten (Robinson 2002; Vogl 2007; Narumi 2015; Pruenster 2016). Diese Rezeptorbindung aktiviert den MAPKinase- und NF- κ B-Signalweg (Srikrishna 2005; Hermani 2006). Das führt zu einer Produktion und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Takeda 2003; Akira 2004). Dadurch erfolgt wiederum eine Aktivierung und Rekrutierung von weiteren Zellen des angeborenen, aber auch des adaptiven Immunsystems (Bianchi 2007; Vogl 2012). Besonders auf die Auswanderung der Leukozyten aus dem Gefäßsystem hat Calprotektin einen Einfluss (Newton 1998). Bei neutrophilen Granulozyten kommt es durch die Bindung an den TLR4-Rezeptor zu einer Aktivierung und Konfirmationsänderung der beta2-Integrine. Die Folge hiervon ist ein verlangsamtes Rollen der Immunzellen auf dem Endothel und somit eine schnellere Auswanderung der Zellen aus der Blutbahn (Pruenster 2015). All diese Eigenschaften von Calprotektin führen zu einer Verstärkung des entzündlichen Signals und damit der inflammatorischen Antwort (Bianchi 2007; Chan 2012).

Das Protein weist aber auch selbst antibakterielle Eigenschaften im Gewebe, im Blut oder im Liquor auf (Steinbakk 1990; Sohnle 1991). Diese Fähigkeit beruht auf der Eigenschaft der heterodimeren Proteinkomplexe Zink binden zu können. Bei diesem Vorgang kommt es zur Heterotetramerisation, wobei sich zwei Heterodimere zusammenlagern und dabei bis zu 12 Zinkionen binden können. Zink ist ein essenzielles Spurenelement für bakterielles Wachstum (Sohnle 2000; Vogl 2006; Vogl 2012).

Die Freisetzung von Calprotektin im Rahmen von Immunreaktionen führt dazu, dass bei einer Reihe von unterschiedlichen Erkrankungen erhöhte Spiegel des Proteins nachgewiesen werden können (Pruenster 2016; Jarlborg 2020).

2.3.3 Klinische Bedeutung des Calprotektins

Mit Hilfe von Calprotektin-Knockout-Mäusen wurde die Bedeutung des Proteins im Rahmen vieler Erkrankungen verdeutlicht (Pruenster 2016). So konnte die Relevanz des Calprotektins während steriler Infektionen wie einer akuten Pankreatitis nachgewiesen werden (Schnekenburger 2008). Große Mengen des Proteins wurden auch im Liquor von Patienten mit einer Pneumokokken-Meningitis gefunden (Wache 2015). Ebenso konnte der starke Einfluss des Calprotektins auf die Letalität während eines durch LPS ausgelösten septischen Schocks gezeigt werden (Vogl 2007).

Neben der wichtigen Rolle des Calprotektins während entzündlicher Prozesse konnte zudem auch eine starke Vermehrung des Proteins in mehreren Tumorentitäten festgestellt werden. Hierbei sind vor allem Brust-, Lungen-, Prostatakrebs und die malignen Erkrankungen des gastro-intestinalen Systems zu nennen (Pruenster 2016). So kann

beispielsweise über den S100A9-CXCL12-Signalweg bei BRCA-1-mutiertem Mammakarzinom eine Tumor-Mikroumgebung geschaffen werden, die ein verstärktes Wachstum des Tumors und eine Resistenz gegenüber Immuntherapien fördert (Li 2022b). Die hohen Proteinlevel von Calprotektin bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen und vor allem die gute Korrelation zwischen der messbaren Proteinmenge mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung prädestinieren Calprotektin als Biomarker für diese Erkrankungen (van Lent 2008; Sipponen 2008; Pruenster 2016). Im Folgenden soll die klinische Bedeutung des Proteins anhand zweier Beispiele aufgezeigt werden.

2.3.3.1 Calprotektin als Marker bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

Die Bestimmung des Calprotektins im Fäces von Patienten gilt als wichtige Verlaufskontrolle bei chronisch entzündlichen Darmkrankheiten wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa und wird auch in der aktuellen S3-Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten empfohlen (Vernia 2019; Sturm 2021). Denn die Menge an fäkalem Calprotektin korreliert sowohl mit der Krankheitsaktivität als auch mit den Ergebnissen der endoskopischen Untersuchungen (Sipponen 2008). Besonders die Tatsache, dass es sich um ein nicht-invasives und äußerst kostengünstiges Verfahren handelt, sprechen neben der gleichmäßigen Verteilung im Stuhl, der langen Stabilität bei Raumtemperatur und dem einfachen Messverfahren für den Einsatz des Proteins als intestinaler Entzündungsmarker (Fatemeh Khaki-Khatibia 2020). Zudem führen diese Tatsachen zu einer hohen Akzeptanz des Tests bei den betroffenen Patienten (Vernia 2019). Die Bestimmung des Calprotektin-Spiegels im Stuhl der Patienten erlaubt im Weiteren die Unterscheidung zwischen organischen und funktionalen intestinalen Erkrankungen und hilft zusätzlich den Verlauf einer Erkrankung vor allem während einer entsprechenden Therapie besser abbilden zu können (Manceau 2017).

2.3.3.2 Calprotektin und COVID-19

Im Jahr 2020 ist die durch das SARS-CoV-2 hervorgerufene COVID-19-Erkrankung ausgebrochen, die sich durch die Verbreitung in mehrere hundert Ländern zu einer weltweiten Pandemie entwickelt hat (Shi 2020). Bei den Patienten wird meist ein moderater Verlauf mit Fieber, Husten und Dyspnoe festgestellt. Einige entwickeln aber auch schwere Verläufe mit einem akuten Atemnotsyndrom, das oft mit einem Multiorganversagen einhergeht. Eine intensivmedizinische Versorgung und Überwachung der Patienten ist die Folge (Silvin 2020). Bei Patienten mit diesen schweren

Verläufen kann im Blut ein schneller und extremer Anstieg von Zytokinen nachgewiesen werden. Hierbei steigen vor allem die Werte von Interleukin-6, Interleukin-2R, Interleukin-10 und TNF- α („*engl. für Tumor Necrosis Factor-alpha*“) stark an (Chen 2020a; Silvin 2020).

In Untersuchungen von hospitalisierten Patienten mit einer nachgewiesenen COVID-19-Infektion konnten erhöhte Serumspiegel des Calprotektins gemessen werden (Shi 2020; Silvin 2020; Chen 2020b). Zusätzlich zeigte sich, dass Patienten mit schwereren Krankheitsverläufen besonders hohe Calprotektin-Spiegel im Blut aufweisen (Shi 2020). Aufgrund der pro-inflammatorischen Eigenschaften des Proteins geht man davon aus, dass die erhöhten Calprotektin-Level den starken Anstieg der Zytokine begünstigen, die wiederum zum schweren Krankheitsverlauf der Patienten mit einer überschießenden Immunreaktion führen (Silvin 2020). Chen et al zeigten zudem, dass hohe Calprotektin-Level bereits mit einem hohen Risikowert im sogenannten COVID-GRAM, einem Tool zur Risikostratifizierung bei COVID-19 Erkrankten, und mit einer erhöhten Mortalität der Patienten einhergehen. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass über die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems und insbesondere der neutrophilen Granulozyten, während einer COVID-19-Infektion, eine große Menge des Calprotektins freigesetzt wird. Dies wiederum führt über die pro-inflammatorische Wirkung des Proteins zu einem starken Anstieg der Zytokine im Blut der Patienten, was wiederum zu einer überschießenden Immunreaktion mit schwerem Krankheitsverlauf führen kann (Silvin 2020).

2.3.4 Sekretion des Calprotektins

Die Freisetzung von DAMPs erfolgt im Allgemeinen entweder passiv über einen nicht programmierten Zelltod oder eine aktive Sekretion (Bianchi 2007; Voganatsi 2001; Urban 2009). Da Calprotektin die entsprechende Signalsequenz fehlt, um über die klassische Golgi-Route aus der Zelle freigesetzt zu werden, muss die aktive Freisetzung über einen Golgi-unabhängigen Sekretionsweg erfolgen (Rammes 1997; Foell 2007; Ehrchen 2009). Untersuchungen haben ergeben, dass der Großteil des Proteins die Zelle durch aktive und nicht durch passive Sekretion verlässt (Rammes 1997). Der genau zugrundeliegende molekulare Mechanismus ist bisher nicht bekannt, allerdings konnte gezeigt werden, dass ein entzündlich verändertes Endothel die Freisetzung des Proteins triggert (Frosch 2000). Eine genauere Untersuchung in Mäusen zeigte zudem, dass die Interaktion von E-Selektin auf den Endothelzellen mit PSGL-1 auf den Immunzellen zur Freisetzung von Calprotektin aus neutrophilen Granulozyten führt (Pruenster 2015).

Interleukin-1 β (IL-1 β), ein ebenfalls proinflammatorisch wirkendes Zytokin, weist ähnlich wie Calprotektin keine Signalsequenz für eine klassische Freisetzung über den Golgi-Apparat auf (Broz 2015; Evavold 2018). Aus diesem Grund war der zugrundeliegende molekulare Mechanismus der Sekretion für lange Zeit ebenfalls unbekannt (Martín-Sánchez 2016; Evavold 2018). Erst mit der Beschreibung der GSDMD-Poren im Jahr 2015 konnte die Signalkaskade für die Freisetzung von IL-1 β entschlüsselt werden. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die aktive IL-1 β -Sekretion über einen NLRP3-Inflammasom-abhängigen („*engl. für NLR family pyrin domain containing 3*“) Signalweg und Bildung von GSDMD-Poren in der Zellmembran erfolgt (Shi 2015; He 2015; Kayagaki 2015).

2.4 Inflammasom-abhängige Proteinsekretion

2.4.1 Aufbau und Struktur des NLRP3-Inflammasoms

Das NLRP3-Inflammasom ist ein Multiproteinkomplex des angeborenen Immunsystems, der sich intrazellulär unter anderem durch die Stimulation der Zelle durch DAMPs und PAMPs („*Pathogen-associated molecular patterns*“) formiert und insbesondere in Monozyten und Makrophagen gut charakterisiert ist (Evavold 2018; Sharma 2021). Generell können mehrere unterschiedliche Inflammasom-Typen unterschieden werden, wobei die grundsätzliche Struktur sehr konsistent ist. So bestehen die Komplexe immer aus einer Rezeptordomäne. Diese ist für die Registrierung des jeweiligen Stimulus entscheidend und namensgebend für das jeweilige Inflammasom (Evavold 2018). Es können NLR („*engl. für nucleotide-binding domain-like receptors*“), RLR („*engl. für RIG-I-like Rezeptoren*“) und AIM2 („*engl. für Absent in Melanoma 2*“) unterschieden werden, wobei die NLRs nochmals anhand ihrer molekularen Struktur unterteilt werden (Broz 2016; Sharma 2021). NLRPs enthalten eine Pyrin-Domäne, wohingegen die NLRCs eine CARD-Domäne („*engl. für Caspase recruitment domain*“) auszeichnet. Diese Eigenschaft ist für die weitere Struktur des Proteinkomplexes entscheidend (Deepika 2016). Während die CARD-Domäne direkt eine Effektor-Caspase bindet und aktiviert, rekrutiert und bindet dagegen die Pyrin-Domäne zunächst das Adaptormolekül ASC (*apoptosis-associated speck like protein containing a caspase recruitment domain*) (Jin 2013; Cai 2014; Evavold 2018). Dieses kann durch Interaktion mit der Pyrin-Domäne weiterer ASC-Moleküle weitreichende Filamente ausbilden. An der Außenseite der Komplexe sind wiederum CARD-Domänen angeordnet, welche die Effektor-Caspasen binden und aktivieren (siehe Abb. 2; Broz 2016). Somit kommt es durch das Adaptormolekül ASC zu einer deutlichen Verstärkung des inflammatorischen Signals

(Broz 2010). Das NLRP3-Inflammasom kann durch eine Vielzahl von Stimuli aktiviert werden und übernimmt in der Abwehr gegenüber Bakterien, Pilzen und anderen Pathogenen eine wichtige Rolle, weshalb die Struktur und Funktionsweise im Folgenden genauer dargestellt wird (Latz 2013; Man 2015).

2.4.2 Signalkaskade des NLRP3-Inflammasoms

Das NLRP3-Rezeptor-Protein reagiert auf eine große Anzahl von verschiedenen Stimuli wie beispielsweise extrazelluläres ATP, Bakterien und Harnsäurekristalle. Aufgrund der großen Bandbreite an möglichen Stimuli scheint das Sensor-Protein nicht direkt die möglichen Stimuli zu binden, sondern vielmehr durch ein gemeinsames intrazelluläres Signal aktiviert zu werden (Kelley 2019). Sobald ein entsprechender Stimulus erkannt wird, bindet das Adaptormolekül ASC über eine Pyrin-Pyrin-Interaktion an das Sensorprotein (Vajjhala 2012; Jin 2013). Durch die Anreicherung von weiteren ASC-Molekülen kommt es zur Bildung von Filamenten. Diese lagern sich wiederum zu makromolekularen Aggregaten, den sogenannten ASC-Specks zusammen (Lu 2014). Auf ihre Oberfläche tragen diese Komplexe CARD-Domänen. An diese Stellen können im nächsten Schritt pro-Caspase-1-Moleküle binden und dadurch aktiviert werden (Broz 2010). Der Adaptor ASC bildet somit zum einen eine Schnittstelle zwischen dem Sensor und der Effektor-Caspase und verstärkt zum anderen durch die Zusammenlagerung mit weiteren ASC-Proteinen und durch die Aktivierung der Caspase-1 das initiale Signal (Lu 2014; Broz 2016). Die aktivierte Caspase-1 überführt das inaktive pro-IL-1 β in seine biologisch aktive Form (Broz 2015). Zusätzlich wird der n-terminale Teil des GSDMD durch die Caspase-1 von seinem c-terminalen Teil getrennt. Vom c-terminalen Ende des GSDMDs wird eine auto-inhibitorische Funktion auf den n-terminalen Teil vermutet (Sborgi 2016; Broz 2020). Der durch die Caspase-1 freigesetzte n-terminale Teil des GSDMDs kann über Zusammenlagerung mit weiteren nt-GSDMDs Poren in der Zellmembran bilden. Hierbei interagiert der n-terminale Teil des Proteins direkt mit den Lipiden der Zellmembran. Besonders Lipide mit negativ-geladenen Kopfgruppen, die sich auf der Innenseite der Zellmembran befinden, werden bevorzugt (Ding 2016; Broz 2020). Bei Untersuchungen mit Hilfe des atomic-force-Mikroskops konnten die Maße der GSDMD-Poren bestimmt werden. Der innere Durchmesser der GSDMD-Poren wird durchschnittlich mit einer Größe von 10-15 nm angegeben (Gaidt 2016; Evavold 2018). IL-1 β mit einer Größe von 4,5 nm kann somit also relativ einfach das Zellinnere durch die GSDMD-Poren verlassen (Evavold 2018). Die Bedeutung der GSDMD-Poren während des Sekretionsprozesses konnte zudem im Maus Modell mit GSDMD^{-/-}-Mäusen

unterstrichen werden. Aus den Zellen dieser Tiere konnte trotz Stimulation kein IL-1 β freigesetzt werden (Ding 2016). Allerdings ist der kleine Durchmesser der Poren auch der Grund dafür, dass nur sehr kleine Proteine auf diese Weise aus der Zelle freigesetzt werden können, wie beispielweise das erwähnte Interleukin-1beta, Interleukin-18 oder die Caspase1. Größere Proteine wie zum Beispiel LDH (*Laktatdehydrogenase*) können so nicht aus der Zelle freigesetzt werden (Gaidt 2016).

2.4.3 Pyroptose

Als Pyroptose wird eine spezielle Art des lytischen Zelltods bezeichnet (Kovacs 2017). Diese unterscheidet sich vor allem bezüglich morphologischer Gesichtspunkte maßgeblich von der in den Zellen ablaufenden Apoptose (Shi 2016). Die Apoptose zeichnet sich durch die Umwandlung der Zelle in Apoptose-Körperchen aus, die dann von Phagozyten entfernt werden. Die Pyroptose dagegen ist durch die Bildung von GSDMD-Poren in der Zellmembran gekennzeichnet (Shi 2016, Kovacs, 2017). Die Poren bedingen ein osmotisch verursachtes Anschwellen der Zellen und eine Ruptur der Zellmembran, was wiederum zur Freisetzung von zytoplasmatischen Stoffen führt. (Broz 2016; Kovacs 2017). Durch die Ruptur der Zellmembran können aber auch Stoffe aus der Zelle freigesetzt werden, die sonst nicht durch den kleinen Porendurchmesser gelangen, wie beispielweise das LDH, welches auch klassischer Weise als Indikator für den Zelltod eingesetzt wird (Gaidt 2016).

Die Pyroptose übernimmt wichtige Aufgaben im Zusammenhang mit der Verteidigung des Organismus gegenüber Bakterien und anderen Pathogenen (Kovacs 2017). Eine große Anzahl an unterschiedlichen Bakterien, die Pyroptose in den Zellen auslösen, sind mittlerweile bekannt. Dazu gehören unter anderem Shigellen, Salmonellen, Yersinien und Listerien (Xia 2018). Pathogene verwenden oft körpereigene Zellen als Nische für den Replikationsprozess. Durch die Aktivierung des Inflammasoms und die Einleitung der Pyroptose wird diese Replikationsnische zerstört und die Pathogene aus der Zelle freigesetzt (Man 2017). Ein weiterer Mechanismus basiert darauf, dass die Pathogene in den pyroptischen Zellen mit rupturierter Zellmembran in einer sogenannten „Poren-induzierten intrazellulären Falle“ gefangen werden. Dort werden sie dann von Phagozyten eliminiert (Kovacs 2017). In die Umgebung der pyroptischen Zelle werden zudem aus dem Zytosol viele pro-inflammatorische Zytokine freigesetzt, was lokal die Entzündungsreaktion verstärkt und umliegende Entzündungszellen aktiviert (Kovacs 2017, Man, 2017).

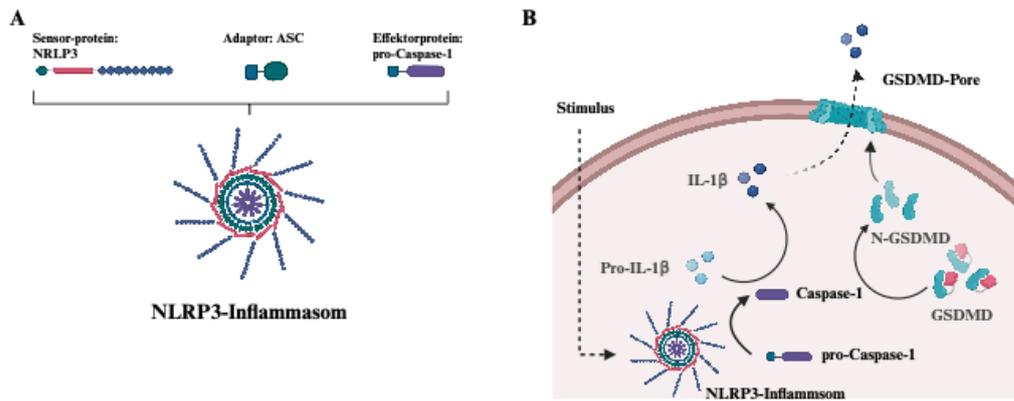


Abbildung 2 – Struktur des NLRP3-Inflammasoms und Sekretion von Interleukin-1beta aus neutrophilen Granulozyten

(A) zeigt den Aufbau des NLRP3-Inflammasoms. Das Sensorprotein bindet bei entsprechender Stimulation über eine Pyrin-Domäne das Adaptorprotein ASC. Dieses wiederum bildet über Pyrin-Pyrin-Interaktionen weitreichende Filamente mit weiteren Adaptorproteinen aus. Zudem enthalten die Adaptorproteine CARD-Domänen, über die Effektorcaspasen wie die Caspase-1 binden können und dadurch aktiviert werden. (B) zeigt die NLRP-3-abhängige Freisetzung von IL-1 β . Hierbei kommt es durch die Aktivierung des NLRP-3-Inflammasoms zur Umwandlung der pro-Caspase1 in die aktive Caspase-1. Diese spaltet zum einen GSDMD in nt- und ct-GSDMD und zum anderen pro-IL-1 β in biologisch aktives IL-1 β . Nt-GSDMD bildet dann durch die Zusammenlagerung mit weiteren nt-GSDMDs Poren in der Zellmembran, worüber IL-1 β aus der Zelle freigesetzt wird. (Abbildung basierend auf Broz 2016; Gaidt 2016; Swanson 2019; Yow 2022; erstellt mit Biorender.com)

3 Hypothese und Zielsetzung

Calprotektin bildet in neutrophilen Granulozyten, aber auch in Monozyten den Großteil der im Zytosol vorkommenden Proteine (Edgeworth 1991; Newton 1998; Vernia 2019). Zudem nimmt Calprotektin im klinischen Alltag aufgrund seiner tragenden Rolle in der Pathophysiologie mehrerer Krankheitsbilder und seiner Bedeutung in der Diagnostik mehrerer Krankheiten eine wichtige Stellung ein (Ehrchen 2009). Dennoch ist der genaue molekulare Signalweg, welcher dem aktiven Sekretionsmechanismus insbesondere aus den neutrophilen Granulozyten zugrunde liegt, bisher nicht bekannt. Dem Protein fehlt die Signalsequenz, um über die klassische Golgi-Route aus der Zelle freigesetzt zu werden, obwohl der Großteil des Proteins nicht über einen passiven, sondern über einen aktiven Mechanismus die Zelle verlässt (Rammes 1997). Pruenster et al. zeigten 2015, dass die Interaktion von E-Selektin auf entzündlichem Endothel und PSGL-1 auf neutrophilen Granulozyten, während der Leukozytenrekrutierungskaskade zur Freisetzung von Calprotektin führt. Ähnlich wie bei Calprotektin war bei Interleukin-1 β der zugrundeliegende Sekretionsweg aufgrund der fehlenden Golgi-Signalsequenz lange unbekannt (Broz 2015; Evavold 2018). Erst mit der Entdeckung der GSDMD-Poren konnte der molekulare Mechanismus der Freisetzung entschlüsselt werden (Shi 2015; He 2015; Kayagaki 2015). In Vorarbeiten konnte mit Hilfe von Western-Blot-Analysen festgestellt werden, dass die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit E-Selektin eine Prozessierung der Effektorproteine des NLRP3-Inflammasoms zur Folge hat. Insbesondere die NLRP3-abhängige Aktivierung der Caspase-1 und des GSDMDs wurden hierbei nachgewiesen (Kuchler 2023).

