

Ricardo Grieshaber Bouyer Rodrigues
Dr. med.

Die Rolle von CD177 in der Biologie neutrophiler Granulozyten

Fach/Einrichtung: Orthopädie

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. Babak Moradi

Das Immunsystem ist das zentrale Abwehrsystem zur Bekämpfung von Pathogenen und körpereigenen, entarteten Zellen. Gleichzeitig bildet eine dysregulierte Immunantwort die Grundlage vieler Krankheiten. Neutrophile Granulozyten sind lebensnotwendige Ersthelfer des Immunsystems aber aufgrund ihres zytotoxischen Potenzials Hauptprotagonisten in chronischer Entzündung, insbesondere in entzündlichen Arthritiden. Derzeit existieren keine verfügbaren immunmodulatorischen Substanzen, um gezielt neutrophile Granulozyten zu beeinflussen. Dennoch sind neutrophile Granulozyten aufgrund ihrer Reaktivität ein attraktives, bisher ungenutztes Therapieziel in immun-vermittelten Krankheiten. Eine solche therapeutische Intervention setzt allerdings voraus, dass pathologisch agierende neutrophile Granulozyten erfasst werden, während die Immunabwehr weiterhin gewährleistet bleibt. Um solche Therapiestrategien entwickeln zu können, ist es daher Voraussetzung, neutrophile Granulozyten in größerem Detail zu verstehen. Andere Leukozyten werden bereits anhand ihrer Oberflächenproteinexpression oder ihres Transkriptom in unterschiedliche Subpopulationen eingeteilt, während Granulozyten weiterhin nur anhand ihres Färbeverhaltens in basophile, eosinophile und neutrophile Granulozyten eingeteilt werden. Diese verhältnismäßig grobe Einteilung wird ihrer zentralen Stellung im Immunsystem nicht gerecht und lässt das Potenzial zur gezielten therapeutischen Manipulation dieser wichtigen Immunzellen ungenutzt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Proteinexpression, die funktionale Kapazität und das Transkriptom neutrophiler Granulozyten sowohl im Gesunden als auch in Zuständen pathologischer Entzündung zu untersuchen. In einem ersten Ansatz wurden zirkulierenden neutrophile Granulozyten aus dem peripheren Blut und aus gepaarten Proben aus Synovialflüssigkeit von Patienten mit entzündlichen Arthritiden gewonnen und mittels Massenzytometrie auf eine Auswahl von 31 Oberflächenproteinen untersucht. In unsupervisionierten Analysen zeigte sich, dass bei allen Patienten das Molekül CD177 die größte Heterogenität verursachte und neutrophile Granulozyten in CD177-negative und CD177-positive Zellen aufteilte. Die funktionale Kapazität CD177-definierter Subpopulationen wurde in einer Reihe von *in vitro* Versuchen getestet. Durch Stimulationsversuche konnte gezeigt werden, dass beide Subpopulationen eine vergleichbare Tendenz zeigen, reaktive Sauerstoffspezies zu synthetisieren und NETs freizusetzen. Es wurde festgestellt, dass Überlebenskapazität, Apoptose- und Nekroserate CD177-negativer und CD177-positiver neutrophiler Granulozyten symmetrisch sind, was es ermöglichte, die Frequenz *in vivo* migrierter neutrophiler Granulozyten in entzündlichen Infiltraten zu untersuchen. In entzündeter Synovialflüssigkeit und im Bronchoalveolarraum wurden CD177-negative und CD177-positive neutrophile Granulozyten gleich häufig gefunden wie in entsprechenden Kontrollproben aus der Zirkulation. In einem *in vitro* Transwell-System von chemotaktischer Migration konnte gezeigt werden, dass ein gegen CD177 gerichteter monoklonaler Antikörper (MEM-166) die Migration neutrophiler Granulozyten blockiert. Ferner löste anti-CD177 eine Zunahme der Integrinexpression auf der Oberfläche aus und führte zur Vergrößerung der zellulären Adhäsionsfläche CD177-positiver neutrophiler Granulozyten. Der aktivierende Effekt von anti-CD177 konnte durch Blockade von CD18 teilweise aufgehoben werden, was einen Hinweis auf das β 2-Integrin Mac-1 (CD11b/CD18) als Signalpartner darstellte. Mittels Konfokalmikroskopie und FLIM wurde schließlich die Interaktion zwischen CD177 und

CD11b auf molekularer Ebene bestätigt, welche sich durch Stimulation mit anti-CD177 noch stärker räumlich annäherten. Im letzten Abschnitt konnte mit RNA-Sequenzierung ein transkriptomischer Fingerabdruck definiert werden, der CD177-negative von CD177-positiven Zellen robust unterscheiden konnte. Ferner wurden in Synovialflüssigkeit dysregulierte Signalwege und ein immunmodulatorischer, PD-L1-positiver Phänotyp neutrophiler Granulozyten entdeckt.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit die zentrale Beobachtung gemacht, dass anti-CD177 die Migration neutrophiler Granulozyten durch einen β 2-Integrin-abhängigen Mechanismus blockiert. Übergeordnet illustriert dieser Mechanismus, wie ein Glycosylphosphatidylinositol-verankertes Oberflächenprotein ohne transzelluläre Domäne (CD177) benachbarte Transmembranproteine (β 2-Integrine) dazu verwenden kann, Signale zu übertragen, welche das Verhalten von Zellen beeinflussen. Da CD177 selektiv auf neutrophilen Granulozyten exprimiert wird, eröffnet der hier beschriebene Mechanismus erstmals die Möglichkeit, die Integrinfunktion und damit Migration in entzündete Kompartimente selektiv bei neutrophilen Granulozyten zu manipulieren und stellt damit einen ersten Schritt in Richtung selektiver therapeutischer Intervention an neutrophilen Granulozyten dar. Somit liefern diese Ergebnisse einen neuen Ansatz, pathologische Entzündung besser therapieren zu können.