

Aus der
Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin III
(Schwerpunkt: Kardiologie und Angiologie)

**Einfluss des Chemokins SDF-1/CXCL12 auf die Bildung
von Protein-Arginin-Deiminase Typ-4 (PAD4)-
vermittelten Neutrophil Extrazellulär Traps (NETs)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jann Arden

2024

Dekan:

Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter:

Professor Dr. O. Borst

2. Berichterstatter:

Professorin Dr. S. Beer-Hammer

Tag der Disputation: 27.02.2024

Für meine Familie.

1. Inhaltsverzeichnis

2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	4
3. TABELLENVERZEICHNIS	5
4. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
5. EINLEITUNG	8
6. MATERIAL UND METHODEN	25
7. ERGEBNISSE	40
8. DISKUSSION	50
9. ZUSAMMENFASSUNG	60
10. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL	61
11. DANKSAGUNG	62
12. LITERATURVERZEICHNIS	63

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	NETose in konfokalmikroskopischer Aufnahme	11
Abbildung 2	Zelluläre Mechanismen der NETose	13
Abbildung 3	Intrazelluläres Signaling von SDF-1/CXCL12	22
Abbildung 4	Arbeitsstruktur der durchgeführten Experimente	31
Abbildung 5	Exemplarische Darstellung der immunzytochemischen Bestimmung von NETose	34
Abbildung 6	Analyseablauf der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie zur automatisierten Bestimmung von NETose	36
Abbildung 7	Gegenüberstellung der NETose neutrophiler Granulozyten nach Stimulation ohne Zugabe von BSA	42
Abbildung 8	Gegenüberstellung der NETose neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit Zugabe von BSA	44
Abbildung 9	Präinkubation neutrophiler Granulozyten mit SDF-1/CXCL12 sowie nachfolgender Stimulation	47
Abbildung 10	PAD4-Expression nach Inkubation mit SDF-1/CXCL12	48

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	SDF-1/CXCL12 Splicevarianten	20
Tabelle 2	Primär- und Sekundärantikörper	25
Tabelle 3	Hersteller-Kits	25
Tabelle 4	Verwendete Stimulanzen	26
Tabelle 5	Verwendete Farbstoffe	26
Tabelle 6	Verwendete Chemikalien	26
Tabelle 7	Verwendete Verbrauchsmaterialien	27
Tabelle 8	Verwendete Geräte	29
Tabelle 9	Herstellung des Nährmediums	30
Tabelle 10	Permeabilisierungspuffer	32
Tabelle 11	Blocking-Puffer	32
Tabelle 12	Standardeinstellungen Fluoreszenzmikroskopie	33
Tabelle 13	Trenn- und Sammelgele	38
Tabelle 14	Verwendete Software	39

4. Abkürzungsverzeichnis

1	7TMR	G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen
2	ACKR3	Atypischer Chemokinrezeptor
3	Akt	Proteinkinase B/ Serin-Threonin-Kinase
4	APL	Akute Promyelozytenleukämie
5	APS	Ammoniumperoxodisulfat
6	AquaDest	Destilliertes Wasser
7	ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrom
8	BSA	Bovines Serumalbumin
9	CXCL12	CXC-Motiv-Chemokin 12
10	Cy5	Cyanin 5.5 NHS-Ester
11	DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
12	DNA	Desoxyribonukleinsäure
13	EAM	Experimentell autoimmun induzierte Myokarditis
14	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
15	GAG	Glykosaminoglykane
16	G-CSF	Granulozyten-kolonie-stimulierender Faktor
17	gp120	Glykoprotein 120
18	H3Cit	Citruliniertes Histon H3
19	H4Cit3	Citruliniertes Histon H4
20	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Puffersubstanz)
21	HMGB1	High mobility group box 1
22	ICC	Immunzytochemie
23	IL-1 β	Interleukin 1 β
24	kDA	Kilodalton
25	LESTR	Leukocyte-derived seven transmembrane domain receptor
26	LPS	Lipopolysaccharid
27	mAB	Monoklonaler Antikörper
28	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
29	MPO	Myeloperoxidase
30	NaCl	Natrium-Chlorid

31	NADPH.....	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
32	NE	Neutrophile Elastase
33	NETose	Prozess zur Bildung Neutrophil extracellular traps
34	NFkB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
35	NLRP3.....	NLR family pyrin domain containing 3
36	p53	p53-Protein
37	p65	Protein p65
38	PAD4	Protein-Arginin-Deiminase Typ-4
39	PBS	Phosphate buffered saline
40	PFA	Paraformaldehyd
41	PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
42	PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
43	PMNs	Polymorphkernige Neutrophile Granulozyten
44	ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
45	RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute)
46	SDF-1.....	Stromal cell-derived factor-1
47	SDS.....	Natriumdodecylsulfat
48	STEMI	ST-elevation myocardial infarction
49	TEMED.....	Tetraethylmethyldiamin
50	TNF-alpha	Tumornekrosefaktor alpha
51	TWEEN	Polyethylenglykol-Sorbitan-Fettsäureester

5. Einleitung

5.1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten stellen im menschlichen Organismus den größten Anteil der zirkulierenden Leukozyten im peripheren Blut dar. Ihre Reifung erfolgt im Knochenmark, aus dem sie nach Durchlaufen verschiedener Reifungsstadien freigesetzt werden. Zirkulierende Stamm- und Progenitorzellen werden hierbei ebenfalls ins periphere Blut ausgeschwemmt. Die Rezirkulation von Vorläuferstadien und ausgereiften Granulozyten ins Knochenmark, auch als Homing bezeichnet, wird durch Chemokine wie CXCL12/SDF-1 vermittelt [1]. Die Lebensdauer von ausgereiften neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut ist sehr gering. So liegt die Halbwertszeit im Regelfall gerade einmal bei 6-10 Stunden, kann jedoch unter bestimmten Umständen auch weit darüber hinaus gehen [2-4]. Die Produktion erfolgt nach Stimulation durch den Granulozyten-Kolonie-Stimulierenden-Faktor (G-CSF), welcher in engem Kontakt mit weiteren Stimulanzen steht, wodurch die Granulozyten-Produktion in Anpassung an systemisch-inflammatorische Prozesse gesteigert oder heruntergefahren wird [4]. Als Teil des angeborenen und unspezifischen Immunsystems vermitteln neutrophile Granulozyten die Erstantwort der Immunabwehr gegenüber Pathogenen wie Bakterien, Pilzen und Viren [3, 5].

Zirkulierende neutrophile Granulozyten interagieren mit verschiedenen Zelltypen wie Endothelzellen und Thrombozyten über die Ausbildung von Adhäsionsrezeptoren wie P-Selectin und E-Selectin und werden so in geschädigtes Gewebe mit steriler oder pathogenassoziierter Inflammation rekrutiert [6, 7]. Sie sind somit die ersten Immunzellen am Ort der Inflammation. Bereits intravasal kommt es zur Voraktivierung (Priming) durch proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor Alpha (TNF-Alpha) und Interleukin 1 β (IL-1 β) [8]. Das Priming soll eine akzidentielle Aktivierung von ruhenden Granulozyten vermeiden und somit eine pathologische Immunantwort verhindern. Im Rahmen systemischer inflammatorischer Prozesse, wie beispielsweise einer Sepsis, kann es jedoch zur pathologischen Voraktivierung von zirkulierenden Granulozyten mit dysfunktionalem Verhalten kommen [9].

Nach transvasaler Migration ins Zielgewebe folgen neutrophile Granulozyten einem Chemokingradienten, der wesentlich durch SDF-1/CXCL12 hervorgerufen wird [10-13]. Eine nachfolgende Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und ihres Signalweges gibt hierbei die Richtung der Neutrophilendiapedese vor [14]. Die finale Aktivierung der Granulozyten im Zielgewebe erfolgt durch direkte Interaktion mit proinflammatorischen Zytokinen [15].

Die physiologischen Funktionen neutrophiler Granulozyten sind weit gefächert und umfassen unter anderem die Freisetzung von Chemokinen, Enzym- und Peptidsekretion, Phagozytose, Chemotaxis, sowie die Produktion und Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale (Reactive oxygen species, ROS) [3]. Die Erregerabwehr umfasst im Wesentlichen zwei voneinander abgrenzbare Vorgänge: Phagozytose und Degranulation. Neutrophile Granulozyten betreiben überaus potente Phagozytose, indem sie innerhalb weniger Minuten den Erreger über das sogenannte Phagosom aufnehmen und nach Verschmelzung mit Lysosomen im so entstehenden Phagolysosom durch Bildung von ROS degradieren können [9]. Dieser Mechanismus dient nicht nur der direkten Erregerabwehr, sondern kann zudem durch Antigenpräsentation auch zur Aktivierung und Beeinflussung des adaptiven Immunsystems führen [7]. Zur extrazellulären Erregerabwehr stehen den neutrophilen Granulozyten verschiedene zytoplasmatische Granula zur Verfügung, die nach Aktivierung schrittweise in die Umgebung entleert werden können. Nach Bindung eines Liganden kommt es durch einen intrazellulären Kalziumanstieg zur Fusion der Granula mit der Zellmembran. Primäre Granula tragen überwiegend lytische und degenerative Substanzen wie Myeloperoxidasen (MPO), Proteasen, Elastasen und Defensine und dienen der direkten Erregerabwehr [9]. Sekundäre und tertiäre Granula bewirken die Freisetzung von Mediatoren und Zytokinen, welche die Immunreaktion vorantreiben. Zur Beseitigung extrazellulärer Erreger stehen über die klassischen Abwehrmechanismen hinaus auch sogenannte Neutrophile Extrazelluläre Traps (NETs) zur Verfügung. NETs sind netzartige, dekondensierte extrazelluläre DNA-Konglomerate, welche das Binden zirkulierender Pathogene ermöglichen und deren weitere Ausbreitung reduzieren

[9, 16, 17]. Sie sind zusätzlich mit bakteriziden Substanzen wie Proteasen, Elastasen, oder antimikrobiellen Histonen besetzt [9]. Durch dieses breite Spektrum an Abwehrmechanismen sind neutrophile Granulozyten hochpotente Abwehrzellen des angeborenen Immunsystems. Daneben kann es aber auch zu einer überschießenden Reaktion neutrophiler Granulozyten kommen. Im Rahmen von systemischer Inflammation sind hierbei oft ausgeprägte Gewebeschäden und Thrombosen die Folge [9, 18-28]. Dies unterstreicht die physiologische, jedoch auch die pathologische Bedeutung von neutrophilen Granulozyten und insbesondere NETs im Rahmen der Immunabwehr, inflammatorischer Prozesse und der Entstehung verschiedener Krankheitsbilder.

Am Ende ihrer Lebensspanne werden überalterte Granulozyten in Leber, Milz oder Knochenmark durch Apoptose abgebaut und durch Makrophagen phagozytiert. Eine Sonderform des programmierten Zelltodes ist die NETose. Sie tritt als funktioneller Bestandteil von aktivierten neutrophilen Granulozyten während der Bildung von NETs und bei der Erregerabwehr oder Inflammation auf [4, 27, 29].

5.2 Neutrophil Extracellular Traps (NETs)

NETs bilden sich ausgehend von neutrophilen Granulozyten und übernehmen im Rahmen des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung unterschiedlichster Pathogene [29]. Sie bestehen aus extrazellulär dekondensiertem und wabenartig vernetztem Chromatin mit einer Porengröße von ungefähr 200 nm [30]. Im Bereich der NETs treten assoziierte Proteine auf, welche ursprünglich in den zellulären Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert waren [31], sowie zytoplasmatisch oder im Nukleus vorlagen (siehe Abbildung 1). Hierzu zählen vor allem citrullinierte Histone, die entscheidend für die zellulären Mechanismen der NETose sind [16], sowie bakterizide Enzymstrukturen wie neutrophile Elastase (NE) und Myeloperoxidasen (MPO) [32]. 1996 wurde erstmalig eine neue Form des Zelltodes neutrophiler Granulozyten entdeckt, welche weder der Apoptose, noch der Nekrose entspricht [33]. Der Begriff *Neutrophil Extracellular Traps* wurde aber erstmals 2004 durch

Brinkmann et. al. geprägt [29]. Die allgemeine Vorstellung ordnete hierbei NETs dem frühen Stadium des Zellunterganges neutrophiler Granulozyten zu [29].

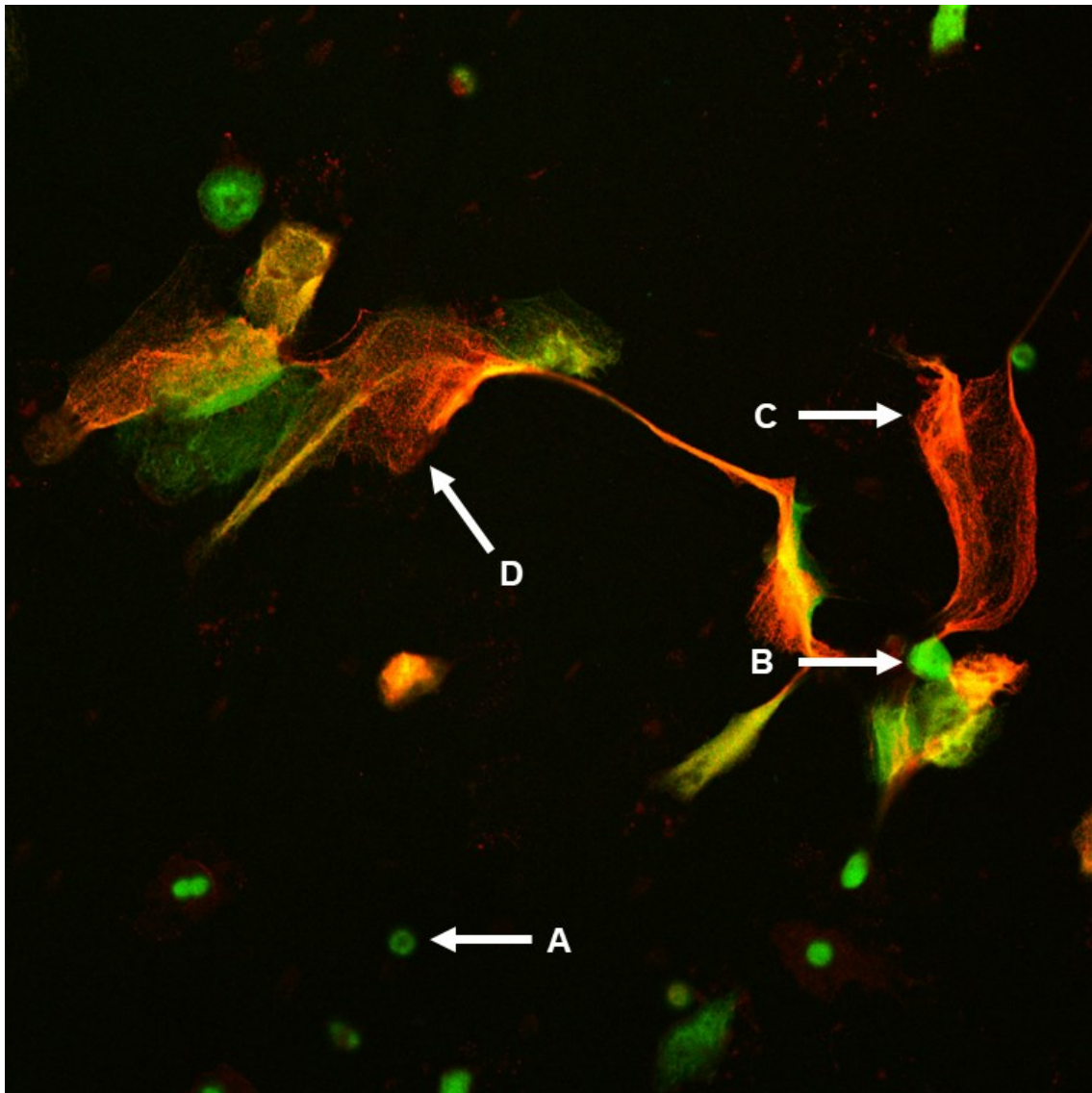


Abbildung 1: Konfokalmikroskopische Aufnahme von Ionomycin-stimulierten humanen neutrophilen Granulozyten. Anfärbung durch DAPI (grün), SytoxGreen (rot) und H4Cit als Marker citrullinierter Histone (gelb). A: Zellkern eines unstimulierten neutrophilen Granulozyten; B: Stimulierter Neutrophiler Granulozyt; C: SytoxGreen angefärbtes NET; D: NET (neutrophile Elastase positiv, H4Cit positiv). Eigene, unveröffentlichte Aufnahme.

Inzwischen ist jedoch bekannt, dass die Bildung von NETs nicht zwangsläufig zum Zelltod neutrophiler Granulozyten führt, was als vitale NETose bezeichnet wird [34]. Die typischen Eigenschaften und Funktionen neutrophiler Granulozyten, wie Phagozytose und Chemotaxis, bleiben hierbei auch über die

NETose hinaus bestehen [35]. Voraussetzung für den Ablauf einer vitalen NETose ist ein funktionierender Vesikeltransport, der das dekondensierte Chromatin zur Freisetzung an die Zelloberfläche befördert [17]. Ob Granulozyten vitale oder lytische NETose durchlaufen, scheint hierbei vom zugeführten Stimulus und der jeweiligen Situation abhängig zu sein, was den Schluss nahelegt, dass neben unterschiedlichen Aktivierungswegen auch unterschiedliche Signalwege beteiligt sein können [34, 35].

5.3 Zelluläre Mechanismen der NETose

Der Ablauf der NETose ist in Abbildung 2 dargestellt und lässt sich in die sechs Schritte Initiation, zytoskeletale Umordnung, Histon-Citrullinierung, Chromatin-Dekondensation, intrazelluläre DNA-Freisetzung, und extrazelluläre DNA-Freisetzung unterteilen [16]. Die genauen zu Grunde liegenden molekularen Signalmechanismen der NETose sind bisher jedoch nur unzureichend geklärt und bedürfen weiterer Forschungsarbeiten.