Die vorliegende Arbeit untersucht deshalb die Hypothese genauer, ob die Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin auf dem entzündeten Endothel über eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zu einem Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran führt, wodurch die aktive Freisetzung von Calprotektin ermöglicht wird. Hieraus ergeben sich folgende Zielsetzungen:

- Nachweis der Porenbildung in der Zellmembran von neutrophilen Granulozyten.
- Untersuchung des Verteilungsmusters von n-terminalem-GSDMD in neutrophilen Granulozyten während der Stimulation mit E-Selektin
- Untersuchung des Freisetzungsprozesses bezüglich einer Abhängigkeit vom NLRP3-Inflammasom.
- Testung der neutrophilen Granulozyten auf Pyroptose in Folge der E-Selektin-Stimulation.

- Vergleichsuntersuchungen mit Monozyten.
- Untersuchung der funktionellen Bedeutung des NLRP3-Inflammasoms in Bezug auf die Freisetzung des Calprotektins während der Diapedese.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

Standardmäßig verwendete Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, etc. werden in diesem Kapitel nicht gesondert aufgelistet.

4.1.1 Isolation und Kultivierung der Zellen

Tabelle 1.1: Materialien zur Isolation und Kultivierung von Zellen

Produkt/Medium	Zusammensetzung	Hersteller
<i>Polymorphprep</i> [®]		AXIS-SHIELD [®] /Progen [®]
<i>Lymphoprep</i> [®]		AXIS-SHIELD [®] /Progen [®]
<i>EasySep</i> [™] <i>mouse neutrophil enrichment kit</i>		STEMCELL-Technologies [®]
<i>EasySep</i> [™] <i>human monocyte enrichment kit</i>		STEMCELL-Technologies [®]
<i>Recommended medium for EasySep</i> [™]	PBS 2% fetal bovine serum (FBS) 1mM EDTA	
<i>EDTA</i>	186,1 g EDTA 800 ml Wasser 20 g NaOH pH 8,0 einstellen auf 1 l mit Wasser auffüllen	
<i>PBS</i>		Invitrogen [®]
<i>Heparin</i>		Sigma [®]
<i>Stimulationsmedium</i>	100 ml Hank's Buffer Salt Solution 238 mg HEPES pH auf 7,4 einstellen	Sigma [®]

4.1.2 Stimulation und Inhibition der Zellen

Tabelle 1.2: Substanzen zur Stimulation und Inhibition der Zellen

Substanz	Stock-Solution	Working-Solution	Hersteller
<i>Recombinant Human E-Selectin/CD62E ohne Fc</i>	1 mg/ml	1 µg/ml	R&D Systems [®]
<i>Recombinant Mouse E-Selectin/CD62E Fc Chimera</i>	1 mg/ml	20 µg/ml	R&D Systems [®]
<i>Recombinant Human ICAM-1/CD54 Fc Chimera</i>	1 mg/ml	15 µg/ml	R&D Systems [®]
<i>LPS from E. Coli Ultrapure</i>	1 mg/ml	10 µg/ml	InvivoGen [®]
<i>Nigericin</i>		7,5 µg/ml	Sigma-Aldrich [®]

<i>MCC950</i>	8,1 mg/ml (20mM)	1 μ M	InvivoGen [®]
<i>DMSO</i>			Sigma [®]
<i>TLR4 Inhibitor, TAK-242</i>	100 mg/ml	1 μ g/ml	NovImmune SA [®]
<i>Paquinimod</i>		10 μ g/ml	Active Biotech Research AB [®]

4.1.3 PI-Uptake

Tabelle 1.3: Materialien für den PI-Uptake

Material	Hersteller
<i>IBIDI[®] 8 well glass bottom slides</i>	IBIDI [®]
<i>Cell Tracker Green CMFDA</i>	Invitrogen [®]
<i>Propidiumiodid (kurz PI) (working solution: 0,33 μg/ml)</i>	Invitrogen [®]
<i>0,01% Poly-L-Lysin</i>	Sigma-Aldrich [®]

4.1.4 LDH-Assay

Tabelle 1.4: Materialien für den LDH-Assay

Material	Hersteller
<i>CyQuant LDH-Zytotoxizitäts Assay-Kit</i>	Invitrogen [®]
<i>Triton-X100</i>	Roth [®]

4.1.5 nt-GSDMD- und CHMP4B-Färbung

Tabelle 1.5: Materialien für die nt-GSDMD- und CHMP4B-Färbung

Material	Hersteller
<i>IBIDI[®] 8 well removable slides</i>	IBIDI [®]
<i>0,01% Poly-L-Lysin</i>	Sigma-Aldrich [®]
<i>2% PFA</i>	AppliChem [®]
<i>Triton-X100</i>	Roth [®]
<i>monoclonal anti-nt-GSDMD-antibody; rabbit anti-human; IgG; abcam215203/ERP20829-408 (working solution: 2 μg/ml)</i>	Abcam [®]
<i>polyclonal anti-CHMP4B-antibody; rabbit anti-human; IgG; abcam135154 (working solution: 5 μg/ml)</i>	Abcam [®]

<i>Antibody diluent</i>	Thermo Fisher®
<i>DAPI (working solution: 1 µg/ml)</i>	Invitrogen®
<i>Donkey anti-rabbit-antibody Alexa488 (working solution: 5 µg/ml)</i>	Thermo Fisher®
<i>ProLong Diamond Antifade Mountant Media</i>	Thermo Fisher®

4.1.6 Flusskammern

Tabelle 1.6: Medien für Flusskammern

Produkt/Medium	Zusammensetzung	Hersteller
<i>5% Casein</i>	40 ml PBS 2g Casein	Sigma®
<i>PBS/BSA</i>		Klinik Apotheke Großhadern

Tabelle 1.7: Materialien für Flusskammern

Material	Hersteller
<i>IBIDI® µ-Slide VI 0,1</i>	IBIDI®
<i>Omnifix® Einmal-Insulinspritze</i>	Braun®

4.1.7 Giemsa-Färbung

Tabelle 1.8: Materialien für die Giemsa-Färbung

Material	Hersteller
<i>Azur-Eosin-Methylenblaulösung (Giemsa)</i>	Merck®
<i>Ethanol</i>	AppliChem®
<i>Xylol</i>	AppliChem®
<i>Essigsäure</i>	AppliChem®
<i>Eukitt®</i>	Sigma-Aldrich®

4.1.8 Software

Tabelle 1.9: Verwendete Software

Software	Anwendung
Microsoft Office®	Dokumentation und Datenauswertung
<i>Biorender®</i>	Erstellung von Übersichtsgraphiken
<i>Inkscape®</i>	Erstellung von Graphen

<i>GraphPad Prism® 10</i>	statistische Tests und Graphenerstellung
<i>Fiji</i>	Bildauswertung und -bearbeitung

4.1.9 Geräte

Geräte	Hersteller
<i>Leica SP8X WLL Confocal Microscope</i>	Leica®
<i>HC PL APO 40x/1,3 NA oil immersion objective</i>	Leica®
<i>Tecan Spark 10M Microplate Reader</i>	Tecan®
<i>Leica SP8X WLL Confocal Microscope</i>	Leica®
<i>HC PL APO 40x/1,3 NA oil immersion objective</i>	Leica®
<i>PHD ULTRA™ Syringe Pump</i>	Harvard Apparatus®
<i>Inverse Fluoreszenz Mikroskop Leica DMi8</i>	Leica®
<i>HC PL FL L 20x/0,40 CORR PHI Objektiv</i>	Leica®
<i>Spectra X F Lichtquelle</i>	Lumencor®
<i>Leica DFC364FX mit Sony IXC285 interlin CCD-Chip</i>	Leica®
<i>Leica DM2500 Durchlichtmikroskop</i>	Leica®
<i>100x/1,4 NA oil immersion Objektiv</i>	Leica®
<i>Leica DMC2900 CMOS Kamera</i>	Leica®

4.1.10 Spender

Blut wurde im Rahmen eines Ethikvotums der Ludwig-Maximilians-Universität München (Az. 611-15) in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki von freiwilligen, gesunden Spendern vornehmlich aus der Vena mediana cubiti mit Hilfe eines Butterfly abgenommen. Das entnommene Blut wurde in heparinisierten Spritzen gesammelt und sofort weiterverarbeitet.

4.1.11 Versuchstiere

C57BL/6-Wildtypmäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) zugekauft und im Tierstall des Biomedizinischen Zentrums der Ludwig-Maximilians-

Universität in Planegg/Martinsried untergebracht und versorgt. Die Caspase-1/11^{-/-}-Mäuse wurden von Prof. Veit Hornung (Genzentrum, LMU, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Für die durchgeführten Versuche wurden zwischen 8 und 25 Wochen alte männliche und weibliche Mäuse verwendet. Für die Tierversuche lag eine Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern vor (AZ.: ROB-55.2-2532.Vet_02-18-22).

4.2 Methoden und Versuchsablauf

4.2.1 Verfahren zur Zellisolation und Zellzahlbestimmung

4.2.1.1 Isolation humaner neutrophiler Granulozyten

Die Isolation der humanen neutrophilen Granulozyten erfolgt mit Hilfe des Dichtegradienten *Polymorphprep*. Hierbei wird Vollblut von freiwilligen, gesunden Spendern über das *Polymorphprep*-Medium im Verhältnis 1:1 geschichtet. Daraufhin wird die Probe für 35 Minuten bei 20 Grad und 800 rpm („*engl. für rounds per minute*“) ohne Bremse zentrifugiert. Hierbei entstehen aufgrund der unterschiedlichen Eigenschaften der verschiedenen Zelltypen und der spezifischen Dichte der Flüssigkeit mehrere Schichten, in denen sich die verschiedenen Zelltypen wiederfinden. Von unten nach oben finden sich folgende Zelltypen und Schichten: Erythrozyten, PMNs („*engl. für polymorphonuclear neutrophils*“), Zwischenschicht, PBMCs („*engl. für peripheral blood mononuclear cells*“) und Plasma. Im nächsten Schritt werden die obersten drei Schichten mit einer Vakuumpumpe abgesaugt. Die nun oberste Schicht aus neutrophilen Granulozyten kann dann mit Hilfe einer Pipette isoliert werden. Im Weiteren werden die Zellen mit PBS für 5 Minuten mit 300 rpm bei 20°C gewaschen, um nun für die nachfolgenden Versuche verwendet werden zu können.

4.2.1.2 Isolation humaner Monozyten

Neben den polymorphkernigen Zellen werden auch Monozyten aus dem Vollblut freiwilliger, gesunder Spender isoliert. Hierbei erfolgt die Isolation über den Dichtegradienten *Lymphoprep*. Bei diesem wird zunächst das Vollblut von freiwilligen, gesunden Spendern im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt. Daraufhin wird das Vollblut-PBS-Gemisch über den *Lymphoprep* im Verhältnis 2:1 geschichtet. Im nächsten Schritt wird die Probe für 20 Minuten bei 20 Grad und 800 rpm zentrifugiert. Hierbei entstehen in der Probe mehrere Schichten, die von unten nach oben folgenden Bestandteilen beinhalten: Erythrozyten, PBMCs und Plasma. Im nächsten Schritt wird die oberste Schicht mit einer Vakuumpumpe abgesaugt, um dann die mononukleären Zellen des

peripheren Blutes abnehmen und in ein neues 50 ml FALCON überführen zu können. Im Anschluss werden die Zellen einmal 5 min bei 20°C und 300 rpm gewaschen. Die weiteren Isolationsschritte erfolgen mit Hilfe des *easysep™ human monocyte isolation kits*. Hierfür wird zunächst die Zellzahl auf eine Konzentration von 5×10^6 Zellen pro 100 μl *recommended medium* eingestellt. Dann werden die Zellen in ein FACS-Röhrchen („engl. für *fluorescence activated cell sorting*“) überführt. Es werden zur Probe jeweils 50 μl *isolation cocktail* und *platelet removal cocktail* pro Milliliter Flüssigkeit zugegeben und das Ganze 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss werden magnetische Partikel gevortext und ebenfalls 50 μl pro Milliliter Flüssigkeit hinzugegeben. Das Volumen im Röhrchen wird auf 2,5 ml Gesamtvolumen mit *recommended medium* aufgefüllt und in einen Magneten gesteckt. Hier werden die Zellen dann für 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wird der Überstand aus dem Röhrchen abgegossen und aufgefangen. Das Isolationssystem basiert auf negativer Selektion. Die magnetischen Partikel binden an unterschiedliche Zelltypen, aber nicht an die Monozyten. Kippt man dann den Überstand aus dem im Magneten befindlichen Röhrchen ab, werden diese Zellen im Röhrchen zurückgehalten und nur die Monozyten, die nicht an magnetische Partikel gebunden sind, isoliert. Um die Menge an isolierten Monozyten zu erhöhen, wird das Röhrchen wieder aus dem Magneten entfernt und zu den zurückgebliebenen Zellen erneut 2,5 ml *recommended medium* zugegeben und die letzten Schritte der Isolation wiederholt.

4.2.1.3 Isolation muriner neutrophiler Granulozyten

Die Isolation muriner neutrophiler Granulozyten erfolgt aus dem Knochenmark von Mäusen. Hierfür werden die Versuchstiere nach der geltenden Tierschutzverordnung getötet. Im Anschluss werden jeweils der Hüftknochen und die Ober- und Unterschenkelknochen der Tiere präpariert und von Bindegewebe und Muskeln befreit. Die präparierten Knochen werden dann in PBS aufbewahrt. Mit einer Schere wird auf beiden Seiten der Knochen die Epiphyse entfernt und im Anschluss das Knochenmark mithilfe einer 1ml Spritze mit aufgesteckter Nadel und PBS aus den Röhrenknochen herausgespült. Das Knochenmark wird dann gefiltert, um Knochenreste und größere Fettinseln zu entfernen, und in einem 50 ml Falcon gesammelt. Im nächsten Schritt werden die hierbei gewonnenen Knochenmarkszellen für 5 Minuten bei 300 G abzentrifugiert. Die weiteren Isolationsschritte erfolgen mit Hilfe des *easysep mouse™ neutrophil isolation kit*. Hier wird die Zellzahl zunächst mit *recommended medium* auf eine Konzentration von 1×10^8 Zellen pro ml eingestellt. Dann werden 50 μl *rat serum* pro Milliliter Flüssigkeit zugegeben und das Volumen in ein FACS-Röhrchen gefüllt. Im

Anschluss werden wiederum 50 µl *enrichment cocktail* pro Milliliter Flüssigkeit zugegeben und das Ganze für 15 min auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation bei 300 g für 10 min, wonach der Überstand verworfen wird und die Zellen wieder mit einer Konzentration von 1×10^8 Zellen/ml in *recommended medium* gelöst werden. Darauf werden 50 µl *biotin selection cocktail* pro Milliliter Flüssigkeit zugegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die magnetischen Partikel werden gut gevortext und in der Konzentration 150 µl pro Milliliter Flüssigkeit zugegeben. Es folgt wiederum ein Inkubationsschritt für 10 min auf Eis. Das Volumen wird dann mit *recommended medium* auf 2,5 ml aufgefüllt und das FACS-Föhrchen in einen Magneten gestellt. Nach erneuten 3 min Wartezeit wird der Überstand abgegossen und aufgefangen. Das System basiert ebenfalls wie die Isolation der Monozyten auf negativer Selektion, sodass im abgekippten Überstand die isolierten neutrophilen Granulozyten zu finden sind.

4.2.1.4 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl nach der Isolation des entsprechenden Zelltyps werden die Zellen zunächst im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau vermischt und im Anschluss 10 µl in eine Neubauerzählkammer gegeben. Unter einem Lichtmikroskop werden vier Eckfelder ausgezählt und der Mittelwert daraus ermittelt. Im Anschluss kann nun unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnungen beim Resuspendieren der Zellen, beim Färben mit Trypanblau und beim Eingeben in die Zählkammer ($\times 10^4$) die Zellzahl ermittelt werden. Die Zellen werden dann erneut bei 300 g für 5 min abzentrifugiert. Im Anschluss kann dann die Konzentration der Zellen für die jeweilige Verwendung eingestellt werden.

4.2.2 Konfokalmikroskopie

4.2.2.1 Zellfärbung

In einem ersten Schritt werden die humanen neutrophilen Granulozyten wie oben beschrieben aus dem Vollblut von freiwilligen, gesunden Probanden isoliert. Dann werden die wells des *8 µ-slides removable* von *Ibidi*[®] mit 0,01% Poly-L-Lysin für 30 Minuten beschichtet. Hierfür werden jeweils 100 µl der Flüssigkeit in die Vertiefungen gegeben. Die Zellen werden in HBSS mit einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ pro 300 µl aufgenommen. Das Poly-L-Lysin wird mit Hilfe einer Vakuumpumpe aus den Vertiefungen der *Ibidi*[®]-Präparate abgesaugt. Im Anschluss werden diese dann mit PBS gewaschen und mit jeweils 300 µl der Zellsuspension gefüllt. Bei 37°C können sich die

Zellen dann für 30 Minuten auf dem Boden absetzen, bevor sie für 10 min mit E-Selektin stimuliert werden. Die Zellen werden dann mit 2% PFA für 15 Minuten fixiert. Nach zweimaligem Waschen werden die Zellen für 60 Minuten mit 0,1% Triton-X-100 in einem 2% BSA/PBS-Gemisch permeabilisiert. Die Zellen werden im Anschluss erneut zwei Mal mit PBS gewaschen. Über Nacht werden die Zellen mit dem primären Antikörper, der in *Antibody Diluent* in einer Konzentration von 2 µg/ml gelöst ist, bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird der primäre Antikörper wiederum mit PBS gewaschen und der sekundäre, Fluoreszenz-gelabelte Antikörper zugegeben. Nach einer Stunde wird dieser dann wiederum entfernt. Nun wird DAPI zugegeben und nach 3 min wiederum gewaschen. Im Anschluss wird die Silikonbegrenzung der einzelnen Vertiefungen entfernt und das Mounting Medium *ProLong Diamond Antifade Mountant* aufgetragen und der Objektträger mit einem high precision Deckglas versiegelt. Nach 24 h Trocknungsphase im Dunkeln bei Raumtemperatur ist der Objektträger einsatzbereit.

4.2.2.2 Bestimmung des Verteilungsindex

Um die Lokalisationsänderung des CHMP4B in neutrophilen Granulozyten genauer quantifizieren zu können, wurde in den Zellen ein Verteilungsindex ermittelt. Hierbei wurde durch die Mitte der Zelle eine Verbindungslinie von einer Zellmembran zur anderen durch die Zelle gelegt. Entlang dieser Linie wurden dann die Randbereiche und die Mitte der Zelle definiert. Als Randbereiche wurden jeweils die ersten 10% der Gesamtstrecke beginnend an der jeweiligen Zellmembran definiert. Als Mitte der Zelle wurde der Bereich festgelegt, der sich vom Mittelpunkt der Zelle entlang der Geraden 10% in beide Richtungen erstreckt. Im Anschluss daran wurde dann die Intensität des CHMP4B in den Randbereichen und der Mitte der Zelle ermittelt und miteinander ins Verhältnis gesetzt. Der ermittelte Wert stellt den Verteilungsindex dar. Auf Basis der mathematischen Formel ergibt sich bei Werten <1 eine Verteilung des Proteins zu Gunsten des Zytoplasmas und bei Werten >1 zu Gunsten der Zellmembran.

$$\text{Verteilungsindex} = \frac{\text{Intensität im Randbereich (10\% + 10\%)}}{\text{Intensität in der Zellmitte (20\%)}}$$

4.2.3 Lebendzellmikroskopie: PI-Aufnahme

4.2.3.1 Basisexperiment

Zur Vorbereitung wurden die humanen Neutrophilen wie oben beschrieben aus dem Vollblut isoliert. Währenddessen wurden bereits die Vertiefungen des *8-well ibidi*[®] u-

slides glass bottom mit jeweils 200 µl 0,01% Poly-L-Lysin für 30 Minuten benetzt. Die isolierten Zellen wurden mit dem *Cell Tracker Green CMFDA* gefärbt. Hierfür wurden zunächst 50 µg des Farbstoffs in 10,7 µl DMSO („kurz für *Dimethylsulfoxid*“) gelöst. Der gelöste Farbstoff wurde im Verhältnis 1:1000 zu den Zellen hinzugegeben. Nach 45 Minuten wurden die Zellen dann mehrfach gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^6 pro 300 µl in HBSS gelöst. Das Coating-Medium wurde dann aus den Vertiefungen des Präparates abgesaugt. Diese wurden dann mit jeweils 300 µl der Zellsuspension befüllt. Den Zellen wurde 30 min Zeit zum Absenken auf den Boden der Vertiefungen gegeben und die Überstände im Anschluss abgesaugt. Die Vertiefungen wurden anschließend noch zweimal mit HBSS gewaschen. Der Objektträger wurde dann am Konfokalmikroskop mit einem inversen Objektiv mit einer 40x-Vergrößerung eingespannt und eine geeignete Aufnahmestelle auf dem Objektträger gesucht. Sobald diese gefunden wurde, konnte die Aufnahme der Zellen gestartet werden. Unmittelbar nach der ersten Aufnahme, welche die Zellen zum Zeitpunkt 0 zeigen, wurde PI und E-Selektin zur Stimulation der Zellen zugegeben. Im Abstand von 20 s wurden kontinuierlich für einen Zeitraum von 20 min Bilder erstellt. Nach dieser Zeit wurden dann noch mehrere Aufnahmen von zufällig ausgewählten Ausschnitten des Präparats angefertigt. Hier wurde dann der Anteil an PI-positiven Zellen ermittelt. Für alle Aufnahmen wurden durchweg einheitliche Einstellungen am Mikroskop verwendet. Die Auswertung der Aufnahmen erfolgte mit dem Programm Fiji. Während der Auswertung wurde die Intensität der einzelnen Zellen im Kanal, der das PI abbildet, bestimmt. Bei der Auswertung der Bilder wurden die Intensitäten zum jeweiligen Zeitpunkt t mit dem Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 verglichen und zusätzlich zum Ausgangswert ins Verhältnis gesetzt. Die Zunahme der PI-Konzentration wurde somit anhand folgender Formel berechnet:

$$\frac{F_t - F_0}{F_0}$$

4.2.3.2 EDTA

Der PI-uptake wird wie oben beschrieben durchgeführt. Allerdings unterscheidet sich das Experiment bezüglich des Vorgehens bei der Stimulation der Zellen: Die neutrophilen Granulozyten werden nun für 10 Minuten mit E-Selektin stimuliert, dann wurde für 5 Minuten EDTA zugegeben, um das E-Selektin wiederum zu entfernen. Nach einem Waschschrift zur Entfernung des EDTA wird HBSS für 30 Minuten hinzugegeben. Währenddessen wird das Präparat im inversen Konfokalmikroskop eingestellt. Im

Anschluss an das HBSS wird PI hinzugefügt und die Aufnahme der Zellen gestartet. Für die Kontrollgruppe wurden die Zellen im Gegensatz für 45 Minuten durchgehend mit E-Selektin stimuliert und im Anschluss daran direkt Propidium-Iodide hinzugegeben.

4.2.3.3 Zeitverlauf

Der PI-uptake wird wie oben beschrieben durchgeführt. Allerdings unterscheidet sich hier wiederum das Vorgehen bezüglich der Stimulation zum oben beschriebenen Vorgehen. Die Zellen werden zunächst mit E-Selektin stimuliert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Stimulation, nämlich nach 5 Minuten, 10 Minuten, 15 Minuten und 20 Minuten wird dann PI zugegeben. Die Aufnahme der Zellen mit dem Mikroskop startet zeitgleich mit dem Beginn der Stimulation. Am Ende werden wiederum in verschiedenen Bereichen des Objektträgers Aufnahmen erstellt, um hier die Anzahl an PI-positiven Zellen bestimmen zu können.

4.2.4 LDH-Assay

Zunächst wurden die Zellen aus dem Vollblut von humanen Spendern entsprechend der oben beschriebenen Vorgehensweise isoliert. Im Anschluss wurden die Zellen mit einer Konzentration von 5×10^3 Zellen pro 100 μ l HBSS aufgenommen. 100 μ l Zellsuspension wurden in jeweils 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Im Anschluss erfolgte die Stimulation der Zellen mit E-Selektin bzw. LPS und Nigericin über unterschiedliche lange Zeitspannen. Diese erstreckten sich über 10 min, 30 min und 180 min. Zudem wurden Zellen ohne Stimulus inkubiert, um die spontane LDH-Freisetzung ermitteln zu können und auch Zellen mit Triton-X100, um den maximal möglichen LDH-Gehalt zu messen. Nach der Stimulation wurden die Reaktionsgefäße sofort bei 4°C auf Eis gestellt, um die ablaufenden Reaktionen zu stoppen. Im nächsten Schritt wurden die Proben 8 min mit 300G bei 4°C abzentrifugiert. 50 μ l der hierbei gewonnenen Überstände wurden abgenommen und in eine 96-well Platte transferiert. Zu den Überständen wurden dann jeweils 50 μ l *reaction mixture* hinzugegeben. Nach 30 Minuten wurde dann die ablaufende Reaktion mit der *stop solution* angehalten. Im Anschluss wurde über die Absorption der 96-well Platte bei Wellenlängen von 490 nm und 680 nm mit Hilfe des *Multimode Mikroplatten Leser Spark 10M* die Menge an freigesetztem LDH gemessen. LDH ist ein zytosolisches Enzym, das in vielen unterschiedlichen Zelltypen vorkommt und bei Schädigung der Zellen freigesetzt wird. Die Menge an freigesetztem LDH wird in diesem Assay mit Hilfe einer enzymatischen Reaktion ermittelt. Sobald LDH aus dem Zytosol freigesetzt wird, katalysiert es die Umwandlung von Laktat in Pyruvat unter der

Reduktion von NAD^+ zu NADH . Gleichzeitig kommt es zur Oxidation von Tetrazoliumsalz in Formazan, dessen Menge durch die Absorption bei 490 nm gemessen werden kann. Die Wellenlänge von 680 nm wurde als Referenzwellenlänge gemessen und von den Werten, die bei 490 nm gemessen wurden, subtrahiert. Der Anteil an abgestorbenen Zellen lässt sich über die Menge an freigesetztem LDH mit Hilfe folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{freigesetztes LDH} - \text{spontan freigesetztes LDH}}{\text{maximal freisetzbare LDH} - \text{spontan freigesetztes LDH}}$$

4.2.5 Flusskammer

Zunächst wurden die Kapillaren der Flusskammern mit einem Querschnitt von 1 mm x 0,1 mm (0,1 mm²) am Tag vor dem eigentlichen Versuch mit verschiedenen Oberflächenmolekülen beschichtet. Hierfür wurde ein Mastermix aus 3 µl E-Selektin, 2,25 µl ICAM-1 und 9,75 PBS/BSA pro Flusskammer hergestellt. Mit dieser Lösung wurden die Flusskammern dann für drei Stunden bei Raumtemperatur beschichtet. Im Anschluss wurden die Flusskammern, aber auch die für das Experiment benötigten Spritzen und Schläuche mit 4%-Casein über Nacht geblockt, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Am nächsten Tag wurden Flusskammern dann vor dem eigentlichen Experiment mit PBS gewaschen. Die isolierten humanen Neutrophilen wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml in HBSS aufgenommen. Die eine Hälfte der Zellen wurde für 30 Minuten mit dem Inhibitor MCC950 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen jeweils mit einem Schlauch in 1 ml Spritzen aufgezogen. Die Spritzen wurden dann in das Pumpensystem von Harvard Apparatus® eingespannt und über ein Schlauchsystem mit den Flusskammern verbunden. Die Pumpe lief mit einer Flussrate von 23,36 µl/min, was einer Schubspannung von 1,8 dyn/cm² in den Kapillaren entspricht. Das Pumpensystem wurde jeweils für 10 min eingeschaltet, wobei die ersten vier Minuten nur abgewartet wurde, damit sich das System equilibrieren kann. Im Anschluss wurden die Flusskammern für sechs Minuten am *DMi8* Mikroskop mit einem Objektiv mit 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Die Zellen mit und ohne vorherige Inkubation mit MCC950 wurden abwechselnd untersucht. Im Anschluss erfolgt die Auswertung mit Image-J, hierbei wurde dem Programm die Distanz in Mikrometer und die Anzahl der Bilder pro Sekunde vorgegeben. Pro Versuch wird die Bewegung von zehn Zellen über einen Zeitraum von 60 s getrackt. Aus diesen Daten berechnet das Programm dann die mittlere Rollgeschwindigkeit für jede Zelle. Für jede Flusskammer

wurden die Rollgeschwindigkeiten von zehn Zellen gemittelt. Für jeden Probanden wurden drei technische Replikate durchgeführt. Um die Probanden miteinander vergleichen zu können, wurden wiederum die Mittelwerte der einzelnen Flusskammern gebildet.

4.2.6 Cremastermuskelfärbung mittels Giemsa

Als Vorbereitung für die Giemsa-Färbung wurden zunächst die Cremaster-Muskeln von Mäusen nach intraskrotaler TNF-alpha-Injektion und zervikaler Dyslokation präpariert und anschließend auf Objektträger aufgespannt. Die Präparate wurden dann vor dem Start der Färbung mindestens 4 Stunden bei 4°C im Kühlschrank in einer Fixierlösung aus 4% PFA (*kurz für „Paraformaldehyd“*) aufbewahrt. Die Objektträger wurden dann aus der PFA-Lösung herausgenommen und abgetupft. Die Präparate wurden in einem Gemisch aus 0,1 M Phosphatpuffer und 5% Ethanol dreimal für 5 Minuten gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger dann in Petrischalen gelegt und die aufgespannten Cremaster-Muskeln jeweils mit ein paar Tropfen Giemsa Azur-Eosin-Methylenblaulösung für drei Minuten bedeckt. Im Anschluss wurden die Objektträger von der Rückseite her mit Leitungswasser abgespült und anschließend in 0,03% Essigsäure für 20 Minuten differenziert. Um den Färbeprozess abzuschließen wurden die Präparate dann in einer aufsteigende Alkoholreihe mit 70% Ethanol, 96% Ethanol und 100% Ethanol für jeweils drei Minuten gewaschen und anschließend zweimal für fünf Minuten in ein Xylolbad gelegt. Die Objektträger wurden dann mit EUKITT eingedeckt und mit einem Deckglas versehen. Nach einem mindestens dreitägigem Trocknungsprozess konnten die Präparate dann unter dem Mikroskop untersucht werden. Hierbei wurde die Anzahl der aus dem Gefäßsystem ausgewanderten neutrophilen Granulozyten an einem DM2500 Mikroskop von Leica mit einem 100x-Objektiv Oil ermittelt.

4.2.7 Statistik

Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte nach der Dokumentation mit Excel über das Programm Graph Pad Prism® 10. Für die Erstellung der Diagramme wurde Graph Pad Prism® in Kombination mit Inkscape® verwendet. Für alle Experimente wurden mindestens drei unabhängige Versuche durchgeführt. Die entsprechenden statistischen Tests sind in den Beschreibungstexten der einzelnen Versuche aufgeführt, zudem sind hier die jeweiligen p-Werte angegeben.

5 Ergebnisse

In Vorarbeiten aus der Arbeitsgruppe, an die sich diese Arbeit anschließt, konnte bereits gezeigt werden, dass durch die Interaktion von E-Selektin auf entzündlich verändertem Endothel mit PSGL-1 auf neutrophilen Granulozyten Calprotektin freigesetzt wird. In einem murinen Assay konnten sowohl in vivo im Blut der Mäuse nach einer Injektion von TNF-alpha als auch in vitro in den Überständen von isolierten neutrophilen Granulozyten, die mit E-Selektin stimuliert wurden, erhöhte Calprotektin-Level gemessen werden. Zusätzlich konnte hier gezeigt werden, dass es bei einer Stimulation von neutrophilen Granulozyten, die aus *Gsdmd*^{-/-}- und *Caspase-1*^{-/-}/*Caspase-11*^{-/-}-Mäusen isoliert wurden, signifikant niedrigere Calprotektin-Konzentrationen gemessen werden als in der Kontrollgruppe (Pruenster 2023; Kuchler 2023). Um eine mögliche Beteiligung des NLRP3-Inflammasoms während der Freisetzung von Calprotektin genauer zu untersuchen, wurden in Western-Blot-Analysen jeweils die Mengen der biologisch aktiven und inaktiven Form von Caspase-1 und GSDMD gemessen. Hierbei zeigten sich nach einer kurzen Stimulation mit E-Selektin sowohl erhöhte Mengen der biologisch aktiven Form der Caspase-1 als auch des n-terminalen Spaltprodukts des GSDMD, sodass die Stimulation mit E-Selektin wohl zu einer Aktivierung des Inflammasoms führt. Somit geben diese Daten bereits Hinweise darauf, dass die Freisetzung von Calprotektin in einen NLRP3-abhängigen Prozess eingebunden ist. Um zu überprüfen, ob die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms auf der extrazellulären Aktivität des Calprotektins basiert, wurde eine Gruppe an neutrophilen Granulozyten mit Paquinimod und dem anti-TLR4-Antagonisten TAC242 inkubiert und anschließend mit E-Selektin stimuliert. Beide Substanzen verhinderten die extrazelluläre Bindung von Calprotektin an den TLR4-Rezeptor. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der NLRP3-abhängigen Prozessierung der beiden Effektorproteine zwischen den beiden Gruppen, sodass für zukünftige Experimente auf die zusätzliche TLR4-Blockade verzichtet wurde (Kuchler 2023).

5.1 Stimulation mit E-Selektin und Propidiumiodidaufnahme in neutrophile Granulozyten

Zur weiteren Abklärung, ob Calprotektin aus neutrophilen Granulozyten durch GSDMD-Poren freigesetzt wird, soll insbesondere der Einbau der GSDMD-Poren in die Zellmembran neutrophiler Granulozyten genauer untersucht werden. Hierfür wurde die Durchlässigkeit der Zellmembran getestet, indem der Fluoreszenzfarbstoff

Propidiumiodid während der Stimulation der Zellen mit E-Selektin hinzugegeben wurde. Der Farbstoff kann intakte Zellmembranen nicht überwinden, sobald allerdings Poren in der Membran der Zellen vorhanden sind, ist es für PI möglich in das Innere der Zellen zu diffundieren und dort an Nukleinsäuren zu binden. Dieses Experiment ermöglicht somit durch den Nachweis des Fluoreszenzfarbstoffs PI im Inneren der Zellen einen indirekten Nachweis von Poren in der Zellmembran. In unserem Fall wurden Zellen mit E-Selektin stimuliert und zeitgleich PI zugegeben, um durch den Einstrom des Farbstoffs in die Zelle das Auftreten von GSDMD-Poren nachzuweisen. Um den Einstrom des Farbstoffs in die Zellen zu quantifizieren, wurden mit Hilfe eines Konfokalmikroskops alle 20 Sekunden während der Stimulation Bilder von den Zellen aufgenommen. Diese Aufnahmen wurden dann mit Hilfe von ImageJ ausgewertet. Hierbei wurde die Intensität des PI zu den unterschiedlichen Zeitpunkten während der Stimulation mit dem Anfangswert vor der Zugabe von E-Selektin und PI verglichen, wodurch es möglich war den zeitlichen Verlauf der PI-Intensität in neutrophilen Granulozyten abzubilden.

5.1.1 Humane neutrophile Granulozyten

Während der Stimulation humaner neutrophiler Granulozyten mit E-Selektin kam es bei gleichzeitiger Zugabe von PI zu einer raschen Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffs in die Zellen (siehe Abb.3A). Verglichen mit der PBS-Kontrollgruppe zeigte sich bereits nach einer sehr kurzen Stimulationszeit von 2 Minuten ein signifikanter Unterschied in der Zunahme der PI-Intensität in den Zellen ($t=2\text{min}$: E-Selektin vs. PBS vs. MCC950: $3,71 \pm 0,68$ vs. $-0,05 \pm 0,09$ vs. $0,09 \pm 0,04$; Mittelwert \pm SEM). Die Intensität des Farbstoffs in der Stimulationsgruppe stieg über den Gesamtaufnahmezeitraum von 20 Minuten kontinuierlich an, wobei die Intensität bei der Kontrollgruppe weiterhin niedrig blieb (siehe Abb.3B; $t=20\text{min}$: E-Selektin vs. PBS vs. MCC950: $22,95 \pm 6,28$ vs. $-0,06 \pm 0,16$ vs. $0,10 \pm 0,09$; Mittelwert \pm SEM).

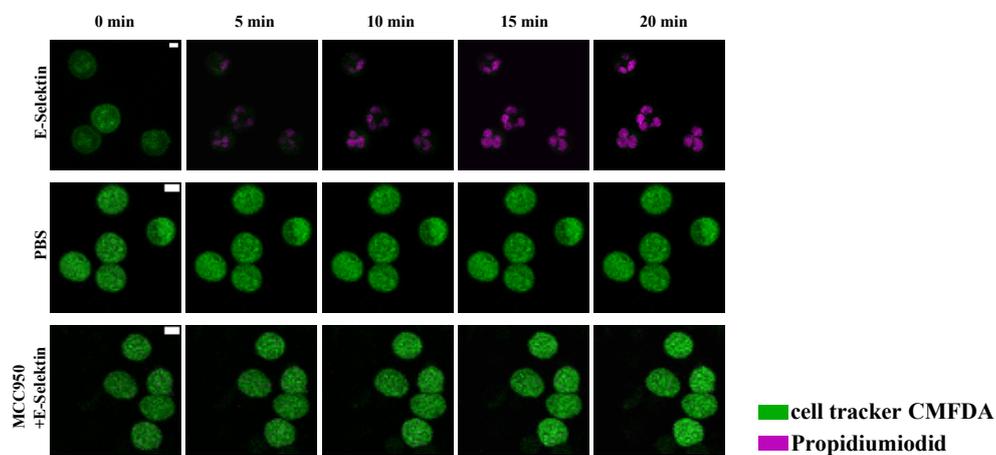
Zusätzlich zur Stimulations- und Kontrollgruppe wurden Zellen vor ihrer Stimulation mit E-Selektin für 30 Minuten bei 37°C mit dem NLRP3-Inhibitor MCC950 behandelt. In dieser Gruppe konnte trotz Stimulation der Zellen mit E-Selektin keine Aufnahme des PI in die Zellen nachgewiesen werden.

Um den gerade beschriebenen Effekt noch untermauern zu können, wurden nach dem Aufnahmezeitraum mehrere Blickfelder des Objektträgers zufällig ausgesucht und aufgenommen. In diesen Bildern wurde dann der Anteil der PI-positiven Zellen bestimmt. Zellen, die mit E-Selektin stimuliert wurden, zeigten eine signifikant höhere Anzahl an PI-positiven Zellen gegenüber der PBS-Kontrollgruppe oder den Zellen, die zuvor mit

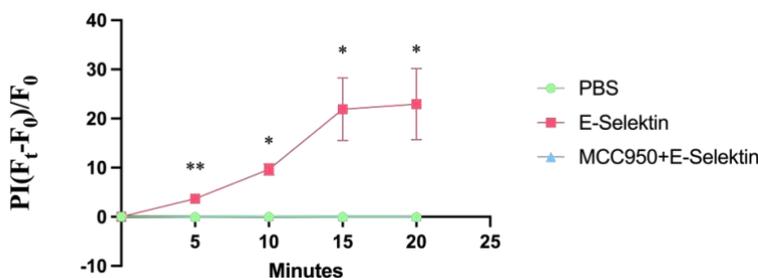
MCC950 behandelt wurden (siehe Abb.3C; E-Selektin vs. PBS vs. MCC950: $0,98 \pm 0,01$ vs. $0,03 \pm 0,02$ vs. $0,02 \pm 0,01$; Mittelwert \pm SEM).

Die Aufnahme von PI in die mit E-Selektin stimulierten Zellen zeigt die Zunahme der Permeabilität der Zellmembran durch den Einbau von GSDMD-Poren. Zudem ist in diesem Assay die Geschwindigkeit dieses Prozesses deutlich erkennbar. Bereits eine Stimulation von 2 Minuten reichte aus, um einen signifikanten Unterschied zwischen Kontroll- und Stimulationsgruppe erkennen zu können. Somit führt eine kurze Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin zu einem schnellen Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran. Die ausbleibende Diffusion von PI in die Zellen bei vorheriger Inkubation mit MCC950 deutet auf eine Abhängigkeit des Vorgangs vom NLRP3-Inflammasom hin.

A



B



C

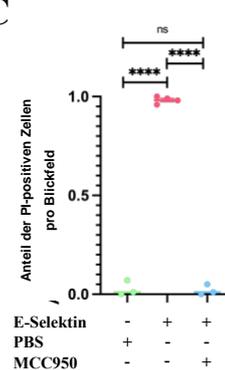


Abbildung 3 – Aufnahme von Propidiumiodid in neutrophile Granulozyten bei Stimulation mit E-Selektin

(A) Repräsentative Übersichtsbilder zeigen neutrophile Granulozyten der verschiedenen Konditionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. (B) Humane neutrophile Granulozyten wurden mit E-Selektin (roter Graph), mit PBS (grüner Graph) oder nach vorheriger Inkubation mit MCC950 mit E-Selektin (blauer Graph) jeweils unter Hinzugabe von PI stimuliert. (C) Nach der 20-minütigen Stimulation der Zellen aus (B) mit E-Selektin (rote Punkte), PBS (grüne Punkte) und E-Selektin nach vorheriger Inkubation mit MCC950 (blaue Punkte) wurde der Anteil an PI-positiven Zellen in zufällig ausgewählten Blickfeldern ausgezählt. Die Abbildungen zeigen den Mittelwert \pm SEM (n=3-

4). Die statistische Analyse wurde bei B zu den Zeitpunkten 5, 10, 15 und 20 Minuten durchgeführt. Für C wurden für die PBS-Kondition 1029 Zellen, für E-Selektin 429 Zellen und für MCC950 315 Zellen ausgewertet. Die statistischen Analysen wurden jeweils mit einem one-way ANOVA durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede $p \leq 0,0001$ wurden mit vier Sternen, $p \leq 0,01$ mit zwei Sternen, $p \leq 0,05$ mit einem Stern und nicht signifikante Unterschiede ($p \geq 0,05$) mit ns markiert.

5.1.2 Murine neutrophile Granulozyten

Um den Zusammenhang zwischen der Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin und dem Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran noch näher zu untersuchen, wurde der PI-Assay auch im murinen System angewendet. Hierbei wurde ein ähnlicher Versuchsaufbau wie im humanen System gewählt. Die stimulierten Zellen stammten sowohl aus Wildtyp-Mäusen als auch aus Caspase1^{-/-}Caspase11^{-/-}-Mäusen. Diese genetisch-modifizierten Mäuse wurden ausgewählt, um den molekularen Mechanismus für den Einbau der Poren in die Zellmembran als Folge der Stimulation mit E-Selektin genauer untersuchen zu können. Es ist bekannt, dass eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms Caspase1 und Caspase11 in ihre aktive Form überführt, welche dann das Protein GSDMD spalten können. Der n-terminale Part von GSDMD bildet dann durch Polymerisation Poren in der Zellmembran.

Während der Stimulation der murinen neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin zeigte sich ein starker Anstieg der Intensität von PI in den Zellen von Wildtyp-Mäusen (siehe Abb.4A). Bereits nach einer Stimulationszeit von 5 Minuten war ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen der Wildtyp- und der Caspase 1^{-/-}Caspase11^{-/-}-Mäuse erkennbar. Nach einer Gesamtstimulationsdauer von 20 Minuten war ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar (siehe Abb.4B; t=5min: Wildtyp vs. Caspase 1/11^{-/-}: $7,92 \pm 1,02$ vs. $0,11 \pm 0,08$; $p \leq 0,01$; t=20 min: Wildtyp vs. Caspase 1/11^{-/-}: $34,35 \pm 4,37$ vs. $0,4 \pm 0,11$; Mittelwert \pm SEM).

In dieser Versuchsanordnung wurden wie auch im humanen System am Ende des Stimulationsprozesses von zufällig ausgewählten Bereichen des Objektträgers Übersichtsaufnahmen angefertigt. In diesen Bildern wurde dann der Anteil der PI-positiven Zellen ermittelt. Hierbei zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied bezüglich des Anteils der PI-positiven Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen (siehe Abb.4C; Wildtyp vs. Caspase 1/11^{-/-}: $0,93 \pm 0,05$ vs. $0,09 \pm 0,04$; Mittelwert \pm SEM).

Die Ergebnisse des Assays im murinen System schließen sich an die des humanen Systems an. Es wird ebenfalls deutlich, dass bereits eine sehr kurze Stimulationsdauer zu einem Einbau der Poren in die Zellmembran führt. Zudem erhärtet die ausbleibende Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffs in die Zellen der Caspase1^{-/-}Caspase11^{-/-}-Mäuse,

dass der gesamte Prozess auf molekularer Ebene von der NLRP3-Inflammasom-Caspase1/Caspase11-Kaskade abhängig ist.