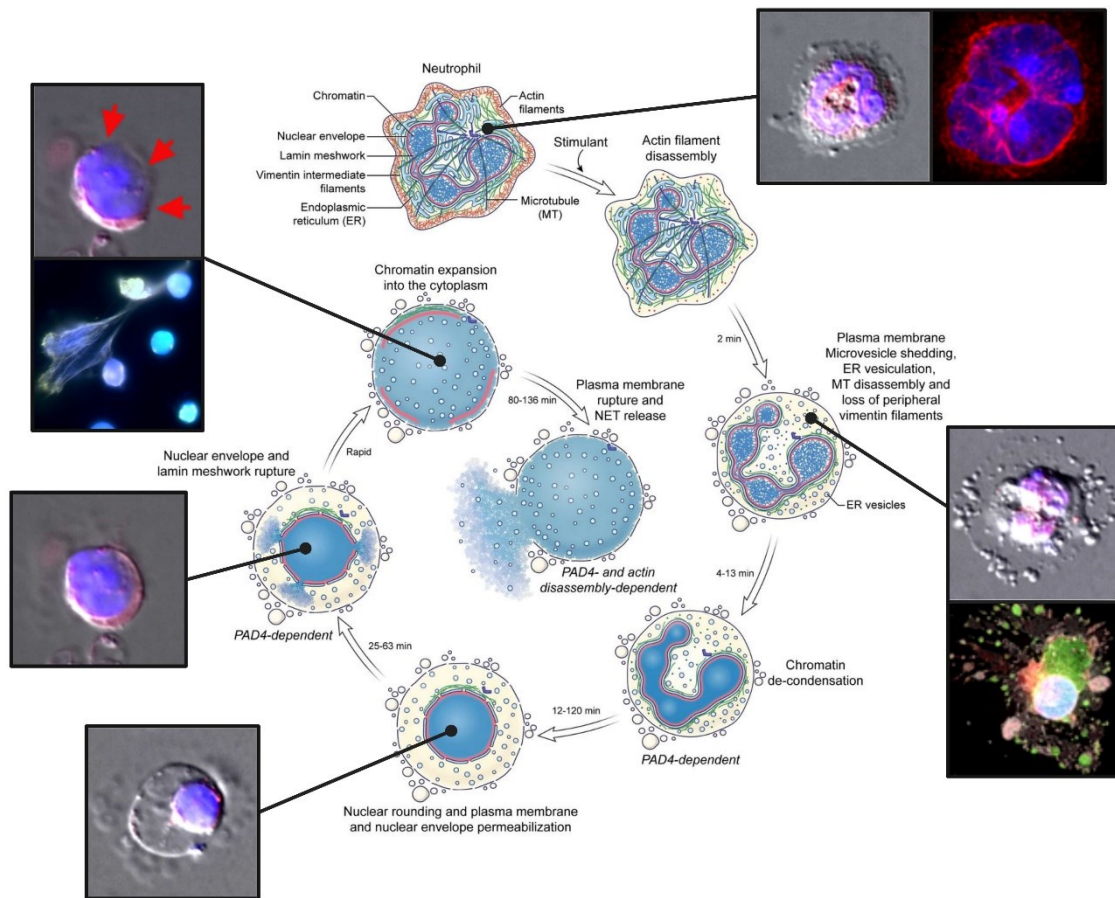


Abbildung 2 Modell der zellulären Abfolge während der NETose sowie deren Regulatoren. Nach Stimulation kommt es zum Umbau und Destabilisierung des Zytoskelettes sowie vermehrter Abschnürung von Vesikeln. Chromatin dekondensiert in Abhängigkeit von PAD4, sodass sich der Nukleus abrundet und die Membran permeabilisiert wird. Nach Freisetzung des dekondensierten Chromatins ins Zytosol kommt es zur Ruptur der Zellmembran und extrazellulären Freisetzung der NETs. Übernommen aus Annual Review of Cell and Developmental Biology, Volume 36, 2020, Thiam, pp 191-218 [16]. Adaptiert durch eigene Aufnahmen der Arbeitsgruppe.

5.3.1 Initiation

Die Stimulation und Induktion der NETose kann durch verschiedene Mediatoren erfolgen. Insbesondere bakterielle Ionophore und Toxine wie das Kalium-Ionophor Nigericin oder das Calcium-Ionophor Ionomycin können NETose ohne Einbeziehung von Oberflächenrezeptoren auslösen [16]. Des Weiteren ist eine Auslösung NETotischer Prozesse durch den Proteinkinase C-Aktivator Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) mit nachfolgender NADPH-Aktivierung und Bildung von freien Sauerstoffradikalen (ROS) beschrieben [16]. ROS stellen nicht nur einen Weg der Stimulation von NETose dar, sondern dienen auch der direkten

Erregerabwehr [36]. Rezeptorvermittelte Aktivierungswege durch Lipopolysaccharide (LPS) erfolgen über Toll-Like-Rezeptoren (TLR), zum Beispiel TLR4, mit intrazellulärer Bindung von Adaptermolekülen wie MyD88 [34]. Besonders hohe Assoziation zu Toll-Like-Rezeptoren weisen die proinflammatorischen Interleukine IL-1 β und IL-6 auf [37]. Unabhängig vom Stimulationsweg kommt es nach Aktivierung der neutrophilen Granulozyten zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration [38]. Hier scheint das Enzym Peptidylarginin-Deiminase Typ IV (PAD4) eine wichtige Rolle zu spielen [39]. PAD4 ist ein Kalzium-abhängiges Enzym und wird deshalb insbesondere durch einen Kalziumanstieg aktiviert [40].

5.3.2 Umordnung des Zytoskelettes

Ein weiterer wichtiger früher Vorgang im Rahmen der NETose ist der Umbau des Filamentsystems. Er ist einer der ersten messbaren Schritte nach Stimulation von neutrophilen Granulozyten [41, 42]. Der Umbau des Zytoskeletts scheint sowohl durch Kalzium, als auch durch ROS stimuliert zu werden [16, 43]. PAD4 scheint zusätzlich das Intermediärfilament Vimentin zu citrullinieren, was wiederum zu einer Instabilität des Filamentsystems und zu einer zusätzlichen Stimulation der NETose führt [22]. Es konnte gezeigt werden, dass eine aktive Stabilisierung des Aktinfilamentsystems den Vorgang der NETose unterbinden kann, was die Bedeutung eines aktivierten und flexiblen Filamentsystems für die NETose unterstreicht [41, 42].

5.3.3 Chromatin-Dekondensation und Citrullinierung durch PAD4

Die Familie der Peptidylarginin-Deiminasen umfasst im Wesentlichen fünf Subtypen, die unterschiedliche organspezifische Expressionsmuster aufweisen. Die Isoform 4 (PAD4) ist hierbei besonders stark in Leukozyten und insbesondere Granulozyten nachweisbar. Als einzige Unterform trägt PAD4 zusätzlich ein nukleäres Lokalisationssignal, was für die weiteren Vorgänge der NETose von entscheidender Bedeutung ist [44]. PAD4 weist fünf Bindungsstellen für Kalzium-Ionen auf, was die Rolle von Kalzium zur Regulation und Aktivierung von PAD4 unterstreicht [45].

Die Aktivierung von PAD4 vermittelt eine vermehrte Citrullinierung nukleärer Histone [46-50]. Citrullinierung beschreibt die Abspaltung von Ammoniak von der Aminosäure Arginin. Dies führt zu einer Reduktion der Molekülmasse sowie dem Verlust einer positiven Ladung und bringt die nicht-proteinogene α -Aminosäure L-Citrullin hervor [51]. Posttranslationale Citrullinierung von Histonen scheint insgesamt einen wesentlichen Einfluss auf die Chromatin-Dekondensation zu haben, da negativ geladene DNA keine elektrostatische Bindungsaffinität mehr zu den nun neutral geladenen citrullinierten Histonen aufweist und das Nukleosom als Organisationseinheit der DNA somit aufgelöst wird [50]. Die Chromatin-Dekondensation ist als spezifischer Marker der NETose anerkannt und stellt somit ein wichtiges Differenzierungsmerkmal gegenüber anderen Formen des Zelltodes dar [52, 53]. Auf die zentrale Bedeutung von PAD4 für die NETose weist neben seiner Fähigkeit zur Citrullinierung auch seine überproportionale Expression in neutrophilen Granulozyten hin [46, 49]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass PAD4-defiziente murine neutrophile Granulozyten in vivo und in vitro keine NETose vollziehen können [54]. Obwohl PAD4 in steriler wie pathogenassoziiertes Inflammation eine zentrale Rolle zu spielen scheint, ist seine Aktivierung abhängig vom jeweiligen Stimulus [16]. So kann trotz pharmakologischer Inhibition von PAD4 dennoch NETose durch Phorbol-12-myristate 13-acetate (PMA) oder Nigericin induziert werden [55]. Nach erfolgreicher Citrullinierung der Histone durch PAD4 erfolgt anschließend die Dekondensierung des Chromatins.

5.3.4 Freisetzung dekondensierten Chromatins ins Zytosol

Damit das dekondensierte Chromatin den Zellkern verlassen kann, kommt es zu einer Umordnung nukleärer Laminstrukturen sowie einer Porenbildung des Nucleus [16]. Aus den entstandenen Lamin-Diskontinuitäten kann die DNA ins Zytosol freigesetzt werden [42], wo sie sich mit zytosolischen Bestandteilen und Proteinen vermischt. Im Rahmen der suizidalen NETose kommt es durch DNA-Freisetzung ins Zytosol zu einer Abrundung und anschließender Ruptur des Zellkerns und zur Freisetzung des Chromatins ins Zytosol. [16]. Der Transport aus dem Zellkern kann auch durch die Abschnürung von Vesikeln geschehen,

was insbesondere beim Vorgang der vitalen NETose eine wichtige Rolle zu spielen scheint [17, 56].

5.3.5 Freisetzung extrazellulärer DNA

Nachdem die dekondensierte DNA ins Zytosol gelangt ist, kommt es zu einer Permeabilisierung der Zellmembran [42]. Hierbei bilden sich Poren mit einer Größe von bis zu 70 kDa, welche den Durchtritt größerer Moleküle ermöglichen [42]. Minuten bis Stunden nach Permeabilisierung der Plasmamembran kommt es schließlich zur Ruptur der Zelle und Freisetzung der NETs [42]. Die Ruptur der Plasmamembran scheint hierbei stark vom Grad der Chromatin-Schwellung abhängig zu sein [41]. Eine Besonderheit stellt die Form der vitalen NETose dar, bei der die DNA aus dem Zytosol über Exozytose in die Umgebung abgegeben werden kann und es zu keiner Ruptur des Zellkerns oder der Zellmembran kommt [17].

5.4 Neutrophil extracellular Traps (NETs) in pathologischen Prozessen

NETs stellen im Rahmen der unspezifischen Erregerabwehr durch neutrophile Granulozyten einen wesentlichen funktionellen Schritt dar: Die Produktion von NETs wird insbesondere durch pathogenassoziierte Stimuli ausgelöst, was wiederum den Prozess der Pathogenbeseitigung durch sogenanntes Trapping unmittelbar unterstützt und dadurch die Ausbreitung der Erreger verhindert. Dies erfolgt entweder durch direkte Toxizität der NETose-assoziierten Substanzen oder durch Immobilisation der Pathogene mit nachfolgender Phagozytose [27]. Das Spektrum abgewehrter Erreger umfasst hierbei eine große Bandbreite, wie Bakterien und Viren, aber auch Pilze und Parasiten [27].

Neben dieser unspezifischen Erregerabwehr scheint NETose auch zunehmend im Kontext von Immunthrombose und Thrombo-inflammation, unkontrollierter pro-inflammatorischer und steriler inflammatorischer Prozesse und damit verbundener Zellschädigung eine wichtige Rolle zu spielen, die zunehmend erforscht wird. So zeigen sie unter anderem in kardiovaskulären Erkrankungen, rheumatischen und neoplastischen Pathologien eine relevante Beteiligung, um nur einige wenige Beispiele zu nennen [24, 27, 28, 57]. Gleichzeitig lässt sich diese Inflammation auch in umgekehrter Reihenfolge beobachten. Insbesondere

Thrombozyten zeigen Interaktionspotenzial mit neutrophilen Granulozyten und führen neben ihrer Rekrutierung auch die Initiation von NETose [58-60].

Die besondere klinische Bedeutung von NETs zeigte sich im Rahmen der durch das Coronavirus SARS-CoV-2 ausgelösten Covid-19 Erkrankungswelle, welche sich zu einer pandemischen Lage internationaler Tragweite ausweitete [61]. Neben klassischer Beteiligung der unteren Atemwege hat sich inzwischen gezeigt, dass es sich bei Covid-19 nicht nur um eine lokale, sondern vielmehr eine systemische hyperinflammatorische Multiorganerkrankung handelt [62, 63]. So wurde neben der Schwere des Lungenversagens auch mehrfach das Auftreten Covid-19 assoziierter Myokarditiden und damit verbundenen Rhythmusstörungen beobachtet. Man nimmt an, dass diese nicht nur durch direkte Virusschädigung hervorgerufen werden, sondern auch durch körpereigene, oft als Zytokinsturm bezeichnete, Hyperinflammationsprozesse [62, 64]. Die Rolle der neutrophilen Granulozyten wird hierbei durch eine Verschiebung des Lymphozyten-Neutrophilen Gradienten zu Gunsten der neutrophilen Granulozyten [65] und der damit verbundenen prognostischen Aussagekraft für den Verlauf einer Covid-19-Erkrankung verdeutlicht [66]. In Folge dieser Hochregulation von neutrophilen Granulozyten zeigt sich eine Vermehrung der NET-Produktion, welche insbesondere in geschädigtem Gewebe (wie zum Beispiel Lungengewebe im Rahmen des akuten Lungenversagens ARDS) nachgewiesen werden konnte [62]. Die Gewebeschädigung erfolgt hierbei auch durch im Rahmen der NETose vermehrt freigesetzten Enzymen wie neutrophile Elastasen (NE), Myeloperoxidasen (MPO) [23, 67] oder durch NETose hervorgerufene Mikrothromben und resultierenden Zirkulationsstörungen [18, 20, 68, 69], was schlussendlich in Multiorganversagen resultiert.

Darüber hinaus fanden sich in für Covid-19 typischen Thrombenformationen vermehrt NETs sowie eine erhöhte Thrombozyten-Neutrophilen-Interaktion, was die Bedeutung neutrophiler Granulozyten sowohl im Rahmen der Covid-19 Erkrankung, als auch im Rahmen der Thrombusbildung unterstreicht [18, 69]. Auch in weiteren metabolischen Erkrankungen, wie Diabetes Mellitus und Adipositas, besteht eine niedrigschwellige, permanente Entzündungsreaktion,

die wiederum das Auftreten von NETs und damit einhergehende Inflammation sowie ein Fortschreiten der Erkrankung begünstigt [24, 27, 70]. Diabetische neutrophile Granulozyten zeigen hohe Expressionslevel von PAD4 und sind für NETose voraktiviert, was insbesondere die Wundheilung diabetischer Patienten negativ beeinflusst [71].

Im Rahmen artherothrombotischer Erkrankungen und Läsionen wie zum Beispiel einem akuten Myokardinfarkt scheinen NETs bereits im frühen Stadium eine Rolle zu spielen. So interagieren sie mit Thrombozyten, die ihrerseits neutrophile Granulozyten durch Expression von HMGB1 zur NETose stimulieren [60]. Ebenso zeigte sich in Mausmodellen, dass insbesondere aktivierte Thrombozyten eine Freisetzung von P-Selektin bewirken und dadurch zu einer ausgeprägten Stimulation der NETose durch neutrophile Granulozyten beitragen [59]. NETs wiederum generieren eine Fibrinvernetzung und aktivieren ihrerseits Thrombin und somit weitere Thrombozyten [24]. Hieraus entstehende Thromben können zum Auftreten einer venösen wie auch in geringem Maße einer arteriellen Thrombose einschließlich der daraus resultierenden Krankheitsbilder führen [72]. Umgekehrt zeigte sich im Mausmodell der tiefen Beinvenenthrombose, dass PAD4-defiziente Mäuse eine reduzierte NETose sowie ein signifikant reduziertes Auftreten von venösen Thrombosen aufweisen [54].

Bei einem akuten Myokardinfarkt mit ST-Streckenveränderungen (STEMI) korreliert die Anzahl der aktivierten neutrophilen Granulozyten und NETs mit der Infarktgröße. NETs spielen hierbei vor allem im Rahmen der Plaque-Ruptur als Auslöseereignis akuter Myokardischämien eine entscheidende Rolle [72]. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass NETs durch ihren Einfluss auf die Bildung von Mikrothromben einen negativen Effekt auf das Myokard im Rahmen des Ischämie-Reperfusionsschadens aufweisen. Vergleichsgruppen mit geringerer NET-Ausprägung, beispielsweise nach Einsatz von DNase-haltigen Substanzen, zeigen einen geringeren zurückbleibenden Gewebeschaden nach Reperfusion [26].

Als wichtiger Bestandteil inflammatorischer Prozesse finden sich NET-Formationen auch in inflammatorischen Kardiomyopathien unterschiedlicher

Genese und Ätiologie. Zusätzlich wurden NETs kürzlich als Treiber im Rahmen der experimentell autoimmun induzierten Myokarditis (EAM) identifiziert, indem sie die Myokardfibrose beschleunigen. Dies spiegelt sich sowohl im akuten als auch im chronischen Stadium einer Myokarditis wider [21]. Insbesondere Zytokine als Mediatoren und Treiber der NETose spielen hier eine entscheidende Rolle. Als zentrales Zytokin stellte sich insbesondere der Wachstumsfaktor Midkine heraus, nach dessen Inhibition es im Modell der EAM zu einer reduzierten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, verminderter Expression von NETs und langfristig sogar zu einer reduzierten Fibrosierung des geschädigten Myokards kam [21].

5.5 NETs als Biomarker

In vitro zählen nach aktuellem Stand der Forschung neben citrullinierten Histonen (insbesondere H3Cit) auch DNA-MPO-Komplexe als Goldstandard zum Nachweis von NETose. Auch in in vivo Tiermodellen haben sie sich als adäquater Referenzmarker für NETose gezeigt [73, 74]. Hier scheinen diese unter anderem in signifikantem Zusammenhang mit Mortalität und Progression kardiovaskulärer Pathologien sowie unterschiedlicher Krebserkrankungen zu stehen [57, 75-77]. Als prognostisch relevante Marker sind NETs oder NET-assoziierte Proteine bisher jedoch nicht im klinischen Alltag angekommen.

5.6 Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)

Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1), auch bekannt als CXCL12, zählt zur Gruppe der chemotaktischen Zytokine. Es wurde erstmalig in Stromazellen des Knochenmarks zur Retention von Stamm- und Progenitorzellen nachgewiesen [12, 78]. Es dient zur allgemeinen Migration und Adhäsion verschiedener Zielzellgruppen [79]. Die wichtigsten Produktionsorte sind die Fibroblasten des Knochenmarks, Lymphknoten, Muskel- und Lungengewebe [11]. SDF-1/CXCL12 weist eine hohe strukturelle und funktionale Heterogenität auf. Es konnten über sieben verschiedene Splicevarianten und damit verbundene Funktionen von SDF-1/CXCL12 entdeckt werden [80-82]. Die Splicevarianten weisen zudem auch eine unterschiedliche organbezogene Ausprägung auf (siehe Tabelle 1). So ist beispielsweise SDF-1/CXCL12-Gamma insbesondere im kardialen Gewebe

ausgeprägt [79] und stellt gleichzeitig eine überdurchschnittlich aktive Isoform der SDF-1/CXCL12-Derivate dar [83].

Tabelle 1:
SDF-1/CXCL12 Splicevarianten

Splice-Varianten	Organexpression [81]	Chemotaktische Potenz [82]
SDF-1/CXCL12-Alpha	Ubiquitär	+++
SDF-1/CXCL12-Beta	Ubiquitär	++
SDF-1/CXCL12-Gamma	Herz	++
SDF-1/CXCL12-Delta	Pankreas	+
SDF-1/CXCL12-Epsilon	Pankreas	+++
SDF-1/CXCL12-Sigma	Pankreas, Niere	+

SDF-1/CXCL12 bindet an den Rezeptor CXCR4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, auch bekannt als LESTR), einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor mit sieben Transmembrandomänen (7TMR) [79]. SDF1/CXCL12 ist der einzige physiologische Rezeptorligand für CXCR4 [84]. G-Protein-vermittelt kommt es nachfolgend zur Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) und des Phospholipase Ca^{2+}/IP_3 -abhängigen Signalweges mit Anstieg des intrazellulären Kalziums und einer Aktivierung sowie Migration entsprechender Zielzellen [79]. Nach Bindung des Liganden an CXCR4 erfolgt die Internalisierung und der Abbau des Rezeptors [79].