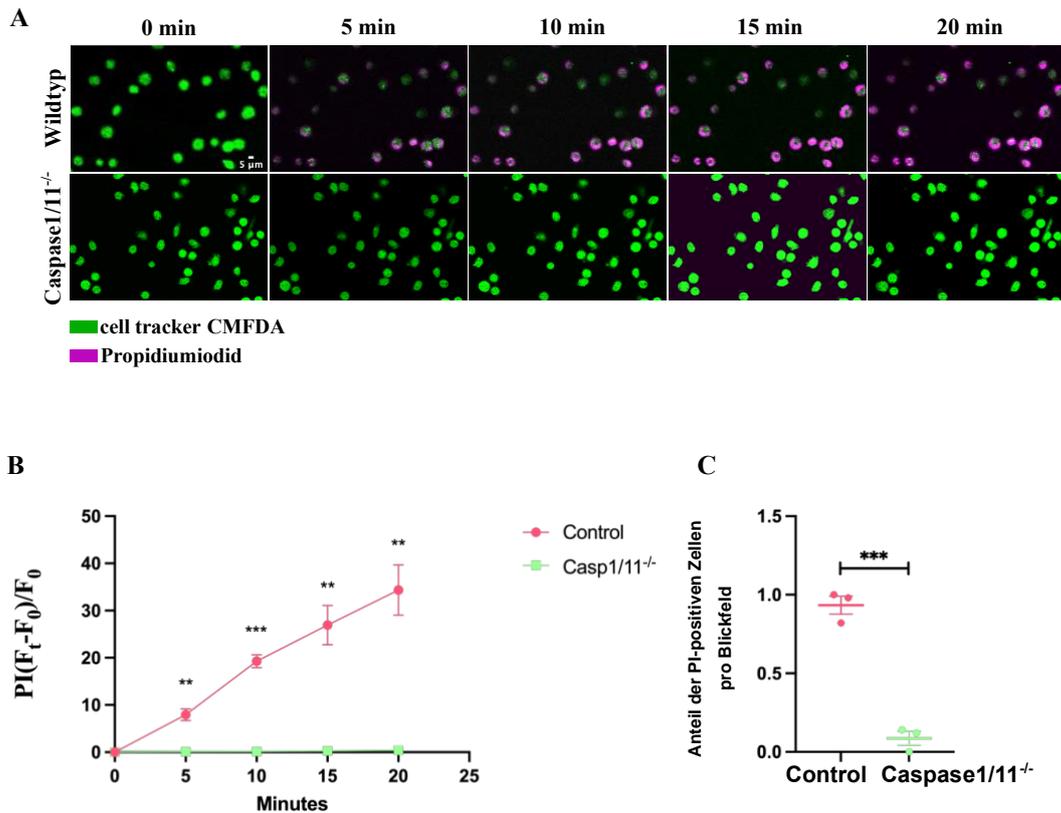


Abbildung 4 – Aufnahme von Propidiumiodid in murine neutrophile Granulozyten bei Stimulation mit E-Selektin

(A) Repräsentative Übersichtsbilder zeigen Zellen der beiden Konditionen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. (B) Murine neutrophile Granulozyten aus Wildtyp- (roter Graph) und Caspase-1^{-/-} Caspase-11^{-/-}-Mäusen (grüner Graph) wurden unter Hinzugabe von PI mit E-Selektin stimuliert. (C) Nach 20-minütiger Stimulation der Zellen aus (B) von Wildtyp- (rote Punkte) und Caspase-1^{-/-} Caspase-11^{-/-}-Mäusen (grüne Punkte) wurde der Anteil an PI-positiven Zellen in zufällig ausgewählten Blickfeldern ausgezählt. Die Abbildung zeigen jeweils den Mittelwert ± SEM der beiden Konditionen (n=3). Die statistischen Analysen wurden jeweils mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test durchgeführt. In der Abbildung C wurden für Wildtyp- 190 und für Knockout-Mäuse 351 Zellen ausgewertet. Statistisch signifikante Unterschiede (p≤0,001) wurden mit drei Sternen und p≤0,01 mit zwei Sternen markiert.

5.2 Stimulation neutrophiler Granulozyten und Pyroptose

Basierend auf der Erkenntnis, dass sich in Folge der Stimulation mit E-Selektin die Permeabilität der Zellmembran in Neutrophilen erhöht und eine Diffusion des PIs in die Zellen möglich ist, soll nun zum einen getestet werden, ob eine Stimulation mit E-Selektin und der damit verbundene Einbau der GSDMD-Poren in die Zellmembran ähnlich wie bei Monozyten zur Pyroptose der Zellen führt, zum anderen soll aber auch ausgeschlossen werden, dass die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffs auf einem Absterben der Zellen in

Folge der Stimulation mit E-Selektin und einer damit verbundenen Membranruptur basiert.

Hierfür wird ein LDH-Assay verwendet, der anhand des freigesetzten LDH die Menge an absterbenden Zellen widerspiegelt. Wichtig ist hierbei, dass LDH nur in Folge eines Zelltods und der damit verbundenen Ruptur der Zellmembran freigesetzt wird und nicht über die GSDMD-Poren selbst die Zellen verlassen kann, wodurch sich dieser Assay hervorragend dafür eignet, eine Aussage über das Absterben der Zellen treffen zu können (Gaidt 2016).

In unserem experimentellen Ansatz wurden neutrophile Granulozyten über unterschiedliche Zeiträume mit E-Selektin stimuliert. Nach 10, 30 oder 180 Minuten wurde dann jeweils das freigesetzte LDH gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über eine mathematische Formel, bei der vom zum jeweiligen Zeitpunkt freigesetzten LDH die Menge an LDH abgezogen wurde, die auch zufällig ohne bestimmte äußere Einwirkung aus Zellen freigesetzt wird. Dieser Betrag wurde dann ins Verhältnis zu der Menge an LDH gesetzt, die freigesetzt wird, wenn alle Zellen abgetötet werden. Somit erhielt man eine prozentuale Aussage darüber wie viele Zellen absterben (siehe Formel zur Berechnung unter 4.2.4).

In diesem Experiment zeigte sich, dass weder eine zehnminütige noch eine dreistündige Stimulation der humanen neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin zu einer substantiellen Freisetzung von LDH aus den Zellen führt. (siehe Abb. 5A-C; t=10 min: Triton-X100 vs. PBS vs. E-Selektin: 1,0 vs. 0,0 ±0,0 vs. 0,01 ± 0,01; t=180 min: Triton-X100 vs. PBS vs. E-Selektin: 1,0 vs. -0,07 ±0,02 vs. -0,06 ± 0,02; Mittelwert ± SEM).

Die Tatsache, dass sich die Menge an LDH, das während der Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin freigesetzt wird, nicht signifikant von der unstimulierten Kontrollgruppe unterscheidet, lässt den Schluss zu, dass es zu keinem relevanten Absterben der Zellen kommt. Diese Erkenntnis zeigt zum einen, dass die Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffs in die Zellen nicht durch ein Absterben der Neutrophilen zu erklären ist, was wiederum die Vermutung stärkt, dass es in Folge der Stimulation mit E-Selektin zu einem Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran kommt. Zum anderen legt es die Annahme nah, dass eine Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin zwar zum Einbau der GSDMD-Poren in die Zellmembran führt, aber dies in den Zellen keine Pyroptose auslöst.

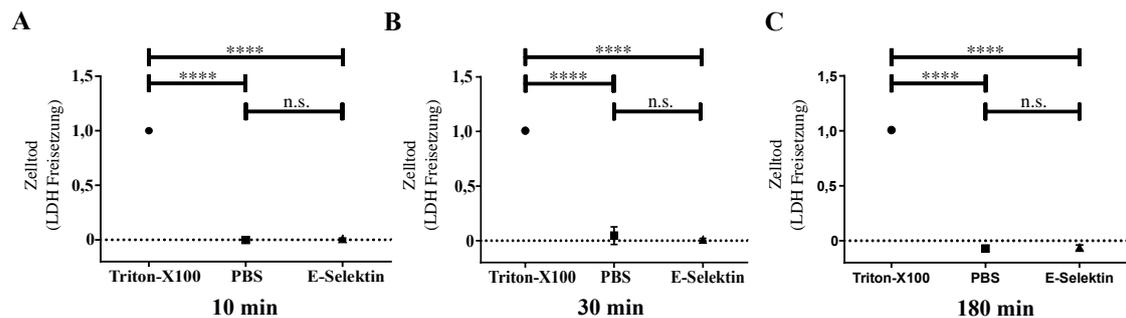


Abbildung 5 – Pyroptose neutrophiler Granulozyten bei Stimulation mit E-Selektin
 Humane neutrophile Granulozyten wurden für 10 min (A), 30 min (B) und 180 min (C) mit E-Selektin (Dreiecke) stimuliert. Anschließend wurde die Menge an LDH im Überstand der Zellen gemessen, um damit den Anteil an abgestorbenen Zellen bestimmen zu können. Als Kontrolle dienten Neutrophile, die mit PBS (Quadrate) und Triton-X100 (Punkte) stimuliert wurden. Für jede Kondition ist der Mittelwert \pm SEM gezeigt ($n=3$). Die Werte für TritonX-100 wurden jeweils auf 1 festgesetzt. Die statistische Analyse wurde mit einem one-way Anova durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,0001$) wurden mit drei Sternen und nicht signifikante Unterschiede ($p \geq 0,05$) mit n.s. markiert.

Als Vergleichsgruppe haben wir humane Monozyten verwendet, die mit LPS über drei Stunden vorbehandelt und dann mit Nigericin unterschiedlich lange stimuliert wurden. Bei diesen Zellen ist bekannt, dass diese Stimulation Pyroptose auslöst, was zum Absterben der Zellen führt. In unserem Versuchsaufbau zeigte sich nach einer dreißigminütigen Stimulation mit Nigericin nach dreistündiger Vorbehandlung mit LPS keine signifikante Freisetzung von LDH (siehe Abb. 6A; $t=30$ min; Triton-X100 vs. PBS vs. LPS/Nigericin: $1,0$ vs. $0,0 \pm 0,01$ vs. $0,06 \pm 0,02$; Mittelwert \pm SEM). Allerdings konnte nach einer Stimulationszeit mit Nigericin von über drei Stunden nach dreistündiger Vorstimulation mit LPS ein signifikanter Anstieg des freigesetzten LDHs gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden (siehe Abb. 6B; $t=180$ min; Triton-X100 vs. PBS vs. LPS/Nigericin: $1,0$ vs. $0,0 \pm 0,01$ vs. $0,76 \pm 0,09$; Mittelwert \pm SEM). Der Anstieg der gemessenen LDH-Konzentration lässt den Schluss zu, dass eine Stimulation der Monozyten mit LPS und Nigericin über 3 Stunden zur Pyroptose der Zellen führt. Dieses Ergebnis bestätigt zum einen bereits publizierte Ergebnisse und bestätigt zudem auch die Funktionstüchtigkeit unseres Assays (Broz 2015; He 2015; Gaidt 2016; Kovacs 2017; Yu 2021).

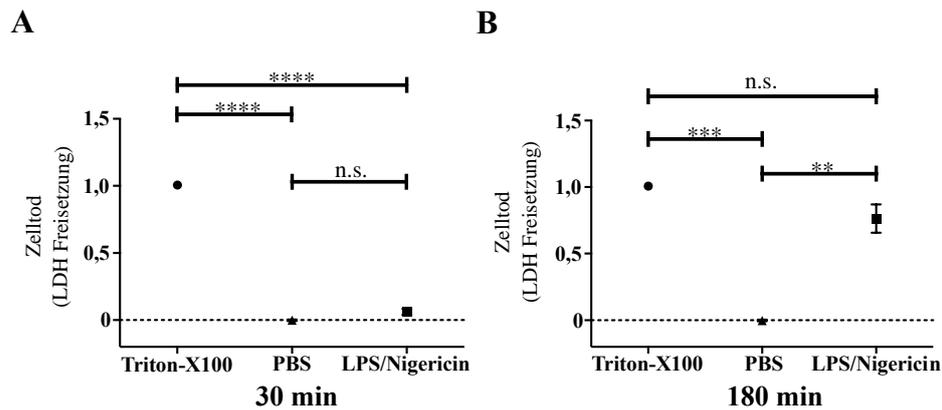


Abbildung 6 – Pyroptose von Monozyten bei Stimulation mit LPS und Nigericin
 Monozyten wurden über 30 Minuten (A) und 180 Minuten (B) mit Nigericin (Quadrate) nach einer Vorstimulation mit LPS über drei Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Menge an LDH im Überstand der Zellen gemessen, um damit den Anteil der abgestorbenen Zellen bestimmen zu können. Als Kontrolle dienten Monozyten, die mit PBS (Dreiecke) und Triton-X100 (Punkte) stimuliert wurden. Für jede Kondition ist der Mittelwert \pm SEM gezeigt ($n=4$). Die Werte für TritonX-100 wurden auf jeweils auf 1 festgesetzt. Die statistische Analyse wurde mit einem one-way Anova durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,0001$) wurden mit vier Sternen, $p \leq 0,001$ mit drei Sternen, $p \leq 0,01$ mit zwei Sternen und nicht signifikante Unterschiede ($p \geq 0,05$) mit n.s. markiert.

Im Weiteren zeigte sich in diesem Experiment ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden untersuchten Zelltypen (Monozyten und neutrophile Granulozyten) während des Stimulationsprozesses. Die Stimulation mit LPS und Nigericin führte zum Absterben der Monozyten, wohingegen die Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin auch über einen langen Zeitraum nicht zum Zelltod führte, obwohl beide Stimuli zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führten. Um diese Beobachtung noch genauer zu untersuchen, wurden auch neutrophile Granulozyten über einen Zeitraum von drei Stunden mit Nigericin nach einer dreistündigen Vorbehandlung mit LPS stimuliert. Hierbei zeigte sich bei dieser langfristigen Stimulation ebenfalls ein Anstieg des LDH-Levels im Vergleich zur Stimulation mit E-Selektin und Kontrollgruppe (siehe Abb. 7; $t=180$ min: Triton-X100 vs. PBS vs. E-Selektin vs. LPS/Nigericin: $1,0$ vs. $0,01 \pm 0,0$ vs. $-0,06 \pm 0,02$ vs. $0,21 \pm 0,05$; Mittelwert \pm SEM). Der Anstieg des gemessenen LDHs zeigt, dass bei einer Stimulation mit LPS und Nigericin bei ca. 20% der neutrophilen Granulozyten der pyroptotische Zelltod eintritt. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass durch die verschiedenen Stimuli jeweils unterschiedliche molekulare Signalwege aktiviert werden.

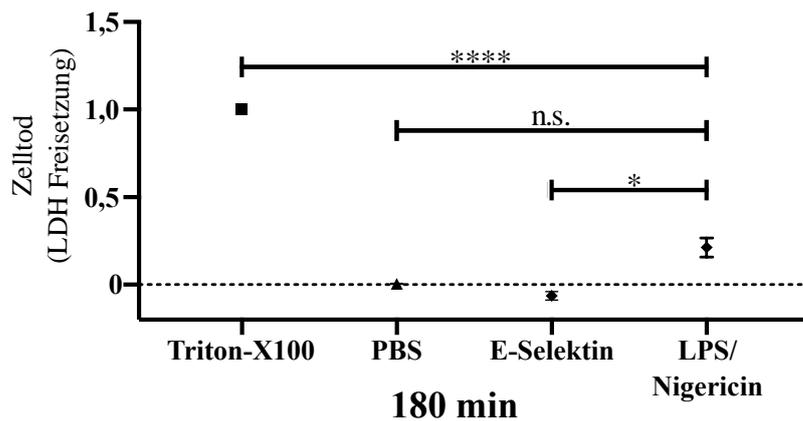


Abbildung 7 – Pyroptose neutrophiler Granulozyten bei Stimulation mit E-Selektin oder LPS und Nigericin

Humane neutrophile Granulozyten wurden mit E-Selektin (Punkt) und LPS/Nigericin (Raute) für 180 Minuten stimuliert. Als Kontrolle dienten Neutrophile, die mit PBS (Dreieck) und Triton-X100 (Quadrat) stimuliert wurden. Für jede Kondition ist der Mittelwert \pm SEM gezeigt ($n=3-4$). Die Werte für TritonX-100 wurden auf 1 festgesetzt. Die statistische Analyse wurde mit einem one-way Anova durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,0001$) wurden mit vier Sternen, $p \leq 0,05$ mit einem Stern und nicht signifikante Unterschiede ($p \geq 0,05$) mit n.s. markiert.

5.3 Stimulation mit E-Selektin und Translokation von nt-GSDMD an die Zellmembran humaner neutrophiler Granulozyten

Während der Stimulation neutrophiler Granulozyten mit E-Selektin kommt es über die Rekrutierung des NLRP3-Inflammasoms zu einer Aktivierung der Caspase-1, die in einem nächsten Schritt GSDMD in einen n- und c-terminalen Teil spaltet. Dem n-terminalen Abschnitt ist es dann möglich sich über einen noch unbekanntem Prozess vom Zytosol in Richtung Zellmembran zu verlagern und sich dort zu Poren zusammen zu lagern. In diesem Experiment sollte nun das n-terminale GSDMD und sein Verteilungsmuster in der Zelle genauer untersucht werden. Hierfür wurden humane neutrophile Granulozyten mit E-Selektin für 10 Minuten stimuliert, im Anschluss fixiert und das n-terminale GSDMD gefärbt. Zur besseren Orientierung wurde zudem DAPI als Kernfärbung verwendet. Zur Aufnahme der Objektträger wurde ein Konfokalmikroskop verwendet, mit dessen Hilfe Schnittbilder über die gesamte Ausdehnung der Zelle aufgenommen wurden.

Hier zeigte sich bei den mit E-Selektin stimulierten Zellen ein einheitliches Verteilungsmuster des n-terminalen GSDMD in den Zellen, welches sich grundlegend von der Kontrollgruppe unterscheidet. In der stimulierten Kohorte ließ sich das n-terminale GSDMD in punktförmigen Clustern insbesondere im Bereich der Zell- und Kernmembran erkennen. Zudem war über die gesamte Zelle verteilt insgesamt deutlich mehr Protein nachweisbar als in der Kontrollgruppe. Bei den unstimulierten Zellen waren

die gerade beschriebenen Cluster im Bereich der Zellmembran nicht erkennbar, zudem war die Gesamtmenge an n-terminalem GSDMD signifikant niedriger. Wurden die Zellen zudem vor der Stimulation mit E-Selektin zusätzlich mit dem NLRP3-Inhibitor MCC950 behandelt, zeigte sich ebenfalls keine Clusterbildung im Bereich der Membranen und die Gesamtmenge ähnelte der Kontrollgruppe (siehe Abb. 8A).

Um die am Mikroskop aufgenommenen Bilder weiter quantifizieren zu können, wurde die Gesamtintensität des n-terminalen GSDMD über die gesamte Zelle erfasst und in den unterschiedlichen Konditionen miteinander verglichen. Hierbei zeigte sich bei den mit E-Selektin stimulierten neutrophilen Granulozyten eine signifikant höhere Gesamtintensität des n-terminalen Proteins (siehe Abb. 8B).

Die Färbung des n-terminalen GSDMD zeigt zum einen aufgrund des Anstiegs der gemessenen Gesamtintensität für nt-GSDMD, dass es durch die Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin zu einer Zunahme des Proteins in der Zelle kommt, was unterstreicht, dass es durch die Stimulation zu einer Spaltung von GSDMD kommt. Zum anderen fällt im Vergleich mit der unstimulierten Vergleichsgruppe auf, dass sich das Verteilungsmuster des n-terminalen GSDMD innerhalb der Zelle deutlich unterscheidet. Die punktförmige Anordnung von nt-GSDMD im Bereich der Zellmembran lässt die Vermutung zu, dass es sich hierbei um die neu entstandenen Poren handelt. Die Tatsache, dass auch in diesem Experiment bei einer Blockade des NLRP3-Inflammasoms sowohl die Menge an nt-GSDMD in der Zelle als auch das Verteilungsmuster der Kontrollgruppe ähnelt, bestärkt es die Annahme, dass der zugrundeliegende molekulare Mechanismus auf einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms basiert.

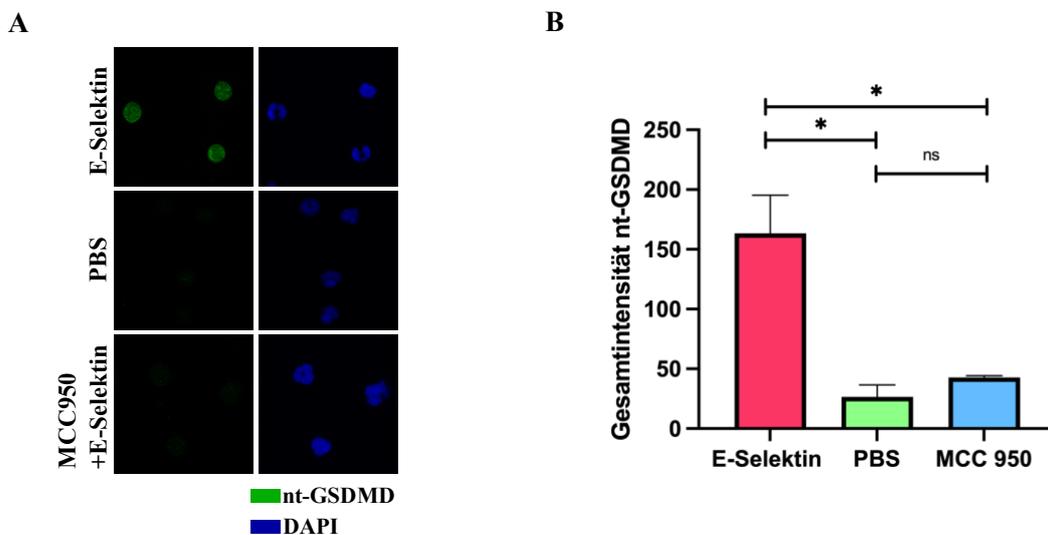


Abbildung 8 – Verteilung und Gesamtintensität des n-terminalen GSDMD bei Stimulation mit E-Selektin in humanen neutrophilen Granulozyten

(A) zeigt repräsentative Bilder der Verteilung des n-terminalen GSDMD in den neutrophilen Granulozyten und die Kernfärbung DAPI. Es handelt sich jeweils um die Gesamtintensität der Fluoreszenz-Kanäle bei Projektion der Ebenen zu einem Gesamtbild. (B) zeigt die Gesamtintensität an nt-GSDMD in den Zellen, die mit E-Selektin (roter Balken), PBS (grüner Balken) oder E-Selektin nach vorheriger Inkubation mit MCC950 (blauer Balken) stimuliert wurden. Für jede Kondition ist der Mittelwert \pm SEM gezeigt (n=3). Für die E-Selektin-Kondition wurden 75 Zellen, für PBS 49 Zellen und für MCC950 62 Zellen ausgewertet. Die statistische Analyse wurde mit einem one-way Anova durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) wurden mit einem Stern und nicht signifikante Unterschiede ($p \geq 0,05$) mit ns markiert.

5.4 Transientes Auftreten von GSDMD-Poren in neutrophilen Granulozyten

Wie oben beschrieben führt die Stimulation neutrophiler Granulozyten mit E-Selektin auch über einen Zeitraum von drei Stunden nicht zu einer signifikanten LDH-Freisetzung, was daraufhin deutet, dass es nicht zu einem Absterben der Zellen kommt. Basierend auf dieser Beobachtung soll das Auftreten der GSDMD-Poren in der Membran der Neutrophilen genauer untersucht werden. Es soll insbesondere getestet werden, ob die Poren in der Membran neutrophiler Granulozyten dauerhaft oder nur transient vorhanden sind. Hierfür wurden humane neutrophile Granulozyten in einem ersten Ansatz über 10 Minuten mit E-Selektin stimuliert und im Anschluss für fünf Minuten mit EDTA gewaschen, um den Stimulus zu entfernen. Danach wurden die Zellen für 30 Minuten in HBSS bei 37°C inkubiert, um ihnen eine gewisse Erholungszeit zu gewähren. Nach diesem Inkubationsschritt wurde erneut PI zugegeben, um die Permeabilität der Membran zu überprüfen. Nach der Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffs war keine signifikante Aufnahme in die Zellen erkennbar, was darauf hindeutet, dass die GSDMD-Poren auch wieder aus der Zellmembran entfernt werden können. Um diese Beobachtung weiter zu untersuchen, wurden die Zellen in einem zweiten Ansatz über 45 Minuten mit E-Selektin stimuliert, ohne den Stimulus zu entfernen. Im Anschluss daran wurde erneut PI zugegeben. Hier zeigte sich allerdings auch keine signifikante Aufnahme des Farbstoffs in die Zellen, was ebenfalls dafürspricht, dass keine Poren mehr in der Membran vorhanden waren (siehe Abb. 9). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die GSDMD-Poren bei einer Stimulation mit E-Selektin zwar in die Zellmembran der neutrophilen Granulozyten eingebaut werden, diese aber nicht dauerhaft bestehen, sondern nur transient vorhanden sind.

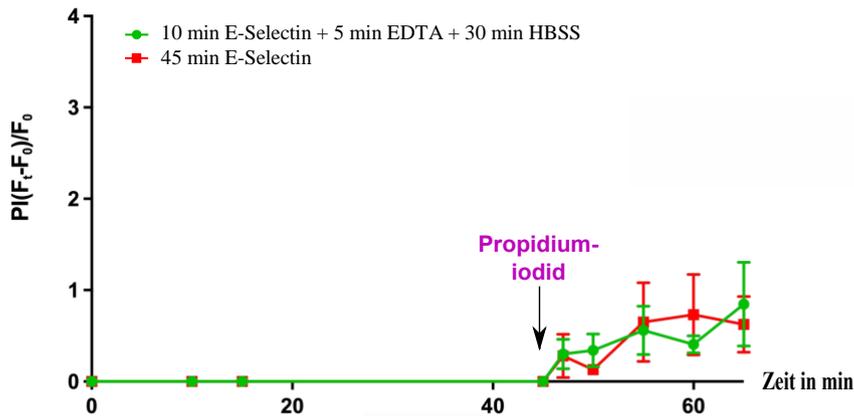


Abbildung 9 – Propidiumiodid Aufnahme nach Stimulation mit E-Selektin mit anschließender Entfernung des Stimulus oder Dauerstimulation mit E-Selektin

Neutrophile Granulozyten wurden für 10 Minuten mit E-Selektin stimuliert, der Stimulus mit Hilfe von EDTA entfernt und die Zellen für 30 Minuten in HBSS gegeben (grüner Graph). Als Kontrollgruppe wurden Neutrophile verwendet, die für 45 Minuten dauerhaft mit E-Selektin stimuliert wurden (roter Graph). Bei beiden Gruppen wurde dann PI zugegeben. Die Abbildung zeigt zu den jeweiligen Zeitpunkten den Mittelwert \pm SEM (n=3). Die statistische Analyse wurde zu den Zeitpunkten 45, 47, 50, 55 und 60 Minuten jeweils mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test durchgeführt. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p \geq 0,05$).

Um diese neuen Befunde noch weiter zu untersuchen, wurde der PI-Assay erneut etwas modifiziert. Die neutrophilen Granulozyten wurden hierbei wie zuvor mit E-Selektin stimuliert, allerdings wurde nun zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Stimulation der Fluoreszenzfarbstoff PI hinzugegeben. Nach weiteren zehn Minuten wurden dann in mehreren zufällig ausgewählten Blickfeldern Bilder aufgenommen. In diesen wurde der Anteil an PI-positiven Zellen bestimmt.

Bei der PI-Zugabe nach fünfminütiger Stimulation kam es bei nahezu allen Zellen zu einer Aufnahme des Farbstoffs. In der zweiten Gruppe nach 10 Minuten war bereits zu erkennen, dass der Anteil an PI-positiven Zellen abnahm. Nach fünfzehn bzw. zwanzig Minuten Stimulation mit E-Selektin waren kaum noch PI-positive Zellen zu finden (siehe Abb.10A; 5min vs. 10 min vs 15 min vs 20 min: $0,93 \pm 0,04$ vs. $0,72 \pm 0,11$ vs. $0,02 \pm 0,01$ vs. $0,02 \pm 0,01$; Mittelwert \pm SEM).

Diese Versuchsanordnung zeigt eindrücklich, dass die Stimulation mit E-Selektin zunächst zu einer deutlichen Zunahme der Membranpermeabilität führt. Allerdings ist ebenfalls zu beobachten, dass trotz der anhaltenden Stimulation die Poren in der Zellmembran nur transient und nicht dauerhaft vorhanden sind (siehe Abb. 10B).

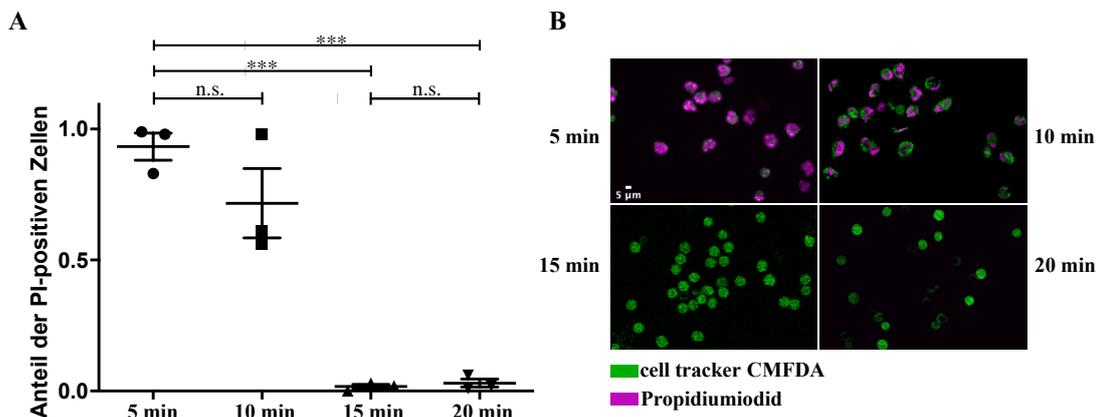


Abbildung 10 – Aufnahme von Propidiumiodid in neutrophile Granulozyten bei Dauerstimulation mit E-Selektin nach unterschiedlichen Zeitintervallen

(A) Neutrophile Granulozyten wurden dauerhaft mit E-Selektin stimuliert. Nach 5, 10, 15 und 20 Minuten wurde jeweils PI zu den unterschiedlichen Konditionen hinzugegeben. Nach 10 Minuten PI-Inkubation wurde dann die Anzahl an PI-positiven Zellen in zufällig ausgewählten Blickfeldern ermittelt. (B) Repräsentative Übersichtsbilder zeigen neutrophilen Granulozyten nach PI-Zugabe zu den unterschiedlichen Zeitpunkten der Stimulation. Die Abbildung zeigt zu den jeweiligen Zeitpunkten den Mittelwert \pm SEM (n=3). Für den Zeitpunkt nach 5 Minuten wurden 274 Zellen, nach 10 Minuten 313, nach 15 Minuten 358 und nach 20 Minuten 466 Zellen ausgewertet. Die statistische Analyse wurde mit einem one-way ANOVA durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$) wurden mit drei Sternen und nicht signifikante Unterschiede ($p \geq 0,05$) mit n.s. markiert.

5.5 ESCRT-III als möglicher Reparaturmechanismus der Zellmembran humaner neutrophiler Granulozyten

Eine mögliche Erklärung für das transiente Auftreten der GSDMD-Poren in der Zellmembran neutrophiler Granulozyten ist ein intrazellulärer Reparaturprozess der Zellmembran. Ein solcher Prozess wurde von Rühl et al. 2018 beschrieben. Hier wird der ESCRT-III-Komplex als Teil eines Reparaturprogramms von GSDMD-Poren in Monozyten angegeben. Die Aktivierung dieses Komplexes erfolgt über den Einstrom von Calciumionen gemäß des Konzentrationsgefälles von extra- nach intrazellulär über die GSDMD-Poren. Um eine mögliche Beteiligung des ESCRT-III-Komplexes an der Reparatur der GSDMD-Poren zu untersuchen, wurden humane neutrophile Granulozyten mit E-Selektin erneut für 10 Minuten stimuliert und fixiert. Mit Hilfe eines Antikörpers, der CHMP4B, einen Bestandteil des ESCRT-III-Komplexes, erkennt, wurde dann das Verteilungsmuster und das Auftreten des Proteinkomplexes in der Zelle untersucht. Insbesondere die Verteilung des Proteins in der Zelle war hierbei relevant. Zur quantitativen Auswertung wurde für jede Zelle ein Verteilungsindex berechnet. Hierbei wurde jeweils in der Mitte der Zelle für jeden Punkt entlang einer Geraden durch die Zelle die Intensität für CHMP4B bestimmt. Im Anschluss daran wurde die Intensität in den Randbereichen (jeweils 10% Distanz von der Membran) in das Verhältnis gesetzt zu einem Bereich um den Mittelpunkt (20% um den Mittelpunkt) der Zelle. Ein

Verteilungsindex von eins gibt nach dieser Berechnung an, dass das Protein gleichmäßig über die Zelle verteilt war, wohingegen ein Wert über eins auf eine Anreicherung im Bereich der Membran und ein Wert unter eins auf eine Anreicherung im Bereich des Zytoplasmas hindeutet. Die Auswertung der Zellen zeigte deutlich, dass es durch die Stimulation der Zellen zu einer Verlagerung von CHMP4B und somit des ESCRT-III Komplexes in den Bereich der Zellmembran kam. Der Verteilungsindex war bei den mit E-Selektin stimulierten neutrophilen Granulozyten nicht nur signifikant höher als die unstimulierte Kontrollgruppe, sondern lag auch deutlich über eins (siehe Abb. 11B; E-Selektin vs. PBS: $2,26 \pm 0,097$ vs. $0,40 \pm 0,05$; Mittelwert \pm SEM). Zusätzlich ließen sich in der stimulierten Gruppe im Bereich der Zellmembran deutliche CHMP4B-Anreicherungen in Form von Clustern erkennen, die in der unstimulierten Kohorte nicht auftraten (siehe Abb.11A). Diese Färbung ist ein Hinweis darauf, dass es durch die Stimulation der Neutrophilen mit E-Selektin neben der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und dem Einbau der GSDMD-Poren auch zu einer Rekrutierung des ESCRT-III in den Bereich der Zellmembran kommt und hier somit Membranreparaturprozesse ablaufen können. Dies wäre eine mögliche Erklärung für das transiente Bestehen der Poren in der Zellmembran und das Überleben der Zellen trotz andauernder Stimulation mit E-Selektin.

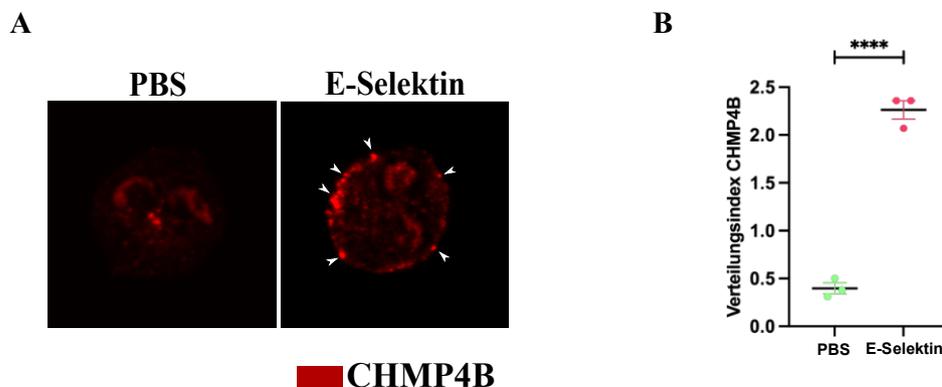


Abbildung 11 – Verteilungsindex von CHMP4B in mit E-Selektin stimulierten und unstimulierten humanen neutrophilen Granulozyten

Neutrophile Granulozyten wurden für 10 Minuten mit E-Selektin stimuliert und im Anschluss für CHMP4B gefärbt. (A) zeigt repräsentative Bilder der stimulierten und unstimulierten neutrophilen Granulozyten. Weiße Pfeile zeigen CHMP4B-Cluster im Bereich der Zellmembran der mit E-Selektin stimulierten neutrophilen Granulozyten. (B) Zur Quantifizierung der CHMP4B-Verteilung in den Zellen wurde ein Verteilungsindex in den Zellen ermittelt, wobei jeweils 10% der Randbereiche mit 20% der Zellmitte ins Verhältnis zueinander gesetzt wurden (siehe 4.2.2.2). Die Abbildung zeigt zu den beiden Konditionen den Mittelwert \pm SEM (n=3). Für die E-Selektin-Gruppe wurden 28 Zellen und für die PBS-Gruppe 29 Zellen ausgewertet. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,0001$) wurden mit vier Sternen markiert.

5.6 Blockade des NLRP3-Inflammasoms und Änderung der Rollgeschwindigkeit von neutrophilen Granulozyten

Die gewonnenen Erkenntnisse über den molekularen Mechanismus, welcher der Freisetzung von Calprotektin zugrunde liegt, soll nun in einem funktionellen Assay in vitro getestet werden. Hierbei wird vor allem die Rolle des freigesetzten Calprotektins im Rahmen der Leukozytenrekrutierungskaskade genutzt. Das freigesetzte Protein bindet autokrin an den extrazellulären TLR4-Rezeptor und führt damit über eine Aktivierung und Konformationsänderung der β 2-Integrine zu einem langsameren Rollen der neutrophilen Granulozyten in einer entsprechenden Flusskammer, was wiederum die Voraussetzung für eine erfolgreiche Auswanderung der Zellen aus dem Gefäßsystem ist (Pruenster 2015). Hierfür wurden Flusskammern über Nacht mit E-Selektin beschichtet. Isolierte humane neutrophile Granulozyten wurden dann entweder für 30 Minuten mit dem NLRP3-Inhibitor MCC950 inkubiert oder blieben unbehandelt. Im Anschluss wurden die Zellen über einen kontinuierlichen Flüssigkeitsstrom durch die Flusskammern geleitet und dies mit dem Mikroskop aufgenommen. Anhand der Aufnahmen konnten dann die Rollgeschwindigkeiten der Zellen ermittelt werden. Zellen, die zuvor mit MCC950 behandelt wurden, zeigten eine signifikant höhere Rollgeschwindigkeit als die unbehandelte Kontrollgruppe (siehe Abb. 12; DMSO vs. MCC950: $1,03 \pm 0,07$ vs. $2,0 \pm 0,31$; Mittelwert \pm SEM). Diese Beobachtung zeigt, dass die Blockade des NLRP3-Inflammasoms das langsame Rollen der Zellen verhindert. Als Ursache hierfür kann die fehlende autokrine Aktivierung des TLR4-Rezeptors und die dadurch ausbleibende Konformationsänderung der beta2-Integrine angenommen werden.

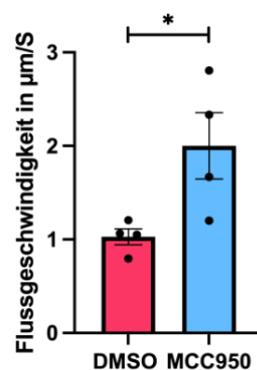


Abbildung 12 – Rollgeschwindigkeiten neutrophiler Granulozyten mit und ohne vorherige Inkubation mit MCC950

Humane neutrophile Granulozyten wurden durch mit E-Selektin und ICAM-1 beschichtete Flusskammern perfundiert. Hierbei wurden deren Rollgeschwindigkeiten entlang der Flusskammern quantifiziert. Die Blockade des NLRP3-Inflammasoms erfolgte durch MCC950 (blauer Balken); Kontrollgruppe: roter Balken. Die Abbildung zeigt zu den beiden Konditionen den Mittelwert \pm SEM (n=4). Pro Flusskammer wurden jeweils zehn Zellen analysiert und drei

technische Replikate durchgeführt. Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) wurden mit einem Stern markiert.

5.6.1 Verlust von GSDMD und Auswirkung auf die Auswanderung von neutrophilen Granulozyten

Hier wurde der Fokus auf das Auswanderungsverhalten der neutrophilen Granulozyten gelegt. Hierzu wurden Wildtyp- und GSDMD^{-/-}-Mäusen TNF- α intraskrotal gespritzt, um dort eine Entzündungsreaktion auszulösen. Im Anschluss wurden die Cremaster-Muskeln der Mäuse präpariert, auf Objektträger aufgespannt und mit einer Giemsa-Färbung gefärbt. Mit Hilfe eines Durchlichtmikroskop wurden dann alle aus den postkapillären Venen ausgewanderten Neutrophilen ausgezählt. Bei der Auswertung zeigte sich bei den GSDMD^{-/-}-Mäusen eine signifikant reduzierte Anzahl an perivaskulären neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (siehe Abb. 13; GSDMD^{-/-} vs. Wildtyp: $36,85 \pm 12,98$ Zellen/FOV vs. $223 \pm 34,90$ Zellen/FOV; Mittelwert \pm SEM). Neutrophile Granulozyten von GSDMD^{-/-}-Mäusen können trotz der Stimulation mit E-Selektin keine Poren in die Membran einbauen, wodurch auch keine Freisetzung von Calprotektin aus der Zelle möglich ist.

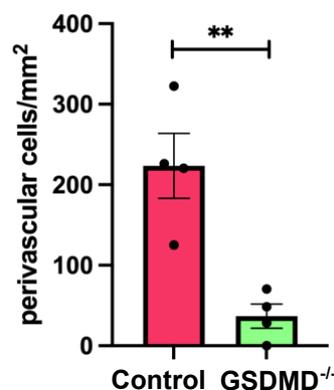


Abbildung 13 – Anzahl perivaskulärer Zellen in Wildtyp- und GSDMD^{-/-}-Mäusen
Cremaster-Muskeln von Wildtyp- (rot) und GSDMD^{-/-}-Mäusen (grün) wurden nach einer intraskrotalen TNF-alpha-Injektion zur Induktion einer inflammatorischen Reaktion mit Hilfe einer Giemsa-Färbung bezüglich aus dem Gefäßsystem ausgewandelter neutrophiler Granulozyten untersucht. Die Abbildung zeigt zu den beiden Konditionen den Mittelwert \pm SEM (n=4). Die statistische Analyse wurde mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test durchgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede ($p \leq 0,01$) wurden mit zwei Sternen markiert.

6 Diskussion

6.1 Unkonventionelle Sekretion von Calprotektin aus neutrophilen Granulozyten

Trotz der großen Mengen an Calprotektin im Zytosol neutrophiler Granulozyten und Monozyten und der umfassenden intra- und extrazellulären Funktionen war der zugrundeliegende Mechanismus der Freisetzung des Proteins bisher nicht bekannt (Edgeworth 1991; Newton 1998; Pruenster 2016; Jarlborg 2020). Die Freisetzung von Proteinen aus einer Zelle erfolgt regulär im Rahmen der konventionellen Sekretion über eine Signalsequenz bzw. eine Transmembrandomäne, die zum Transport des Proteins in das endoplasmatische Retikulum führt. Im Anschluss daran erfolgt der Weitertransport mittels COP-II-positiven Vesikeln in Richtung Golgi-Apparat, Zellmembran und schließlich in den extrazellulären Raum (Giuliani 2011; Rabouille 2017). Calprotektin weist diese Signalsequenz nicht auf, weshalb eine Freisetzung im Rahmen der konventionellen Sekretion nicht möglich ist (Rammes 1997; Foell 2007; Ehrchen 2009). Sekretionsmechanismen, die nicht unter die klassische Sekretion fallen, werden unter dem Begriff unkonventionelle Proteinsekretion UPS („*engl. unconventional protein secretion*“) zusammengefasst. Hierbei werden Proteine, die keine Signalsequenz oder Transmembran-Domäne aufweisen, in einem Golgi-Apparat-unabhängigen Prozess aus der Zelle freigesetzt (Giuliani 2011; Rabouille 2012; Rabouille 2017). Insbesondere in Situationen, in denen Zellen Stress ausgesetzt sind, kommt es zur Freisetzung von Proteinen durch unkonventionelle Sekretion. Mögliche Ursachen hierfür sind zum einen, dass die Freisetzung durch unkonventionelle Sekretion deutlich schneller abläuft als über den konventionellen Transportweg, und zum anderen, dass durch den zusätzlichen Sekretionsweg die regulären Abläufe und Transportvorgänge in der Zelle nicht gestört werden (Giuliani 2011; Rabouille 2017). Bei Calprotektin ist bekannt, dass insbesondere der Kontakt der Immunzellen mit entzündlich verändertem Endothel zur Freisetzung führt. Hierbei kann der Kontakt mit den entzündlich veränderten Endothelzellen im Rahmen eines inflammatorischen Prozesses als Stressor für die Zellen gewertet werden (Frosch 2000). Im Rahmen der unkonventionellen Sekretion können anhand des zugrundeliegenden molekularen Mechanismus der Freisetzung vier unterschiedliche Kategorien unterschieden werden. Typ I basiert auf einer Freisetzung von Proteinen durch Poren, die sich in der Plasmamembran bilden (Rabouille 2017; Brough 2017). Bei Typ II der unkonventionellen Sekretion übernehmen ABC-Transporter die Ausschleusung aus der Zelle (Rabouille 2012). Im Rahmen des Typ III kommt es zu einer Endosom-oder

Autophagosom-abhängigen Freisetzung aus der Zelle (Nickel 2009). Bei einer Freisetzung nach dem Mechanismus vom Typ IV weisen die Proteine eine Signalsequenz bzw. Transmembrandomäne auf, die zu einem Transport in das endoplasmatische Retikulum führt, allerdings kommt es dann zu einem direkten Transport in Richtung Zellmembran ohne Zwischenstopp im Golgi-Apparat (Grieve 2011). Der Sekretionsmechanismus von Interleukin-1beta durch GSDMD-Poren, die in einem Inflammasom-abhängigen Prozess in die Zellmembran eingebaut werden, wird als Typ-I der unkonventionellen Sekretion klassifiziert (Rabouille 2017). In der Literatur wird die Sekretion aber auch teilweise dem Typ-III zugeordnet, was auf der Tatsache basiert, dass die Sekretion von Interleukin-1beta auch in einem GSDMD-unabhängigen Prozess erfolgen kann (Rabouille 2017; Heilig 2018; Karmakar 2020b). Aufgrund ähnlicher Eigenschaften von Interleukin-1beta und Calprotektin stellten wir die Hypothese auf, dass die Sekretion von Calprotektion einem ähnlichen molekularen Mechanismus folgt wie die Freisetzung von Interleukin-1beta. Die Proteine sind beide proinflammatorische Zytokine, haben beide keine Signalsequenz, sodass sie über unkonventionelle Sekretion aus der Zelle freigesetzt werden müssen. Sie werden zudem beide im Rahmen von Entzündungsreaktionen, welche Stresssituationen für die Zellen darstellen, aus Zellen der myeloiden Reihe freigesetzt (Evavold 2018; Jarlborg 2020). Im Weiteren weisen die beiden Proteine ein ähnliches molekulares Gewicht auf (Interleukin-1beta 17,5 kDa und bei Calprotektin 25 kDa), sodass die Freisetzung von Calprotektin anhand der Größe ebenfalls durch GSDMD-Poren möglich ist (Mosley 1987; van den Bos 1996; Vogl 1999; Vogl 2012).