Gleichzeitig bindet SDF-1/CXCL12 an den atypischen Chemokinrezeptor 3 (ACKR3) auch bekannt als CXCR7. Dieser 7TMR, ebenfalls G-Protein-gekoppelte Rezeptor stimuliert die Bindung von β -Arrestin [85]. β -Arrestin stellt einen Regulationsfaktor der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion dar, indem es zur Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors beiträgt. Neben der regulatorischen Komponente scheint β -Arrestin auch eine zentrale Rolle im Kinase-vermittelten Signalweg zu spielen. So ist es unter anderem an der Regulation des PI3/Akt-Signalweges beteiligt [86]. Dass β -Arrestin außerdem eine entscheidende Rolle in der SDF-1/CXCL12-moderierten Zellmigration

einnimmt, wird dadurch deutlich, dass seine Inaktivierung zu einem verminderten CXCR7-vermittelten Infiltrationseffekt auf die Zielzellen führt [87]. Durch seine hohe Bindungsaffinität gegenüber SDF-1/CXCL12 beeinflusst CXCR7 außerdem die zirkulierende Menge an SDF-1/CXCL12 und ist somit entscheidend an der Regulation des Wirkspiegels und der daraus resultierenden Zellmigration in inflammatorische Gewebe hinein beteiligt [10].

Es konnte gezeigt werden, dass CXCR4 und CXCR7 in inflammatorischem Gewebe häufig als Heterodimere co-exprimiert sind. Die zytomigratorischen Effekte CXCR4/CXCR7-exprimierender Zellen können durch SDF-1/CXCL12 potenziert werden [87]. Beide Rezeptortypen sind bekannte Oberflächenproteine von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und somit von besonderem Interesse im molekularen Prozess der NETose [88-90]

Eine weitere Säule neben der Rezeptorbindung stellt die Interaktion von SDF-1/CXCL12 mit membrangebundenen Glykosaminoglykanen (GAGs) dar. Durch die Bindung wird eine optimale Präsentation des Chemokins gegenüber zirkulierenden Zielzellen gewährleistet [79, 84]. Die Bindung dient nicht nur als Nebeneffekt, sondern als entscheidender funktioneller Bestandteil im Zusammenspiel mit gleichzeitig stattfindender Rezeptorbindung, um den Effekt von SDF-1/CXCL12 vollumfänglich zu vermitteln [91].

SDF-1/CXCL12 selbst ist einer der potentesten Migrationsfaktoren für zirkulierende CXCR4-tragende Zelltypen. Dies umfasst sowohl proinflammatorische Zelltypen wie Lymphozyten und Monozyten als auch CXCR4-positive Progenitor- und Stammzellen [11, 12]. Auch für das Homing, sowie die Bildung und Freisetzung von neutrophilen Granulozyten in ihrem Ursprungsgewebe spielt SDF-1/CXCL12 eine wichtige Rolle [92-95]. Im peripheren Gewebe ist SDF-1/CXCL12 für neutrophile Granulozyten isoliert betrachtet als eher schwacher Migrationsfaktor beschrieben, kann jedoch durch seine Oberflächenpräsentation an Glykosaminoglykanen synergistisch mit anderen Chemokinen seine Aktivität potenzieren und wird somit zum potenten Migrationsfaktor für neutrophile Granulozyten und andere inflammatorische Zellarten [96].

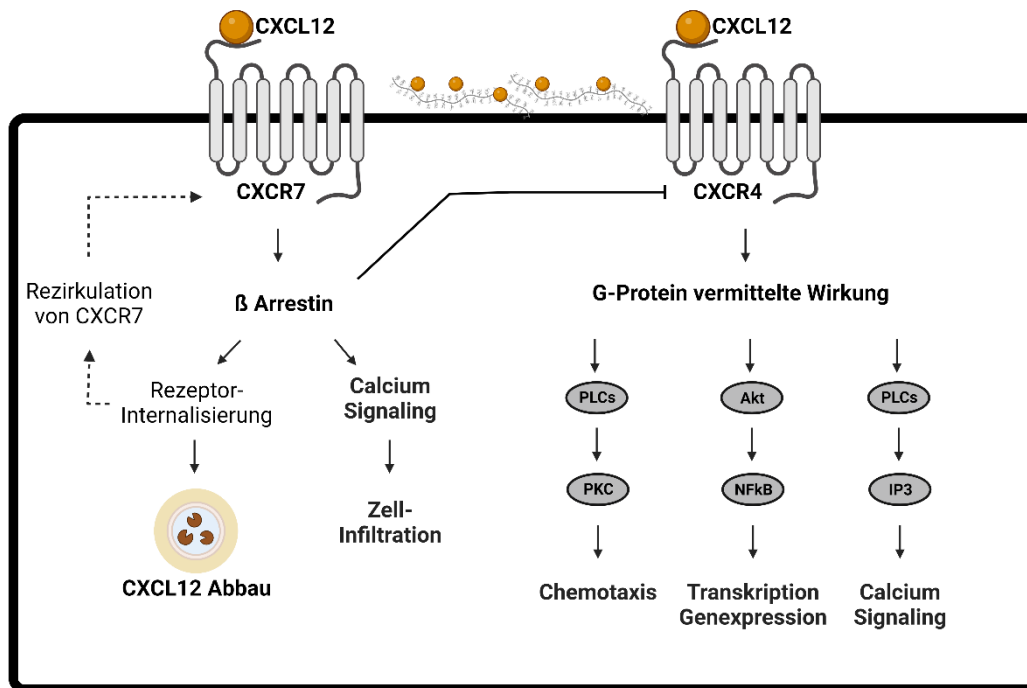


Abbildung 3: Vereinfachte Signalkaskade und Effekte von SDF-1/CXCL12 nach Bindung an seine Rezeptoren CXCR4, CXCR7 und Glykosaminoglykanen. Adaptiert nach Janssens, R., et al. (2018). "The unique structural and functional features of CXCL12." *Cell Mol Immunol* 15(4): 299-311 und Teicher, B. A. and S. P. Fricker (2010). "CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer." *Clin Cancer Res* 16(11): 2927-2931. Erstellt mit BioRender.com

Der Einfluss von SDF-1/CXCL12 auf die Transkription ist neben seiner Rolle im Rahmen der Chemotaxis bisher nur unzureichend untersucht. Jedoch konnte beobachtet werden, dass ein hoher SDF-1/CXCL12-Spiegel mit einer erhöhten Expression von CD54, einem der zentralen Zielgene des Transkriptionsfaktors NFκB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), einhergeht [97]. NFκB ist ein vielseitiger Transkriptionsfaktor, der unter anderem in der Regulation von Immunantworten eine zentrale Rolle einnimmt. Im Mausmodell konnte an retinalen Photorezeptorzellen gezeigt werden, dass eine Aktivierung der SDF-1/CXCL12-CXCR4-Achse zu einer erhöhten Expression von NFκB führt [98]. Darüber hinaus wurde NFκB als direktes Zielmolekül einer Citrullinierung durch PAD4 identifiziert [99]. Auch wenn es sich vorerst um Einzelfallbeschreibungen handelt, liegt dennoch der Schluss nahe, dass SDF-

1/CXCL12 über seinen Rezeptor CXCR4 nicht nur zytomigratorische, sondern auch transkriptionsbeeinflussende Eigenschaften vermittelt.

Die Effekte von SDF-1/CXCL12 sind vielseitig und ambivalent. Bereits früh war eine entscheidende Rolle in homöostatischen Prozessen wie Embryogenese, Angiogenese, Neurogenese oder Hämatopoese bekannt [79, 81, 84]. SDF-1/CXCL12 scheint sowohl protektive und regenerative als auch destruktive Eigenschaften im Rahmen verschiedener Krankheitsbilder zu vermitteln. So zeigt sich seine proinflammatorische Aktivität im Rahmen inflammatorischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis, systemischer Lupus Erythematoses aber auch bei der diabetischen Retinopathie, Asthma bronchiale und im akuten Lungenversagen [84]. Auch in der Krebsentstehung und Metastasierung wird der SDF-1/CXCL12/CXCR4/CXCR7-Achse eine entscheidende Rolle zugeschrieben [84, 100]. In prospektiven histologisch und immunhistologisch untersuchten Myokardbiopsien von Patienten mit bestehender Myokarditis zeigte sich zudem, dass SDF-1/CXCL12 bei inflammatorischen Kardiomyopathien signifikant erhöht war [101]. Darüber hinaus korreliert eine hohe SDF-1/CXCL12 Expression mit einem erhöhten Fibrosierungsgrad und dient als Prädiktor für Patientenmortalität [101].

5.7 Neutrophile Granulozyten und NETose im Kontext SDF1/CXCL12

Neutrophile Granulozyten treten im Rahmen inflammatorischer Prozesse als eine der ersten Zellgruppen im betroffenen Gewebe auf. Zur Verringerung möglicher Folgeschäden für das Gewebe werden neutrophile Granulozyten abgebaut oder wandern in Form reverser Migration aus dem entzündlichen Gewebe aus [102]. Verbleiben neutrophile Granulozyten dauerhaft in inflammatorischem Gewebe kommt es vermehrt zur chronischen Inflammation und NET Bildung, wie es zum Beispiel im Rahmen von ischämischen Kardiomyopathien zu beobachten ist [102]. Obwohl SDF-1/CXCL12 wie zuvor beschrieben im Zielgewebe auch kardioprotektive Wirkung zeigen kann [101], scheint die Aktivität der SDF-1/CXCL12/CXCR4-Achse im Rahmen inflammatorischer Ereignisse mit einer verschlechterten Prognose und verminderter reverser Migration von neutrophile Granulozyten einherzugehen [101, 102].

5.8 Fragestellung

Obwohl SDF-1/CXCL12 einen Einfluss auf die Progression und Prognose inflammatorischer Erkrankungen, insbesondere entzündliche Kardiomyopathien, ausübt [101, 103] und an einer verminderten reversen Migration von neutrophilen Granulozyten aus geschädigtem Gewebe beteiligt zu sein scheint [102], ist der diesen Prozessen zu Grunde liegende Pathomechanismus jedoch noch nicht abschließend geklärt. Da NETs im Rahmen der Pathogenese inflammatorischer Erkrankungen und Kardiomyopathien ebenfalls eine entscheidende Rolle spielen [21], soll der mögliche Zusammenhang zwischen SDF-1/CXCL12 der Ausbildung von NETs genauer untersucht werden.

Zunächst soll die Etablierung der IncuCyte®-Methode am Standort als Form der Echtzeitquantifizierung für NETose erfolgen. Als Vorlage dient die Erstbeschreibung von Gupta et. al. [104]. Diese Methode eignet sich besonders zur umfangreichen Identifizierung möglicher Einflussfaktoren und ergänzt die bereits etablierten Immunzytochemie als Methode der NETose-Quantifizierung.

Anschließend soll der Effekt von SDF-1/CXCL12 auf die Bildung von NETs untersucht werden. Hierbei kommen bereits etablierte und anerkannte in vitro NETose-Assays der Immunzytochemie zum Einsatz. Als untersuchte und anerkannte Zielgröße der NETose wird die PAD4-abhängige Citrullinierung von Histonen herangezogen. Dabei ist zu klären, ob SDF-1/CXCL12 eine direkte Induktion der NETose bewirkt, oder möglicherweise über sekundäre Mechanismen den Prozess der NETose beeinflusst.

6. Material und Methoden

6.1 Material

Tabelle 2:

Primär- und Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
IRDye® 800CW Donkey anti-rabbit [926-32213]	LI-COR®
IRDye® 680CW Donkey anti-rabbit [926-68072]	LI-COR®
Neutrophile Elastase NP57	DAKO
Anti-Histone H3 (citrulline R17) antibody [EPR20358-120]	Abcam
Anti-Histone H4 (Citrulline 3) [07-596]	Milipore
Anti-PADI4 / PAD4 antibody [OTI4H5]	Abcam [ab128086]
β-Actin, rabbit mAB	Cell Signaling Technology®[49710L]

Tabelle 3:

Hersteller-Kits

Kit	Hersteller
Polymorphprep™	Alere Technologies AS
ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI	Invitrogen™
Protein Assay Dye	BIO-RAD
Protein-Standard Bradford	Sigma-Aldrich
Lysepuffer (#9803)	Cell Signaling Technology®
Western Blot Protein Marker IV (pre-stained)	peqGOLD

Tabelle 4:
Verwendete Stimulanzen

Stimulanzen	Hersteller
Ionomycin	ThermoFisher Scientific
PMA	Sigma-Aldrich
Rh/rm/feSDF-1 α /PBSF/CXCL12 [350-NS-010]	R&D Systems

Tabelle 5:
Verwendete Farbstoffe

Färbemittel	Hersteller
Sytox Green	Invitrogen
NUCLEAR ID [®] - Red	Invitrogen
DAPI Mountant medium	ThermoFisher Scientific

Tabelle 6:
Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth
BSA A1470-25G	Sigma-Aldrich
Ethanol	SV Liquid Production GmbH, Flintbach
Formaldehyd-Lösung 4%	Otto Fischar GmbH&Co.KG
Glycin	Carl Roth
HEPES 15630-080	ThermoFisher Scientific
Hydrochlorid Säure 1%	AppliChem
Isopropanol	SV Liquid Production GmbH, Flintbach
Methanol	Riedel-de Haën
Natrium Chlorid	PanRac AppliChem ITW

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth
NF-Acrylamid/bis-acrylamid 30%	Carl Roth
PBS	ThermoFisher Scientific
RPMI 1640 11835-063	ThermoFisher Scientific
Tetraethylmethyldiamin (TEMED)	Carl Roth
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris Base)	Sigma-Aldrich
Triton-X 100	Sigma-Aldrich
TWEEN-20	Sigma-Aldrich

Tabelle 7:

Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller/ Lieferant
Deckgläser 25x50	R. Langbrick GmbH
Falcon-Röhrchen PP steril 50ml	Greiner Bio-One GmbH
Falcon-Röhrchen PP steril 15ml	Greiner Bio-One GmbH
Gewebekulturplatte 24 Well, steril	Corning B.V. Life Sciences
Gewebekulturplatte 96 Well, steril	Corning B.V. Life Sciences
Kanüle Butterfly Safe 21G	Sarstedt AG & Co.KG
Kanüle Mini Spike grün	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG
Mikroplatte PS F-Form 96 Well, unsteril	Greiner Bio-One GmbH
Zählkammer C-Chip Neubauer	Biochrom AG
Objektträger Superfrost plus Menzel 25x75mm	R. Langenbrinck GmbH
Parafilm Laboratory film PM996	Bemis
Pipette gerade mit Spitze 10ml	Corning B.V. Life Sciences
Pipette gerade mit Spitze 25ml	Corning B.V. Life Sciences

Pipette gerade mit Spitze 50ml	Corning B.V. Life Sciences
Pipette gerade mit Spitze 5ml	Corning B.V. Life Sciences
Pipette gerade mit Spitze steril 10ml	Corning B.V. Life Sciences
Pipettenspitzen 101-1000µl	Fisher Scientific GmbH
Pipettenspitzen farblos 10µl	Biozym Scientific GmbH
Pipettenspitzen gelb 1-200µl	Sarstedt AG & Co.KG
Reaktionsgefäß Safe-Lock 2ml	VWR International GmbH
Softasept® N Desinfektionsspray	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG
Spritze Injekt 10ml	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG
Spritze Injekt 20ml	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG
Spritze Injekt 5ml	B. Braun Deutschland GmbH & Co. KG
Stauschlauch Tournistrip	Sarstedt AG & Co.KG
1.5 Glas Deckgläser 12mm	Warner Instruments
Reaktionsgefäß Safe-Lock 0,5ml	VWR International GmbH
Sterilfilter Millex 0,22µm	Merck Chemicals GmbH
Reaktionsgefäß Safe-Lock 1,5ml	VWR International GmbH
Monovette EDTA 2,6ml	Sarstedt AG & Co.KG
Eppendorf Tubes 5,0ml	Eppendorf AG, Hamburg
Monovette EDTA, 9,0ml	Sarstedt AG & Co.KG

Tabelle 8:
Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
BioShake IQ	life science unlimited
Feinwaage (AT261 DeltaRange FACT)	Mettler
Glomax® Multi Detector System	Promega TM
IncuCyte®-Zoom S3	Essen BioScience Inc.
IncuSafe CO ₂ -Inkubator	Sanyo
Kamera (Mikroskop)	Nikon DS-Qi2
Li-Cor	Odyssey
Mikroskop	Nikon Eclipse Ti2
Objektiv	S Plan Fluor ELWD 40x Ph2 ADM
Konfokalmikroskop LSM 510	ZEISS
Mini-Protean® Tetra System	BIO-RAD
pH-Meter S210	SevenCompact
PIPETBOY acu	IBS Integra Bioscience
PowerPac™ Basic Power Supply	BIO-RAD
Schüttelinkubator	Heidolph
Sterilbank HERAsafe	Thermo Heraeus
Automatischer Hämatologie Analysator (KX-21N)	Sysmex
Tischwaage	Denver Instruments
Tischzentrifuge (Centrifuge 5417C)	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Centrifuge 5417N)	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge (Rotina 420R)	Hettich

6.2 Isolation polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMNs)

Zur Materialgewinnung von polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) wurde freiwilligen Spendern venöses Vollblut in EDTA-Monovetten abgenommen (Bestätigt durch das Ethikvotum des Universitätsklinikums

Tübingen, #141/2018B02). 5ml abgenommenes EDTA-Vollblut wurden auf 5ml Isolationsmedium Polymorphprep™ aufgetragen und nach Herstellerangaben zentrifugiert (30min, 550G, 21°C, ohne Bremse). Der aufgetrennte PMN-Gradient wurde mittels Pasteurpipette abgenommen und in einem 15ml Falcon mit dem gleichen Volumen 0,45% NaCl zusammengeführt. Der verbliebene Überstand wurde verworfen. Nach einmaligem Waschen (10min, 400G, 21°C) erfolgte für 30 Sekunden eine hypotone Erythrozytenlyse mit 0,2% NaCl. Anschließend erfolgte ein weiterer Waschgang (10min, 400G, 21°C). Das entstandene Zellpellet wurde in 250µl des Nährmediums (siehe 6.2.1) resuspendiert. Zur vergleichbaren Weiterverarbeitung der Zellen wurde die Anzahl neutrophiler Granulozyten mittels automatisierter Zellzählung (Sysmex KX-21N) oder einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellkonzentration eingestellt. Individuelle Variabilität zwischen den Spendern ergaben deutliche Schwankungen in der Menge der isolierten neutrophilen Granulozyten, sodass die biologischen Replikat der Versuchsansätze zum Teil variiert wurde.

6.2.1 Zusammensetzung des verwendeten Nährmediums

Das Nährmedium wurde zur Resuspension zuvor isolierter nativer PMNs und zur Verdünnung später hinzugegebener Stimulanzen verwendet. Es besteht aus RPMI-1640 Zellkulturmedium, das mit 1M HEPES Lösung auf die Zielkonzentration 1% (v/v) versetzt wurde. In den zu vergleichenden Versuchsreihen wurde ebenfalls BSA (Zielkonzentration 0,05% w/v) zu dem bereits vorgemischtem RPMI 1640/HEPES zugesetzt, sodass ein direkter Vergleich zwischen BSA-haltigem und BSA-freiem Nährmedium getroffen werden kann.