6.2 Stimulation neutrophiler Granulozyten mit E-Selektin und schnelle NLRP3-abhängige Freisetzung von Calprotektin

Die Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit entzündlich verändertem Endothel führt zu einer Freisetzung von Calprotektin aus den Immunzellen (Frosch 2000). In näheren Analysen konnte die Interaktion von E-Selektin auf den Endothelzellen mit PSGL-1 auf den Neutrophilen als zugrundeliegender Mechanismus identifiziert werden (Pruenster 2015). In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte bereits gezeigt werden, dass es durch die Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin für eine kurze Periode von 15 Minuten zu einer Freisetzung von Calprotektin kommt. Die gemessene Menge an freigesetztem Protein bei einer Stimulation von Zellen, die aus Caspase1^{-/-} Caspase11^{-/-} und GSDMD^{-/-}-Mäusen isoliert wurden, war hierbei signifikant geringer (Kuchler 2023). Diese Befunde bestätigen zum einen, dass die Stimulation mit E-Selektin

zu einer Freisetzung von Calprotektin führt und zum anderen, dass es einen Zusammenhang mit dem NLRP-3-Inflammasom gibt, da sowohl die Caspase-1 als auch das GSDMD wichtige Bestandteile des NLRP3-Inflammasom-Signalwegs darstellen (Shi 2015; Kayagaki 2015). Der Einfluss der Stimulation mit E-Selektin auf die beiden Proteine Caspase-1 und GSDMD wurde in Western-Blot-Analysen weiter untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die Stimulation der Zellen bereits für einen kurzen Zeitraum von 15 Minuten zu einer Spaltung der Proteine und damit zu einer Überführung in deren aktive Form führt. Hier konnte zudem durch den Einsatz von MCC950 die Abhängigkeit der Signalkaskade vom NLRP3-Inflammasom nachgewiesen werden (Kuchler 2023).

Die Aktivierung des Inflammasoms ist grundsätzlich über zwei Signalkaskaden möglich. Die kanonische Aktivierung erfolgt in zwei Schritten. Zunächst kommt es zu einem Priming der neutrophilen Granulozyten, wodurch die Expression der unterschiedlichen Bestandteile des Inflammasoms und der Zytokine pro-Interleukin-1beta und pro-Interleukin-18 verstärkt wird und die Zelle somit auf die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine vorbereitet wird. In einem zweiten Schritt kommt es dann durch das eigentliche Aktivierungssignal zur Oligomerisierung des NLRP3-Inflammasoms und zu dessen Aktivierung. Die nicht-kanonische Aktivierung erfolgt im Gegensatz dazu durch eine intrazelluläre Stimulation durch gram-negative Bakterien oder intrazelluläres LPS. Dieses bindet in Mäusen direkt an Caspase-11 und im Menschen an Caspase-4 und -5, wodurch es zu einer Oligomerisierung und Aktivierung der Caspasen kommt. Diese spalten im Anschluss GSDMD in seine aktive Form, welches wiederum Poren in der Zellmembran bildet, wodurch es zu einem Ausfluss von Kalium aus der Zelle kommt. Dieser Ionenfluss aktiviert dann das NLRP3-Inflammasom (Shi 2014; George R. Dubyak 2022; Paget 2022). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin auch ohne vorheriges Priming zu einer schnellen Aktivierung und einem raschen Einbau der GSDMD-Poren in der Zellmembran führt. Hierbei kommt es durch die Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin zu einem Kalium-Ausstrom über den spannungsabhängigen $K_v1.3$ -Kanal, was zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt (Pruenster 2023). Neben dem Kaliumausstrom kommt es auch zu einer posttranslationalen Modifikation des NLRP3, was einen entscheidenden Schritt für eine suffiziente Aktivierung des Inflammasoms darstellt (Song 2017). Hierbei führt die Stimulation mit E-Selektin in einem Kalium-unabhängigen Vorgang zur einer BTK-abhängigen Tyrosin-Phosphorylierung von NLRP3, wodurch eine Aktivierung des Inflammasoms ermöglicht wird (Pruenster 2023). Western-Blot-Analysen zeigten zudem, dass es in neutrophilen Granulozyten, die in

kaliumreichem Zellkulturmedium (K^+ :50 mM) mit E-Selektin stimuliert werden, zu keiner Spaltung von Caspase-1 und GSDMD kommt (Kuchler 2023).

Der hier aufgezeigte Signalweg läuft rasch und ohne vorheriges Priming der Zellen ab. Neutrophile Granulozyten weisen die besondere Eigenschaft auf, dass sie sehr schnell auf entzündliche Reize reagieren können. So können sie ohne vorherige Umwandlung in einen proinflammatorischen Phänotypus große Mengen an Zytokinen und weitere Faktoren mit proinflammatorischen Mediatoren über ihre Granula ausschütten. Neutrophile sind zudem vollständig mit allen Rezeptoren und Proteinen ausgestattet, die eindringende Pathogenen bekämpfen können (Mantovani 2011). In zirkulierenden neutrophilen Granulozyten stellt Calprotektin das am meisten vorkommende Protein im Zytosol dar, wodurch eine rasche Sekretion ohne de-novo Synthese möglich ist (Edgeworth 1991; Newton 1998). Dies stellt einen deutlichen Unterschied zur Freisetzung von Interleukin-1beta dar, welches typischerweise im Rahmen der zweistufigen, kanonischen Aktivierung freigesetzt wird und im Rahmen dieses Prozesses auch noch synthetisiert werden muss (Paget 2022). So ist es nicht verwunderlich, dass IL-1 β nach kurzer E-Selektin-Stimulation nicht im Zellüberstand gefunden wird (Pruenster 2023).

6.3 Stimulation mit E-Selektin und schneller Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran neutrophiler Granulozyten

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Stimulation neutrophiler Granulozyten nicht nur zu einer Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms führt, sondern auch zu einem Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran. Hierfür wurde durch Zugabe von PI während der Zellstimulation die Permeabilität der Membran untersucht. Sowohl die Stimulation humaner als auch muriner neutrophiler Granulozyten führte zu einer raschen Aufnahme des Fluoreszenzfarbstoffs in die Zellen. Diese Zunahme der Permeabilität ist ein deutlicher Hinweis für den Einbau von Poren als Folge der Zellstimulation. Bei Zellen, die vor der Stimulation mit MCC950 behandelt wurden, und bei murinen Zellen, welche aus Caspase-1^{-/-}-Caspase11^{-/-}-Mäusen isoliert wurden, konnte keine Aufnahme an PI beobachtet werden. Somit konnte gezeigt werden, dass der Einbau der Poren abhängig von der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms ist. Zusätzlich konnte durch die Analyse des Verteilungsmusters des n-terminalen-GSDMDs (kurz nt-GSDMD), welches die aktive, porenbildende Form des Proteins darstellt, festgestellt werden, dass es durch die Stimulation mit E-Selektin zu einer Verlagerung des nt-GSDMD an die Zellmembran kommt. Dies zeigt zum einen, dass es sich bei den Poren, die sich in der Zellmembran

bilden, tatsächlich um GSDMD-Poren handelt und zum anderen bestätigt es den Einbau von Poren in die Zellmembran. Somit erfolgt die Freisetzung von Calprotektin als Folge der Stimulation mit E-Selektin durch GSDMD-Poren, die in die Zellmembran eingebaut werden. Karmakar et al. beschrieben 2020 für die Freisetzung von Interleukin-1beta zusätzlich einen alternativen Signalweg, bei dem es nicht zum Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran kommt. Hierbei führt die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und der Caspase-1 zwar zur Spaltung und damit zur Aktivierung von GSDMD, allerdings erfolgt kein Einbau in die Zellmembran, sondern in azurophile Granula und LC3⁺-Autophagosomen, wodurch die Inhalte der Granula wie beispielsweise die Neutrophilen-Elastase freigesetzt werden. Durch das Enzym kommt es zu einer sekundären, alternativen Spaltung von GSDMD, was die Grundlage für die Freisetzung von Interleukin-1beta in einem Autophagie-abhängigem Prozess darstellt (Karmakar 2020a).

Damit ein Molekül durch Poren in der Zellmembran freigesetzt werden kann, muss der Durchmesser der Poren größer als der Durchmesser des Moleküls sein. Die GSDMD-Poren haben eine Größe von ca. 20-25 nm und einem Innendurchmesser von ca. 15 nm (Sborgi 2016; Gaidt 2016; Rühl 2021). Dieser Durchmesser ermöglicht sehr kleinen Molekülen und Ionen die Zelle zu verlassen, wohingegen dies für größere Moleküle nicht möglich ist (Evavold 2018; Heilig 2018; Devant 2023). Calprotektin hat mit einem Gewicht von 24 kDa eine ähnliche Größe wie Interleukin-1beta und kann somit durch die GSDMD-Poren aus den Zellen freigesetzt werden (Mosley 1987; van den Bos 1996; Vogl 1999; Vogl 2012). Neben dem Aspekt der Größe spielt aber auch die Ladung der Pore und der Fracht eine entscheidende Rolle (Devant 2023). GSDMD-Poren sind negativ geladen, wodurch Moleküle mit einer positiven oder neutralen Ladung für den Transport aus der Zelle bevorzugt werden (Xia 2021). Calprotektin ist bei physiologischem pH-Wert positiv geladen, sodass eine effiziente Freisetzung durch die GSDMD-Poren erfolgen kann (Pruenster 2016).

6.4 Neutrophile Granulozyten und Induktion von Pyroptose

Um die Vitalität der neutrophilen Granulozyten während der Stimulation mit E-Selektin zu überprüfen und somit auch falsch-positive Ergebnisse der PI-Aufnahme ausschließen zu können, wurde über die Menge an freigesetztem LDH der Anteil an absterbenden Zellen bestimmt. Zusätzlich kann so untersucht werden, ob die Stimulation mit E-Selektin zur Einleitung der Pyroptose in den Zellen führt. LDH kann aufgrund seiner molekularen Größe nicht über GSDMD-Poren freigesetzt werden, sodass eine Freisetzung aus der

Zelle mit dem Absterben der Zellen korreliert (Gaidt 2016; Devant 2023). Meine Ergebnisse zeigen, dass eine Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin oder mit LPS/Nigericin auch bei sehr langen Stimulationsperioden nicht zum Absterben der Zellen und somit nicht zur Aktivierung der Pyroptose führte. Im Gegensatz dazu führte die Stimulation von Monozyten mit LPS/Nigericin im gleichen Zeitraum zu einem signifikanten Absterben der Zellen durch Aktivierung der Pyroptose. In Monozyten ist bekannt, dass die kanonische Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zu einem Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran führt, wodurch es zu einem Kollaps des osmotischen und des elektrischen Gradienten in der Zelle kommt (Gaidt 2016; DiPeso 2017; Carty 2019). Hierdurch kommt es zu einer Störung des Zellmetabolismus und der Zellhomöostase (Rühl 2021). Die Folge ist die Freisetzung weiterer intrazellulärer Zytokine und der Einstrom von Wasser in die Zelle, was ein Anschwellen der Zellen und schließlich die Ruptur der Zellmembran zur Folge hat (Gaidt 2016). Nachdem in Monozyten das Auftreten der Pyroptose als Folge des Einbaus der GSDMD-Poren in die Zellmembran beschrieben wurde, kam es zu der Annahme, dass das Auftreten der GSDMD-Poren immer zum Absterben der Zellen führt (Liu 2016; Sborgi 2016; Ding 2016). Doch bei Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin konnte ich trotz Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms kein Absterben der Zellen und somit keine Pyroptose beobachten. Dies zeigt, dass trotz der Aktivierung des Inflammasoms und des Einbaus der GSDMD-Poren in die Zellmembran keine Pyroptose stattfinden muss. Die Resistenz der neutrophilen Granulozyten gegenüber Pyroptose konnte bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden und stellt einen deutlichen Unterschied zu Monozyten dar (Chen 2014; Conos 2016; Evavold 2018; Heilig 2018). Unklar ist, wie es in neutrophilen Granulozyten trotz der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und des Einbaus der GSDMD-Poren in die Zellmembran nicht zu einer Aktivierung der Pyroptose und zu einem Absterben der Zellen kommt. Hierfür gibt es mehrere mögliche Erklärungsansätze (Seunghwan Son 2021; Rühl 2021). Die Transkriptionsraten für GSDMD, Caspase-1 und ASC sind in neutrophilen Granulozyten deutlich niedriger als in Monozyten (Boucher 2018). Diese Tatsache hat zur Folge, dass grundsätzlich weniger Poren in die Zellmembran eingebaut werden (Rühl 2021). Aufgrund der wenigen Poren in der Membran kann die Mindestanzahl an Poren wahrscheinlich nicht erreicht werden, um einen osmotischen Kollaps der Zellen und somit den Tod der Zelle auszulösen (Carty 2019).

Kayagaki et al. haben 2021 NINJ1 im Zusammenhang mit der Ruptur der Zellmembran in Monozyten als entscheidenden Faktor identifiziert. Die Plasmamembranruptur ist

hierbei kein passiver Prozess, der als Folge der mechanischen Scherkräfte, die während des Anschwellens der Zellen entstehen, auftritt, sondern ein eigenständiger Vorgang, der unabhängig vom Einbau der GSDMD-Poren in die Membran und der Freisetzung von Zytokinen abläuft, und von der Oligomerisierung des NINJ1-abhängig ist (Davis 2019; Wang 2021; Kayagaki 2021). Wie NINJ1 genau aktiviert wird und wie es im Anschluss daran zur Ruptur der Membran kommt, ist bisher nicht bekannt und muss noch weiter untersucht werden (Rühl 2021). Zudem gibt es bisher keine Erkenntnisse darüber, welche Rolle NINJ1 in neutrophilen Granulozyten spielt und in welchem Zusammenhang es mit der Pyroptose-Resistenz steht (Yow 2022).

Doch nicht nur in Neutrophilen wurde beobachtet, dass es trotz Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und des Einbaus der GSDMD-Poren in die Zellmembran zu keinem Absterben der Zellen kommt, sondern auch in Monozyten (Evavold 2018; Heilig 2018). Die Aktivierung des Inflammasoms kann hier zu zwei unterschiedlichen Zuständen der Zellen führen. Entweder kommt es zu einem Absterben der Zellen durch die Aktivierung der Pyroptose oder die Zellen überleben, was mit einer Hyperaktivierung und einer verstärkten Freisetzung von IL-1 β einhergeht. Der genaue molekulare Mechanismus hierfür ist noch nicht bekannt. Carty et al. beschreiben 2019, dass SARM („*engl. Sterile a and HEAT Armadillo motif-containing protein*“) hierbei eine wichtige Rolle einnehmen könnte. So kommt es durch die Aktivierung von SARM zu einer mitochondrialen Depolarisation, was im Anschluss die Hyperaktivierung der Zelle begünstigt und die Pyroptose der Zelle verhindert. Diese Theorie unterstützt somit ebenfalls die Annahme, dass die alleinige Präsenz der GSDMD-Poren in der Zellmembran nicht ausreicht, um einen osmotischen Kollaps der Zellen und damit die Pyroptose auszulösen (Carty 2019). Rühl et al. zeigten 2018, dass durch die in die Zellmembran eingebauten GSDMD-Poren ein Einstrom von Calcium in die Zellen begünstigt wird. Dieser aktiviert in den Zellen den ESCRT-III-Komplex („*endosomal sorting complexes required for transport*“), wodurch ein Membranreparaturprogramm initiiert wird. Hierbei lagert sich der Komplex im Bereich der Zellmembran an beschädigte Bereiche, wie in diesem Fall die Poren, an und trägt zur Reparatur der entsprechenden Bereiche bei. Die Reparaturprozesse führen zu einem Verschwinden der Poren von der Zelloberfläche und verhindern dadurch die Einleitung der Pyroptose. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass es durch die Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin zu einer Verlagerung von CHMP4B, einem Bestandteil des ESCRT-III, an die Zellmembran kommt, was für die Aktivierung eines Membranreparaturprogrammes in neutrophilen Granulozyten spricht und wiederum einen möglichen Erklärungsansatz für das Ausbleiben der Pyroptose darstellt. Zusätzlich

erhöht der Calcium-Einstrom in die Zellen die Effizienz der Calprotektin-Sekretion aus den Zellen, denn die Erhöhung der intrazellulären Calcium-Konzentration führt zu einer Verlagerung des Proteins an die Zellmembran, sodass die Freisetzung über die Poren deutlich erleichtert wird (Lemarchand 1992; Roth 1993).

Doch es gibt auch Beobachtungen, die zeigen, dass eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in Neutrophilen zum Absterben der Zellen durch Induktion der NETose führen kann (Sollberger 2018; Chen 2018; Broz 2020). Längere Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit dem Ionophor Nigericin nach einem Priming mit LPS hat bei mir ebenfalls zu signifikant höheren Raten an absterbenden Zellen geführt. Dies impliziert, dass verschiedene Stimuli jeweils unterschiedliche Signalwege aktivieren, die zu einem jeweils anderen Outcome für die Zellen führen.

6.5 Stimulation neutrophiler Granulozyten mit E-Selektin und transientes Auftreten von GSDMD-Poren in der Zellmembran

Die Experimente in dieser Arbeit zeigen, dass eine Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin einerseits zu einer schnellen Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und einem raschen Einbau der GSDMD-Poren in die Zellmembran führt, wodurch Calprotektin aus der Zelle freigesetzt wird, und es andererseits über die Rekrutierung des ESCRT-III zu einer Aktivierung eines Membranreparaturprogramms kommt, was wiederum zu einem Abbau der Poren führt. Basierend auf dieser Theorie wurden die GSDMD-Poren im Rahmen einer dauerhaften Stimulation mit E-Selektin genauer untersucht. Hierfür wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten PI zugegeben, um die Permeabilität der Membran nach verschiedenen Stimulationszeiten zu testen. Bereits nach zehn Minuten kam es zu einer deutlichen Abnahme der PI-Aufnahme in die Zellen. Diese Beobachtung zeigt, dass es durch die Stimulation mit E-Selektin in den neutrophilen Granulozyten zwar zu einem Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran kommt, diese allerdings auch rasch wieder verschwinden und somit nur transient vorhanden sind. Ursächlich hierfür sind wahrscheinlich das Zusammenspiel mehrere Faktoren wie zum einen die niedrige Anzahl an GSDMD-Poren in neutrophilen Granulozyten und zum anderen die Aktivierung von Membranreparaturvorgängen. Insbesondere die Reparatur der Zellmembran dürfte hier eine wichtige Rolle spielen (Rühl 2018; Rühl 2021). Um den genauen molekularen Mechanismus zu entschlüsseln sind allerdings noch weitere Untersuchungen notwendig.

Der Kontakt der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin auf dem entzündlich veränderten Endothel erfolgt während der Diapedese bereits bei den ersten Kontakten

zwischen Immunzellen und der Gefäßwand. Diese Interaktion ist zudem entscheidend für den Rollvorgang entlang des Endothels (Pruenster 2015; Morikis 2017). Aufgrund der Tatsache, dass sich die Aufgaben und Funktionen neutrophiler Granulozyten im Gewebe an Orten entzündlicher Prozesse abspielen, ist es wichtig, dass die Auswanderung aus dem Gefäßsystem suffizient abläuft und die Zellen dort auch ankommen. Aus diesem Grund wird durch das transiente Auftreten der GSDMD-Poren das Überleben der Zellen während der Diapedese gesichert und somit deren Funktionstüchtigkeit für die Aufgaben im Gewebe erhalten. Denn im Gewebe übernehmen neutrophile Granulozyten komplexe Aufgaben, wie die Koordination der Immunantwort, die Bekämpfung von Pathogenen, die Rekrutierung und Aktivierung anderer Immunzellen und auch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (Chen 2014; Karmakar 2015; Paget 2022). Es konnte zudem bereits gezeigt werden, dass die Stimulation von neutrophiler Granulozyten im Rahmen von Entzündungsreaktionen zur Aktivierung anti-apoptotischer Programme in den Zellen führt. Hierdurch wird ein längeres Überleben der Zellen im entzündlichen Gewebe ermöglicht (Silvestre-Roig 2016). Vor diesem Hintergrund sind sowohl die Pyroptose-Resistenz, als auch das transiente Auftreten von GSDMD-Poren als wichtige Mechanismen zu verstehen.

6.6 Bedeutung von NLRP3 und GSDMD für die Neutrophilen Rekrutierung

Die Freisetzung von Calprotektin infolge einer Stimulation der Zellen mit E-Selektin erfolgt *in vivo* während des Rollvorgangs der neutrophilen Granulozyten entlang des Endothels. Das freigesetzte Calprotektin bindet dann in einem autokrinen Vorgang an den TLR4-Rezeptor der Granulozyten und aktiviert dadurch die β 2-Integrine der Zellen, die durch eine Konformationsänderung zu einem langsameren Rollen der Zellen beitragen (Pruenster 2015). Bei einer Blockade des NLRP3-Inflammasoms durch den Inhibitor MCC950 kann in mit E-Selektin beschichteten Flusskammern eine deutlich höhere Rollgeschwindigkeit der Zellen gemessen werden. Diese Tatsache bestätigt zum einen die Abhängigkeit der Calprotektin-Sekretion vom NLRP3-Inflammasom und zum anderen unterstreicht es die wichtige Rolle des Proteins und somit auch des gesamten molekularen Signalwegs, der zur Freisetzung von Calprotektin beiträgt, während der Diapedese. Denn nur durch eine Verlangsamung der Rollgeschwindigkeit mit Aktivierung von β 2-Integrinen ist eine Auswanderung aus dem Gefäßsystem effizient möglich (Morikis 2017).

Anhand von Giemsa-gefärbten Cremaster-Muskeln von Wildtyp- und GSDMD^{-/-}-Mäusen, bei denen zuvor eine Entzündungsreaktion durch die Injektion von TNF-alpha

ausgelöst wurde, ist die Anzahl an extravasalen neutrophilen Granulozyten bestimmt worden. Hierbei zeigte sich eine signifikant niedrigere Anzahl an ausgewanderten Granulozyten bei GSDMD^{-/-}-Mäusen. Diese Beobachtung unterstreicht zum einen die wichtige Rolle von Calprotektin während der Diapedese, zusätzlich zeigt es aber auch, dass es durch die Freisetzung von Calprotektin zu einer lokalen Verstärkung der Entzündungsreaktion kommt, wodurch es zu einer vermehrten Auswanderung von Zellen aus dem Gefäßsystem kommt. Zudem zeigen diese Erkenntnisse auch wie wichtig die Aktivierung des NLRP-3-Inflammasoms und der damit verbundene Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran für eine suffiziente Diapedese und somit auch für eine funktionierende Immunabwehr sind. Dennoch ist hier ebenfalls anzuführen, dass die reduzierte Auswanderung neutrophiler Granulozyten in GSDMD^{-/-}-Mäusen ebenfalls durch das generelle Fehlen von GSDMD auch in anderen Immunzellen erklärt werden kann.