Tabelle 9:

Herstellung des Nährmediums

Substanz	Zielkonzentration	Menge/ Volumen
RPMI 1640		49,5ml
HEPES	1% (v/v)	0,5ml
BSA	0,05% (w/v)	0,025g

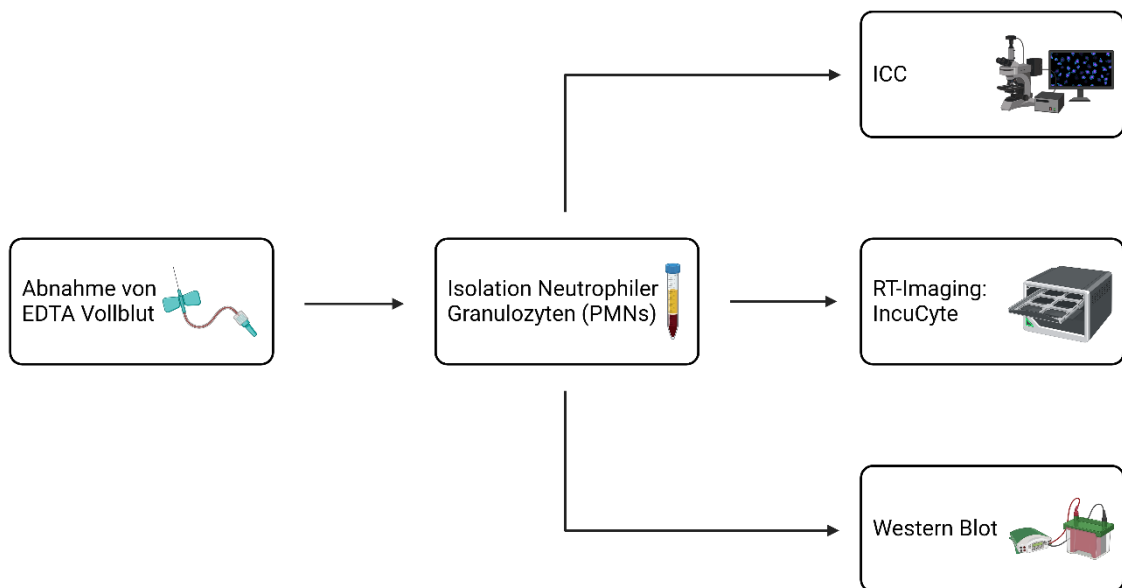


Abbildung 4: Arbeitsstruktur der Experimente. Nach Abnahme von EDTA Vollblut erfolgte die Isolation humaner Neutrophiler Granulozyten (PMNs). Der entstehende Ansatz wurde je nach Zellzahl in drei Folgeansätze für die Immunzytochemie (ICC), Lebendzellmikroskopie (IncuCyte®) und zur Anfertigung von Western Blot-Proben aufgeteilt. Erstellt mit BioRender.com

6.3 Immunzytochemie (ICC)

Unbeschichtete 24-Well Platten wurden mit Parafilm und zuvor in Ethanol abgeflammt Deckgläsern ausgelegt. Auf jedes Deckglas wurden nach Auskühlen 30.000 Zellen in 100µl Nährmedium (300 Zellen/µl) ausgesät und für 30 Minuten zur Adhäsion inkubiert (37°C, 5% CO₂). Die Präinkubation erfolgte mit Nährmedium, sowie zusätzlich mit SDF-1-Alpha/PBSF/CXCL12 in den Zielkonzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml. Nach Zugabe von 100 µl/Well zuvor verdünnter Stimulanzen (Nährmedium als Negativkontrolle, 4 µM Ionomycin und 100 nM PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) als Positivkontrolle, sowie SDF-1-Alpha/PBSF/CXCL12 in den Zielkonzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml) erfolgte eine Inkubation über vier Stunden (37°C, 5%CO₂). Zur Fixierung der Zellen wurden anschließend 135 µl 4%-iges PFA pro Well hinzugegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach

einem Waschgang mit 250 µl PBS pro Well erfolgte die Permeabilisierung (0,1% BSA/ 0,1% Triton-X 100 in PBS, 10 Minuten Inkubation bei 4°C) und anschließend das Blocken (2,5%BSA/ 0,5%TWEEN-20 in PBS) der Zellen für 60 Minuten (37°C, 5% CO₂). Die Primärantikörper (siehe Tabelle 2) wurden in 1:250-Verdünnung mit 240 µl pro Well aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 250 µl PBS pro Well wurden die Sekundärantikörper sowie SytoxGreen (1:25.000) aufgetragen und für 2 Stunden bei Raumtemperatur (21°C) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 250 µl PBS pro Well erfolgte die Abnahme und Eindeckung der auf den Deckgläsern adhärenen Zellen mit ProLong™ Diamond Antifade Mountant + DAPI (Invitrogen™) auf Objektträgern. Die Objektträger wurden anschließend für mindestens 24h unter dem Abzug getrocknet.

Tabelle 10:

Permeabilisierungspuffer

Substanz	Zielkonzentration	Menge/ Volumen
PBS		50ml
BSA	0,1% (w/v)	50µg
Triton-X 100	0,1% (v/v)	50µl

Tabelle 11:

Blocking-Puffer

Substanz	Zielkonzentration	Menge/ Volumen
PBS		50ml
BSA	2,5% (w/v)	1,25g
TWEEN-20	0,05% (v/v)	25µl

6.4 Fluoreszenzmikroskopie

Tabelle 12:

Standardisierte Einstellungen von Mikroskop und Kamera.

	DAPI	GFP	TxRed	Cy5
Binning	1,0 x 1,0	1,0 x 1,0	1,0 x 1,0	1,0 x 1,0
Exposure	400 ms	200 ms	400 ms	600 ms
Gain	1,0x	1,0x	1,0x	1,0x
DIC Prims	Out	Out	Out	Out
Bertrand Lens	Out	Out	Out	Out
Turret-Lo	DAPI-5060c	GFP-4050B	TXRED-4040c	Cy5-4040C
FL-Lo	Open	Open	Open	Open
DIA LED	Closed	Closed	Closed	Closed
DIA	Off	Off	Off	Off
DIA Iris intensity	26,5	9,8	9,8	9,8
Zoom	1,00x	1,00x	1,00x	1,00x
Sola	active	active	active	active
Sola Iris intensity	50,0	50,0	50,0	100,0

6.4.1 Auswertung

Die Auswertung der Immunzytochemie erfolgte durch die open source Software FIJI unter bestehender general public license [105]. Hierbei wurden stets dieselben Kontrasteinstellungen verwendet (siehe Tabelle 12), welche anhand der zuerst gefertigten Aufnahme festgelegt wurden.

NETs wurden anhand morphologischer Kriterien im DAPI-Kanal bestimmt (Zellkerndekondensation oder DNA-Freisetzung) und anschließend nummeriert. Zur Validierung der NETs wurden die zuvor nummerierten Zellen im TexasRed (H4Cit3) und Cy5-Kanal (Neutrophile Elastase) abgeglichen und identisch nummerierte Zellen auf Färbungskompatibilität verglichen. Als NETs wurden nur die Zellen gewertet, welche sowohl die morphologischen Kriterien im DAPI-Kanal als auch eine H4Cit3-Färbung zeigten (siehe Abbildung 5).

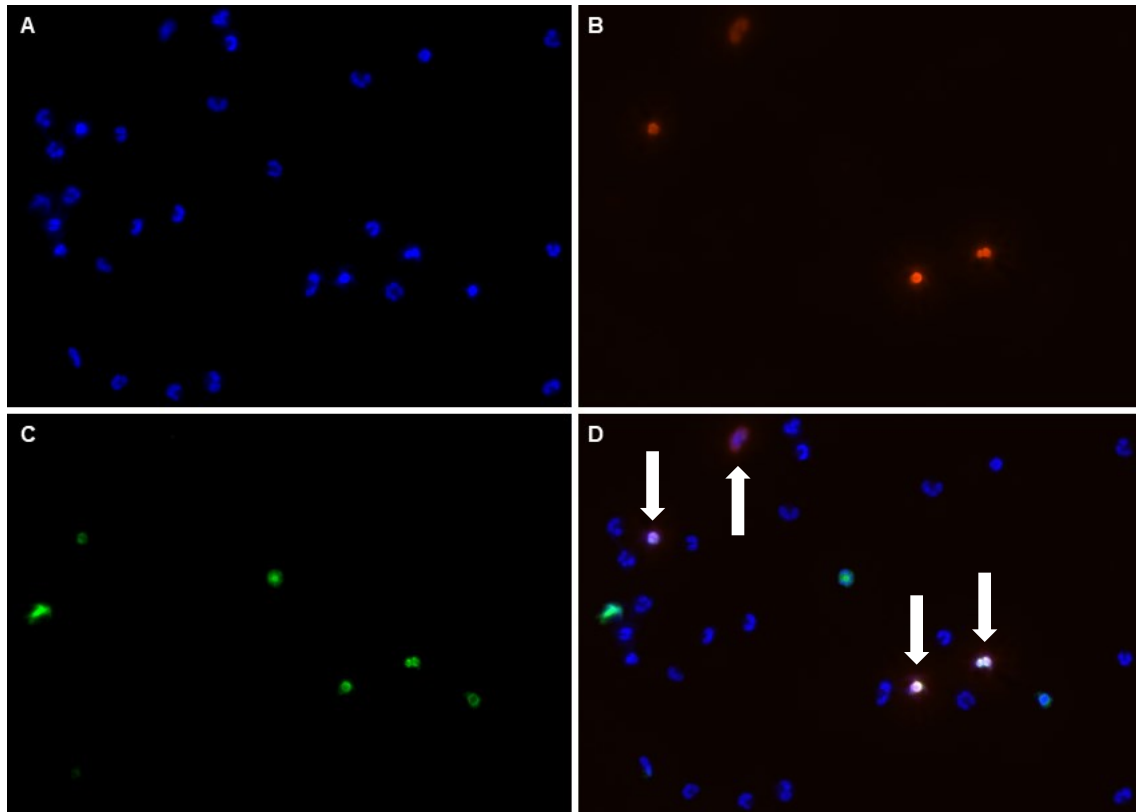


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunzytochemisch angefärbter humaner neutrophiler Granulozyten nach Stimulation mit 4 μM Ionomycin. **A:** DAPI-Kanal. **B:** Texas Red-Kanal, H4Cit+/H3Cit+. **C:** Cy5-Kanal, Neutrophile Elastase. **D:** Merge. Eigene Aufnahme, unveröffentlicht.

6.5 Automatisierte IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie

Die Isolation der PMNs erfolgte wie in Kapitel 6.2 dargestellt gemäß Herstellerprotokoll und Polymorphprep™. In Eppendorf-Cups wurden 3×10^6 Zellen in Nährmedium ausgelegt und mit 1 μl des membrangängigen Kernfarbstoffes NUCLEAR ID-Red für fünf Minuten bei Dunkelheit inkubiert. In drei aufeinanderfolgenden Waschschrritten mit Nährmedium wurden die Zellen zunächst zentrifugiert (2400G, 5min, 21°C) und erneut in Nährmedium resuspendiert. Hieraus wurden 100 μl pro Well (50.000 Zellen) in eine unbeschichtete 96-Well Platte ausgelegt (100 μl Zellsuspension respektive 90 μl Zellsuspension mit 10 μl Nährmedium als Kontrollgruppe, oder 10 μl SDF-1Alpha/PBSF/CXCL12 in den Zielkonzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml) und für 30 Minuten inkubiert (37°C, 5%CO₂). Während der Inkubation erfolgte die Vorbereitung der Stimulanzien (Nährmedium als Negativkontrolle, 4 μM

Ionomycin und 100 nM PMA (Phorbol 12-myristat 13-acetat) als Positivkontrolle, sowie SDF-1Alpha/PBSF/CXCL12 in den Zielkonzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml) durch Verdünnung in Nährmedium sowie unter Zugabe des DNA-Farbstoffes SytoxGreen mit einer Zielkonzentration von 0,2 μ M. Nach Inkubation wurden 100 μ l der entsprechenden Stimulanzen pro Well auf die bereits vorgelegte Zellsuspension hinzugegeben. Entstandene Luftblasen durch das Pipettieren wurden vorsichtig entfernt und die Platte zur Messung im IncuCyte® S3 platziert.

Pro Well erfolgten vier Aufnahmen, die innerhalb eines Inkubators unter konstanten Bedingungen (37°C, 5% CO₂) stattfanden. Sie wurden mit einem 20x Trockenobjektiv in drei Kanälen aufgenommen (Phasenkontrast, roter Kanal (exposure 800ms) und grüner Kanal (exposure 400ms)) und erfolgten in einer zeitlichen Frequenz von 10-20 Minuten über einen Gesamtzeitraum von mindestens vier Stunden. Jeder Ansatz wurde in Duplikaten durchgeführt, um Störfaktoren und Messungenauigkeiten ausgleichen zu können.

6.5.1 Auswertung IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie

Die Auswertung der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie-Bildaufnahmen erfolgte durch die bereitgestellte Herstellersoftware. Die Auswertungskriterien sind in Abbildung 6 dargestellt und orientieren sich hierbei an bestehender Vorpublikation [104]. NETose wurde über unterschiedliche Parameter wie Fluoreszenz, Fläche und Radius determiniert. Durch NUCLEAR ID-Red rot angefärbte Zellen wurden ausgeschlossen, sollten sie einen Radius kleiner 10 μ m, eine Fluoreszenz kleiner 0,5 oder eine Fläche kleiner 15 μ m² zeigen. Grün fluoreszierende Objekte unter einem Radius von 10 μ m, einer Fluoreszenz unter 1.00 oder einer Fläche unter 100 μ m² wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. Zur Hintergrund-Korrektur wurde die Top-Hat Methode verwendet, sowie eng zusammenliegende Zellen durch Anwendung der Edge-Split Einstellung differenziert.

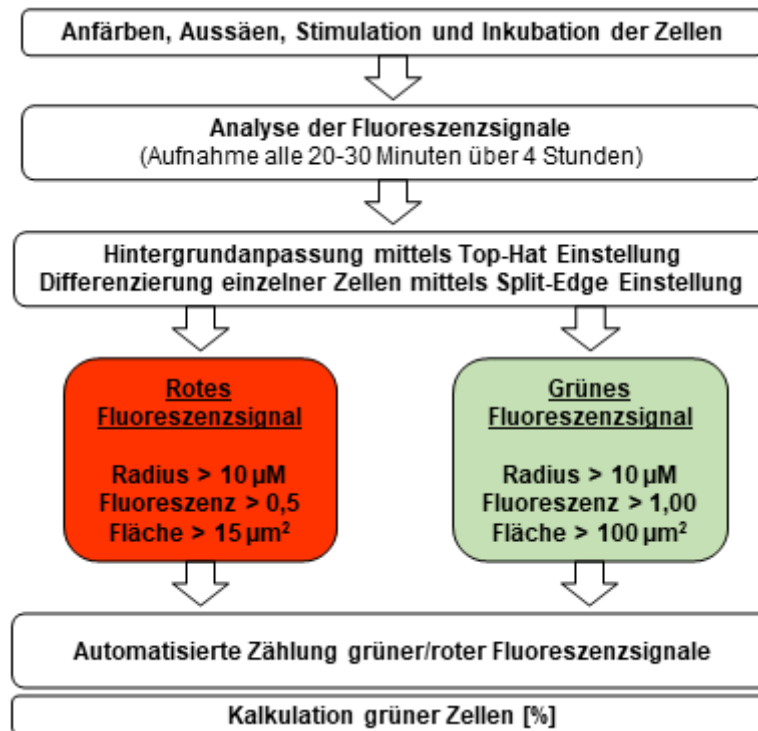


Abbildung 6: Arbeitsablauf und Ausschlusskriterien der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie. Eigene Abbildung in Anlehnung an Gupta, S., et al., A High-Throughput Real-Time Imaging Technique To Quantify NETosis and Distinguish Mechanisms of Cell Death in Human Neutrophils. J Immunol, 2018. **200**(2): p. 869-879.

6.6 Western Blot

6.6.1 Aufbereitung der Western Blot-Proben

Die Isolation humaner PMNs aus EDTA-Vollblut erfolgte wie in Kapitel 6.2 dargestellt. 50 µl der isolierten Zellsuspension wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und mit den entsprechenden Stimulanzen versetzt (Nährmedium als Negativkontrolle, 4 µM Ionomycin als Positivkontrolle und SDF-1-Alpha/PBSF/CXCL12 in den Zielkonzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml). Die Proben inkubierten über vier Stunden (37°C, 5%CO₂). Die Zellen wurden zentrifugiert (2400G, 5 Minuten, 21°C) und in 1x Lysepuffer (Cell Signaling Technology®) resuspendiert. Anschließend wurden sie auf Eis gestellt und in kurzen Abständen mehrfach gevortext. Das Zelllysat wurde in einer vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert (20000G, 20 Minuten, 4°C) und der verbliebene Überstand bis zur weiteren Verarbeitung in -20°C eingefroren.

6.6.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay

Zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration wurde eine Protein-(BSA)-Standardkurve (Verdünnung in AquaDest) in Triplikaten in eine 96-Well Platte ausgelegt. Nach einer 1:5 Verdünnung in AquaDest der zu messenden Proben wurden diese ebenfalls in Triplikaten in die 96-Well Platte ausgelegt. Nach Hinzugeben von 200 µl Bradford-Färbelösung (ebenfalls in 1:5 Verdünnung in AquaDest) erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration durch Messung der Absorption (Glomax®). Nach Bestimmung des benötigten Gesamtvolumens wurde das Proteinisolat mit AquaDest und Laufpuffer (Verhältnis 1:4) auf die gewünschte Protein-Zielkonzentration von 50 µg eingestellt. Es erfolgte anschließend die thermische Denaturierung jedes Ansatzes für 5 Minuten bei 96°C (BioShake IQ, life science unlimited) sowie das Einfrieren bei -20°C.

6.6.3 Durchführung des Western Blot

Die Vorbereitung der Sammelgele (Zielkonzentration 5%, AquaDest, 1M Tris/HCl pH 6,8, Acrylamide/bis-acrylamid 30%, 10%SDS, 10%APS, TEMED) und Trenngele (Zielkonzentration 10%, AquaDest, 1,5M Tris/HCl pH 8,8, Acrylamide/bis-acrylamid 30%, 10%SDS, 10%APS, TEMED) erfolgte in Anpassung an das Zielprotein PAD4 mit 74 kDA (siehe Tabelle 13). Zuerst erfolgte die Befüllung der Glaskassetten mit Trenngel und nach Auspolymerisierung die Überschichtung mit Sammelgel.

Nach dem Auftauen wurden 30 µl Probe beziehungsweise 5 µl Proteinmarker in die vorbereiteten Geltaschen pipettiert. Nach Einstellen der Gele in die Gelelektrophoresekammer erfolgte das Auffüllen der inneren und äußeren Kammer mit 1x Laufpuffer (TrisBase, Glycin, 10%SDS, AquaDest). Die Proben und Marker wurden bei 400mA und 80V gesammelt. Das Auftrennen erfolgte bei 120V und wurde nach kompletter Bandenaufteilung des mitlaufenden Markers beendet.

Nitrozellulosemembranen wurden zurechtgeschnitten und zeitgleich die Filterpapiere in zuvor auf 4°C gekühlten Blotting-Puffer (TrisBase, Glycin, AquaDest, 20% Methanol) gewässert. Die Laufkassette mit den aufgetrennten Proteinen wurden geöffnet und die Gele entnommen. Anschließend erfolgte das

Einspannen der Gele zusammen mit vorbereiteten Filtern in Kassetten (Kathode/Schwamm/Filter/Gel/Membran/Filter/Schwamm/Anode). Hierbei wurden Luftblasen durch kraftvolles Ausrollen unter Wasser vermieden. Die Kammer wurde mit Blotting-Puffer (TrisBase, Glycin, AquaDest, 20% Methanol) sowie Kühlakkus aufgefüllt. Luftblasen wurden mittels Pipette entfernt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf Nitrozellulosemembranen erfolgte bei 80 Volt, 300 mA für 85 Minuten.

Tabelle 13:
Trenn- und Sammelgele

	Sammelgel (5%)	Trenngel (10%)
AquaDest	3,4ml	8ml
Acrylamid/bis-acrylamid 30%	850µl	6,7ml
1.5M TRIS (pH 8,8)	-	5ml
1M TRIS (pH 6,8)	625µl	-
SDS 10%	50µl	200µl
APS 10%	50µl	160µl
TEMED	5µl	20µl

Tabelle 6: Trenngele wurden in Glaskassetten vorgelegt und durch Überschichtung mit Isopropanol von Luftblasen befreit. Nach Auspolymerisierung für 30 Minuten erfolgte die Überschichtung mit Sammelgel.

6.6.4 Immunodetektion

Zur Immunodetektion wurden die beladenen Membranen für eine Stunde in 5%TBST/BSA in der Dunkelkammer auf einem Schüttler inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers (PAD4 1:2000, Actin 1:1000, siehe Tabelle 2) erfolgte über Nacht bei 4°C. Nach dreimaligem Waschen für 15 Minuten in 1x TBST erfolgte die Inkubation des Sekundärantikörpers (Donkey anti-mouse, LI-COR® und Donkey anti-rabbit, LI-COR®) für 1,5 Stunden bei 21°C. Nach einem letzten Waschgang (3-mal für 15 Minuten in 1x TBST) wurden die Membranen in einer Trockenmappe getrocknet. Nach abschließender Trocknung wurden die Membranen im Licor Odyssey eingescannt.

6.6.5 Auswertung WB

Die Auswertung der Western Blot-Membranen erfolgte durch semiquantitative Bestimmung der optischen Dichte unter Zuhilfenahme von Image J [105]. Als Referenz des Zielproteins PAD4 wurde β -Actin verwendet.

6.7 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte softwaregestützt durch GraphPad PRISM. Die Daten wurden mittels Kolmogorow-Smirnow-Test auf Normalverteilung hin überprüft. Zur Bestimmung der Signifikanz wurde anschließend ein One-Way ANOVA durchgeführt. Ein P-Wert unter 0,05 wurde als signifikant gewertet.

6.8 Software

Bei den verwendeten Software-Programmen handelt es sich um Open-Source-Programme oder durch Universität, Fakultät oder Uniklinik bereitgestellte Anwendungen. Abbildungen wurden mit GraphPad Prism 9, Microsoft PowerPoint und BioRender erstellt.

Tabelle 14:
Verwendete Software

Software	Provider
FIJI/ Image J (Version 2.0.0)	Open source [105]
GraphPad PRISM Version 9.1.2	GraphPad Software
Biorender.com	BioRender
IncuCyte Software (Version 2021A)	Essen BioScience Inc.
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft Word	Microsoft
Microsoft PowerPoint	Microsoft
NIS-Elements BR	Nikon

7. Ergebnisse

7.1 IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie stellt eine alternative Methode für die Quantifizierung von induzierter NETose dar

Die morphologische Erfassung der Bildung von NETs durch neutrophile Granulozyten ist entscheidender experimenteller Bestandteil der Untersuchung von NETose-assoziierten Vorgängen. Als methodischer Goldstandard hat sich die Immunzytochemie (ICC) etabliert, die es erlaubt, NETs nach zuvor festgelegten Kriterien unter dem Fluoreszenzmikroskop quantitativ zu erfassen.

Zur Etablierung der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie am Standort wurden nach Isolation humaner neutrophiler Granulozyten aus peripherem Vollblut zwei Ansätze mit neutrophilen Granulozyten vorbereitet, die mit den bereits allgemein anerkannten NETose-Stimulanzen Ionomycin und PMA stimuliert wurden. Anschließend wurde die ermittelte Anzahl von NETose mittels manueller (Immunzytochemie) und automatisierter (IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie) Messmethode verglichen.

Um zusätzlich den diskutierten Stellenwert von Serumalbuminen (in unseren Versuchsansätzen: BSA) für die Isolation und Kultivierung humaner neutrophiler Granulozyten zu determinieren [106], führten wir unsere Gegenüberstellung der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie und Immunzytochemie in zwei Versuchsansätzen durch. Die Vergleichsgruppe unter Hinzunahme von BSA wurde hierbei mit der Kontrollgruppe ohne Zugabe von BSA abgeglichen. Die Ergebnisse sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

7.2 Im Rahmen der Inkubation isolierter neutrophiler Granulozyten ist die Zugabe von BSA zur Reduktion der Grundaktivierung entscheidend

Aus Vollblut isolierte neutrophile Granulozyten wurden mit Ionomycin, PMA und SDF-1/CXCL12 in den Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml in BSA-freiem Medium stimuliert. Eine Übersicht der Ergebnisse ist in Abbildung 7 dargestellt. Eine ausführliche Darstellung der Ergebnisse nach Stimulation mit SDF-1/CXCL12 findet sich in Kapitel 7.3. In der durchgeführten IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie zeigte sich ein ungewöhnlich hohes

Aktivierungsverhalten unstimulierter neutrophiler Granulozyten, welche sich kaum bis gar nicht vom Aktivierungszustand ihrer stimulierten Vergleichsgruppen unterschieden (Abbildung 7A und 7C). In der parallel durchgeführten Immunzytochemie ließ sich diese vergleichsweise hohe Grundaktivierung ebenfalls beobachten (Abbildung 7D).

Insgesamt zeigte die unstimulierte Kontrollgruppe im Mittel sogar höhere Aktivierungswerte als ihre mit Ionomycin stimulierte Vergleichsgruppe (Abbildung 7D). Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung der mit PMA stimulierten Vergleichsgruppe war aufgrund der hochgradigen Aktivierung der neutrophilen Granulozyten und einer fehlenden optischen Abgrenzbarkeit der NETs nicht möglich (Abbildung 7D+F). Neutrophile Granulozyten wiesen hier zwar einen aktivierten Zustand auf, zeigten jedoch keine NETose typischen morphologischen Veränderungen.

Bei hoher Grundaktivierung der neutrophilen Granulozyten, der zum Teil nicht erfüllten morphologischen NETose-Kriterien, sowie einer trotz mehrfacher Wiederholungen mangelnden Vergleichbarkeit der Lebendzellmikroskopie mit der Immunzytochemie wurde der Versuchsansatz als nicht erfolgreich eingestuft. Ohne die Zugabe von BSA konnten keine Aussagen zur NETose und zur Äquivalenz der beiden Methoden getroffen werden.

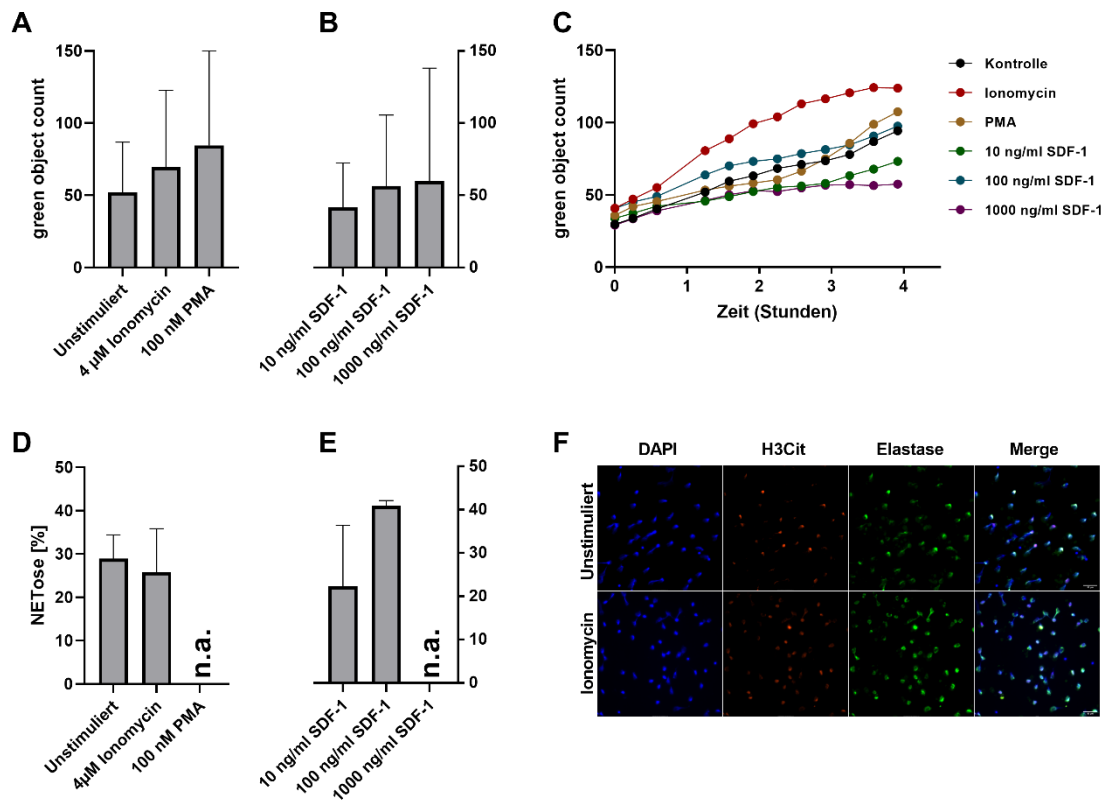


Abbildung 7: Gegenüberstellung der NETose-Ausprägung stimulierter neutrophiler Granulozyten ohne Zugabe von BSA. Messung nach vier Stunden mittels IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie in A-C (n=8) und Immunzytochemie in D-F(n=6). **A:** NETose automatisiert ermittelt durch IncuCyte® unter Zugabe von Ionomycin (4 μ M) oder PMA (100 nM), **B:** NETose automatisiert ermittelt durch IncuCyte® unter Zugabe von SDF-1/CXCL12 in den Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 1000 ng/ml, ausführlich beschrieben in Kapitel 7.3 **C:** Automatisierte Quantifizierung von NETose in graphischer Aufarbeitung durch IncuCyte®, **D:** NETose manuell ermittelt mittels Immunzytochemie unter Zugabe von Ionomycin (4 μ M) oder PMA (100 nM), n.a.: NETose nach Zugabe von PMA aufgrund nicht differenzierbarer Aktivitätsmuster nicht auswertbar, **E:** NETose manuell ermittelt mittels Immunzytochemie unter Zugabe von SDF-1/CXCL12 in den Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 1000 ng/ml, n.a.: NETose nach Zugabe von 1000 ng/ml SDF-1/CXCL12 aufgrund nicht differenzierbarer Aktivitätsmuster nicht auswertbar, ausführlich beschrieben in Kapitel 7.3 **F:** Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunzytochemisch gefärbter Zellen mit NETose.

In einer neuen Versuchsreihe wurden neutrophile Granulozyten isoliert und das Nährmedium unter Zusatz von BSA verwendet (siehe Abbildung 8). Das aus Rindern isolierte Serumalbumin ist in der Kultivierung von Körpergewebe und Zellkulturlinien bereits regelhaft etabliert. Es vermittelt eine Stabilisierung von Proteinen und Zellmembranen sowie die Bindung zirkulierender Toxine. Erneut erfolgte die Stimulation mit Ionomycin und PMA. Die Grundaktivierung unstimulierter neutrophiler Granulozyten zeigte dieses Mal sowohl in der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie als auch in der Immunzytochemie eine im Vergleich zu Vorversuchen deutlich geringere Grundaktivierung relativ gesehen zur anschließenden Stimulation mit Ionomycin und PMA (Abbildung 8A und 8D). Nach Zugabe des Kalzium-Ionophors Ionomycin zeigte sich sowohl in der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie, als auch der Immunzytochemie ein vergleichbarer Anstieg der NETose-Aktivierung. Die Stimulation mit PMA führte im Vergleich sowohl zur unstimulierten Gruppe als auch mit Ionomycin stimulierten Gruppen zur am stärksten ausgeprägten NETose-Aktivierung. Die IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie zeigte im Verlauf eine schnellere NETose-Bildung und frühzeitiges Plateau nach Stimulation mit Ionomycin verglichen mit PMA. PMA-induzierte NETose steigt langsamer, aber erzielt höhere NETose-Raten als Ionomycin. Im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe war die NETose-Aktivierung nach Stimulation mit PMA sogar signifikant erhöht. Dies konnte sowohl in der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie, als auch in der Immunzytochemie nachgewiesen werden (Abbildung 8A und 8D). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen zeigte sich zusätzlich auch die optische Abgrenzbarkeit von NETose in der Immunzytochemie (Abbildung 8F) im Vergleich zum Versuchsansatz ohne BSA (Abbildung 7F) deutlich verbessert.

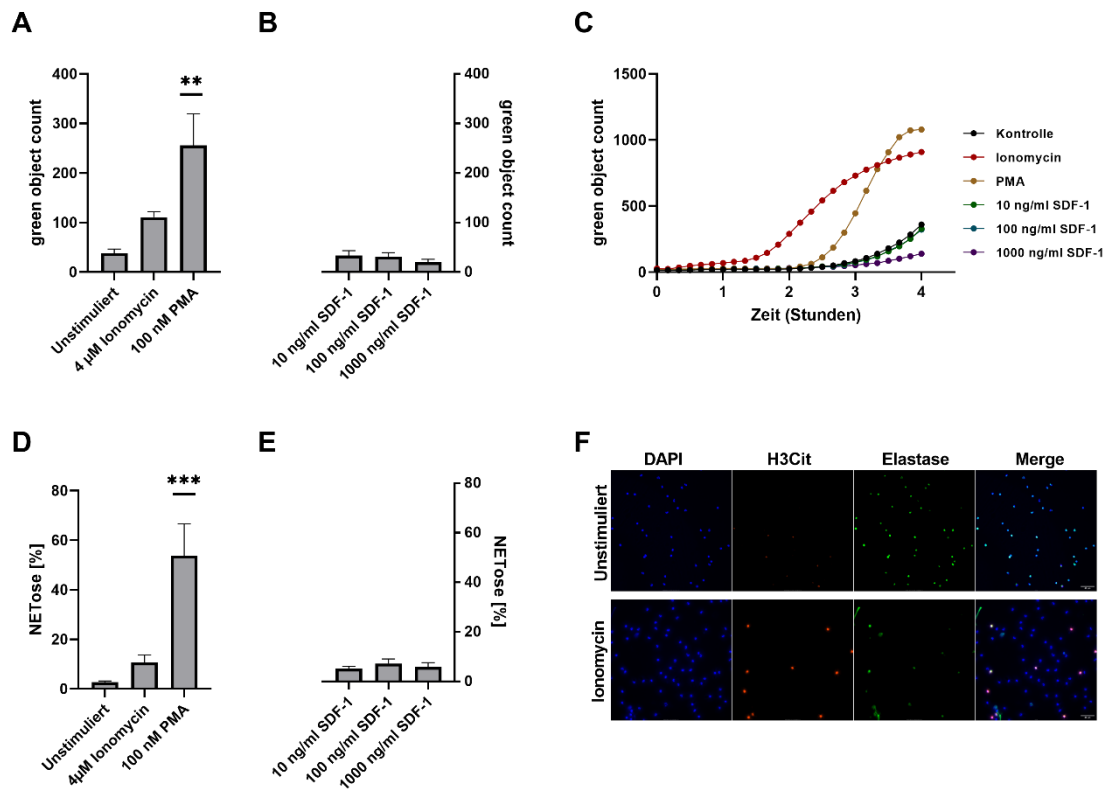


Abbildung 8: Gegenüberstellung der NETose-Ausprägung stimulierter neutrophiler Granulozyten unter Zugabe von BSA. Messung nach vier Stunden mittels IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie in A-C (n=8) und Immunzytochemie in D-F (n=8). **A:** NETose automatisch ermittelt durch IncuCyte® unter Zugabe von Ionomycin (4 μ M) oder PMA (100 nM), **B:** NETose automatisch ermittelt durch IncuCyte® unter Zugabe von SDF-1/CXCL12 in den Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 1000 ng/ml, ausführlich beschrieben in Kapitel 7.3 **C:** Automatisierte Quantifizierung von NETose in graphischer Aufarbeitung durch IncuCyte®, **D:** NETose manuell ermittelt mittels Immunzytochemie unter Zugabe von Ionomycin (4 μ M) oder PMA (100 nM), **E:** NETose manuell ermittelt mittels Immunzytochemie unter Zugabe von SDF-1/CXCL12 in den Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml oder 1000 ng/ml, ausführlich beschrieben in Kapitel 7.3 **F:** Exemplarische fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunzytochemisch gefärbter Zellen mit NETose (**p<0,01, ***p<0,001).

Es stellte sich heraus, dass für die Inkubation und Induktion der NETose von humanen neutrophilen Granulozyten die Zugabe von BSA entscheidend ist. Im Weiteren zeigte sich die erfolgreiche Etablierung der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie als gleichwertige Quantifizierungsmethode für NETose gegenüber des bisherigen Goldstandard der Immunzytochemie.

7.3 Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit SDF-1/CXCL12 führt zu keiner signifikanten Bildung von NETs

Parallel zur Etablierung der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie erfolgte die Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit dem Chemokin SDF-1/CXCL12. SDF-1/CXCL12 wurde orientierend in drei Zielkonzentrationen hinzugegeben: 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml. Im Etablierungsversuch ohne Verwendung von BSA zeigte die Stimulation mit SDF-1/CXCL12 in der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie sowie in der Immunzytochemie ebenso ungewöhnlich hohe Aktivierungswerte, wie die Kontroll- und Stimulationsgruppe (Abbildung 7B und 7E).

Im Rahmen der erfolgreichen Etablierung der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie als Alternative zur Immunzytochemie wurde auch die Stimulation mit SDF-1/CXCL12 in den Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml in der Gegenwart von BSA erneut durchgeführt. Hier zeigte sich, dass das Aktivierungsniveau durch SDF-1/CXCL12 sowohl in der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie, als auch in der Immunzytochemie auf vergleichbarem Niveau wie die unstimulierte Kontrollgruppe lagen (Abbildung 8B und 8E). Lediglich im Ansatz der Immunzytochemie zeigte sich nach Stimulation mit 100 ng/ml SDF-1/CXCL12 eine signifikante Erhöhung der NETose ($p < 0,05$) im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe (Abbildung 8E). Eine Zunahme (1000 ng/ml) der SDF-1/CXCL12-Konzentration zeigte weiterhin keine Steigerung der NETose-Rate. Zusammenfassend geht aus den Ergebnissen hervor, dass eine Stimulation mit SDF-1/CXCL12 übergeordnet zu keiner signifikanten Induktion der NETose von neutrophilen Granulozyten führt.

7.4 Präinkubation neutrophiler Granulozyten mit SDF-1/CXCL12 führt zu einer vermehrten Bildung von NETose nach Stimulation mit PMA

Nach Stimulation neutrophiler Granulozyten mit SDF-1/CXCL12 wurde der weitere Einfluss von SDF-1/CXCL12 auf die NETose beleuchtet. Hierzu wurden isolierte neutrophile Granulozyten in RPMI mit Zugabe von BSA aufgenommen und in verschiedenen Ansätzen mit SDF-1/CXCL12 in den Zielkonzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml, sowie einer RPMI-Kontrollgruppe für einen zuvor definierten Zeitraum von 30 Minuten prä-inkubiert und anschließend mit Ionomycin oder PMA stimuliert. Als Kontrollgruppe wurden neutrophile Granulozyten mit SDF-1/CXCL12 inkubiert und nachfolgend mit reinem Isolationsmedium RPMI inkubiert. Die Beurteilung der Aktivierung erfolgte mittels IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie. Eine Übersicht der Ergebnisse beider Versuchsansätze ist in Abbildung 9 dargestellt.