6.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit präsentiert neue Erkenntnisse bezüglich der molekularen Signalkaskade, welcher der Freisetzung von Calprotektin aus neutrophilen Granulozyten zugrunde liegt. Zudem wird ein bisher unbekannter, schneller Aktivierungsweg des NLRP-3-Inflammasoms in neutrophilen Granulozyten beschrieben, der zu einem transienten Auftreten von GSDMD-Poren in der Zellmembran führt.

Insbesondere die Entschlüsselung des Sekretionsmechanismus von Calprotektin ist von entscheidender Bedeutung, denn Calprotektin spielt in der Pathophysiologie mehrere akuter und chronischer Entzündungsreaktionen und auch in Bezug auf mehrere Tumorentitäten eine wichtige Rolle. Somit können neue Erkenntnisse in diesem Bereich die Grundlage für neue Therapieansätze darstellen (Pruenster 2016). Im Rahmen von Covid-19-Erkrankungen konnte gezeigt werden, dass erhöhte Level von Calprotektin mit schweren Krankheitsverläufen einhergehen. Hierbei verursacht Calprotektin einen starken Anstieg von Zytokinen im Blut, wodurch es zu einer überschießenden Immunreaktion in den Patienten kommt (Silvin 2020). Im Mausmodell wird bereits versucht, diese überschießende Immunreaktion zu verhindern, indem die Interaktion von Calprotektin mit dem TLR4-Rezeptor durch den Einsatz von Paquinimod unterbunden wird. Hierdurch soll es zu einer Verbesserung des Outcomes der Tiere kommen (Mellett 2022). Durch die Entschlüsselung der Signalkaskade, die der Freisetzung von Calprotektin aus neutrophilen Granulozyten zu Grunde liegt, wird es nun möglich, bereits die Sekretion des Proteins aus den Immunzellen zu blockieren. Hierbei könnte die

Blockade des Sekretionsmechanismus von Calprotektin durch die Inhibition des NLRP3-Inflammasoms mittels MCC950 ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt sein. Auch in anderen Bereichen konnte bereits in präklinischen Forschungsansätzen beobachtet werden, dass durch den Einsatz von MCC950 vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung von Autoimmun-, kardiovaskulären und Stoffwechselerkrankungen erzielt werden konnten (Li 2022a). Dennoch sind noch weitere intensive Forschungsarbeiten notwendig, um den gesamten molekularen Mechanismus der Freisetzung von Calprotektin zu entschlüsseln. Hierbei ist insbesondere der genaue Aktivierungsmechanismus des NLRP3-Inflammasoms von Bedeutung. Zudem gilt es zu untersuchen, ob auch in Monozyten eine solche schnelle Aktivierung des Inflammasoms möglich ist oder ob dies exklusiv in neutrophilen Granulozyten vorkommt.

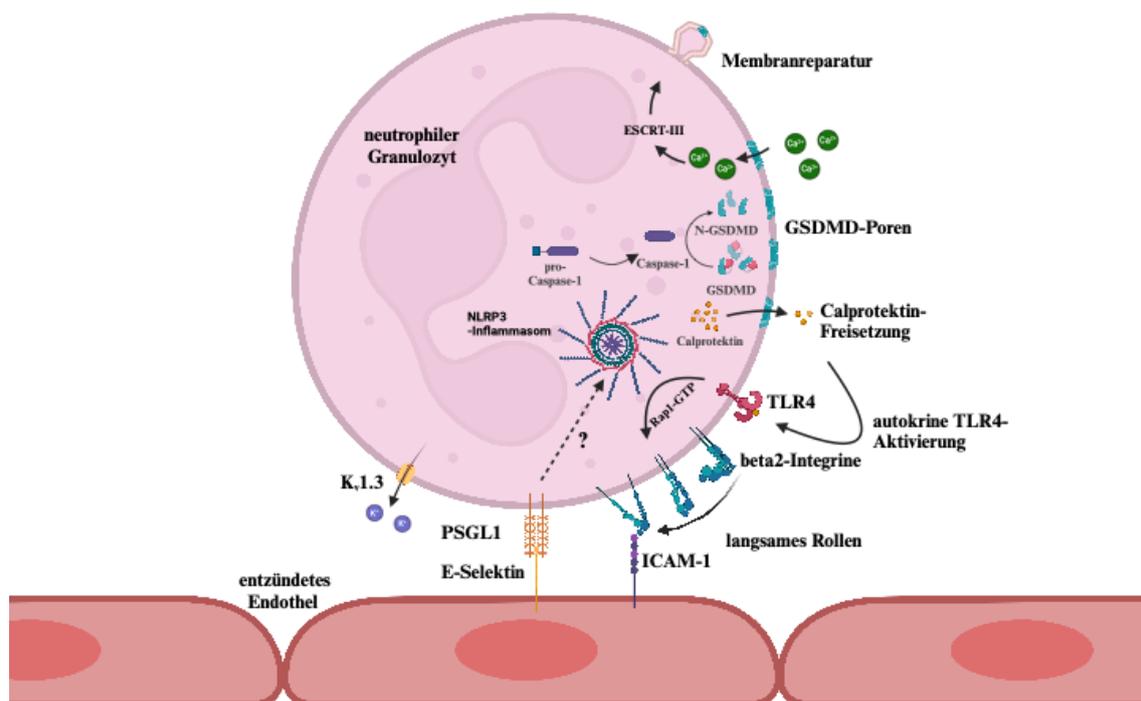


Abbildung 14 - NLRP3-abhängige Freisetzung von Calprotektin durch transient auftretende GSDMD-Poren

E-Selektin-abhängiges Rollen führt zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms unter Beteiligung eines Kaliumausstroms über den spannungsabhängigen Kalium-Kanal $K_v1.3$. Dadurch kommt es im nächsten Schritt zur Aktivierung der Caspase-1. Die Caspase-1 spaltet dann GSDMD, sodass sich der n-terminale Part mit weiteren nt-GSDMDs zusammenlagern und in der Zellmembran Poren bilden kann. Diese Poren dienen zur Freisetzung von Calprotektin aus neutrophilen Granulozyten. Zudem kommt es durch die Porenbildung zum Einstrom von Calcium, was die Aktivierung des ESCRT-III-Komplexes zur Folge hat, wodurch es zur Reparatur der Zellmembran kommt. Das freigesetzte Calprotektin bindet an den TLR4-Rezeptor und führt durch eine autokrine Aktivierung zur Aktivierung der $\beta 2$ -Integrine. Hierdurch wird langsames Rollen der Zellen induziert. (erstellt mit Biorender.com)

7 Zusammenfassung

Calprotektin ist im klinischen Alltag ein wichtiger diagnostischer Marker für unterschiedliche akute und chronisch-entzündliche Erkrankungen und spielt zudem in der Pathophysiologie mehrere Krankheitsbilder eine entscheidende Rolle (Pruenster 2016). Dennoch war der molekulare Signalweg, der zur aktiven Freisetzung des Proteins führt, bisher nicht bekannt. Bereits in Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin sowohl *in vivo* als auch *in vitro* zu einer Freisetzung von Calprotektin führt. Zudem konnte im Western-Blot beobachtet werden, dass es durch die Stimulation der neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin zu einer Prozessierung der Effektorproteine des NLRP3-Inflammasoms nämlich der Caspase-1 und des GSDMDs kommt (Kuchler 2023). Die vorliegende Arbeit berichtet nun, dass es bei der Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit E-Selektin durch eine schnelle Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms zu einem Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran kommt. Hierbei konnte durch die Konfokalmikroskopie die Verlagerung des n-terminalen-GSDMD an die Zellmembran nachgewiesen werden. Trotz der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms und des Einbaus der GSDMD-Poren in die Membran konnte allerdings kein signifikantes Absterben der neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Somit scheint die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in neutrophilen Granulozyten, anders als in Monozyten nicht zu einer Aktivierung der Pyroptose zu führen. Aus diesem Grund wurden die Zellen und insbesondere die Poren in der Zellmembran bei anhaltender Stimulation eingehend untersucht. Hierbei zeigte sich, dass bei einer anhaltenden Stimulation mit E-Selektin die Anzahl an Zellen, die PI nach Zugabe im Verlauf aufnehmen, abnimmt. Diese Beobachtung deutet auf ein Verschwinden der Poren von der Membran hin, sodass diese Arbeit erstmals ein transientes Auftreten von GSDMD-Poren in neutrophilen Granulozyten in Folge einer Stimulation mit E-Selektin beschreibt. Zudem kann bei einer Stimulation mit E-Selektin eine Verlagerung und Aktivierung des ESCRT-III in Richtung der Zellmembran der neutrophilen Granulozyten beobachtet werden, was daraufhin deutet, dass in dieser Signalkaskade Membranreparaturprozesse eine wichtige Rolle spielen (siehe Abb. 14). Die funktionelle Bedeutung der NLRP3-abhängigen Freisetzung von Calprotektin während der Diapedese wurde mit Hilfe von Flusskammern genauer untersucht und zeigte, dass die Blockade des Inflammasoms zu schnelleren Rollgeschwindigkeiten entlang des Endothels führt. Zudem war die Anzahl an aus dem Gefäßsystem ausgewanderten neutrophilen Granulozyten in GSDMD^{-/-}-Mäusen unter *in vivo* Bedingungen signifikant geringer als in Kontrollmäusen, was den Einfluss des NLRP3-

GSDMD-Signalwegs auf die Diapedese ebenfalls widerspiegelt. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit den NLRP3-abhängigen Einbau von transient auftretenden GSDMD-Poren in die Zellmembran von neutrophilen Granulozyten. Hierbei führt die Stimulation mit E-Selektin zu einer schnellen Aktivierung des NLRP-3-Inflammasoms, wodurch es zu einem Einbau von GSDMD-Poren in die Zellmembran kommt. Durch diese Poren ist die Freisetzung von Calprotektin aus der Zelle möglich. Bei den neutrophilen Granulozyten kann zudem anders als bei Monozyten trotz der Aktivierung des Inflammasoms und des Einbaus der GSDMD-Poren keine Aktivierung der Pyroptose beobachtet werden, vielmehr kommt es nur zu einem transienten Auftreten der Poren in der Zellmembran. Die neuen Erkenntnisse stellen zum einen mögliche Anknüpfungspunkte für weitere Forschungsarbeiten in diesem Bereich dar und zeigen zum anderen neue therapeutische Angriffspunkte für akut und chronisch-entzündliche Erkrankungen auf.

8 Anhang

8.1 Literaturverzeichnis

- Akira, S. & Takeda, K. (2004): Toll-like Receptor Signalling. *Nature Reviews Immunology*, 4, 499-511.
- Aroca-Crevillén, A., Vicanolo, T., Ovadia, S. & Hidalgo, A. (2024): Neutrophils in Physiology and Pathology. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 19, 227–59.
- Bianchi, M. E. (2007): DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of Leukocyte Biology*, 81, 1-5.
- Boucher, D., Monteleone, M., Coll, R. C., Chen, K. W., Ross, C. M., Teo, J. L., Gomez, G. A., Holley, C. L., Bierschenk, D., Stacey, K. J., Yap, A. S., Bezbradica, J. S. & Schroder, K. (2018): Caspase-1 self-cleavage is an intrinsic mechanism to terminate inflammasome activity. *Journal of Experimental Medicine*, 215, 827-840.
- Brough, D., Pelegrin, P. & Nickel, W. (2017): An emerging case for membrane pore formation as a common mechanism for the unconventional secretion of FGF2 and IL-1 β . *The Company of Biologists*, 130, 1-6.
- Broz, P. (2015): Caspase target drives pyroptosis. *Nature*, 526, 660-666.
- Broz, P. & Dixit, V. M. (2016): Infalmmasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*, 16, 407-420.
- Broz, P., Pelegrín, P. & Shao, F. (2020): The gasdermins, a protein family executing cell death and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 20, 143-157.
- Broz, P., Von Moltke, J., Jones, J. W., Vance, R. E. & Monack, D. M. (2010): Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing. *Cell*, 8, 471-483.
- Cai, X., Chen, J., Xu, H., Liu, S., Jiang, Q.-X., Halfmann, R. & Chen, Z. J. (2014): Prion-like Polymerization Underlies Signal Transduction in Antiviral Immune Defense and Inflammasome Activation. *Cell*, 156, 1207-1222.
- Carty, M., Kearney, J., Shanahan, K. A., Hams, E., Sugisawa, R., Connolly, D., Doran, C. G., Muñoz-Wolf, N., Guertler, C., Fitzgerald, K. A., Lavelle, E. C., Fallon, P. G. & Bowie, A. G. (2019): Cell Survival and Cytokine Release after Inflammasome Activation Is Regulated by the Toll-IL-1R Protein SARM. *Immunity*, 50, 1412-1424.
- Chan, J. K., Roth, J., Oppenheim, J. J., Tracey, K. J., Vogl, T., Feldmann, M., Horwood, N. & Nanchahal, J. (2012): Alarmins: awaiting a clinical response. *The Journal of Clinical Investigation*, 122, 2711-2719.

- Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J. & Ning, Q. (2020a): Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *The Journal of Clinical Investigations*, 120, 2620-2629.
- Chen, K. W., Groß, C. J., Sotomayor, F. V., Stacey, K. J., Tschopp, J., Sweet, M. J. & Schroder, K. (2014): The Neutrophil NLRC4 Inflammasome Selectively Promotes IL-1b Maturation without Pyroptosis during Acute Salmonella Challenge. *Cell Reports*, 8, 570-582.
- Chen, K. W., Lawlor, K. E., Von Pein, J. B., Boucher, D., Gerlic, M., Croker, B. A., Bezbradica, J. S., Vince, J. E. & Schroder, K. (2018): Cutting Edge: Blockade of Inhibitor of Apoptosis Proteins Sensitizes Neutrophils to TNF- but Not Lipopolysaccharide-Mediated Cell Death and IL-1b Secretion. *The Journal of Immunology*, 200, 3341-3346.
- Chen, L., Long, X., Xu, Q., Tan, J., Wang, G., Cao, Y., Wei, J., Luo, H., Zhu, H., Huang, L., Meng, F., Huang, L., Wang, N., Zhou, X., Zhao, L., Chen, X., Mao, Z., Chen, C., Li, Z., Sun, Z., Zhao, J., Wang, D., Huang, G., Wang, W. & Zhou, J. (2020b): Elevated serum levels of S100A8/A9 and HMGB1 at hospital admission are correlated with inferior clinical outcomes in COVID-19 patients. *Cellular & Molecular Immunology*, 17, 992-994.
- Conos, S., Lawlor, K., Vaux, D., Vince, J. & Lindqvist, L. (2016): Cell death is not essential for caspase-1-mediated interleukin-1 β activation and secretion. *Cell Death and Differentiation*, 23, 1827-1838.
- Davis, M. A., Fairgrieve, M. R., Hartigh, A. D., Yakovenko, O., Duvvuri, B., Lood, C., Thomas, W. E., Fink, S. L. & Gale Jr., M. (2019): Calpain drives pyroptotic vimentin cleavage, intermediate filament loss, and cell rupture that mediates immunostimulation. *PNAS*, 116, 5061-5070.
- Deepika, S. & Thirumala-Devi, K. (2016): The cell biology of inflammasomes: Mechanisms of inflammasome activation and regulation. *The Journal of Cell Biology*, 213, 617-629.
- Devant, P. & Kagan, J. C. (2023): Molecular mechanisms of gasdermin D pore-forming activity. *Nature Immunology*, 24, 1064-1075.
- Ding, J., Wang, K., Liu, W., She, Y., Sun, Q., Shi, J., Sun, H., Wang, D.-C. & Shao, F. (2016): Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature*, 535, 111-116.

- Diposo, L., Ji, D. X., Vance, R. E. & Price, J. V. (2017): Cell death and cell lysis are separable events during pyroptosis. *Cell Death Discovery*, 3, 1-10.
- Edgeworth, J., Gorman, M., Bennett, R., Freemont, P. & Hogg, N. (1991): Identification of p8,14 as a Highly Abundant Heterodimeric Calcium Binding Protein Complex of Myeloid Cell. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 7706-7713.
- Ehrchen, J. M., Sunderkoetter, C., Foell, D., Thomas, V. & Roth, J. (2009): The endogenous Toll-like receptor 4 agonist S100A8/S100A9 (calprotectin) as innate amplifier of infection, autoimmunity, and cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 86, 557-566.
- Evavold, C. L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H. & Kagan, J. C. (2018): The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity*, 48, 35-44.
- Fatemeh Khaki-Khatibia, D. Q., Mehrdad Kashifard, Soheila Moeine, Mahmood Maniatif, Mostafa Vaghari-Tabari (2020): Calprotectin in inflammatory bowel disease. *Clinica Chimica Acta*, 510, 556-565.
- Foell, D. & Roth, J. (2004): Proinflammatory S100 Proteins in Arthritis and Autoimmune Disease. *Arthritis and Rheumatism*, 50, 3762-3771.
- Foell, D., Wittkowski, H. & Roth, J. (2007): Mechanisms of Disease: a 'DAMP' view of inflammatory arthritis *Nature Clinical Practice*, 3, 382-390.
- Frosch, M., Strey, A., Vogl, T., Wulffraat, N. M., Kuis, W., Sunderkötter, C., Harms, E., Sorg, C. & Roth, J. (2000): Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 43, 628-637.
- Gaidt, M. M. & Hornung, V. (2016): Pore Formation by GSDMD is the effector mechanism of pyroptosis. *The EMBO Journal*, 20, 2167-2169.
- George R. Dubyak, B. a. M., Eric Pearlman (2022): Pyroptosis in neutrophils: Multimodal integration of inflammasome and regulated cell death signaling pathways. *Immunological Reviews*, 314, 229-249.
- Giuliani, F., Grieve, A. & Rabouille, C. (2011): Unconventional secretion: a stress on GRASP. *Current Opinion in Cell Biology*, 23, 498-504.
- Goebeler, M., Roth, J., Van Den Bos, C., Ader, G. & Sorg, C. (1995): Increase of calcium levels in epithelial cells induces translocation of calcium-binding proteins migration inhibitory factor-related protein 8 (MRP8) and MRP14 to keratin intermediate filaments. *Biochemical Journal*, 309, 419-424.

- Grieve, A. G. & Rabouille, C. (2011): Golgi Bypass: Skirting Around the Heart of Classical Secretion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3, 1-15.
- He, W.-T., Wan, H., Hu, L., Chen, P., Wang, X., Zhe, H., Yang, Z.-H., Zhong, C.-Q. & Han, J. (2015): Gasdermin D is an executor of pyroptosis and required for interleukin-1 β secretion. *Cell Research*, 25, 1285-1298.
- Heilig, R., Dick, M. S., Sborgi, L., Meunier, E., Hiller, S. & Broz, P. (2018): The Gasdermin-D pore acts as a conduit for IL-1 β secretion in mice. *European Journal of Immunology*, 48, 584-592.
- Hermani, A., De Servia, B., Medunjanina, S., Tessier, P. A. & Mayer, D. (2006): S100A8 and S100A9 activate MAP kinase and NF- κ B signaling pathways and trigger translocation of RAGE in human prostate cancer cells. *Experimental Cell Research*, 312, 184-197.
- Ivetic, A., Green, H. L. H. & Hart, S. J. (2019): L-selectin: A major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Frontiers in Immunology*, 10, 1-22.
- Jarlborg, M., Courvoisier, D. S., Lamacchia, C., Prat, L. M., Mahler, M., Bentow, C., Finckh, A., Gabay, C. & Nissen, M. J. (2020): Serum calprotectin: a promising biomarker in rheumatoid arthritis and axial spondyloarthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 22, 1-11.
- Jin, T., Curry, J., Smith, P., Jiang, J. & Xiao, T. S. (2013): Structure of the NLRP1 caspase recruitment domain suggests potential mechanisms for its association with procaspase-1. *Proteins*, 81, 1266-1270.
- Karmakar, M., Katsnelson, M., Malak, H. A., Greene, N. G., Howell, S. J., Hise, A. G., Camilli, A., Kadioglu, A., Dubyak, G. R. & Pearlman, E. (2015): Neutrophil IL-1 β Processing Induced by Pneumolysin Is Mediated by the NLRP3/ASC Inflammasome and Caspase-1 Activation and Is Dependent on K⁺ Efflux. *The Journal of Immunology*, 194, 1763-1775.
- Karmakar, M., Minns, M., Greenberg, E. N., Diaz-Aponte, J., Pestonjamas, K., Johnson, J. L., Rathkey, J. K., Abbott, D. W., Wang, K., Shao, F., Catz, S. D., Dubyak, G. R. & Pearlman, E. (2020a): N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1 β release independently of plasma membrane pores and pyroptosis. *Nature Communications*, 11, 1-14.
- Karmakar, M., Minns, M., Greenberg, E. N., Diaz-Aponte, J., Pestonjamas, K., Johnson, J. L., Rathkey, J. K., Abbott, D. W., Wang, K., Shao, F., Dubyak, G. R. & Pearlman, E. (2020b): N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates

- IL-1beta release independently of plasma membrane pores and pyroptosis. *Nature Communications*, 11, 1-14.
- Kayagaki, N., Kornfeld, O. S., Lee, B. L., Stowe, I. B., O'rourke, K., Li, Q., Sandoval, W., Yan, D., Kang, J., Xu, M., Zhang, J., Lee, W. P., Mckenzie, B. S., Ulas, G., Payandeh, J., Roose-Girma, M., Modrusan, Z., Reja, R., Sagolla, M., Webster, J. D., Cho, V., Andrews, T. D., Morris, L. X., Miosge, L. A., Goodnow, C. C., Bertram, E. M. & Dixit, V. M. (2021): NINJ1 mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature*, 591, 131-153.
- Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q. T., Liu, P. S., Lill, J. R., Li, H., Wu, J., Kummerfeld, S., Zhang, J., Lee, W. P., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., Morris, L. X., Fitzgerald, L., Zhang, Y., Bertram, E. M., Goodnow, C. C. & Dixit, V. M. (2015): Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome signalling. *Nature*, 526, 666-671.
- Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y. & He, Y. (2019): The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1-24.
- Kolaczowska, E. & Kubes, P. (2013): Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13, 159-175.
- Kovacs, S. B. & Miao, E. A. (2017): Gasdermins: Effectors of Pyroptosis. *Cell*, 27, 673-684.
- Kuchler, T. (2023): Die NLRP3-abhängige Freisetzung von MRP8/14 im neutrophilen Granulozyten. *Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät*.
- Lagasse, E. & Weissman, I. L. (1992): Mouse MRPS and MRP14, Two Intracellular Calcium-Binding Proteins Associated With the Development of the Myeloid Lineage *Blood*, 79, 1907-1915.
- Latz, E., Xiao, T. S. & Stutz, A. (2013): Activation and regulation of the inflammasomes. *Nature Reviews*, 13, 397-411.
- Lemarchand, P., Vaglio, M., Mauel, J. & Markert, M. (1992): Translocation of a Small Cytosolic Calcium-binding Protein (MRP-8) to Plasma Membrane Correlates with Human Neutrophil Activation. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 19379-19382.
- Leukert, N., Vogl, T., Strupat, K., Reichelt, R., Sorg, C. & Roth, J. (2006): Calcium-dependent Tetramer Formation of S100A8 and S100A9 is Essential for Biological Activity. *Journal of Molecular Biology*, 359, 961-972.