Nach Stimulation mit RPMI (Kontrollgruppe) oder Ionomycin zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten unter Präinkubation mit SDF-1/CXCL12. Unter Stimulation durch PMA konnte mit steigender Konzentration an SDF-1/CXCL12 im Rahmen der Präinkubation auch eine zunehmende Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beobachtet werden (Abbildung 9A).

Um das Ausmaß der Präaktivierung besser einschätzen zu können, wurde in einem nachgeordneten Versuchsansatz die Stimulation der neutrophilen Granulozyten nach Prä-Inkubation mit 10 ng/ml bzw. 100 ng/ml SDF-1/CXCL12 mit der halben Zielkonzentration der initial eingesetzten Stimulantien durchgeführt (2 µM Ionomycin bzw. 50 nM PMA). Hier zeigte sich eine deutliche SDF-1/CXCL12-abhängige Präaktivierung der neutrophilen Granulozyten, wobei es innerhalb der Vergleichsgruppe durch vorherige Inkubation der Zellen mit SDF-1/CXCL12 jedoch zu keiner weiteren Steigerung des Aktivierungsgrades kam (Abbildung 9B). Der in Abbildung 9A festgestellte Effekt im Sinne einer möglichen Sensibilisierung neutrophiler Granulozyten scheint somit nicht nur von SDF-1/CXCL12, sondern auch von der Konzentration der eingesetzten Stimulantien abhängig zu sein und führt nicht per se zu einer verstärkten Zellantwort.

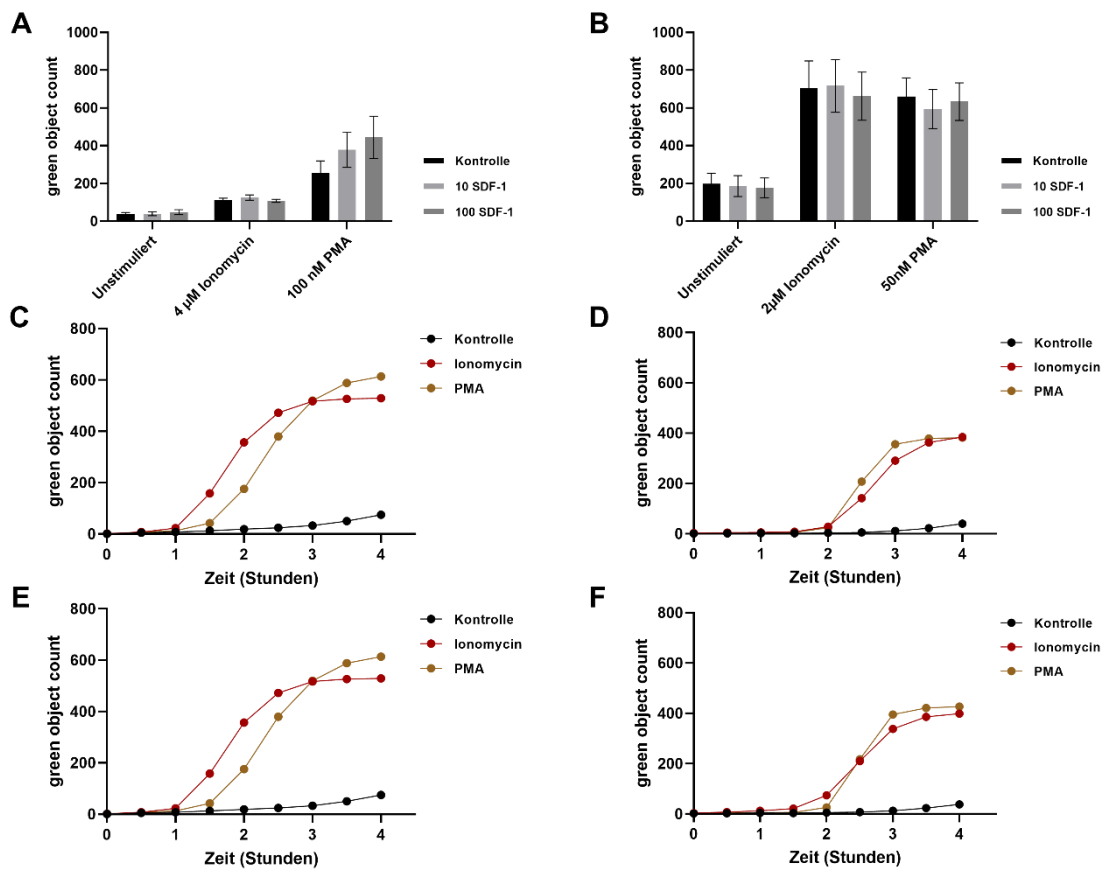


Abbildung 9: Prä-inkubierte (Kontrolle, 10 ng/ml SDF-1/CXCL12, 100 ng/ml SDF-1/CXCL12) neutrophile Granulozyten nach Stimulation von NETose durch Ionomycin oder PMA. **A:** Automatisierte Quantifizierung von NETose nach Stimulation mit 4 μ M Ionomycin und 100 μ M PMA (n=8), **B:** Automatisierte Quantifizierung von NETose nach Stimulation mit 2 μ M Ionomycin und 50 μ M PMA (n=6), **C:** Automatisierte Quantifizierung von NETose in graphischer Aufarbeitung durch IncuCyte® nach Präinkubation mit 10 ng/ml SDF-1/CXCL12 und Stimulation mit 4 μ M Ionomycin und 100 μ M PMA (n=8), **D:** Automatisierte Quantifizierung von NETose in graphischer Aufarbeitung durch IncuCyte® nach Präinkubation mit 10 ng/ml SDF-1/CXCL12 und Stimulation mit 2 μ M Ionomycin und 50 μ M PMA (n=6), **E:** Automatisierte Quantifizierung von NETose in graphischer Aufarbeitung durch IncuCyte® nach Präinkubation mit 100 ng/ml SDF-1/CXCL12 und Stimulation mit 4 μ M Ionomycin und 100 μ M PMA (n=8), **F:** Automatisierte Quantifizierung von NETose in graphischer Aufarbeitung durch IncuCyte® nach Präinkubation mit 100 ng/ml SDF-1/CXCL12 und Stimulation mit 2 μ M Ionomycin und 50 μ M PMA (n=6).

7.5 Präinkubation von neutrophilen Granulozyten mit SDF-1/CXCL12 scheint zur vermehrten Expression von PAD4 zu führen

Um den Einfluss von SDF-1/CXCL12 auf den Prozess der NETose genauer beschreiben zu können, untersuchten wir auf Proteinebene die Expressionsspiegel des Enzyms PAD4. PAD4 nimmt eine zentrale Rolle im zellulären Ablauf der NETose ein und kann somit als geeignete Zielgröße der NETose herangezogen werden. Neutrophile Granulozyten wurden aus peripherem Vollblut isoliert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 4 μ M Ionomycin oder SDF-1/CXCL12 (10 ng/ml, 100 ng/ml) und Abnahme des Zellpellets nach 240 Minuten (Abbildung 10). Zur Auswertung erfolgte die Normalisierung auf die unstimulierte Kontrollgruppe. Die Inkubation mit 10 ng/ml beziehungsweise 100 ng/ml SDF-1/CXCL12 führte dabei zu einer Erhöhung der PAD4-Expression (1,6- bis 1,7-facher Anstieg), im Vergleich zu den unstimulierten Proben (Abbildung 10B).

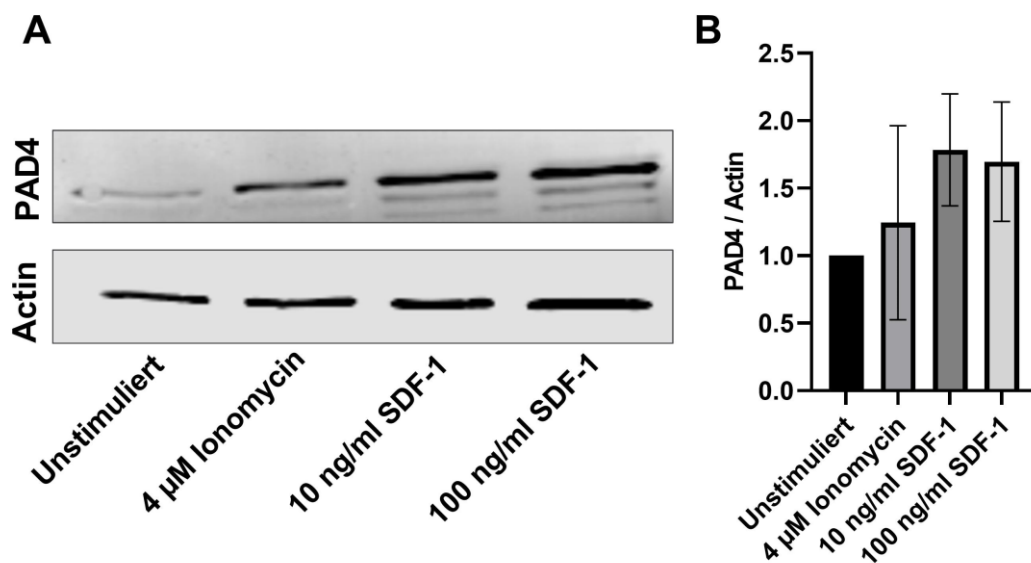


Abbildung 10: PAD4-Expression nach Inkubation mit Ionomycin (4 μ M) oder SDF-1/CXCL12 (10 ng/ml, 100 ng/ml) nach 240 Minuten normalisiert zur unstimulierten Kontrollgruppe mit 1.0), **A:** Repräsentativer Ausschnitt eines durchgeführten Western Blots (n=3) nach 240 Minuten (PAD4-Bande und Actin-Kontrollbande) **B:** PAD4-Expression (PAD4/Actin) nach 240 Minuten (n=3 bis 10).

Aus den Ergebnissen des Western Blots ist zu entnehmen, dass SDF-1/CXCL12 tendenziell zu einer Steigerung der PAD4-Expression führen kann. Hierfür muss jedoch ein gewisser Wirkspiegel des Stimulators vorliegen, um einen solchen Effekt erzielen zu können.

8. Diskussion

NETose stellt für neutrophile Granulozyten einen zentralen Prozess in der Erfüllung ihrer physiologischen Funktion sowie auch im Rahmen von Inflammation und Krankheitsprogression dar. Als Goldstandard zur Determinierung von NETose hat sich die Immunzytochemie etabliert. Wesentliche Limitation dieser Methode ist neben dem zeitlichen und personellen Aufwand für Versuchsdurchführung und -auswertung auch eine fehlende Beurteilbarkeit dynamischer NETotischer Prozesse, sofern die Zellen nicht im Vorfeld fixiert werden. Hier konnte durch den Einsatz der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie eine moderne Methode am Standort etabliert werden, die es erlaubt, NETose dynamisch zu beurteilen.

8.1 Standortetablierung IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie

Erste Etablierungsversuche zeigten unerwartet hohe Aktivitätsmuster der isolierten Granulozyten, welche sich sowohl in der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie, als auch der als Referenz herangezogenen Immunzytochemie zeigten. Um Verunreinigungen sowie Störfaktoren zu reduzieren führten wir zunächst eine Neubeschaffung und Neuansetzung sämtlicher Kulturmedien sowie ein alternatives Isolationsverfahren mittels Percoll-Isolationsmedium durch, was jedoch zu keiner Stabilisierung des Zellverhaltens führte. Da in der Literatur bereits spontane NETose-Formationen in serumfreiem Kulturmedium beschrieben wurden [107], deren Zahl durch Zugabe von Serum um ein signifikantes Level gesenkt werden konnten, ohne hierdurch die Aktivierung durch Stimulanzen wie PMA zu unterbinden [106], fügten wir im nächsten Schritt dem Isolationsmedium BSA hinzu. BSA wirkt membranstabilisierend. Die Zugabe von BSA ist jedoch nicht unumstritten, da es bereits in niedrigen Konzentrationen zu einer Inhibition der NETose in humanen Neutrophilen durch ebenfalls etablierte Stimulanzen wie beispielsweise LPS kommt [106, 108]. In Übereinstimmung mit bereits veröffentlichten Ergebnissen [71, 106, 109, 110] zeigte sich durch Zugabe von BSA eine Reduktion der Grundaktivierung und Stabilisierung des Zellverhaltens,

ohne dass eine Stimulation durch Ionomycin oder PMA unterbunden wurde. Aufgrund der reproduzierten Ergebnisse wurden die weiteren Ansätze in serumhaltigem Medium durchgeführt.

Den stabilisierenden Effekt serumhaltiger Medien konnten wir vergleichbar in der Immunzytochemie und der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie in unterschiedlichen Versuchen reproduzieren (Abbildung 7 und Abbildung 8). IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie ist eine bereits für diverse Zellreihen zur Echtzeit-Quantifizierung und Beurteilung eine etablierte Messmethode. Ihre Anwendung zur Quantifizierung von NETose wurde in einem Methodenpaper von Gupta et. al. ausführlich als äquivalent zur Immunzytochemie dargelegt [104]. Eine breitgestreute Etablierung der Methode ist unseres Wissens jedoch noch nicht erfolgt. Ihr bedeutender Vorteil und Zugewinn für kommende Experimente im Vergleich zur Immunzytochemie liegt darin, dass NETose dynamisch beurteilt werden kann, ohne den eigentlichen Vorgang durch Zellfixation zu unterbrechen. Darüber hinaus ist durch die automatisierte Auswertung der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie ein hohes Maß an Objektivität und sehr gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet. Dies stellt jedoch gleichzeitig auch eine wichtige Limitation dar. Durch rein optische Beurteilungskriterien gehen Feinheiten der NETose wie beispielsweise variierende Größe der neutrophilen Granulozyten verloren. Weiterhin können qualitative Merkmale wie Citrullinierung von Histonen, oder Ausprägung von Enzymen wie Metalloproteasen oder Elastasen noch nicht erfasst werden. Die Stärke des IncuCyte® liegt vielmehr in der schnellen Beurteilbarkeit von NETose und somit in der Eignung zum Screenen NETose-beeinflussender Substanzen. Hinsichtlich der Anfärbung qualitativer Merkmale und Differenzierung morphologischer Unterschiede bleibt die Immunzytochemie jedoch zum aktuellen Zeitpunkt überlegen.

Auf Basis der oben dargelegten Untersuchungen konnten wir zeigen, dass die IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie äquivalente Ergebnisse im Vergleich zum etablierten Goldstandard der Immunzytochemie liefert und somit eine adäquate Messmethode zur Quantifizierung von NETose darstellt. Des Weiteren stellte sich die Bedeutung der Zugabe von BSA zu isolierten neutrophilen Granulozyten

heraus, um eine unkontrollierte Präaktivierung von neutrophilen Granulozyten weitgehend zu unterbinden und somit die Sensitivität der Messmethoden zu erhöhen.

8.2 Präinkubation neutrophiler Granulozyten mit SDF-1/CXCL12 und anschließender Stimulation durch PMA führt zu vermehrter NETose

Zur Evaluation des Effektes von SDF-1/CXCL12 auf NETose-formende neutrophile Granulozyten wurden aus Vollblut isolierte PMNs mit SDF-1/CXCL12 inkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation ausgewählter Ansätze durch Ionomycin und PMA. Hierunter ließen sich somit Stimulations- und Präinkubationseffekte von SDF-1/CXCL12 beurteilen. In den durchgeführten Experimenten zeigten sich nach Stimulation mit SDF-1/CXCL12 keine bedeutend höheren NETose-Raten im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe (Abbildung 8). Unsere Ergebnisse füllen hierbei eine Lücke der zur Verfügung stehenden Literatur, in der bisher keine direkten Effekte des Chemokins SDF-1/CXCL12 auf NETose beschrieben wurde. Da SDF-1/CXCL12 als Chemokin das Homing von neutrophilen Granulozyten vermittelt [1], könnten die fehlenden stimulatorischen Effekte auf eine fehlende pro-inflammatorische Rolle hindeuten. Dem entgegen steht jedoch die mehrfach beschriebene Beobachtung, dass SDF-1/CXCL12 pro-inflammatorische Effekte vermittelt und eine Korrelation mit diversen Krankheitsentitäten aufweist [84, 100, 101].

Der gesamtphysiologische Effekt von SDF-1/CXCL12 zeigt sich vielschichtig und ist immer noch nicht vollständig erfasst. Insbesondere das komplexe Rezeptorbindungsprofil mit nachfolgender Aktivierung von Signalkaskaden scheint *in vitro* nur schwer darstellbar zu sein. Hierzu legen Ergebnisse von Neumann et al. nahe, dass eine mögliche Heterodimerisierung von CXCR4 und CXCR7 im Rahmen der SDF-1/CXCL12-Signalkaskade *in vivo* nicht beobachtbar ist [111, 112]. Zudem ist der Gesamtprozess der SDF-1/CXCL12-vermittelten NETose *in vivo* nicht abbildbar, wodurch deren physiologische Beurteilbarkeit nur eingeschränkt möglich ist. Eine weitere Limitation des extrakorporalen experimentellen Ansatzes liegt im Auftreten unterschiedlicher Splice-Varianten von SDF-1/CXCL12 vor (vergleiche Tabelle 1). Physiologisch treten

unterschiedliche Splice-Varianten mit unterschiedlicher Organotropie und Wirkspektrum auf [79, 82]. Es ist daher also durchaus möglich, dass die von uns verwendete Alpha-Variante von CXCL12/SDF-1 einen anderen, möglicherweise geringeren Einfluss auf NETose hat als die weiteren Varianten. SDF-1/CXCL12-Alpha ist im gesamten menschlichen Organismus am weitesten verbreitet und an verschiedenen physiologischen Prozessen, wie Hämatopoese, Stammzellrekrutierung und Neuromodulation beteiligt [10, 113-115]. Als eine weitere wichtige Splice-Variante tritt SDF-1/CXCL12-Beta vor allem in hoch vaskularisierten Organen wie Leber, Milz oder dem Knochenmark auf und scheint in bemerkenswerter Interaktion mit CXCR4-tragenden Zellen zu stehen [81, 116]. Als prädominante kardial-exprimierte Form zeigte sich SDF-1/CXCL12-Gamma [81]. Interessanterweise konnte im Rahmen eines Myokardinfarktes jedoch auch die vermehrte Expression von SDF-1/CXCL12-Alpha bei unveränderter Gamma-Variante nachgewiesen werden [117]. Insgesamt scheinen die Splice-Varianten somit neben organbezogenen auch unterschiedliche Expressionen und Funktionen in Abhängigkeit von ihrem physiologischem oder pathologischem Kontext zu besitzen. Da SDF-1/CXCL12-Alpha unter allen Splicevarianten neben ubiquitärer Organexpression auch den stärksten chemotaktischen Gradienten erzeugt, erachten wir diese als geeignete Splicevariante um exemplarisch den Effekt der SDF-1/CXCL12-Familie zu beurteilen. Als Limitation der zur Verfügung stehenden Literatur sind zudem häufig nicht die Splice-Varianten von SDF-1/CXCL12 genannt, was eine Differenzierung der einzelnen Varianten erschwert und mögliche Unterschiede in Bezug auf physiologisches wie pathologisches Potenzial verschwimmen lässt. Unser Anliegen ist es daher auf die Notwendigkeit der differenzierten Benennung der Splice-Varianten aufmerksam zu machen.

Der Nachweis eines direkten molekularbiologischen Zusammenhang zwischen SDF-1/CXCL12 und NETose gelang bisher nicht. Über seine Rezeptorbindung an CXCR4 und nachfolgender Aktivierung kalziummobilisierender Signalwege kommt SDF-1/CXCL12 jedoch als potenzieller Aktivator der NETose in Frage [100, 118]. In vorherigen Studien konnte außerdem gezeigt werden, dass erhöhte SDF-1/CXCL12-Level mit einer erhöhten PAD4-Konzentration einhergehen können [84], ohne jedoch näher auf den Vorgang der NETose einzugehen. Die

Vermutung der Autoren war, dass SDF-/CXCL12 durch PAD4 citrulliniert wird und sich somit in seiner Serumkonzentration limitiert. Ob hierdurch auch vermehrte NETose induziert wird ist bisher unklar. Ein Grund dafür ist die Beobachtung, dass die Kalzium-Aktivierungsschwelle von PAD4 in vitro deutlich höher liegt als die in vivo erreichten Kalziumkonzentrationen [38]. Eine singuläre Initiation der NETose durch einen Kalziumanstieg erscheint daher unwahrscheinlich.

In weiterführenden Experimenten konnten wir zeigen, dass in prä-inkubierten Zellen im Vergleich zur nicht vorbehandelten Kontrollgruppe die NETose-Rate tendenziell erhöht ist (Abbildung 9). Auf Basis unserer Ergebnisse liegt daher der Schluss nahe, dass eine Interaktion beider Stoffe im Sinne einer Sensibilisierung oder Präaktivierung vorliegt und sich auch auf den Prozess der NETose auswirken kann. Diese Hypothese unterstützt eine Publikation, die einen solchen Präaktivierungseffekt neutrophiler Granulozyten für NETose in der Krankheitsprogression des Diabetes Mellitus beschreibt [71]. Der molekulare Vorgang konnte hier jedoch nicht weiterführend erfasst werden. Im Fall der SDF-1/CXCL12 vermittelten Präaktivierung ist das Rezeptorbindungsverhalten als erster Kontaktpunkt zu untersuchen. Altenburg et. al. beschrieben 2007, dass eine Blockade von CXCR4 und CXCR7 durch AMD3100 (1,1'- (1,4-Phenylenebis(methylene))-bis-1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane, Plexifavor), einem anerkannten CXCR4-Inhibitor, die chemotaktische Wirkung von SDF-1/CXCL12 signifikant beeinflusst [82]. Denkbar wäre somit, dass eine Blockade von CXCR4 auch zu einer reduzierten Präaktivierung neutrophiler Granulozyten gegenüber NETose führt. Im Rahmen unseres experimentellen Ansatzes wäre daher in weiteren Schritten zu beurteilen, ob AMD3100 oder entsprechende Knockout-Mäuse ebenfalls die beobachteten Effekte der SDF-1/CXCL12-induzierten NETose beeinflussen.

Der Zusammenhang zwischen SDF-1/CXCL12 und NETose sollte somit in zukünftigen Experimenten genauer beleuchtet werden. Aufgrund der zeitlichen Latenz der beobachteten Hochregulation der PAD4-Expression halten wir es für plausibel, dass SDF-1/CXCL12 NETose über Regulation der Proteinexpression, beispielsweise durch Einfluss auf die Transkription, beeinflusst. Als Produkt der Proteinbiosynthese kann im Rahmen der NETose PAD4 als Schlüsselenzym

herangezogen werden [31]. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde nachfolgend ein Western-Blot zur Quantifizierung der Expression von PAD4 durchgeführt.

8.3 Präinkubation neutrophiler Granulozyten mit SDF-1/CXCL12 scheint zur vermehrten Expression von PAD4 zu führen

Zur Beurteilung einer möglichen SDF-1/CXCL12-vermittelten Beeinflussung der PAD4-Proteinexpression wurden neutrophile Granulozyten mit drei Konzentrationen SDF-1/CXCL12 inkubiert und die PAD4-Expression semiquantitativ bestimmt (siehe Abbildung 10). Es zeigte sich, dass es nach 240 Minuten zu einem erkennbaren Anstieg der PAD4-Expression kommt. Ausgehend von der Vermutung, dass SDF-1/CXCL12 die NETose über Affektion der Proteinexpression beeinflusst, scheint sich dieser Verdacht zu erhärten. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um diese Hypothese vollends zu überprüfen.

Dass eine Beeinflussung der Proteinexpression durch SDF-1/CXCL12 vorliegt unterstützen bisherige Erkenntnisse zum SDF-1/CXCL12-CXCR4-Bindungsverhalten und ihrer nachgeschalteten Signalkaskaden (siehe Abbildung 3). Durch Aktivierung des PI3/Akt- und Ras-Signalweges kommt es zur Rekrutierung des vielfach beschriebenen Transkriptionsfaktors NFκB [98, 100]. Durch Bindung an verschiedene DNA-Motive ist NFκB in der Lage die Transkription zu steigern. Seine Beteiligung an der Ausbildung des NLRP3-Inflammasoms unterstreicht seine entscheidende Rolle im Rahmen proinflammatorischer Prozesse [119]. Münzer et al. zeigten zudem, dass eine Assimilation des Inflammasoms eine Formation von NETs fördert [120] und somit auch ein indirekter Zusammenhang zwischen NETose und NFκB-Aktivierung vorliegt. Die direkte Beeinflussung von NETose oder der PAD4-Expression durch NFκB ist bisher nicht gelungen. Eine konkrete transkriptionelle Regulation von PAD4 ist jedoch in anderem Kontext beschrieben worden. Hierbei handelt es sich neben einer Östrogen-Estradiol-vermittelten Regulation auch um eine p53-vermittelte Aktivierung der PAD4-Expression [121, 122]. Weiterhin zeigt sich PAD4 selbst ebenfalls als transkriptionsregulierender Faktor, indem es aktiv die

Citrullinierung von Histonen beeinflusst und durch Interaktion mit p65 die NFκB-Aktivität unmittelbar beeinflusst [44, 99, 123]. Die direkte Verbindung der SDF-1/CXCL12/CXCR4-Achse mit einer möglichen p53-vermittelten Regulation der PAD4-Expression ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Exemplarische Ergebnisse an primären Neuronen konnten keine vermehrte Expression von p53 nach Stimulation von CXCR4 mit SDF-1/CXCL12 im Vergleich zum exogenen CXCR4-Aktivator gp120 zeigen [124, 125]. Dem gegenüber stehen Beobachtungen, dass es nach Bindung von SDF-1/CXCL12 an CXCR4 zu einer Acetylierung und vermehrten Bildung von p53 zu kommen scheint [126]. Weiterhin scheint p53 die Produktion von SDF-1/CXCL12 durch Herunterregulation der Transkription von SDF-1/CXCL12 zu vermindern, was einem negativen Rückkopplungsmechanismus entsprechen könnte [127]. In Zusammenschau der Literatur erscheint es daher suggestiv, dass ein molekularer Zusammenhang zwischen SDF-1/CXCL12 und der Regulation von Transkriptionsfaktoren wie NFκB besteht.

Forschungsarbeiten legen inzwischen den Fokus vermehrt auf beobachtete Interaktionen zwischen NFκB und p53. Sowohl NFκB, als auch p53 spielen im Rahmen inflammatorischer Prozesse eine zentrale Rolle [120, 128-130]. Ihre kombinierte Aktivierung scheint die vermehrte Produktion von proinflammatorischen Chemokinen und Interleukinen in Monozyten und Makrophagen zu stimulieren [131]. Die produzierten Chemokine führen ihrerseits zu einer chemotaktischen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe [131, 132]. Eine konkrete intrazelluläre Aktivierung von PAD4 durch SDF-1/CXCL12 ist auch in diesem Zusammenhang noch nicht vollständig geklärt. Naheliegend scheint neben einer kalziumvermittelten Aktivierung jedoch die transkriptionelle und genexpressive Beeinflussung über einen möglichen Zusammenhang zwischen NFκB- und p53-abhängigen Signalwegen zu sein. Um diesen möglichen Zusammenhang der pro-inflammatorischen Wirkung von SDF-1/CXCL12 über NFκB und p53 auf die PAD4-Expression mit schlussendlicher NETose weiter zu verstehen sind zukünftig umfassende Arbeiten mit Fokus auf intrazelluläre Signalkaskaden anzustreben.

8.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Es konnte gezeigt werden, dass die IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie im Vergleich zur Immunzytochemie eine äquivalente Quantifizierung der NETose ermöglicht. Insbesondere in Bezug auf Zeitersparnis und mögliche Breite der zu untersuchenden Reagenzien zeigt sie ihre entscheidenden Vorteile. Dies eröffnet der weiteren Erforschung von Einflussgrößen auf Inflammation, Aktivierung neutrophiler Granulozyten und insbesondere NETose neue Möglichkeiten. Für zukünftige Experimente ermöglicht dies konkret die Untersuchung bisher unerforschter Einflussgrößen auf NETose in Hochdurchsatzverfahren und die Auswahl geeigneter Kandidaten, um das Verständnis von NETose in unterschiedlichen Kontexten, Pathologien und Umgebungen zu erweitern. Nachfolgend kann somit zielgerichtet die qualitative und quantitative Untersuchung von NETose mittels Immunzytochemie und Immunfluoreszenz erfolgen und der individuelle molekulare Prozess evaluiert werden.

Unsere Untersuchungen des Chemokins SDF-1/CXCL12 und seiner vermittelten Effekte zeigten, dass SDF-1/CXCL12 zwar keinen unmittelbaren Aktivierungseffekt vermittelt, jedoch auf Eben der Proteinexpression durch Beeinflussung der PAD4-Expression den Ablauf der NETose zu beeinflussen scheint. In zukünftigen Versuchen wird es interessant sein, zu untersuchen, ob sich die verschiedenen SDF-1/CXCL12-Splicevarianten in Verhalten und ihrem Einfluss auf NETose unterscheiden. Ausgehend von unseren Beobachtungen stellen sich mehrere weiterführende Fragen: Auf welche Art und Weise vermittelt SDF-1/CXCL12 seine Effekte auf die PAD4-Expression? Da bereits bekannt ist, dass SDF-1/CXCL12 stromabwärts die Regulation des Transkriptionsfaktors NFκB beeinflusst, sollte der Fokus bei zukünftigen Untersuchungen auf intrazellulären Signalwegen liegen. Da ein indirekter Zusammenhang zwischen NFκB und NETose dargestellt werden konnte, sollte insbesondere ein direkter Zusammenhang beleuchtet werden. Darüber hinaus ist zu klären, ob einzelne Signalwege nach Bindung von SDF-1/CXCL12 bevorzugt und andere benachteiligt beansprucht werden, da beispielsweise PKC/IP3 Kalzium-Signalwege unmittelbar zu keiner Steigerung der kalziumsensitiven NETose zu führen scheint. Methodisch wären hierbei in vitro Proteininhibitionsversuche

mittels siRNA an alternativen Zellkulturmodellen denkbar, um einzelne Schlüsselproteine des intrazellulären Signalweges gezielt zu beeinträchtigen und das Verständnis des SDF-1/CXCL12/CXCR4-Signalweges insgesamt zu erweitern. Auch die Verknüpfung zur PAD4-Expression sollte weiter untersucht werden. Die NFκB-p53-Interaktionen sowie PAD4-p63-Zusammenhänge als mögliche Kommunikationsweg sind zwar bereits beschrieben, jedoch immer noch kontrovers diskutiert und nicht abschließend geklärt. Als möglicher Ansatz ließe sich in vitro sowohl der stromabwärts-vermittelte Effekt von NFκB auf PAD4 durch schrittweise Inhibition innerhalb der Signalkaskade als auch stromaufwärts ausgehend von bereits bekannten Transkriptionsfaktoren wie p53 wählen. Ziel sollte hierbei die Identifikation der relevanten Zwischenschritte und das Aufzeigen einer möglichen molekularen Verbindung zwischen SDF-1/CXCL12/CXCR4-Signaling und PAD4-Expression sein.

Sollte sich in vitro ein signifikanter Effekt und Zusammenhang aufzeigen gilt es diesen hinsichtlich seiner Relevanz im Rahmen der NETose und in seinem physiologischen beziehungsweise pathophysiologischen Stellenwert durch gezielte in vivo Versuche einzuordnen. Es hat sich gerade im Bereich des intrazellulären Signalings gezeigt, dass Rezeptoreigenschaften von CXCR4 und CXCR7 in vitro zu in vivo divergieren, was die Notwendigkeit einer Überführung beobachtbarer Ergebnisse hin zu in vivo Modellen unterstreicht. Dies erweitert die Beurteilbarkeit des komplexen Ablaufes und kann zudem mögliche Ansatzpunkte für die Beeinflussung der Signalübertragung und molekularen NETose liefern.

Neben der grundlagenwissenschaftlichen Herangehensweise sollte zudem eine direkte klinische Einordnung erwogen werden. Da sich sowohl die Rolle von SDF-1/CXCL12, als auch die Funktion neutrophiler Granulozyten im physiologischen und pathologischen Zusammenhang wesentlich unterscheidet, ist es sinnvoll, beobachtbare Ergebnisse in krankheitsbezogenem Kontext unter Einbeziehung von Patientenproben zu evaluieren. Einen großen Vorteil stellt, neben des pathologiespezifischen Ansatzes bei guter klinischer Anbindung auch der, im Vergleich zu Tiermodellen, niedrige Beschaffungsaufwand des Probenmaterials dar.

NETose ist ein verhältnismäßig junger Bereich und spannender Bereich der immunologischen Forschung. Trotz großer Fortschritte und Erkenntnisse stehen wir erst am Anfang des Verständnisses über den Umfang und hochkomplexen Ablauf der NETose. Auch wenn sich zunehmend molekulare Verknüpfungen zur NETose andeuten, sind die zugrunde liegenden intrazellulären Mechanismen bisher nur rudimentär verstanden. Die pathologische Rolle von NETs in verschiedenen Krankheitsentitäten, immunologischen- und inflammatorischen Abläufen zeigt jedoch die Bedeutsamkeit dieses Forschungsbereiches für alle Fachdisziplinen der Medizin und lassen einen mit Spannung auf kommende Experimente und Publikationen blicken.

9. Zusammenfassung

Neutrophile Granulozyten spielen eine zentrale Rolle im Rahmen pathogenassoziierter und autoinflammatorischer Prozesse. Hierbei zeigte sich, dass die NETose einen Schlüsselmechanismus in der Progression verschiedener Krankheitsbilder darstellt. Zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von NETs soll zunächst die Standortetablierung der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie als effizientes Äquivalent zur Immunzytochemie erfolgen. Um den Einfluss von Chemokinen auf NETose weiter zu beurteilen, wurde exemplarisch der Einfluss des Chemokins SDF-1/CXCL12 auf NETose genauer untersucht und dargestellt.

Es zeigt sich, dass BSA für die Inkubation von humanen neutrophilen Granulozyten mit anschließender NETose Induktion von großer Bedeutung ist. Dabei lassen sich die aufgeführten Beobachtungen äquivalent sowohl durch Immunzytochemie als auch IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie im Sinne einer erfolgreichen Standortetablierung reproduzieren. Die Stimulation von neutrophilen Granulozyten mit SDF-1/CXCL12 führt zu keiner übergeordneten Induktion der NETose-Rate. Im Rahmen der Präinkubation mit SDF-1/CXCL12 stellte sich hingegen eine vermehrte Bildung von NETs nach Stimulation mit PMA heraus. In Western Blots konnte jedoch gezeigt werden, dass die PAD4-Proteinkonzentration mit zunehmender Konzentration von SDF-1/CXCL12 und Inkubationsdauer tendenziell ansteigt, was einen möglichen Einfluss auf die Proteinexpression nahelegt.

Aufbauend auf unseren Ergebnissen ist festzuhalten, dass die IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie eine äquivalente Messmethode zur Bestimmung von NETose darstellt und daher auch zukünftig für die Ermittlung von Einflussfaktoren auf die NETose im Sinne von breiten Hochdurchsatz-Experimenten herangezogen werden kann. Die Rolle von SDF-1/CXCL12, insbesondere das komplexe molekulare Wirkungsprofil und der daraus resultierende Einfluss auf NETose gilt es in diesem Zusammenhang weiter zu beleuchten.

10. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Universitätsklinik, Abteilung Innere Medizin III unter Betreuung von Prof. Dr. med. Oliver Borst durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Patrick Münzer, Arbeitsgruppenleiter, Abteilung für Innere Medizin III, Universitätsklinikum Tübingen.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. Patrick Münzer von mir eigenständig durchgeführt. Die Durchführung der Western Blots erfolgten in ihrer technischen Umsetzung in Zusammenarbeit mit Daniela Eißler (Labortechnische Assistentin, Arbeitsgruppe Borst). Die Durchführung der IncuCyte®-Lebendzellmikroskopie erfolgte nach Unterweisung durch M.Sc. Malte Ritter unter Nutzung des IncuCyte®-Zoom der Arbeitsgruppe Skokowa, Abteilung für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Tübingen. Die methodische Beratung erfolgte durch Dr. rer. nat. Patrick Münzer und M. Sc. Mailin Manke. Die abschließende statistische Auswertung erfolgte durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Es bestehen keine Interessenskonflikte, insbesondere in Bezug auf Nennung von Herstellern und Entwicklern, sowie der Nennung von geschützten Warenbezeichnungen.

Tübingen, den 06.12.2023

Jann Arden

11. Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Allen bedanken, die mich fachlich wie persönlich während meiner wissenschaftlichen Arbeit und der Erstellung meiner Dissertation begleitet haben. Besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Oliver Borst und meiner Zweitgutachterin Sandra Beer-Hammer, sowie das Lesen und Bewerten der Dissertationsarbeit.

Ich bedanke mich bei der gesamten Arbeitsgruppe für freundliche Aufnahme, die umfassende Unterstützung und die Möglichkeit in der AG Borst meine Dissertation verfassen zu dürfen. Mein besonders herzlicher Dank gilt meinem Betreuer Patrick Münzer, der mich in engem Austausch und mit wertvoller Hilfe über den gesamten Zeitraum begleitet hat.

Die Arbeit wurde durch das IZKF Promotionskolleg der Medizinischen Fakultät Tübingen finanziell und ideell gefördert. Für die Unterstützung und stetige Ansprechbarkeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Im Rahmen der Dissertation möchte ich mich sinnbildlich bei allen für die Ermöglichung, Unterstützung und Begleitung während des gesamten Studiums bedanken, die mich auf diesem Weg begleitet haben. Besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinen Schwestern, sowie meiner Partnerin, ohne deren Unterstützung ich mein gesamtes Studium nicht in dieser Form hätte durchführen können.

12. Literaturverzeichnis

1. Ratajczak, M.Z., et al., A novel perspective on stem cell homing and mobilization: review on bioactive lipids as potent chemoattractants and cationic peptides as underappreciated modulators of responsiveness to SDF-1 gradients. *Leukemia*, 2012. **26**(1): p. 63-72.
2. Athens, J.W., et al., Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest*, 1961. **40**(6): p. 989-95.
3. Malech, H.L., F.R. DeLeo, and M.T. Quinn, The role of neutrophils in the immune system: an overview. *Methods Mol Biol*, 2014. **1124**: p. 3-10.
4. Kolaczkowska, E. and P. Kubes, Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 2013. **13**(3): p. 159-75.
5. Dale, D.C. and W.P.t. Hammond, Cyclic neutropenia: a clinical review. *Blood Rev*, 1988. **2**(3): p. 178-85.
6. de Oliveira, S., E.E. Rosowski, and A. Huttenlocher, Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nat Rev Immunol*, 2016. **16**(6): p. 378-91.
7. Ley, K., et al., Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(9): p. 678-89.
8. Summers, C., et al., Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol*, 2010. **31**(8): p. 318-24.
9. Liew, P.X. and P. Kubes, The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev*, 2019. **99**(2): p. 1223-1248.
10. Boldajipour, B., et al., Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell*, 2008. **132**(3): p. 463-73.
11. Kucia, M., et al., CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. *J Mol Histol*, 2004. **35**(3): p. 233-45.
12. Bleul, C.C., et al., A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med*, 1996. **184**(3): p. 1101-9.
13. Tu, R., et al., The stromal cell-derived factor 1/C-X-C chemokine receptor type 4 axis is important in neutrophil migration caused by cardiopulmonary

- bypass in children. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2018. **26**(3): p. 431-437.
14. Funamoto, S., et al., Spatial and Temporal Regulation of 3-Phosphoinositides by PI 3-Kinase and PTEN Mediates Chemotaxis. *Cell*, 2002. **109**(5): p. 611-623.
 15. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 181-218.
 16. Thiam, H.R., et al., Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2020. **36**: p. 191-218.
 17. Pilsczek, F.H., et al., A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
 18. Skendros, P., et al., Complement and tissue factor-enriched neutrophil extracellular traps are key drivers in COVID-19 immunothrombosis. *J Clin Invest*, 2020. **130**(11): p. 6151-6157.
 19. Sorvillo, N., et al., Extracellular DNA NET-Works With Dire Consequences for Health. *Circ Res*, 2019. **125**(4): p. 470-488.
 20. Fuchs, T.A., et al., Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(36): p. 15880-5.
 21. Weckbach, L.T., et al., Midkine drives cardiac inflammation by promoting neutrophil trafficking and NETosis in myocarditis. *J Exp Med*, 2019. **216**(2): p. 350-368.
 22. Khandpur, R., et al., NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis. *Sci Transl Med*, 2013. **5**(178): p. 178ra40.
 23. Grabcanovic-Musija, F., et al., Neutrophil extracellular trap (NET) formation characterises stable and exacerbated COPD and correlates with airflow limitation. *Respir Res*, 2015. **16**(1): p. 59.
 24. Bonaventura, A., et al., Neutrophil Extracellular Traps and Cardiovascular Diseases: An Update. *Cells*, 2020. **9**(1).
 25. Delgado-Rizo, V., et al., Neutrophil Extracellular Traps and Its Implications in Inflammation: An Overview. *Front Immunol*, 2017. **8**: p. 81.

26. Ge, L., et al., Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2015. **308**(5): p. H500-9.
27. Mutua, V. and L.J. Gershwin, A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2020.
28. Martinod, K. and D.D. Wagner, Thrombosis: tangled up in NETs. *Blood*, 2014. **123**(18): p. 2768-76.
29. Brinkmann, V., et al., Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
30. Pires, R.H., S.B. Felix, and M. Delcea, The architecture of neutrophil extracellular traps investigated by atomic force microscopy. *Nanoscale*, 2016. **8**(29): p. 14193-202.
31. Li, P., et al., PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *Journal of Experimental Medicine*, 2010. **207**(9): p. 1853-1862.
32. Wysocka, J., R. Lipartowska, and A. Lipska, [Granules of neutrophils]. *Postepy Hig Med Dosw*, 2001. **55**(1): p. 177-88.
33. Takei, H., et al., Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J Leukoc Biol*, 1996. **59**(2): p. 229-40.
34. Yipp, B.G. and P. Kubes, NETosis: how vital is it? *Blood*, 2013. **122**(16): p. 2784-94.
35. Masuda, S., et al., NETosis markers: Quest for specific, objective, and quantitative markers. *Clin Chim Acta*, 2016. **459**: p. 89-93.
36. Nguyen, G.T., E.R. Green, and J. Meccas, Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 373.
37. Sermet, S., et al., Cannabidiol selectively modulates interleukin (IL)-1 β and IL-6 production in toll-like receptor activated human peripheral blood monocytes. *Toxicology*, 2021. **464**: p. 153016.

38. Krause, K.H., et al., The calcium signal and neutrophil activation. *Clin Biochem*, 1990. **23**(2): p. 159-66.
39. Wong, S.L. and D.D. Wagner, Peptidylarginine deiminase 4: a nuclear button triggering neutrophil extracellular traps in inflammatory diseases and aging. *Faseb j*, 2018. **32**(12): p. fj201800691R.
40. Kearney, P.L., et al., Kinetic characterization of protein arginine deiminase 4: a transcriptional corepressor implicated in the onset and progression of rheumatoid arthritis. *Biochemistry*, 2005. **44**(31): p. 10570-82.
41. Neubert, E., et al., Chromatin swelling drives neutrophil extracellular trap release. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 3767.
42. Thiam, H.R., et al., NETosis proceeds by cytoskeleton and endomembrane disassembly and PAD4-mediated chromatin decondensation and nuclear envelope rupture. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(13): p. 7326-7337.
43. Petretto, A., et al., Neutrophil extracellular traps (NET) induced by different stimuli: A comparative proteomic analysis. *PLoS One*, 2019. **14**(7): p. e0218946.
44. Wang, S. and Y. Wang, Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1829**(10): p. 1126-35.
45. Liu, Y.L., et al., Functional roles of the non-catalytic calcium-binding sites in the N-terminal domain of human peptidylarginine deiminase 4. *PLoS One*, 2013. **8**(1): p. e51660.
46. Thompson, P.R. and W. Fast, Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS Chem Biol*, 2006. **1**(7): p. 433-41.
47. Cuthbert, G.L., et al., Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell*, 2004. **118**(5): p. 545-53.
48. Hagiwara, T., Y. Hidaka, and M. Yamada, Deimination of histone H2A and H4 at arginine 3 in HL-60 granulocytes. *Biochemistry*, 2005. **44**(15): p. 5827-34.

49. Christophorou, M.A., et al., Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. *Nature*, 2014. **507**(7490): p. 104-8.
50. Wang, Y., et al., Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*, 2009. **184**(2): p. 205-13.
51. Smith, B.C. and J.M. Denu, Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1789**(1): p. 45-57.
52. de Vasconcelos, N.M., et al., Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. *Cell Death & Differentiation*, 2019. **26**(1): p. 146-161.
53. Goldmann, O. and E. Medina, The expanding world of extracellular traps: not only neutrophils but much more. *Front Immunol*, 2012. **3**: p. 420.
54. Martinod, K., et al., Neutrophil histone modification by peptidylarginine deiminase 4 is critical for deep vein thrombosis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. **110**(21): p. 8674-8679.
55. Kenny, E.F., et al., Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife*, 2017. **6**.
56. Fuchs, T.A., et al., Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 2007. **176**(2): p. 231-41.
57. Carroll, G.M., et al., Does postoperative inflammation or sepsis generate neutrophil extracellular traps that influence colorectal cancer progression? A systematic review. *Surg Open Sci*, 2020. **2**(2): p. 57-69.
58. Stark, K., Platelet-neutrophil crosstalk and netosis. *Hemasphere*, 2019. **3**(Suppl).
59. Etulain, J., et al., P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice. *Blood*, 2015. **126**(2): p. 242-6.
60. Maugeri, N., et al., Activated platelets present high mobility group box 1 to neutrophils, inducing autophagy and promoting the extrusion of neutrophil extracellular traps. *J Thromb Haemost*, 2014. **12**(12): p. 2074-88.
61. Baloch, S., et al., The Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic. *Tohoku J Exp Med*, 2020. **250**(4): p. 271-278.

62. Borges, L., et al., COVID-19 and Neutrophils: The Relationship between Hyperinflammation and Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators Inflamm*, 2020. **2020**: p. 8829674.
63. Gavriatopoulou, M., et al., Organ-specific manifestations of COVID-19 infection. *Clin Exp Med*, 2020. **20**(4): p. 493-506.
64. Siripanthong, B., et al., Recognizing COVID-19-related myocarditis: The possible pathophysiology and proposed guideline for diagnosis and management. *Heart Rhythm*, 2020. **17**(9): p. 1463-1471.
65. Qin, C., et al., Dysregulation of Immune Response in Patients With Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis*, 2020. **71**(15): p. 762-768.
66. Lagunas-Rangel, F.A., Neutrophil-to-lymphocyte ratio and lymphocyte-to-C-reactive protein ratio in patients with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): A meta-analysis. *J Med Virol*, 2020. **92**(10): p. 1733-1734.
67. Papayannopoulos, V., et al., Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol*, 2010. **191**(3): p. 677-91.
68. Zuo, Y., et al., Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*, 2020. **5**(11).
69. Nicolai, L., et al., Immunothrombotic Dysregulation in COVID-19 Pneumonia Is Associated With Respiratory Failure and Coagulopathy. *Circulation*, 2020. **142**(12): p. 1176-1189.
70. Berezin, A., Neutrophil extracellular traps: The core player in vascular complications of diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr*, 2019. **13**(5): p. 3017-3023.
71. Wong, S.L., et al., Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nat Med*, 2015. **21**(7): p. 815-9.
72. Doring, Y., O. Soehnlein, and C. Weber, Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ Res*, 2017. **120**(4): p. 736-743.

73. Li, R.H.L., et al., A novel approach to identifying and quantifying neutrophil extracellular trap formation in septic dogs using immunofluorescence microscopy. *BMC Veterinary Research*, 2018. **14**(1): p. 210.
74. Donkel, S.J., et al., Circulating Myeloperoxidase (MPO)-DNA complexes as marker for Neutrophil Extracellular Traps (NETs) levels and the association with cardiovascular risk factors in the general population. *PLoS One*, 2021. **16**(8): p. e0253698.
75. Thålin, C., et al., Neutrophil Extracellular Traps: Villains and Targets in Arterial, Venous, and Cancer-Associated Thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2019. **39**(9): p. 1724-1738.
76. Mozzini, C. and M. Pagani, Cardiovascular Diseases: Consider Netosis. *Curr Probl Cardiol*, 2022. **47**(10): p. 100929.
77. Klopff, J., et al., Neutrophil Extracellular Traps and Their Implications in Cardiovascular and Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(2).
78. Kim, C.H. and H.E. Broxmeyer, In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood*, 1998. **91**(1): p. 100-10.
79. Janssens, R., S. Struyf, and P. Proost, The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol*, 2018. **15**(4): p. 299-311.
80. Shirozu, M., et al., Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics*, 1995. **28**(3): p. 495-500.
81. Yu, L., et al., Identification and expression of novel isoforms of human stromal cell-derived factor 1. *Gene*, 2006. **374**: p. 174-9.
82. Altenburg, J.D., et al., A naturally occurring splice variant of CXCL12/stromal cell-derived factor 1 is a potent human immunodeficiency virus type 1 inhibitor with weak chemotaxis and cell survival activities. *J Virol*, 2007. **81**(15): p. 8140-8.
83. Rueda, P., et al., The CXCL12gamma chemokine displays unprecedented structural and functional properties that make it a paradigm of chemoattractant proteins. *PLoS One*, 2008. **3**(7): p. e2543.

84. Janssens, R., S. Struyf, and P. Proost, Pathological roles of the homeostatic chemokine CXCL12. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2018. **44**: p. 51-68.
85. Richard-Bildstein, S., et al., Discovery of the Potent, Selective, Orally Available CXCR7 Antagonist ACT-1004-1239. *J Med Chem*, 2020. **63**(24): p. 15864-15882.
86. Jean-Charles, P.Y., S. Kaur, and S.K. Shenoy, G Protein-Coupled Receptor Signaling Through beta-Arrestin-Dependent Mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017. **70**(3): p. 142-158.
87. Decaillot, F.M., et al., CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *J Biol Chem*, 2011. **286**(37): p. 32188-97.
88. Radermecker, C., et al., Locally instructed CXCR4(hi) neutrophils trigger environment-driven allergic asthma through the release of neutrophil extracellular traps. *Nat Immunol*, 2019. **20**(11): p. 1444-1455.
89. Ngamsri, K.C., et al., CXCR4 and CXCR7 Inhibition Ameliorates the Formation of Platelet-Neutrophil Complexes and Neutrophil Extracellular Traps through Adora2b Signaling. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(24).
90. Koenen, J., et al., Atypical Chemokine Receptor 3 (ACKR3): A Comprehensive Overview of its Expression and Potential Roles in the Immune System. *Mol Pharmacol*, 2019. **96**(6): p. 809-818.
91. Rueda, P., et al., Homeostatic and tissue reparation defaults in mice carrying selective genetic invalidation of CXCL12/proteoglycan interactions. *Circulation*, 2012. **126**(15): p. 1882-95.
92. Gębura, K., et al., G-CSF administration favours SDF-1 release and activation of neutrophils and monocytes in recipients of autologous peripheral blood progenitor cells. *Cytokine*, 2019. **116**: p. 38-47.
93. Lau, T.T. and D.A. Wang, Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1): homing factor for engineered regenerative medicine. *Expert Opin Biol Ther*, 2011. **11**(2): p. 189-97.
94. Suratt, B.T., et al., Role of the CXCR4/SDF-1 chemokine axis in circulating neutrophil homeostasis. *Blood*, 2004. **104**(2): p. 565-71.

95. Martin, C., et al., Chemokines acting via CXCR2 and CXCR4 control the release of neutrophils from the bone marrow and their return following senescence. *Immunity*, 2003. **19**(4): p. 583-93.
96. Gouwy, M., et al., Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration. *Journal of leukocyte biology*, 2004. **76**(1): p. 185-194.
97. Islam, A., et al., SDF-1 Is Responsible for the Constitutively High NF- κ B Activity in Human Myeloma Cells. *Blood*, 2007. **110**(11): p. 4737-4737.
98. Shimizu, J., et al., Interaction between SDF1 and CXCR4 Promotes Photoreceptor Differentiation via Upregulation of NFkappaB Pathway Signaling Activity in Pax6 Gene-Transfected Photoreceptor Precursors. *Ophthalmic Res*, 2020. **63**(4): p. 392-403.
99. Sun, B., et al., Citrullination of NF- κ B p65 promotes its nuclear localization and TLR-induced expression of IL-1 β and TNF α . *Sci Immunol*, 2017. **2**(12).
100. Teicher, B.A. and S.P. Fricker, CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(11): p. 2927-31.
101. Zuern, C.S., et al., Endomyocardial expression of SDF-1 predicts mortality in patients with suspected myocarditis. *Clinical research in cardiology : official journal of the German Cardiac Society*, 2015. **104**(12): p. 1033-1043.
102. Isles, H.M., et al., The CXCL12/CXCR4 Signaling Axis Retains Neutrophils at Inflammatory Sites in Zebrafish. *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 1784.
103. Borst, O., et al., CXCL16 is a novel diagnostic marker and predictor of mortality in inflammatory cardiomyopathy and heart failure. *Int J Cardiol*, 2014. **176**(3): p. 896-903.
104. Gupta, S., et al., A High-Throughput Real-Time Imaging Technique To Quantify NETosis and Distinguish Mechanisms of Cell Death in Human Neutrophils. *J Immunol*, 2018. **200**(2): p. 869-879.
105. Schindelin, J., et al., Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 2012. **9**(7): p. 676-682.

106. Neubert, E., et al., Serum and Serum Albumin Inhibit in vitro Formation of Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Front Immunol*, 2019. **10**: p. 12.
107. Kamoshida, G., et al., Spontaneous formation of neutrophil extracellular traps in serum-free culture conditions. *FEBS Open Bio*, 2017. **7**(6): p. 877-886.
108. Ohbuchi, A., et al., Quantitative analysis of hemin-induced neutrophil extracellular trap formation and effects of hydrogen peroxide on this phenomenon. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017. **511**: p. 147-153.
109. Brinkmann, V., et al., Neutrophil extracellular traps: how to generate and visualize them. *J Vis Exp*, 2010(36).
110. Metzler, K.D., et al., A myeloperoxidase-containing complex regulates neutrophil elastase release and actin dynamics during NETosis. *Cell Rep*, 2014. **8**(3): p. 883-96.
111. Naumann, U., et al., CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PLoS One*, 2010. **5**(2): p. e9175.
112. Sánchez-Martín, L., P. Sánchez-Mateos, and C. Cabañas, CXCR7 impact on CXCL12 biology and disease. *Trends Mol Med*, 2013. **19**(1): p. 12-22.
113. Davis, D.A., et al., Identification of carboxypeptidase N as an enzyme responsible for C-terminal cleavage of stromal cell-derived factor-1alpha in the circulation. *Blood*, 2005. **105**(12): p. 4561-8.
114. Weidt, C., et al., Stem cell migration: a quintessential stepping stone to successful therapy. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2007. **2**(1): p. 89-103.
115. Limatola, C., et al., SDF-1alpha-mediated modulation of synaptic transmission in rat cerebellum. *Eur J Neurosci*, 2000. **12**(7): p. 2497-504.
116. Stumm, R.K., et al., A dual role for the SDF-1/CXCR4 chemokine receptor system in adult brain: isoform-selective regulation of SDF-1 expression modulates CXCR4-dependent neuronal plasticity and cerebral leukocyte recruitment after focal ischemia. *J Neurosci*, 2002. **22**(14): p. 5865-78.
117. Pillarisetti, K. and S.K. Gupta, Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1)1: SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation*, 2001. **25**(5): p. 293-300.

118. Portella, L., A.M. Bello, and S. Scala, CXCL12 Signaling in the Tumor Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*, 2021. **1302**: p. 51-70.
119. Liu, T., et al., NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2017. **2**(1): p. 17023.
120. Münzer, P., et al., NLRP3 Inflammasome Assembly in Neutrophils Is Supported by PAD4 and Promotes NETosis Under Sterile Conditions. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 683803.
121. Tanikawa, C., et al., Regulation of protein Citrullination through p53/PADI4 network in DNA damage response. *Cancer Res*, 2009. **69**(22): p. 8761-9.
122. Koushik, S., et al., PAD4: pathophysiology, current therapeutics and future perspective in rheumatoid arthritis. *Expert Opin Ther Targets*, 2017. **21**(4): p. 433-447.
123. Wang, Y., et al., The roles of PAD2- and PAD4-mediated protein citrullination catalysis in cancers. *Int J Cancer*, 2021. **148**(2): p. 267-276.
124. Lin, G., et al., Identification of gp120 binding sites on CXCR4 by using CD4-independent human immunodeficiency virus type 2 Env proteins. *J Virol*, 2003. **77**(2): p. 931-42.
125. Khan, M.Z., et al., Regulation of neuronal P53 activity by CXCR4. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 2005. **30**(1): p. 58-66.
126. Mehta, S.A., et al., Negative regulation of chemokine receptor CXCR4 by tumor suppressor p53 in breast cancer cells: implications of p53 mutation or isoform expression on breast cancer cell invasion. *Oncogene*, 2007. **26**(23): p. 3329-3337.
127. Moskovits, N., et al., p53 Attenuates cancer cell migration and invasion through repression of SDF-1/CXCL12 expression in stromal fibroblasts. *Cancer Res*, 2006. **66**(22): p. 10671-6.
128. Oeckinghaus, A., M.S. Hayden, and S. Ghosh, Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol*, 2011. **12**(8): p. 695-708.
129. Ben-Neriah, Y. and M. Karin, Inflammation meets cancer, with NF- κ B as the matchmaker. *Nat Immunol*, 2011. **12**(8): p. 715-23.
130. Lane, D. and A. Levine, p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010. **2**(12): p. a000893.

131. Lowe, J.M., et al., p53 and NF- κ B coregulate proinflammatory gene responses in human macrophages. *Cancer Res*, 2014. **74**(8): p. 2182-92.
132. Kobayashi, Y., The role of chemokines in neutrophil biology. *Front Biosci*, 2008. **13**: p. 2400-7.