- Ley, K., Hoffman, H. M., Kubes, P., Cassatella, M. A., Zychlinsky, A., Hedrick, C. C. & Catz, S. D. (2018): Neutrophils: New insights and open questions. *Science Immunology*, 3, 1-14.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. & Nourshargh, S. (2007): Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology*, 7, 678-689.
- Li, H., Guan, Y., Liang, B., Ding, P., Hou, X., Wei, W. & Ma, Y. (2022a): Therapeutic potential of MCC950, a specific inhibitor of NLRP3 inflammasome *European Journal of Pharmacology*, 928, 1-9.
- Li, J., Shu, X., Xu, J., Su, S. M., Chan, U. I., Mo, L., Liu, J., Zhang, X., Adhav, R., Chen, Q., Wang, Y., An, T., Zhang, X., Lyu, X., Li, X., Lei, J. H., Miao, K., Sun, H., Xing, F., Zhang, A., Deng, C. & Xu, X. (2022b): S100A9-CXCL12 activation in BRCA1-mutant breast cancer promotes an immunosuppressive microenvironment associated with resistance to immunotherapy. *Nature Communications*, 13, 1481-1500.
- Liu, X., Zhang, Z., Ruan, J., Pan, Y., Magupalli, V. G., Wu, H. & Lieberman, J. (2016): Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature*, 535, 153-158.
- Lominadze, G., Rane, M. J., Merchant, M., Cai, J., Ward, R. A. & Mcleish, K. R. (2005): Myeloid-Related Protein-14 Is a p38 MAPK Substrate in Human Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 174, 7257-7267.
- Lu, A., Magupalli, V., Ruan, J., Yin, Q., Atianand, M. K., Vos, M., Schröder, G. F., Fitzgerald, K. A., Wu, H. & Egelman, E. H. (2014): Unified Polymerization Mechanism for the Assembly of ASC- dependent Inflammasomes. *Cell*, 156, 1193-1206.
- Man, S. M. & Kanneganti, T.-D. (2015): Regulation of inflammasome activation. *Immunological Reviews*, 215, 6-21.
- Man, S. M., Karki, R. & Kanneganti, T.-D. (2017): Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. *Immunological Reviews*, 277, 61-75.
- Manceau, H., Chicha-Cattoir, V., Puy, H. & Peoc'h, K. (2017): Fecal calprotectin in inflammatory bowel diseases: update and perspectives. *Clinical Chemistry Lab Med*, 55, 474-483.

- Mantovani, A., Cassatella, M. A., Costantini, C. & Jaillon, S. (2011): Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews*, 11, 519-531.
- Martín-Sánchez, F., Diamond, C., Zeitler, M., Gomez, A., Baroja-Mazo, A., Bagnall, J., Spiller, D., White, M., Daniels, M., Mortellaro, A., Peñalver, M., Paszek, P., Steringer, J., Nickel, W., Brough, D. & Pelegrin, P. (2016): Inflammasome-dependent IL-1beta release depends upon membrane permeabilisation. *Nature Cell Death & Differentiation*, 23, 1219–1231.
- Mellet, L. & Khader, S. A. (2022): S100A8/A9 in COVID-19 pathogenesis: Impact on clinical outcomes *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 63, 90-97.
- Mócsai, A. (2013): Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med*, 210, 1283-1299.
- Morikis, V. A., Chase, S., Wun, T., Chaikof, E. L., Magnani, J. L. & Scott, S. I. (2017): Selectin catch-bonds mechanotransduce integrin activation and neutrophil arrest on inflamed endothelium under shear flow. *Blood*, 130, 2101-2110.
- Mosley, B., Urdal, D. L., Prickett, K. S., Larsen, A., Cosman, D., Conlon, P. J., Gillis, S. & Dower, S. K. (1987): The Interleukin- 1 Receptor Binds the Human Interleukin-1beta Precursor but not the Interleukin-1beta Precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 262, 2941-2944.
- Narumi, K., Miyakawa, R., Ueda, R., Hashimoto, H., Yamamoto, Y., Yoshida, T. & Aoki, K. (2015): Proinflammatory Proteins S100A8/S100A9 Activate NK Cells via Interaction with RAGE. *The Journal of Immunology*, 194, 5539-5548.
- Németh, T., Sperandio, M. & Mócsai, A. (2020): Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 19, 1-23.
- Newton, R. A. & Hogg, N. (1998): The Human S100 Protein MRP-14 Is a Novel Activator of the b2 Integrin Mac-1 on Neutrophils. *The Journal of Immunology*, 160, 1427-1435.
- Nickel, W. & Rabouille, C. (2009): Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nature Reviews*, 10, 148-155.
- Paget, C., Doz-Deblauwe, E., Winter, N. & Briard, B. (2022): Specific NLRP3 Inflammasome Assembling and Regulation in Neutrophils: Relevance in Inflammatory and Infectious Diseases. *Cells*, 11, 1-21.
- Parsons, S. A., Sharma, R., Roccamatysi, D. L., Zhang, H., Petri, B., Kubes, P., Colarusso, P. & Patel, K. D. (2012): Endothelial paxillin and focal adhesion kinase (FAK)

- play a critical role in neutrophil transmigration. *European Journal of Immunology*, 42, 436-446.
- Phillipson, M. & Kubes, P. (2011): The neutrophil in vascular inflammation. *Nature Medicine*, 17, 1381-1390.
- Pruenster, M., Immler, R., Roth, J., Kuchler, T., Bromberger, T., Napoli, M., Nussbaumer, K., Rohwedder, I., Wackerbarth, L. M., Piantoni, C., Hennis, K., Fink, D., Kallabis, S., Schroll, T., Masgrau-Alsina, S., Budke, A., Liu, W., Vestweber, D., Wahl-Schott, C., Roth, J., Meissner, F., Moser, M., Vogl, T., Hornung, V., Broz, P. & Sperandio, M. (2023): E-selectin-mediated rapid NLRP3 inflammasome activation regulates S100A8/S100A9 release from neutrophils via transient gasdermin D pore formation. *Nature Immunology*, 24, 2021-2031.
- Pruenster, M., Kurz, A. R. M., Chung, K.-J., Cao-Eklker, X., Bieber, S., Nussbaum, C. F., Bierschenk, S., Eggersmann, T., Rohwedder, I., Heining, K., Immler, R., Moser, M., Koedel, U., Gran, S., Mcever, R. P., Vestweber, D., Verschoor, A., Leanderson, T., Chavakis, T., Roth, J., Vogl, T. & Sperandio, M. (2015): Extracellular MRP8/14 is a regulator of beta2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. *Nature Communications*, 6, 1-11.
- Pruenster, M., Vogl, T., Roth, J. & Sperandio, M. (2016): S100A8/A9: From basic science to clinical application. *Pharmacology and Therapeutics*, 167, 120-131.
- Rabouille, C. (2017): Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends in Cell Biology*, 27, 1-11.
- Rabouille, C., Malhotra, V. & Nickel, W. (2012): Diversity in unconventional protein secretion. *Journal of Cell Science*, 125, 5251-5255.
- Rammes, A., Roth, J., Goebeler, M., Klempt, M., Hartmann, M. & Sorg, C. (1997): Myeloid-related Protein (MRP) 8 and MRP14, Calcium-binding Proteins of the S100 Family, Are Secreted by Activated Monocytes via a Novel, Tubulin-dependent Pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 9496-9502.
- Robinson, M. J., Tessier, P., Poulson, R. & Hogg, N. (2002): The S100 Family Heterodimer, MRP-8/14, Binds with High Affinity to Heparin and Heparan Sulfate Glycosaminoglycans on Endothelial Cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 3658-3665.
- Rosales, C. (2020): Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Journal of leukocyte biology*, 108, 377-396.
- Roth, J., Burwinkel, F., Van Den Bos, C., Goebeler, M., Vollmer, E. & Sorg, C. (1993): MRPS and MRP14, S-100-Like Proteins Associated With Myeloid

- Differentiation, Are Translocated to Plasma Membrane and Intermediate Filaments in a Calcium-Dependent Manner *Blood*, 82, 1875-1883.
- Rühl, S. & Broz, P. (2021): Regulation of Lytic and Non-Lytic Functions of Gasdermin Pores. *Journal of Molecular Biology*, 434, 167246-167259.
- Rühl, S., Shkarina, K., Demarco, Benjamin, Heilig, R., Santos, J. C. & Broz, P. (2018): ESCRT-dependent membrane repair negatively regulates pyroptosis downstream of GSDMD activation. *Science*, 362, 956-960.
- Sborgi, L., Rühl, S., Mulvihill, E., Pipercevic, J., Heilig, R., Henning, S., Farady, C. J., Müller, D. J., Broz, P. & Hiller, S. (2016): GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *The EMBO Journal*, 35, 1766–1778.
- Schaff, U., Mattila, P. E., Scott, S. I. & Walcheck, B. (2008): Neutrophil adhesion to E-selectin under shear promotes the redistribution and co-clustering of ADAM17 and its proteolytic substrate L-selectin. *Journal of Leukocyte Biology*, 83, 99-105.
- Schmidt, S., Moser, M. & Sperandio, M. (2013): The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Molecular Immunology*, 55, 49-58.
- Schnekenburger, J., Schick, V., Kruger, B., Manitz, M. P., Sorg, C., Nacken, W., Kerkhoff, C., Kahlert, A., Mayerle, J., Domschke, W. & Lerch, M. M. (2008): The Calcium Binding Protein S100A9 Is Essential for Pancreatic Leukocyte Infiltration and Induces Disruption of Cell–Cell Contacts. *Journal of Cellular Physiology*, 216, 558-567.
- Seunghwan Son, S.-H. Y., Byeong Jun Chae, Inhwa Hwang, Do-Wan Shim, Young Ho Choe, Young-Min Hyun and Je-Wook Yu (2021): Neutrophils Facilitate Prolonged Inflammasome Response in the DAMP-Rich Inflammatory Milieu. *Frontiers in Immunology*, 12, 1-15.
- Sharma, B. R. & Kanneganti, T.-D. (2021): NLRP3 inflammasome in cancer and metabolic diseases. *Nature Immunology*, 22, 550-559.
- Shi, H., Zuo, Y., Yalavarthi, S., Gockman, K., Zuo, M., Madison, J. A., Blair, C., Wrenn, W., Lezak, S. P., Lugogo, N. L., Woods, R. J., Lood, C., Knight, J. S. & Kanthi, Y. (2020): Neutrophil calprotectin identifies severe pulmonary disease in COVID-19. *Journal of Leukocyte Biology*, 109, 1-6.
- Shi, J., Gao, W. & Shao, F. (2016): Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Cell*, 42, 245-254.

- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F. & Shao, F. (2015): Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526, 660-665.
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, Y., Gao, W., Ding, J., Li, P., Hu, L. & Shao, F. (2014): Inflammatory caspases are innate immune receptors for intracellular LPS. *Nature*, 514, 187-192.
- Silvestre-Roig, C., Hidalgo, A. & Soehnlein, O. (2016): Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood*, 127, 2173-2181.
- Silvin, A., Chapuis, N., Dunsmore, G., Goubet, A.-G., Dubuisson, A., Derosa, L. & Solary, E. (2020): Elevated calprotectin and abnormal myeloid cell subsets discriminate severe from mild COVID-19. *Cell*, 182, 1401–1418.
- Sipponen, T., Savilahti, E., Kolho, K.-L., Nuutinen, H., Turunen, U. & Färkkilä, M. (2008): Crohn's disease activity assessed by fecal calprotectin and lactoferrin: correlation with Crohn's disease activity index and endoscopic findings. *Inflamm Bowel Dis*, 14, 40-46.
- Sohnle, P. G., Collins-Lech, C. & Wiessner, J. H. (1991): Antimicrobial Activity of an Abundant Calcium-Binding Protein in the Cytoplasm of Human Neutrophils. *J Infect Dis.*, 163, 187-192.
- Sohnle, P. G., Hunter, M. J., Hahn, B. & Chazin, W. J. (2000): Zinc-Reversible Antimicrobial Activity of Recombinant Calprotectin (Migration Inhibitory Factor–Related Proteins 8 and 14). *The Journal of Infectious Diseases*, 182, 1272-1275.
- Sollberger, G., Choidas, A., Burn, G. L., Habenberger, P., Di Lucrezia, R., Kordes, S., Menninger, S., Eickhoff, J., Nussbaumer, P., Klebl, B., Krüger, R., Herzig, A. & Zychlinsky, A. (2018): Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Science Immunology*, 3, 1-12.
- Song, N., Liu, Z.-S., Xue, W., Bai, Z.-F., Wang, Q.-Y., Dai, J., Liu, X., Huang, Y.-J., Cai, H., Zhan, X.-Y., Han, Q.-Y., Wang, H., Chen, Y., Li, H.-Y., Li, A.-L., Zhang, X.-M., Zhou, T. & Li, T. (2017): NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Molecular Cell*, 68, 185-197.
- Sperandio, M., Gleissner, C. A. & Ley, K. (2009): Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunological Reviews*, 230, 97-113.
- Srikrishna, G., Turovskaya, O., Shaikh, R., Newlin, R., Foell, D., Murch, S., Kronenberg, M. & Freeze, H. H. (2005): Carboxylated Glycans Mediate Colitis through Activation of NF- κ B. *The Journal of Immunology*, 175, 5412-5422.

- Stadtman, A., Germena, G., Block, H., Boras, M., Rossaint, J., Sundd, P., Lefort, C., Fisher, C. I., Buscher, K., Gelschefarth, B., Uzainqui, A., Gerke, V., Ley, K. & Zarbock, A. (2013): The PSGL-1–L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow. *Journal of Experimental Medicine*, 210, 2171-2180.
- Stark, M. A., Huo, Y., Burcin, T. L., Morris, M. A., Olson, T. S. & Ley, K. (2005): Phagocytosis of Apoptotic Neutrophils Regulates Granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22, 285–294.
- Steinbakk, M., Naess-Andresen, C.-F., Fagerhol, M. K., Lingaas, E., Dale, I. & Brandtzaeg, P. (1990): Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *The Lancet*, 333, 763-765.
- Sturm, A., Atreya, R., Bettenworth, D., Bokemeyer, B., Dignaß, A., Eehalt, R., Germer, C., Grunert, P. C., Helwig, U., Herrlinger, K., Kienle, P., Kreis, M. E., Kucharzik, T., Langhorst, J., Maaser, C., Ockenga, J., Ott, C., Siegmund, B., Zeißig, S. & Stallmach, A. (2021): Aktualisierte S3-Leitlinie „Diagnostik und Therapie des Morbus Crohn“ der Deutschen Gesellschaft für Gastroenterologie, Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). *Z Gastroenterol*, 60, 332-418.
- Takeda, K., Kaisho, T. & Akira, S. (2003): Toll-like Receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 21, 335-376.
- Tecchio, C. & Cassatella, M. A. (2016): Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Seminars in Immunology*, 28, 1-10.
- Urban, C. F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P. R. & Zychlinsky, A. (2009): Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense against *Candida albicans*. *PLOS Pathogens*, 5, 1-18.
- Vajjhala, P. R., Mirams, R. E. & Hill, J. M. (2012): Multiple Binding Sites on the Pyrin Domain of ASC Protein Allow Self-association and Interaction with NLRP3 Protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 41732-41743.
- Van Den Bos, C., Roth, J., Koch, H. G., Hartmann, M. & Sorg, C. (1996): Phosphorylation of MRP14, an S100 Protein Expressed During Monocytic Differentiation, Modulates Ca²⁺-Dependent Translocation from Cytoplasm to Membranes and Cytoskeleton. *J Immunol*, 156, 1247-1254.
- Van Lent, P., Grevers, L., Blom, A. B., Sloetjes, A., Mort, J. S., Vogl, T., Nacken, W., Van Den Berg, W. B. & Roth, J. (2008): Myeloid-related proteins

- S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis*, 67, 1750-1758.
- Vernia, F., Ruscio, M. D. & Latella, G. (2019): Is fecal calprotectin an accurate marker in the management of Crohn's disease? *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 35, 390-400.
- Voganatsi, A., Panyutich, A., Miyasaki, K. T. & Murthy, R. K. (2001): Mechanism of extracellular release of human neutrophil calprotectin complex. *Journal of Leukocyte Biology*, 70, 130-134.
- Vogl, T., Gharibyan, A. L. & Morozova-Roche, L. A. (2012): Pro-Inflammatory S100A8 and S100A9 Proteins: Self-Assembly into Multifunctional Native and Amyloid Complexes. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 2893-2917.
- Vogl, T., Leukert, N., Barczyk, K., Strupat, K. & Roth, J. (2006): Biophysical characterization of S100A8 and S100A9 in the absence and presence of bivalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1763, 1298–1306.
- Vogl, T., Ludwig, S., Goebeler, M., Strey, A., Thorey, I. S., Reichelt, R., Foell, D., Gerke, V., Manitz, M. P., Nacken, W., Werner, S., Sorg, C. & Roth, J. (2004): MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*, 104, 4260-4268.
- Vogl, T., Roth, J., Sorg, C., Hillenkamp, F. & Strupat, K. (1999): Calcium-Induced Noncovalently Linked Tetramers of MRP8 and MRP14 Detected by Ultraviolet Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom*, 10, 1124-1130.
- Vogl, T., Tenbrock, K., Ludwig, S., Leukert, N., Ehrhardt, C., Van Zoelen, M. a. D., Nacken, W., Foell, D., Van Der Poll, T., Sorg, C. & Roth, J. (2007): Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nature Medicine*, 13, 1042-1049.
- Wache, C., Klein, M., Ostergaard, C., Angele, B., Häcker, H., Pfister, H.-W., Pruenster, M., Sperandio, M., Leanderson, T., Roth, J., Vogl, T. & Koedel, U. (2015): Myeloid-Related Protein 14 Promotes Inflammation and Injury in Meningitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 212, 247-257.
- Wang, Y. & Shao, F. (2021): NINJ1, rupturing swollen membranes for cataclysmic cell lysis. *Molecular Cell*, 81, 1370-1371.
- Xia, S., Zhang, Z., Magupalli, V. G., Pablo, J. L., Dong, Y., Vora, S. M., Wang, L., Fu, T.-M., Jacobson, M. P., Greka, A., Lieberman, J., Ruan, J. & Wu, H. (2021):

- Gasdermin D pore structure reveals preferential release of mature interleukin-1. *Nature*, 593, 607-611.
- Xia, X., Wang, X., Zheng, Y., Jiang, J. & Hu, J. (2018): What role does pyroptosis play in microbial infection? *The Journal of Cellular Physiology*, 234, 7885-7892.
- Xu, T., Chen, L., Shang, X., Cui, L., Luo, J., Chen, C., Ba, X. & Zeng, X. (2008): Critical role of Lck in L-selectin signaling induced by sulfatides engagement. *Journal of Leukocyte Biology*, 84, 1192-1201.
- Yao, A. T. a. Y. (2015): Neutrophil plasticity: acquisition of phenotype and functionality of antigen-presenting cell. *Journal of Leukocyte Biology*, 98, 489-496.
- Yow, S. J., Yeap, H. W. & Chen, K. W. (2022): Inflammasome and gasdermin signaling in neutrophils. *Mol Microbiol.*, 117, 961-972.
- Yu, P., Zhang, X., Liu, N., Tang, L., Peng, C. & Chen, X. (2021): Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapies*, 6, 1-21.

8.2 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Markus Sperandio für die Möglichkeit bedanken in seiner Arbeitsgruppe an meinem Dissertationsthema arbeiten zu können. Hier möchte ich mich insbesondere für die individuelle und sehr intensive Betreuung durch ihn und Dr. Monika Prünster bedanken. Dies hat grundlegend dazu beigetragen mein Interesse und meine Begeisterung für das wissenschaftliche Arbeiten zu wecken. Darüber hinaus habe ich vor allem von der ideellen Förderung im Rahmen von Seminaren und Retreats des Sonderforschungsbereich SFB914 profitiert. Ich möchte mich zusätzlich bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe bedanken, die mich während meiner Arbeit im Labor tatkräftig unterstützt haben, insbesondere bei Dr. Roland Immler und Dr. Ina Rohwedder. Abschließend möchte ich meiner Partnerin Ellen, ihren Eltern und meiner Familie einen großen Dank für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion aussprechen.

8.3 Publikationen

Roth J, Raya E, Hücker S, Körkel-Qu H, Seitz S, Klein C.A. Characterization of EpCAM-positive cells for specific detection of disseminated cancer cells in bone marrow of early breast cancer patients. AACR Annual Meeting 2024, San Diego. Abstract number 3708.

Pruenster, M., Immler, R., Roth, J., Kuchler, T., Bromberger, T., Napoli, M., Nussbaumer, K., Rohwedder, I., Wackerbarth, L. M., Piantoni, C., Hennis, K., Fink, D., Kallabis, S., Schroll, T., Masgrau-Alsina, S., Budke, A., Liu, W., Vestweber, D., Wahl-Schott, C., Roth, J., Meissner, F., Moser, M., Vogl, T., Hornung, V., Broz, P. & Sperandio, M. (2023): E-selectin-mediated rapid NLRP3 inflammasome activation regulates S100A8/S100A9 release from neutrophils via transient gasdermin D pore formation. *Nature Immunology*, 24, 2021-2031.

Immler R, Lange-Sperandio B, Steffen T, Beck H, Rohwedder I, Roth J, Napoli M, Hupel G, Pfister F, Popper B, Uhl B, Mannell H, Reichel CA, Vielhauer V, Scherberich J, Sperandio M, Pruenster M. (2022): Extratubular Polymerized Uromodulin Induces Leukocyte Recruitment and Inflammation *In Vivo*. *Front Immunol.*, 11, 1-16.

8.4 Eidesstattliche Versicherung

	LUDWIG- MAXIMILIANS- UNIVERSITÄT MÜNCHEN	Promotionsbüro Medizinische Fakultät		
Eidesstattliche Versicherung				

Roth, Jonas

Name, Vorname

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

Die NLRP3-abhängige Bildung transient auftretender GSDMD-Poren in neutrophilen Granulozyten

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

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

Regensburg, 18.01.2025

Ort, Datum

Jonas Roth

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand