

Abschlussbericht

Projekt 3/17: Veränderte Immunzell-Mechanik als Modulator der Pathogenese und potentiell diagnostisches Tool Caspase-1-assoziiierter autoinflammatorischer Erkrankungen (CASP1-AAE)

Roland-Ernst-Stiftung für Gesundheitswesen

Dresden, 30. April 2021

Prof. Sigrun R. Hofmann
Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, TU Dresden
Fetscherstr. 74
01307 Dresden

Arbeits- und Ergebnisbericht

1. Ausgangsfragen und Zielsetzung des Projektes

Die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase und damit eines Gleichgewichtes zwischen pro- und antiinflammatorischen Signalen unterliegt einer strengen Kontrolle. Eine Störung dieses Gleichgewichtes durch beispielsweise eine Dysregulation von Zytokingenen oder durch eine Fehlregulation der Zytokinsignalübertragung kann zu schwerwiegenden autoinflammatorischen und Autoimmunerkrankungen führen. Gerade die aktuelle Situation der Corona SARS-Cov-2 Pandemie mit der sehr schwer verlaufenden Form eines Inflammatory Response Syndroms (im Sinne eines Zytokinsturms), welches häufig tödlich verläuft, hat gezeigt, dass das Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Signalen entscheidend ist. Ausserdem konnten in den letzten zwei Jahrzehnten immer mehr Erkrankungen dem Spektrum der „Autoinflammation“ zugeordnet werden. Nicht nur seltene monogen vererbte Erkrankungen, wie das familiäre Mittelmeerfieber oder NOMID (neonatal onset multisystem inflammatory disease), sondern auch chronische Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit, der Typ2- Diabetes oder die chronisch rekurrende multifokale Osteomyelitis (CRMO) wurden diesem Erkrankungsspektrum zugeordnet. Für einige gibt es nach wie vor keine geeigneten Therapieansätze, weshalb ein detailliertes Verständnis der zugrundeliegenden molekularbiologischen Prozesse von zunehmender Bedeutung ist.

Anhand monogen-bedingter autoinflammatorischer Erkrankungen (wie z.B. NOMID) gelang es zudem, grundlegende Mechanismen von Entzündungsreaktionen besser zu verstehen und neue Therapiekonzepte (z.B. IL-1-Rezeptor Antagonist, Anakinra®) zu entwickeln. Einer Vielzahl der autoinflammatorischen Erkrankungen liegt jedoch ein eher komplexer, polygener Vererbungsmodus zugrunde und die Ausprägung des Phänotyps wird zusätzlich maßgeblich von weiteren Triggern, wie mechanischen Traumata, Kälteexposition, hormonellen Einflüssen, Impfungen oder psychischem Stress, geprägt. Die Pathogenese dieser Erkrankungen wird durch das **angeborene Immunsystem** dominiert. Myeloische Zellen in Kombination mit fremden mikrobiellen (pathogen associated molecular pattern, PAMPs) oder endogenen, veränderten körpereigenen Molekülen (danger associated molecular pattern, DAMPs) sind die Initiatoren der entzündlichen Reaktionen. Exogene oder endogene Gefahrensignale werden durch spezielle Sensoren, sogenannte pattern recognition receptors (PRR) erkannt. Zu den PRR gehört die Familie der NOD-like Rezeptoren (NLR), die nicht nur bestimmte Gefahrensignale erkennen, sondern die als Gerüstprotein auch zu der Zusammensetzung eines Komplexes beitragen, der als **Inflammasom** bezeichnet wird. Neben dem Gerüstprotein sind dabei Procaspase-1 sowie ein Adaptermolekül ASC (apoptosis associated speck like protein containing a CARD) involviert.

Die Bildung von Inflammasomen geht mit einem interessanten Phänomen einher, welches als **Speck-Bildung** bezeichnet wird. Dabei lässt sich nach Inflammasom-Stimulation mit Hilfe von Fluorophor-markierten Proteinen, welche in das Inflammasom rekrutiert werden, ein Zytoskelett-„Kollaps“ beobachten, bei welchem die zuvor zytoplasmatisch verteilten Proteine in einem „Speck“ (punktförmigem Areal) in der Nähe des Zellkerns akkumulieren. Diese Speck-Bildung geht dem Caspase-1-abhängigen, entzündungs-assoziierten Zelltod (der Pyroptose) voraus. Dabei wird kontrovers diskutiert, ob die Specks den Inflammasomen entsprechen. Die **Pyroptose** zeigt ebenfalls charakteristische Merkmale. Sie ist durch ein morphologisch sichtbares Anschwellen der Zellen gekennzeichnet, welches durch das Auftreten von Membranporen und einen nachfolgenden Wassereinstrom in die Zelle initiiert

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

wird. Dabei kommt es zusätzlich zu einer Abschnürung/Freisetzung von Membran-umhüllten Vesikeln, welche die zytoplasmatischen Bestandteile enthalten.

Der Fokus unserer Untersuchungen liegt auf der Aufklärung der zugrundeliegenden Pathomechanismen autoinflammatorischer Krankheitsbilder. Im Speziellen befassten wir uns im Rahmen dieses Projektes mit der Erforschung zugrundeliegender Mechanismen des **CASP1-assoziierten autoinflammatorischen Krankheitsbildes (CASP1-AAE)**. Diese Patienten leiden unter wiederkehrendem Fieber sowie systemischen, durch den Körper selbst ausgelösten Entzündungsreaktionen (Gelenk- und Muskelschmerzen, Gelenkentzündungen, Exantheme, Diarrhoe, Lymphknotenschwellungen und Aphthen). Da diese seltene Erkrankung überwiegend im Kindes- und Jugendalter beginnt, kann sie bei zu später oder fehlender Behandlung insbesondere durch die Muskel- und Gelenkbeteiligung schwerwiegende Auswirkungen auf die kindliche Entwicklung nehmen und den weiteren Lebensweg betroffener Patienten entscheidend mitbestimmen. Paradoxiertweise sind natürlich vorkommende (Pro)Caspase-1-Varianten, welche eine verminderte enzymatische Aktivität besitzen und damit weniger proinflammatorisches IL-1 β freisetzen können, mit systemischen Entzündungsreaktionen assoziiert. Daher stellte sich die Frage, welche alternativen Signalwege durch CASP1-Varianten hochreguliert werden, die zu Fieber und Entzündung führen. Zurückliegend konnten wir zeigen, dass CASP1-Varianten vermehrt mit Receptor Interacting Protein 2 (RIP2) interagieren und zur Aktivierung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF- κ B führen. Dies scheint aber nicht der einzige Mechanismus zu sein, da CASP1-Mutationen auch bei asymptomatischen Familienmitgliedern und mit einer geringen Frequenz auch in der gesunden Normalbevölkerung auftreten können. Daher bleiben viele Fragen offen. Es liegt die Hypothese nahe, dass weitere Mechanismen existieren müssen, die zur Ausprägung des autoinflammatorischen Krankheitsbildes beitragen. Einer dieser Mechanismen könnte die Beeinflussung der zytomechanischen Eigenschaften von Immunzellen durch CASP1-Varianten sein.

Ziel der beantragten Studie war es, den Einfluss von CASP1-Varianten auf zytomechanische Eigenschaften der bei der Entzündungsreaktion beteiligten Immunzellen abzuklären und deren Verwendbarkeit als diagnostischer Marker zu testen. *Wir postulierten, dass CASP1-Varianten zu einer veränderten Steifheit des Zytoskeletts von Monozyten/Makrophagen führen, was mit veränderten Migrations-, Exozytose und Phagozytoseeigenschaften einhergehen und dadurch zu einer Akkumulation von Entzündungszellen im Gewebe führen und Entzündungsreaktionen beeinflussen könnte.*

Neben den Effekten auf zytomechanische Eigenschaften von Immunzellen interessierte uns, ob CASP1-Varianten weitere/zusätzliche Interaktionspartner ins Inflammasom rekrutieren und dadurch zur Aktivierung alternativer pro-inflammatorischer Signalwege beitragen, und ob CASP1-Varianten auch auf weitere Vorgänge des proinflammatorischen Zelltodes Einfluss nehmen und damit direkt auf die beteiligten Immunzellen einwirken können.

2. Ergebnisse und Diskussion

Mittels genetisch modifizierter humaner Zelllinien (THP1) sollten folgende Schwerpunkte bearbeitet werden:

- i) Welchen Einfluss haben CASP1-Varianten auf die Zellmechanik?

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

- ii) Wie beeinflussen *CASP1*-Varianten den durch Inflammasom-Stimulation verursachten „Zytoskelett-Kollaps“ und damit die Aktin-/Tubulin-Filamentstruktur?
- iii) Welche Bestandteile des Zytoskeletts bzw. welche weiteren Proteine sind in die Pyroptosenbildung involviert?
- iv) Welchen Einfluss haben *CASP1*-Varianten auf die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und damit andere Signalwege?

2.1. Welchen Einfluss haben natürlich vorkommende *CASP1*-Varianten auf die Zellmechanik?

Ziel dieses Teilprojektes war es, den Einfluss von *CASP1*-Varianten auf die zytomechanischen Eigenschaften von Makrophagen nach verschiedenen Inflammasom-Stimuli näher zu untersuchen. Insbesondere interessierte uns, ob und wie die Deformierbarkeit der Zellen, die Phagozytosefähigkeit und die Zytokinfreisetzung durch *CASP1*-Varianten beeinflusst werden.

Als Zellmodell für die avisierten Untersuchungen dienten die bereits generierten THP-1-Zellen mit endogenem Procaspase-1 Knockdown (Herunterregulierung der Wildtyp-Procaspase-1 auf ein Level von ca. 10-20%; THP1/aPC1), in welche die Procaspase-1-Varianten (WT, p.C285A, p.L265S und p.R240Q) viral transduziert wurden. Diese monozytären Zelllinien wurden mit Phorbol-Myristat-Acetat (PMA) zu Makrophagen differenziert, mit Lipopolysaccharid (LPS) geprimed und anschließend mit den NLRP3-Inflammasom-Stimuli Nigericin und Monosodium urate crystals (MSU), sowie polydAdT (AIM2-Inflammasom) behandelt und über eine Zeit von 10-30 min mittels *Real-Time Deformability Cytometry* (RT-DC) gemessen. Als Kontrolle dienten Zellen ohne LPS-priming.

Für die RT-DC wurden die zu analysierenden Zellen pelletiert und in Methylcellulosehaltigem PBS (MC-PBS) resuspendiert. Jede Probe wurde mit drei verschiedenen Flussraten (0,16 $\mu\text{L/s}$, 0,24 $\mu\text{L/s}$, 0,32 $\mu\text{L/s}$) durch einen Mess-Chip geleitet, welcher die Zellen hydrodynamisch fokussiert.

Die Messung erfolgte wie folgt: In dem mikrofluidischen Kanal des Mess-Chips, in dem (wie in einem Fluss/Kanal) unterschiedliche Flussgeschwindigkeiten vorherrschen, ist in der Mitte die „Strömung“ deutlich stärker/schneller, während sie am Rand durch Reibung verlangsamt wird. Da das Zentrum der Zellen theoretisch „schneller“ fließt als ihr äußerer Rand, werden die Zellen aufgrund des Reibungseffektes Kegel-förmig verformt. Kurz bevor die Zellen aus dem Mikro-Kanal ausströmen, wurde jede einzelne mit einer Hochgeschwindigkeitskamera aufgenommen. Über flexibel einstellbare Flussraten können die Kräfte, die auf die Zellen einwirken, justiert werden. Damit wird eine optimale Verformung der Zellen erreicht. Zusätzlich erlaubt eine frei wählbare *region of interest* (ROI) eine Vergleichsmessung mit den Zellen, welche sich im Reservoir befinden und noch keinem mechanischen Stress ausgesetzt sind.

Erste Daten zum Einfluss von Procaspase-1-Varianten auf die Verformbarkeit von Makrophagen publizieren konnten wir bereits publizieren [1]. Wir konnten zeigen, dass *CASP1*-Varianten zu Veränderungen in der Verformbarkeit von Monozyten/Makrophagen führen (**Abb.1**). THP1/aPC1-Zellen mit Re-Transduktion GFP-markierter *CASP1*-Varianten wurden mit PMA (2,5 ng/ml, 16 h) zu Makrophagen differenziert, LPS-geprimed (1 $\mu\text{g/ml}$, 3 h) und mit Nigericin (10 μM) stimuliert. Messungen erfolgten bei 0 min und 20 min nach Nigericinzugabe. Die Inertia Ratio (ein Maß für die Verformbarkeit der Zellen) zeigte bereits zum Zeitpunkt 0 min (ohne Nigericin-Stimulation) einen signifikanten Unterschied zwischen GFP-WT und GFP-L265S ($p=0,04764$). 20 min nach Nigericin-Stimulation unterschied sich

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

die Inertia Ratio signifikant zwischen GFP-WT und GFP-L265S ($p=0,04827$) und auch zwischen GFP-WT und GFP-C285A ($p=0,01188$), was eine höhere Verformbarkeit der Procaspase-1-Varianten im Vergleich zum WT anzeigt.

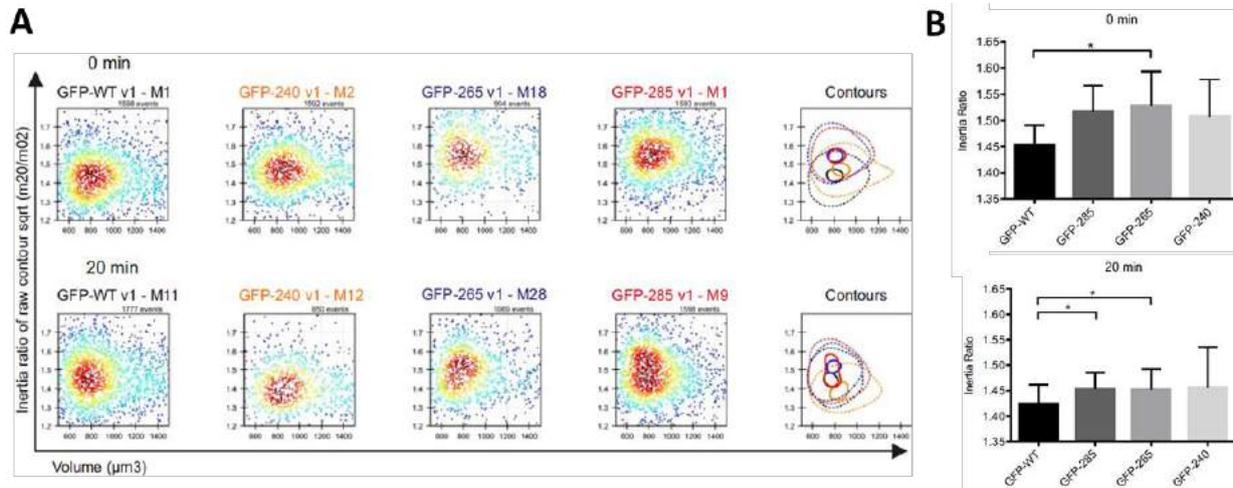


Abb.1: Morphologische und mechanische Eigenschaften von Makrophagen, analysiert mittels Real-Time Deformability Cytometry (RT-DC). Repräsentative Scatter- und Konturdiagramme (A) und statistische Analysen (B) der Inertia ratio und des Volumens, die die Verformung von Zellen anzeigen, werden dargestellt. THP-1-Zellen wurden mit PMA (2,5 ng/ml, 16 h) zu Makrophagen differenziert, LPS-geprimed (1 µg/ml, 3 h) und mit Nigericin (10 µM) stimuliert. Analysen erfolgten mit ShapeOut. Das Inertia-Verhältnis sowie das Volumen (μm^3) wurden für Messungen bei 0 min und 20 min nach Nigericinzugabe bestimmt. Die Inertia Ratio (I) ist ein Parameter, der die Deformation quantifiziert ($I=1$ bedeutet Kreis, höheres I bedeutet stärker deformiert). Statistische Signifikanzprüfung mittels Linear Mixed Models-Analyse. Das Volumen unterscheidet sich zwischen den Zelllinien zu keinem Zeitpunkt. Die Inertia Ratio zeigt bereits zum Zeitpunkt 0 min einen signifikanten Unterschied zwischen GFP-WT und GFP-L265S ($p=0,04764$). 20 min nach Nigericin-Stimulation unterscheidet sich die Inertia Ratio signifikant zwischen GFP-WT und GFP-L265S ($p=0,04827$) und auch zwischen GFP-WT und GFP-C285A ($p=0,01188$), was eine höhere Verformbarkeit der Procaspase-1-Varianten im Vergleich zum WT anzeigt. *, $p<0,05$. [1]

Diese Untersuchungen stellten jedoch nur einen Anfang bei der Aufklärung der zugrundeliegenden molekularen Mechanismen dar.

Insbesondere fragten wir uns, ob die in unserem shRNA-knock-down Zellsystem noch zu 10-20% vorhandene Wildtyp-Procaspase-1 bestimmte Untersuchungsergebnisse beeinflussen oder gar „verschleiern“ könnte. Zwar kommen *CASP1*-Varianten bei Patienten in der Regel heterozygot vor (das heißt, neben dem mutierten Procaspase-1 Allel besitzen die Patienten ein WT-Procaspase-1-Allel), so dass unser Zellsystem die *in vivo*-Situation „nachstellen“ würde, jedoch lassen sich eventuell durch Procaspase-1-Varianten verursachte Effekte dadurch nicht ausreichend gut abbilden. Daher entschlossen wir uns, ein verbessertes Zellmodell zu etablieren, THP-1 Zellen mit Caspase-1 knock out.

Zur Generierung der THP-1 Procaspase-1 knock out (ko) Zelllinien wurde ein lentivirales CRISPR/Cas9 System verwendet (CRISPR/Cas9 Gene Silencing Technologie), hier: THP-1-Zellen mit stabiler Expression der *Streptococcus pyogenes* Cas9 Endonuclease, welche durch eine Doxycyclin-induzierbare sgRNA geleitet wird, um Doppelstrangbrüche im open reading frame (ORF) des Target-Gens zu erzeugen, was zu „nonhomologous end joining“ und „frameshift mutations“ führt. Nach Doxycyclin-Induktion produzierten die Zellen, welche sgRNA gegen Procaspase-1 enthielten, eine „truncated version“ der Procaspase-1 (Deletion des Exon 2) und damit einen stabilen knock out.

In diese *CASP1* knock out- Zellen erfolgte dann der lentivirale Transfer der Procaspase-1 WT-Varianten. Die Methoden und die verwendeten sgRNA-Konstrukte zur Generierung des *CASP1* knock out sind in Baker et al. 2018 und Masters et al. 2016 beschrieben [2, 3].

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Die für das CRISPR/Cas9 Gene Silencing erforderlichen Plasmide wurden uns durch unseren Kooperationspartner (Seth L. Masters, Inflammation Division, The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville 3052, Australia) zur Verfügung gestellt.

Folgende **Zelllinien** wurden etabliert:

- a) THP-1/Casp1ko
- b) THP-1/Casp1ko + Leervektor (Empty)
- c) THP-1/Casp1ko + WT (WT)
- d) THP-1/Casp1ko + R240Q (R240Q), reduzierte enzymatische Aktivität
- e) THP-1/Casp1ko + L265S (L265S), keine enzymatische Aktivität
- f) THP-1/Casp1ko + C285A (C285A), keine enzymatische Aktivität

Der erfolgreiche *CASP1* knock out sowie die Expression der WT-Procaspase-1 und der *CASP1*-Varianten wurden mittels Western Blot überprüft (**Abb.2**). Zu erkennen ist, dass der *CASP1* knock out nicht komplett war, es war eine Rest-Expressionsrate von ca. 4-5% der Procaspase-1 detektierbar (**Abb. 2A**). Daher wurden Einzelzellklone erstellt, die jedoch im DotBlot Screen eine sehr unterschiedliche Restexpression der Procaspase-1 aufwiesen (**Abb. 2B,C**). Die Procaspase-1 Expression war jedoch durch den DotBlot-Screen nicht vorhersagbar, da sie nicht mit der Proteinexpression im Western Blot korrelierte.

Da Einzelzellklone jedoch eine lange Wachstumszeit benötigen, um eine ausreichende Zellmenge für weitere Experimente zu generieren, und die Zellen aufgrund der dadurch stattfindenden Alterung in der Zellkultur „instabil“ werden in Bezug auf Zytokinsekretion und Stimulierbarkeit, wurden für Folgeexperiment „bulk cells“ verwendet, die auf einen *CASP1* ko mittels Durchfluss-Zytometrie „gesorted“ worden waren. Damit werden auch Artefakte vermieden, die evtl. durch Einzelzellklone entstehen können.

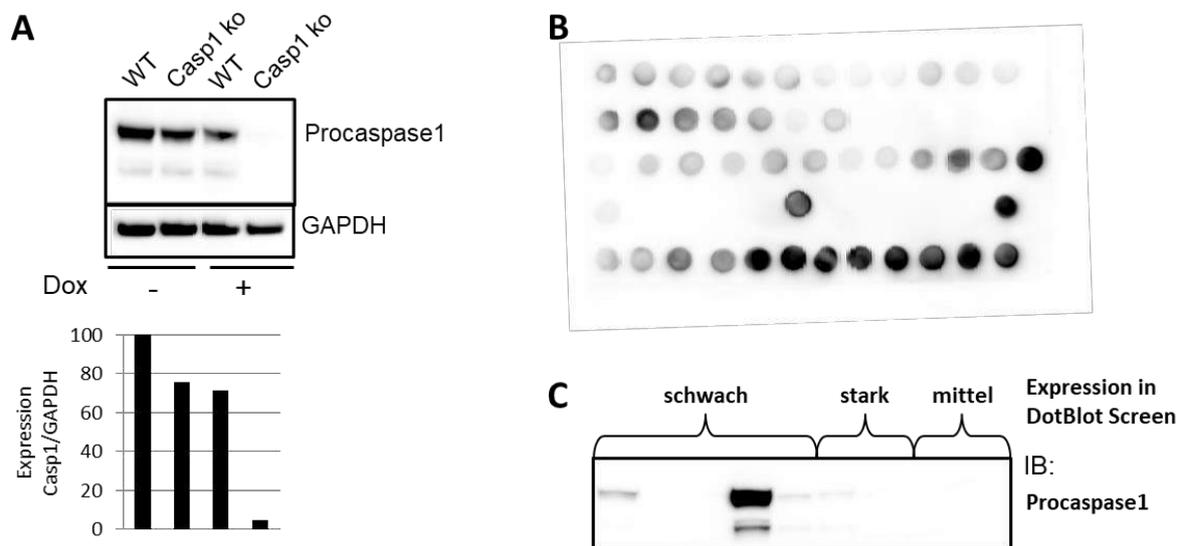


Abb.2: Genetische Deletion der Procaspase-1 in humanen monozytären THP-1-Zellen. (A) Western Blot von Protein Lysaten von THP-1 Monozyten mit CRISPR/Cas9 generiertem knockout (Doxycycline-induzierbar) gegen *CASP1*. Zu erkennen ist, dass der *CASP1* ko nicht komplett war, es war eine Rest-Expressionsrate von ca. 4-5% der Procaspase-1 detektierbar. Daher wurden Einzelzellklone erstellt, die jedoch eine sehr unterschiedliche Restexpression der Procaspase-1 aufwiesen (B, C). Die Procaspase-1 Expression zwischen DotBlot und Westernblot korrelierte nicht, das heißt, der *CASP1* ko war durch einen DotBlot nicht vorhersagbar (C). sgRNA for CRISPR targeting: *CASP1* caspase-1 (exon 2) AAAGCTGTTTATCCGTTCCA

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Des Weiteren erfolgten Western Blots zur Bestätigung des endogenen *CASP1* knock outs und der Re-Expression der *CASP1*-Varianten (**Abb. 3**).

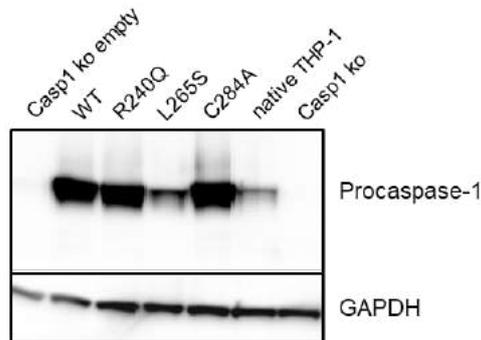


Abb.3: Genetische Deletion der Procaspase-1 in humanen monozytären THP-1-Zellen und Re-Expression der *CASP1*-Varianten. Western Blot von Protein Lysaten von THP-1 Monozyten mit CRISPR/Cas9 generiertem knockout gegen *CASP1* und lentivirale Re-Expression von WT oder *CASP1*-Varianten (R240Q, L265S, C285A) oder Leervektor als Negativkontrolle. Native THP-1-Zellen dienen als Positivkontrolle.

Um die Funktionalität des Zellsystems zu überprüfen, erfolgten Zellstimulationsassays und die anschließende Analyse der IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α Sekretionsraten. Dafür wurden monozytäre THP1/*CASP1* ko-Zellen mit Re-Expression der *CASP1*-Varianten mit 5 ng/ml PMA für 48h zu Makrophagen (M0) differenziert. Für die Differenzierung zu M1-Makrophagen erhielten die Zellen zusätzlich für 24h 20 ng/ml IFN- γ und für die Differenzierung in M2-Makrophagen 20 ng/ml IL-4. Anschließend erfolgte die AIM2-Inflammasom-Stimulation mit polydAdT oder genomischer DNA (gDNA) und die Messung der Zytokinsekretion mittels Cytometric Bead Array (CBA). Wie in **Abb. 4** ersichtlich, fällt auf, dass transduzierte Zellen viel schlechter reagierten als native THP-1-Zellen. Das lag wahrscheinlich am Alter der Zellen, welche durch die Generierung des *CASP1* knock out, die Re-Transduktion der *CASP1*-Varianten und die zusätzliche Differenzierung in M0-, M1- und M2-Makrophagen bereits älter als 3 Monate waren. Aus diesem Grund wurden für Folgeexperimente jeweils frische Zellen generiert.

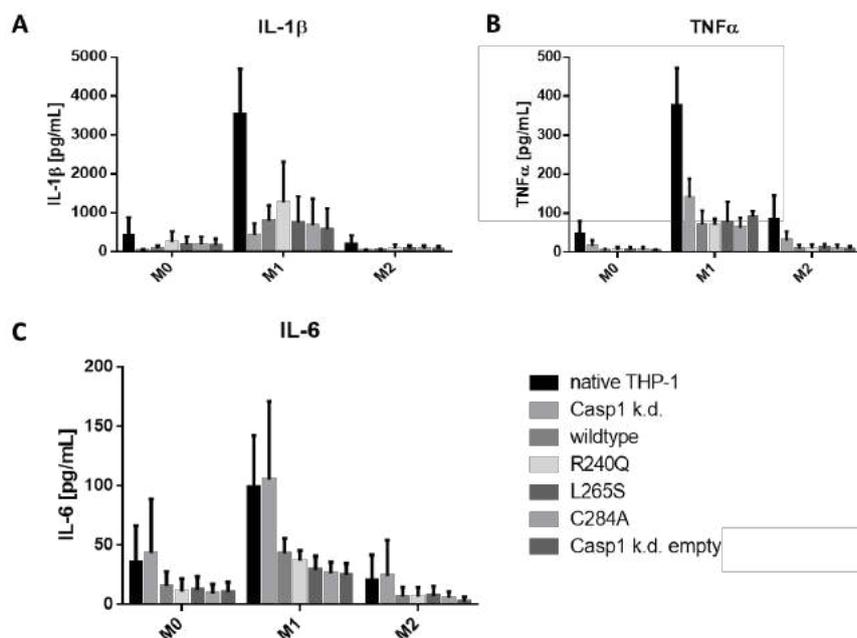


Abb.4: Zytokinsekretion von M1- und M2-differenzierten Makrophagen (generiert aus THP-1/Casp1 ko Zellen mit Re-Expression der *CASP1*-Varianten) nach AIM2-Inflammasom-Stimulation.

Monozytäre THP1/Casp1 ko-Zellen mit Re-Expression der *CASP1*-Varianten wurden mit 5 ng/ml PMA für 48h zu Makrophagen (M0) differenziert. Für die Differenzierung zu M1-Makrophagen erhielten die Zellen zusätzlich für 24h 20 ng/ml IFN- γ und für die Differenzierung in M2-Makrophagen 20 ng/ml IL-4. Anschließend erfolgte die AIM2-Inflammasom-Stimulation mit polydAdT oder genomischer DNA (gDNA). Die Zytokinsekretion in den Zellkulturüberstand wurde mittels Cytometric Bead Arrays (CBA) auf IL-1 β - (A), TNF α - (B) und IL-6- (C) gemessen.

Neu generierte *CASP1* knock out Zelllinien mit Re-Expression der *CASP1*-Varianten wurden mit PMA (5 ng/ml, 48 h) zu Makrophagen differenziert, mit LPS-geprimed (100 ng/ml, 16 h)

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

und mit AIM2- (polydAdT, gDNA; **Abb. 5**) und NLRP3-Inflammasom- (ATP, Nigericin, MSU; **Abb. 6**) Aktivatoren stimuliert und erneut auf die Zytokinexpression analysiert, um anschließend für die Untersuchung der zytomechanischen Eigenschaften mittels RT-DC zur Verfügung zu stehen.

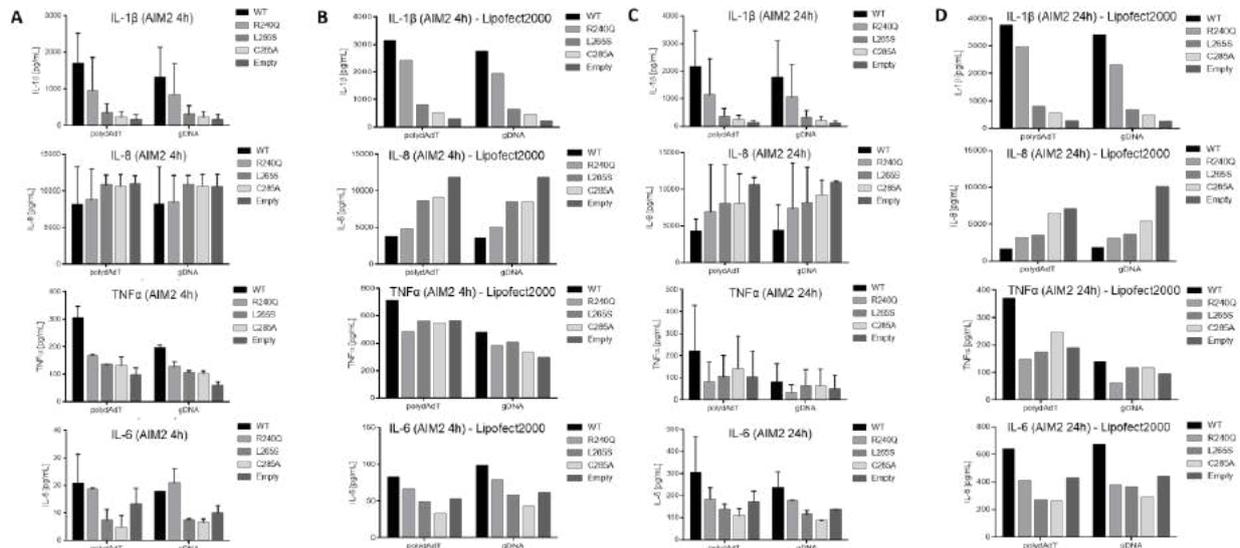
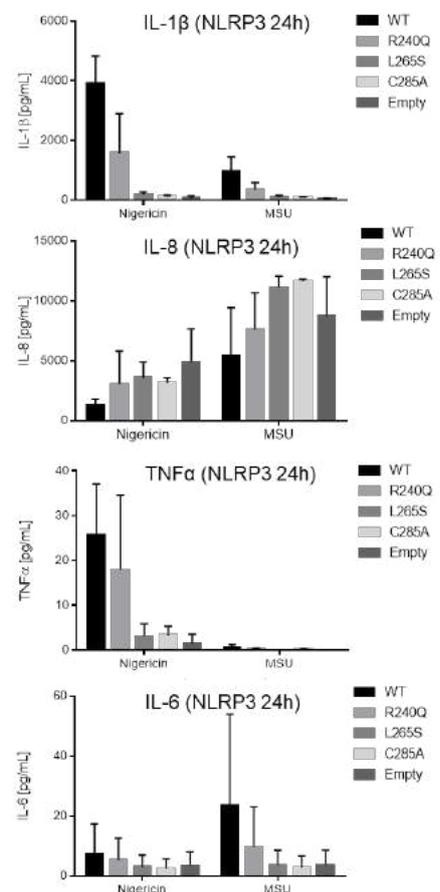


Abb.5: Zytokinsekretion von THP-1/CASP1 ko Zellen mit Re-Expression der CASP1-Varianten nach AIM2-Inflammasom-Stimulation. Monozytäre THP1/CASP1 ko-Zellen mit Re-Expression der CASP1-Varianten wurden mit 5 ng/ml PMA für 48h zu Makrophagen differenziert. Anschließend erfolgte die AIM2-Inflammasom-Stimulation mit polydAdT oder genomischer DNA (gDNA) mit Lipofectamine 3000 (A, C) oder Lipofectamin2000 (B, D) für 4h (A, B) oder 24h (C, D). Die Zytokinsekretion in den Zellkulturüberstand wurde mittels Cytometric Bead Arrays (CBA) auf IL-1 β , IL-8, TNF α und IL-6 gemessen. Empty Vector entspricht der Negativkontrolle (Caspase-1 ko Zellen mit Leervektor transduziert).

Nach AIM2-Inflammasom-Stimulation verhält sich die IL-1 β -Freisetzung durch die verschiedenen CASP1-Varianten proportional zur Restaktivität der CASP1-Varianten (**Abb. 5A-D**) und ist deutlich niedriger im Vergleich zum WT. IL-8 ist bei allen CASP1-Varianten im Vergleich zum WT erhöht (**Abb. 5A-D**), was die Theorie unterstützt, dass CASP1-Varianten alternative proinflammatorische Signalwege aktivieren.

Nach NLRP3-Inflammasom-Stimulation zeigen sich ähnliche Ergebnisse (**Abb. 6**). Die IL-1 β -Freisetzung durch die verschiedenen CASP1-Varianten verhält sich proportional zur Restaktivität der CASP1-Varianten, mit fast fehlender IL-1 β -Sekretion für p.L265S und p.C285A. Diese Varianten zeigen jedoch eine vermehrte Sekretion von IL-8.

Abb.6: Zytokinsekretion von THP-1/Casp1 ko Zellen mit Re-Expression der CASP1-Varianten nach NLRP3-Inflammasom-Stimulation. Monozytäre THP1/CASP1 ko-Zellen mit Re-Expression der CASP1-Varianten wurden mit 5 ng/ml PMA für 48h zu Makrophagen differenziert, mit LPS geprimed und anschließend mit NLRP3-Inflammasom-Aktivatoren (Nigericin oder MSU) stimuliert. Die Zytokinsekretion in den Zellkulturüberstand wurde mittels Cytometric Bead Arrays (CBA) auf IL-1 β , IL-8, TNF α und IL-6 gemessen. Empty Vector entspricht der Negativkontrolle (Caspase-1 ko Zellen mit Leervektor transduziert).



„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Nach der erfolgten Charakterisierung der Zellen und der Überprüfung der Funktionalität der Zell-Stimulation wurden die geplanten RT-DC Messungen mit den THP-1/*CASP1* knock out-Zelllinien durchgeführt (**Abb. 8**).

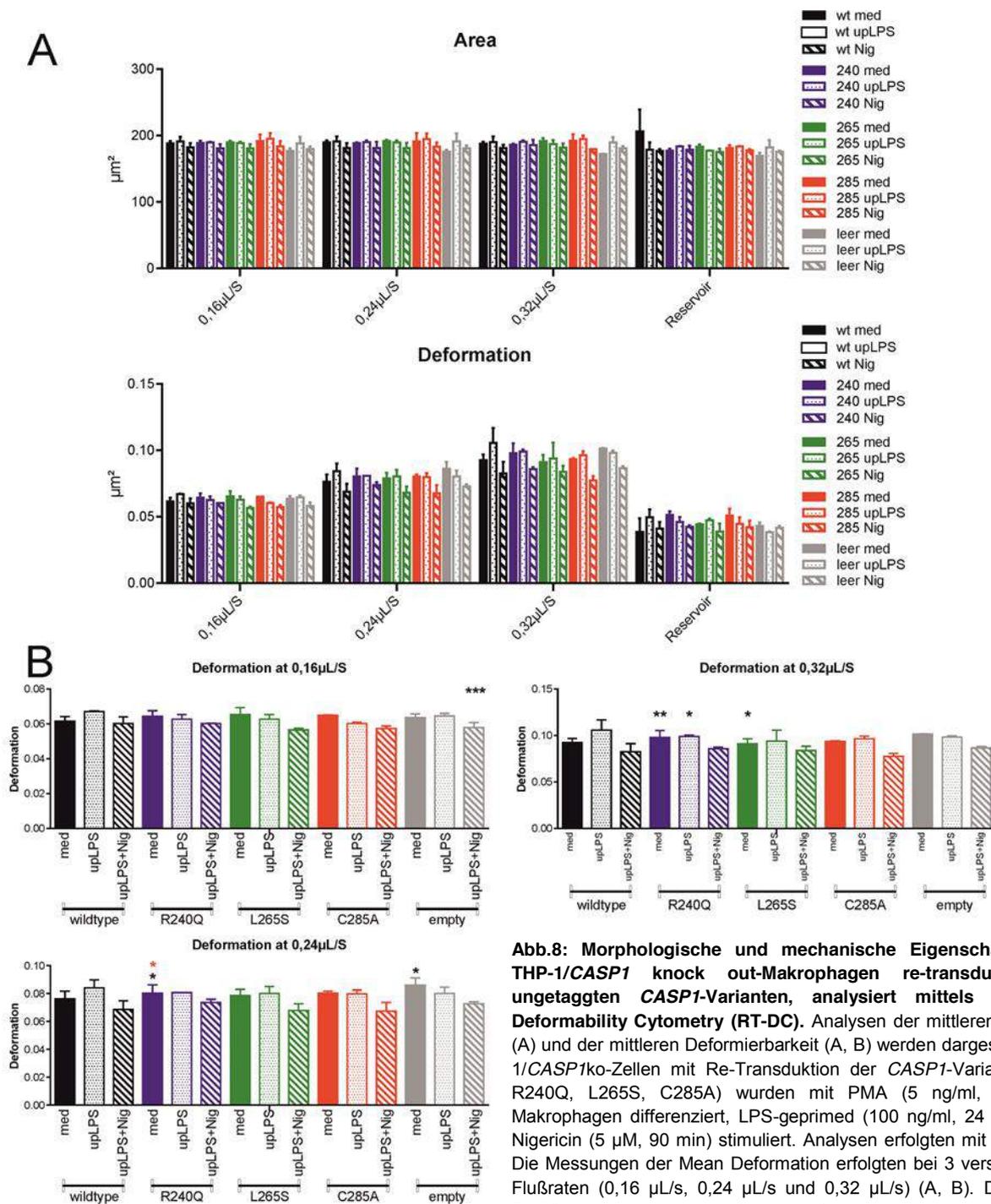


Abb.8: Morphologische und mechanische Eigenschaften von THP-1/*CASP1* knock out-Makrophagen re-transduziert mit untaggen *CASP1*-Varianten, analysiert mittels Real-Time Deformability Cytometry (RT-DC). Analysen der mittleren Zellgröße (A) und der mittleren Deformierbarkeit (A, B) werden dargestellt. THP-1/*CASP1*ko-Zellen mit Re-Transduktion der *CASP1*-Varianten (WT, R240Q, L265S, C285A) wurden mit PMA (5 ng/ml, 48 h) zu Makrophagen differenziert, LPS-geprimed (100 ng/ml, 24 h) und mit Nigericin (5 μM, 90 min) stimuliert. Analysen erfolgten mit ShapeOut. Die Messungen der Mean Deformation erfolgten bei 3 verschiedenen Flußraten (0,16 μL/s, 0,24 μL/s und 0,32 μL/s) (A, B). Die mittlere Zellfläche (Mean Area) unterscheidet sich zwischen den Zelllinien nicht (A). Die statistische Analyse der mittlere Deformierbarkeit (B) zeigt eine höhere Deformierbarkeit der *CASP1*-Variante R240Q und L265S und des *CASP1*-ko (empty) im Vergleich zum Wildtyp (WT) bei der Flußrate 0,32 μL/s bei den unstimulierten Zellen (medium) (B). Bei LPS priming und Stimulation mit Nigericin verlieren sich diese Unterschiede. Empty Vector entspricht der Negativkontrolle (Caspase-1 ko Zellen mit Leervektor transduziert). N=3

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Die mittlere Zellfläche (Mean Area) unterscheidet sich zwischen den Zelllinien nicht (**Abb. 8A**). Die statistische Analyse der mittlere Deformierbarkeit (**Abb. 8B**) zeigt eine höhere Deformierbarkeit der *CASP1*-Variante R240Q und L265S und des *CASP1*-ko (empty) im Vergleich zum Wildtyp (WT) bei der Flußrate 0,32 $\mu\text{L/s}$ für die unstimulierten Zellen (Zellen erhielten anstelle von LPS und Nigericin nur Medium). Bei LPS priming und Stimulation mit Nigericin verloren sich diese Unterschiede wieder.

Um die Deformierbarkeits-Unterschiede zwischen rekonstituierten *CASP1*-WT- und *CASP1* knock out Zellen (empty vector) (**Abb. 8**) ohne eine erneute Virustransduktion (die evtl. einen Einfluss auf die Deformierbarkeit der Zellen haben könnte) zu untersuchen, wurden die mittels CRISPR/Cas9 System generierten Zellen ohne Doxycyclin (*CASP1*-WT) und mit Doxycyclin (*CASP1* ko) kultiviert und dann mit PMA (5 ng/ml, 48 h) zu Makrophagen differenziert, mit LPS-geprimed (100 ng/ml, 16 h) und mit Nigericin (5 μM) für 90 min oder 24 h stimuliert (**Abb. 9**). Die statistische Analyse der mittlere Deformierbarkeit (B) zeigt eine höhere Deformierbarkeit der Casp1 KO Zellen im Vergleich zum Wildtyp (Casp1) bei der Flußrate 0,16 und 0,24 $\mu\text{L/s}$ bei den unstimulierten Zellen (medium) nach 90 min Nigericin sowie bei LPS-geprimten Zellen nach 24 h Nigericin (B). Das bestätigte die Ergebnisse mit den THP-1/*CASP1* knock out-Makrophagen re-transduziert mit ungetaggtten *CASP1*-Varianten (siehe **Abb. 8**).

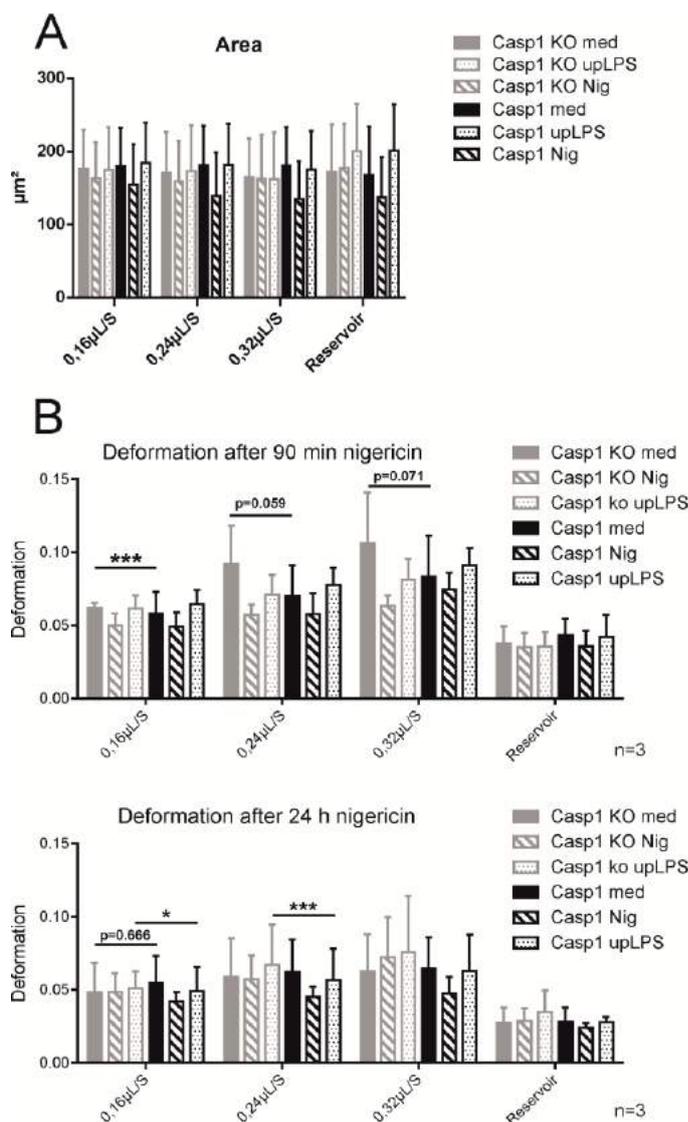


Abb.9: Morphologische und mechanische Eigenschaften von CRISPR/Cas9-generierten THP1/*CASP1*-WT (ohne Doxycyclin) und *CASP1*-KO (mit Doxycyclin) Zelllinien, analysiert mittels Real-Time Deformability Cytometry (RT-DC). Analysen der mittleren Zellgröße (A) und der mittleren Deformierbarkeit (B) werden dargestellt. Die Zellen wurden mit PMA (5 ng/ml, 48 h) zu Makrophagen differenziert, LPS-geprimed (100 ng/ml, 16 h) und mit Nigericin (5 μM) stimuliert. Messungen erfolgten nach 90 min und 24 h Nigericin-Stimulation. Die Mean Deformation wurde bei 3 verschiedenen Flußraten (0,16 $\mu\text{L/s}$, 0,24 $\mu\text{L/s}$ und 0,32 $\mu\text{L/s}$) gemessen. Die mittlere Zellfläche (Area) unterscheidet sich zwischen den Zelllinien nicht (A). Die statistische Analyse der mittlere Deformierbarkeit (B) zeigt eine höhere Deformierbarkeit der Casp1 KO Zellen im Vergleich zum Wildtyp (Casp1) bei der Flußrate 0,16 und 0,24 $\mu\text{L/s}$ bei den unstimulierten Zellen (medium) nach 90 min Nigericin sowie bei LPS-geprimten Zellen nach 24 h Nigericin (B). Analysen wurden mit ShapeOut durchgeführt. N=3

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Des Weiteren erfolgten Stimulationen der mit ungetaggten *CASP1*-Varianten retransduzierten THP-1/*CASP1* knock out-Makrophagen mit dem NLRP3-Inflammasom-Stimulus MSU. Die MSU-Kristalle führten jedoch aufgrund ihrer Größe zu einer Verstopfung der Kanäle des RT-DC. Trotz mehrfacher Waschschriffe gelang es nicht, die MSU-Kristalle nach erfolgter Stimulation von den Zellen zu trennen.

Eine weitere Stimulation der Zelllinien erfolgte mit dem AIM2-Inflammasom-Stimulus polydAdT. Monozytäre THP1/*CASP1* KO-Zellen mit Re-Expression der *CASP1*-Varianten wurden mit 5 ng/ml PMA für 48h zu Makrophagen differenziert. Anschließend erfolgte die AIM2-Inflammasom-Stimulation mittels Transfektion von polydAdT. Diese erbrachte jedoch keine statistischen Unterschiede zwischen den Zelllinien (Daten nicht gezeigt). Wahrscheinlich führte die polydAdT-Transfektion bereits zu Zellstress, wodurch eventuelle Unterschiede zwischen den Zelllinien nicht mehr erfassbar waren.

Zusammenfassend lässt sich für die **RT-DC-Messungen** feststellen:

Die Ergebnisse mit den GFP-markierten *Casp1*-Konstrukten (heterozygoten Zellsystem) als auch mit den CRISPR/Cas9-generierten THP1/*CASP1* knock out re-exprimierenden *CASP1*-Varianten Zelllinien, demonstrieren, dass Veränderungen der Monozyten-/Makrophagenzellform und -deformation als weitere Mechanismen dazu beitragen könnten, wie *CASP1*-Varianten trotz verringerter IL-1 β -Freisetzung zu vermehrter Entzündungsreaktion beitragen. Eine verbesserte Verformbarkeit der Monozyten/Makrophagen mit *CASP1* knock out und *CASP-1* Varianten könnte dazu führen, dass diese Zellen besser ins Gewebe migrieren und dort dann eine vermehrte Entzündungsreaktion auslösen.

Leider zeigten sich jedoch nur geringe und partielle Unterschiede und die RT-DC Messung erscheint insgesamt zu anfällig, um sie für die klinische Diagnostik bei oben genannter Fragestellung einzusetzen. Die Aktivierung der Zellen mit Inflammasom-Stimuli führt bereits zur Induktion des inflammatorischen Zelltodes (Pyroptose), was wahrscheinlich die Zell-Verformbarkeit maßgeblich beeinflusst.

2.2. Wie beeinflussen *CASP1*-Varianten den durch Inflammasom-Stimulation verursachten „Zytoskelett-Kollaps“ und damit die Aktin-/Tubulin-Filamentstruktur?

Beeinflussung der Pyroptosomenbildung durch *CASP1*-Varianten

Das Zytoskelett spielt sowohl für die Zellform und Zellgröße, als auch die Verformbarkeit und damit die Zellmigration eine maßgebliche Rolle. Daher war es unser Ziel, durch *CASP1*-Varianten verursachte *Unterschiede in der Zellmechanik als auch der Pyroptosomenbildung mit Veränderungen des Zytoskeletts*, wie z.B. einer veränderten Anordnung von Aktin-/Tubulinfilamenten, zu *assoziiieren*. In Kapplusch et al. 2019 [1] konnten wir erste *in-vitro*-Daten im humanen Zellmodell für die mögliche Bedeutung der Pyroptosom-Bildung und Pyroptose in der Pathophysiologie der Caspase-1-assoziierten autoinflammatorischen Erkrankung liefern. Pyroptose beschreibt den pro-inflammatorischen Zelltod und ist mit einem Zytoskelett-Kollaps in Form einer „Speck“-Bildung assoziiert.

Mit Life-time Imaging und Antikörperfärbung an fixierten Zellen konnten wir zeigen, dass die p.L265S-Variante im Vergleich zum Wildtyp (WT) nach Nigericin-Stimulation eine signifikant verminderte Pyroptosomen-Bildung mit im Durchschnitt kleineren und schwächer

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

leuchtenden Procaspase-1-Specks zeigte (**Abb.10**), was evtl. durch die Fehlfaltung dieser Variante erklärbar ist, während sich die Größe der ASC-Specks nicht unterschied. Im Gegensatz dazu zeigten die Varianten p.C285A und p.R240Q eine erhöhte Pyroptosomengröße und -intensität (**Abb.10**), die zur Verstärkung von Entzündungssignalen beitragen könnte, wenn Specks in den extrazellulären Raum freigesetzt werden.

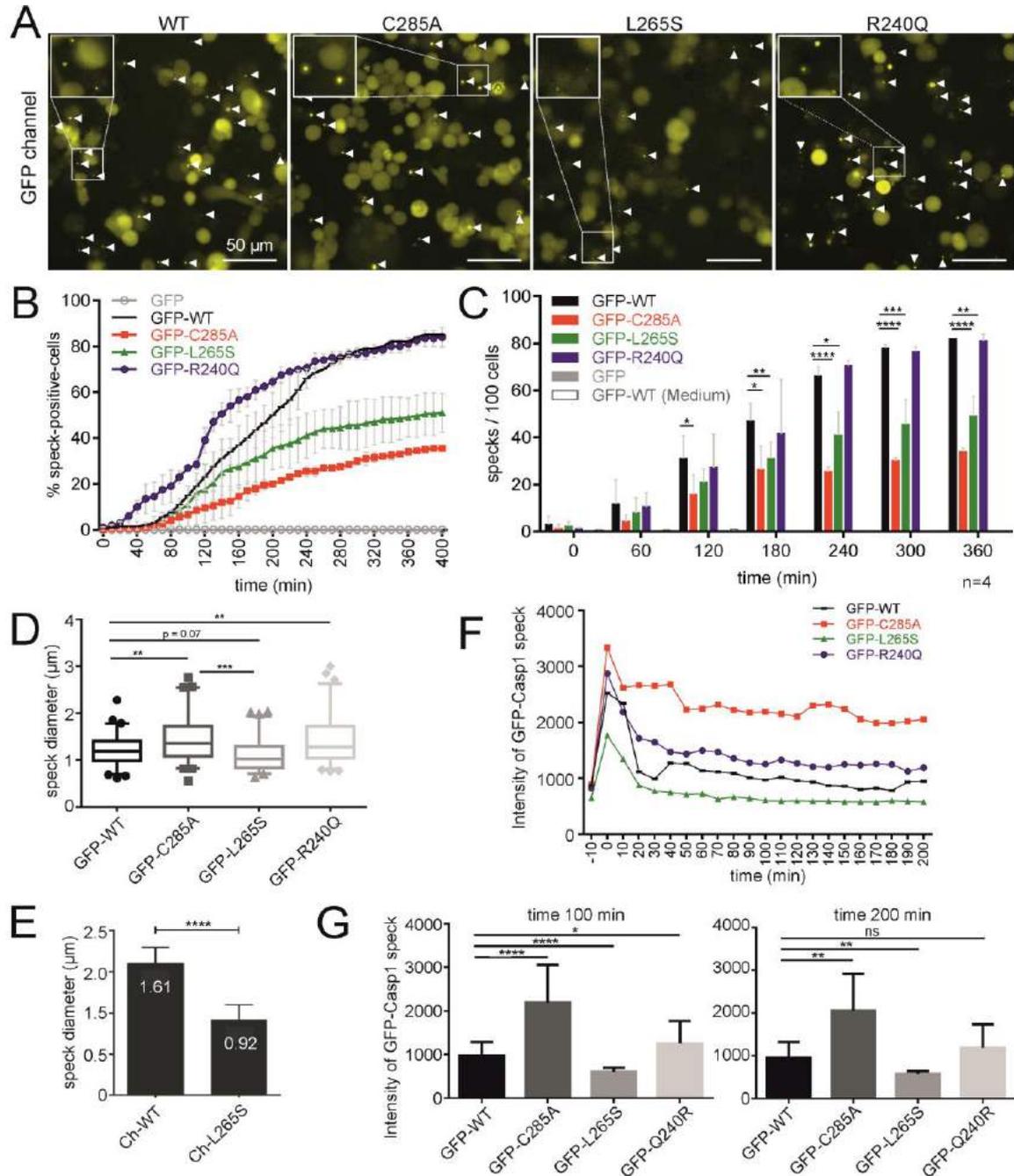


Abb.10 Procaspase-1-Varianten mit verminderter oder fehlender enzymatischer Aktivität verhindern in Makrophagen nicht die Bildung von Pyroptosomen, beeinflussen jedoch deren Anzahl, Größe und Intensität. EGFP-Fusionsproteine der WT-Procaspase-1 (WT) oder enzymatisch inaktiver (p.C285A, p.L265S) oder abgeschwächter (p.R240Q) Procaspase-1 wurden in THP-Zellen mit shRNA knockdown der endogenen Procaspase-1 (THP-1/a-PC1) exprimiert, und ggf. mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS für 3 h geprimed, gefolgt von 10 μM Nigericin oder 2 mM ATP Stimulation (1 h) und Life time imaging. A) Mikroskopie: GFP-Procaspase-1-Specks zum Zeitpunkt 310 min nach der Zugabe von Nigericin. B) Life-time Imaging der GFP-Procaspase-1-Speckbildung. Bilder alle 10 min über 400 min aufgenommen. Zu jedem Zeitpunkt wurden erstmals auftretende Specks gezählt und zur Speck-Anzahl in den vorherigen Bildern addiert. Anzahl der beobachteten Specks wurde auf die Gesamtzahl

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

der Zellkerne (Hoechst-Färbungen) innerhalb desselben Bildausschnittes bezogen. Analysiert wurden 700-1000 Zellen pro Zelllinie. Ergebnisse zweier unabhängiger Experimente gezeigt (repräsentativ für 4 unabhängige Experimente). Die p.L265S- und p.C285A-Variante zeigen eine deutlich verminderte Pyroptomen-Bildung. C) GFP-Procaspase-1-Specks, die mittels Fluoreszenzmikroskopie nach 60, 120, 180, 240, 300 und 360 min (B) beobachtet wurden, wurden gezählt und auf die Gesamtmenge der Kerne (DAPI) bezogen. Die kumulierte Anzahl der Specks aus 4 unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mittels two-way-Anova und „multiple comparison test adjusted by Bonferroni“ ermittelt. D) Aus den Fluoreszenz-Mikroskopie Experimenten (A) wurde die Speck-Größe in Zellen gemessen, die GFP-WT- oder GFP-markierte Procaspase-1-Varianten exprimierten (n=70 Specks/Zelllinie aus 4 unabhängigen Experimenten). Statistik: Mann-Whitney-Test. *, p<0,05; **, p<0,01; p<0,001; ****, p<0,0001; ns, nicht signifikant. Standardfehler des Mittelwerts. E) Die p.L265S-Variante bildet kleinere Procaspase-1-Specks (bei gleicher ASC-Speck-Größe). F) Wie in (A) gezeigt, weisen die Specks Intensitäts-Unterschiede auf. Zeitreihe zeigt Mittelwerte der maximalen Fluoreszenzintensitäten der Specks von GFP-WT-/GFP-Procaspase-1-Varianten. Die erste Speckbildung wurde als Startpunkt (0 min) festgelegt und für jedes Pyroptosom einzeln bewertet. Intensitätsstufen 10 Minuten vor der Speckbildung (-10 Minuten) repräsentieren das Hintergrundsignal des Zytosols. Die Speckintensität nach 100 min und 200 min wurden für die statistische Analyse ausgewählt (n=22 pro Zeitpunkt) (G). p.C285A-Specks sind deutlich größer und heller als WT-Specks, während die p.L265S-Specks schwächer leuchten und kleiner sind. [1]

Die Speck-Bildung geht dem Caspase-1-abhängigen, entzündungsassoziierten Zelltod (Pyroptose) voraus. Aufgrund der Beteiligung des Zytoskeletts bei der Speck-Bildung liegt es nahe, dass *CASP1*-Mutationen zu veränderten zellmechanischen Eigenschaften der Monozyten/Makrophagen führen könnten und dadurch eventuell die Phagozytose-Fähigkeit dieser Zellen als auch Migrationseigenschaften beeinflussen.

Daher erfolgten Proliferations- und Phagozytose-Messungen mit dem IncuCyte®-Live-Cell-Analysesystem in Kombination mit pH-empfindlichen Sonden (z.B. pHrodo *E.coli*-Mikropartikel). Die Proliferation und Phagozytose von Monozyten/Makrophagen wurde durch *CASP1*-Varianten jedoch nicht signifikant beeinflusst (**Abb. 11**).

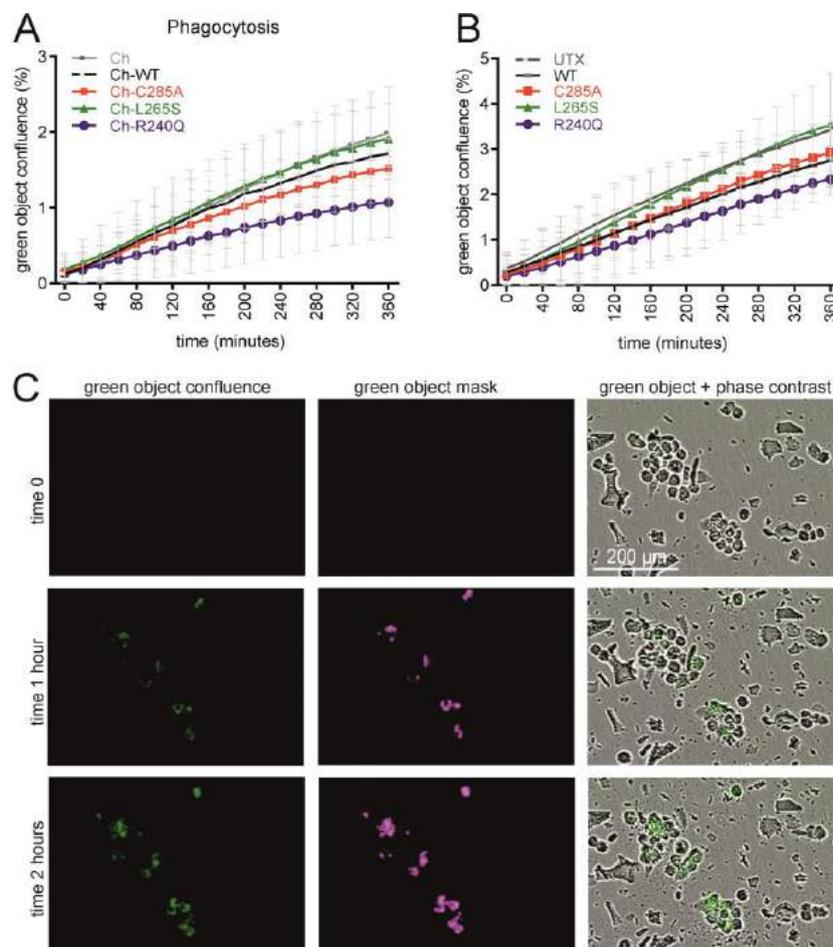


Abb.11: Procaspase-1-Varianten beeinflussen die Phagozytose von THP1-Makrophagen nicht. A+B, THP-1-Zellen mit Knock-down der mit WT rekonstituierten endogenen Procaspase-1 (a-PCasp1) und Procaspase-1-Varianten (A, mCherry-Fusionsproteine oder B, "untagged") wurden mit 2,5 ng/ml PMA über Nacht zu Makrophagen differenziert. Analyse der Phagozytose-Kapazität der Zelllinien hinsichtlich der Phagozytose von pHrodo Green *E. coli* BioParticles, die nur im sauren Milieu von Phago lysosomen fluoreszieren (IncuCyte). Die aufgenommenen Bilder wurden für jeden Zeitpunkt über 4 Stunden auf die Konfluenz der grünen Objekte quantifiziert (%). C, Repräsentative Bilder der Fluoreszenzobjektquantifizierung werden zu den Zeitpunkten 0, 1 und 2 Stunden gezeigt. [1]

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Im Weiteren wurde geprüft, ob *CASP1*-Varianten direkt einen Einfluss auf das Aktin-Zytoskelett nehmen. Das Aktin-Zytoskelett ist entscheidend für viele zelluläre Funktionen, einschließlich der Aufrechterhaltung und Regulierung der Zellform, der Motilität, der intrazellulären Kommunikation, des intrazellulären Transports und der Weiterleitung extrazellulärer Signale in die Zelle. Aktin kommt in zwei Zuständen vor, als globuläres monomeres *G-Aktin* und als aneinandergereihte Aktin-Filamente, welche unter ATP-Verbrauch aus mehreren Aktin-Monomeren entstehen (*F-Aktin*). Durch Polymerisierung, F-Aktin-Bildung, Bildung eines F-Aktin-Doppelstranges sowie Einbau weiterer Proteine, entstehen dreidimensionale Netzwerke. Dieser Prozess verläuft dynamisch und die Zelle passt sich damit den aktuellen Erfordernissen an.

Die reproduzierbarste und genaueste Methode zur Bestimmung des Gehalts an F-Aktin im Vergleich zum Gehalt an freiem G-Aktin in Zellen ist die Quantifizierung der zellulären Fraktionen von F-Aktin und G-Aktin mittels Western Blot. Der allgemeine Ansatz besteht darin, die Zellen in F-Aktin-Stabilisierungspuffer zu homogenisieren, gefolgt von einer Zentrifugation, um den F-Aktin- vom G-Aktin-Anteil zu trennen. Die Fraktionen werden dann durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot detektiert. Durch Quantifizierung der Western Blot Banden lässt sich das Verhältnis von F-Aktin, das in das Zytoskelett eingebaut ist, gegenüber dem G-Aktin, welches im Zytosol gefunden wird bestimmen.

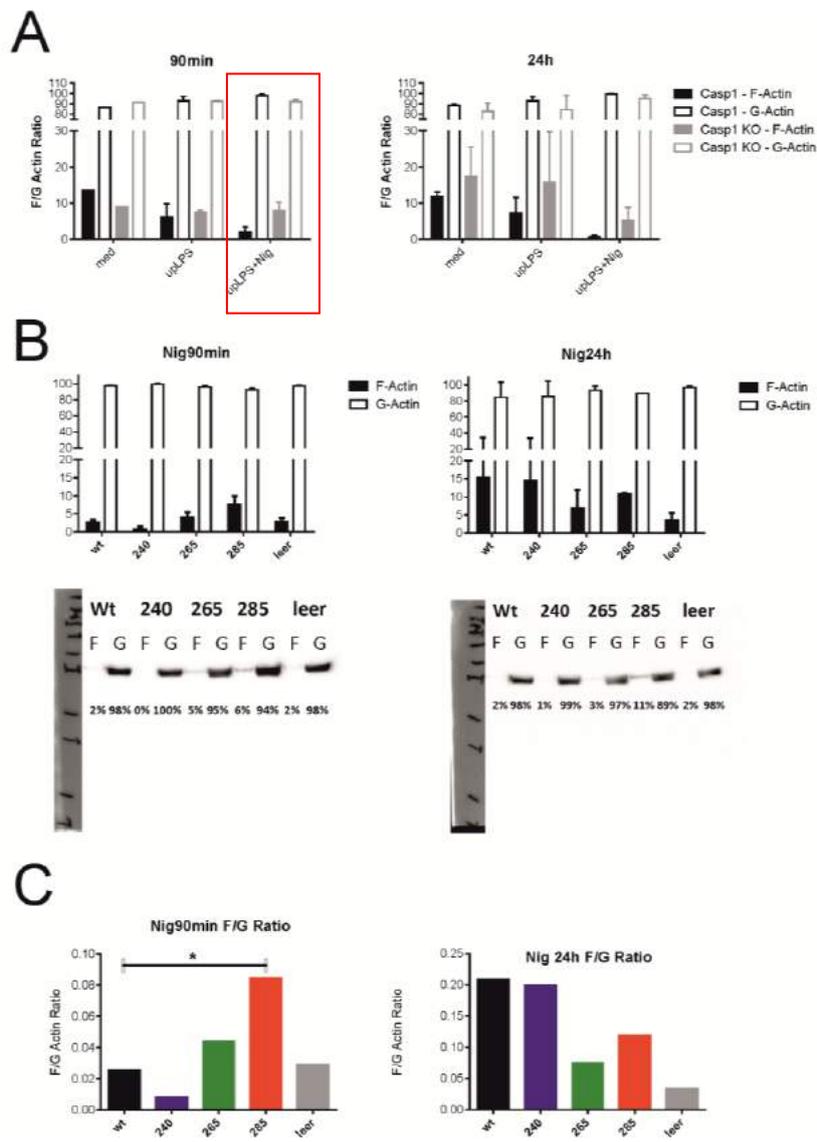


Abb.12: Verhältnis von F- und G-Aktin in CRISPR/Cas9-generierten THP1/*CASP1*-WT (ohne Doxycyclin) und *CASP1*-KO (mit Doxycyclin) Zelllinien sowie THP-1/*CASP1* knock out-Makrophagen re-transduziert mit ungetaggtten *CASP1*-Varianten. (A) Analyse der F/G-Aktin Verteilung in CRISPR/Cas9-generierten THP1/*CASP1*-WT (ohne Doxycyclin) und *CASP1*-KO (mit Doxycyclin) Zelllinien sowie in (B) THP-1/*CASP1* knock out-Makrophagen re-transduziert mit ungetaggtten *CASP1*-Varianten. Die Zellen wurden mit PMA (5 ng/ml, 48 h) zu Makrophagen differenziert. LPS-geprimed (100 ng/ml, 16 h) und mit Nigericin (5 µM, 90 min oder 24 h) stimuliert. Anschließend erfolgten Westernblots auf F- und G-Aktin. Die Western Blot Banden wurden quantifiziert und die F/G-Ratio berechnet (C). med, medium (unstimuliert)

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Die Analyse der F/G-Aktin Verteilung in CRISPR/Cas9-generierten THP1/*CASP1*-WT (ohne Doxycyclin) und *CASP1*-KO (mit Doxycyclin) Zelllinien (**Abb. 12A**) sowie in THP-1/*CASP1* knock out-Makrophagen re-transduziert mit ungetaggenen *CASP1*-Varianten (**Abb. 12 B, C**) zeigt, dass die F/G-Ratio bei der C285A-Caspase-1-Variante eine signifikante Erhöhung nach 90 min Nigericin-Stimulation aufweist (**Abb. 12 C**), was mit einer verstärkten Motilität und Verformbarkeit der Zellen einhergehen könnte. Nach 24 h Nigericin-Stimulation weisen jedoch alle *CASP1* Varianten eine verminderte F/G-Aktin Ratio auf (**Abb. 12 C**), was wahrscheinlich durch den nach 24 h vermehrt aufgetretenen pro-inflammatorischen Zelltod zu erklären ist. Der Caspase-1 knock out geht ebenfalls mit einer erhöhten F/G Aktin ratio einher (**Abb. 12 A**, rote Markierung).

Damit lässt sich schlussfolgern, je weniger Caspase-1-Aktivität vorhanden ist, desto mehr F-Aktin liegt vor. Das könnte dazu führen, dass die Zellen mit enzymatisch inaktiven Caspase-1 Varianten eine verbesserte Verformbarkeit und Zellmotilität aufweisen. Zukünftig planen wir, Zellmigrationsassays durchzuführen, um diese Hypothese zu erhärten.

Einfluss natürlicher *CASP1*-Varianten auf den pro-inflammatorischen Zelltod

Um den Einfluss der natürlichen *CASP1*-Varianten auf den pro-inflammatorischen Zelltod (die Pyroptose) quantitativ zu untersuchen, wurden zusätzlich LDH- (Lactatdehydrogenase) Assays durchgeführt. Hierbei dient die bei der Zellyse freigesetzte LDH als Zelltodmarker.

Zu beachten ist, dass LDH ein allgemeiner Zelltodmarker ist und daher nicht spezifisch für die Pyroptose [4].

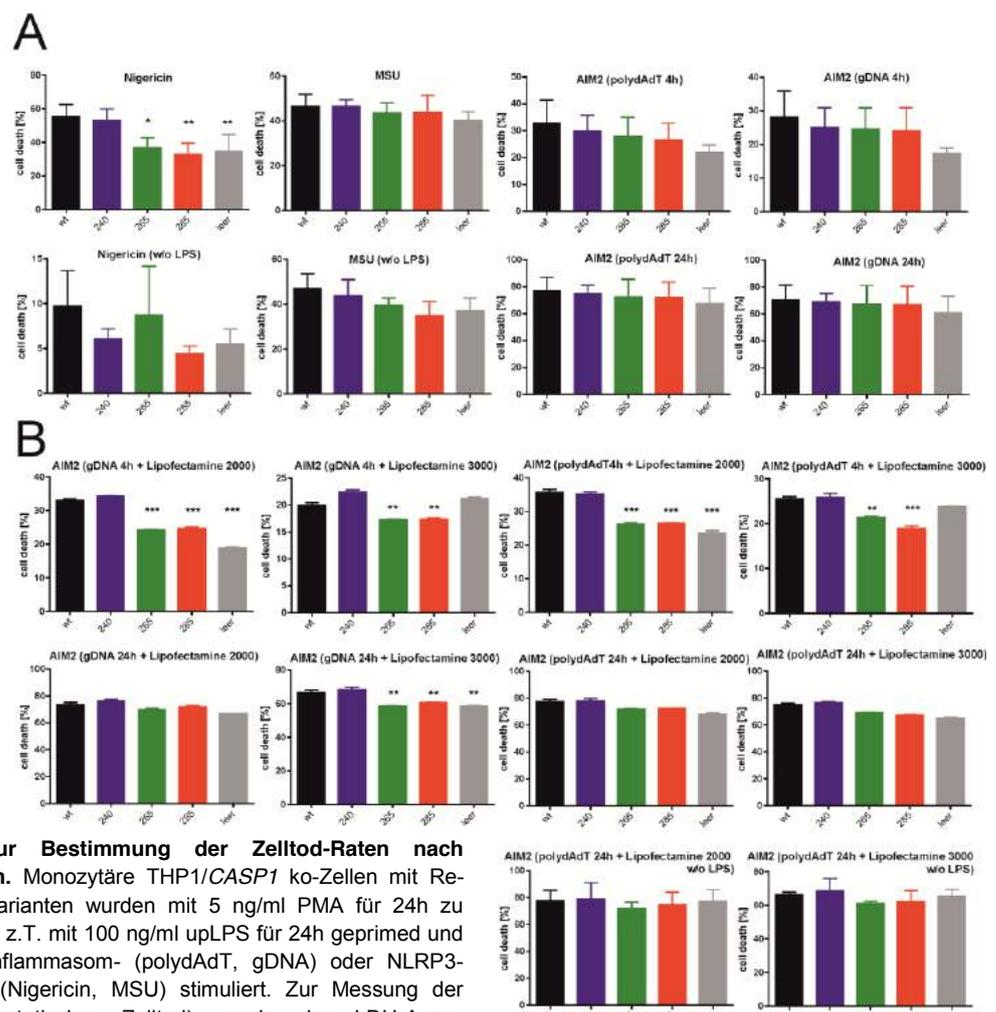


Abb.13: LDH-Assay zur Bestimmung der Zelltod-Raten nach Inflammasom-Stimulation. Monozytäre THP1/*CASP1* ko-Zellen mit Re-Expression der *CASP1*-Varianten wurden mit 5 ng/ml PMA für 24h zu Makrophagen differenziert, z.T. mit 100 ng/ml uLPS für 24h geprimed und anschließend mit AIM2-Inflammasom- (polydAdT, gDNA) oder NLRP3-Inflammasom-Aktivatoren (Nigericin, MSU) stimuliert. Zur Messung der Zelltod-Raten (hier pyroptotischer Zelltod) wurde der LDH-Assay verwendet. Empty Vector entspricht der Negativkontrolle (Caspase-1 ko Zellen mit Leervektor transduziert). Stimulationen: 24h mit polydAdT oder gDNA (4 µg/mL mit Lipofectamine3000 oder Lipofectamine2000); 24h mit 1 µM Nigericin oder 250 µg/ml MSU jeweils nach Mediumwechsel.

In **Abb. 13** ist ersichtlich, dass nach und NLRP3-Stimulation mit Nigericin (Abb. 13A) und AIM2-Inflammasom-Stimulation (4h) mit gDNA und polydAdT (Abb. 13A und B) die enzymatisch inaktiven *CASP1*-Varianten im Vergleich zu den WT-Zellen einen verminderten Zelltod zeigen. Nach 24h AIM2-Inflammasom-Stimulation ist dieser Effekt aufgehoben, da dann der Großteil der Zellen (60-80%) stirbt. Bei der NLRP3-Inflammasom-Stimulation mit Nigericin ist ein vorheriges Priming mit upLPS notwendig, um den (pyroptischen) Zelltod zu initiieren.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass *CASP1*-Varianten nach Stimulation mit AIM2- oder NLRP3-Stimuli verminderte Zelltodraten aufweisen.

2.3. Welche Bestandteile des Zytoskeletts bzw. welche weiteren Proteine sind in die Pyroptosenbildung involviert?

Die Untersuchung des genauen Pathomechanismus der autoinflammatorischen Prozesse der natürlich vorkommenden Varianten der Caspase-1, beispielsweise inwiefern die *CASP1*-Varianten möglicherweise Interaktionen mit anderen Proteinen begünstigen und dadurch zu einem inflammatorischen Phänotyp beitragen könnten, ist Gegenstand dieses Teilprojektes.

Proteomics-Analysen zur Identifizierung weiterer CARD-Interaktionspartner

Aufgrund des Einflusses von Tags auf die Procaspase-1-Aktivität und die Bindung potentieller Interaktionspartner [5] wählten wir THP-1/a-PC1-Zellen mit Re-Transduktion von *ungetaggen* Procaspase-1-Varianten.

Um weitere Interaktionspartner der Procaspase-1 zu identifizieren, wurde eine Co-Immünpräzipitation (IP) mit einem Antikörper gegen die CARD-Domäne der Procaspase-1 durchgeführt und anschließend mittels LC-MS/MS (Liquid-Chromatographie-Massenspektrometrie/Massenspektrometrie) analysiert. Dazu wurden THP-1/a-PC1 Zellen, welche verschiedene Varianten der Procaspase-1 exprimieren, wie beschrieben mit LPS geprimed und mit ATP stimuliert. Mittels LC-MS/MS-Analyse konnten 211 Proteine identifiziert werden, welche sowohl unter unstimulierten Bedingungen als auch unter ATP-Stimulation mit WT- und enzymatisch inaktiver *CASP1p.C285A*-Variante interagieren (**Abb.14**). Weitere 196 Proteine konnten in stimulierten WT- und *CASP1p.C285A*-exprimierenden Zellen gefunden werden. 20 Proteine konnten nur in stimulierten WT-Zellen und 10 Proteine in *CASP1p.C285A*-exprimierenden Zellen identifiziert werden. Mit der dargestellten Methode wurden **23 Proteine identifiziert**, die nach Stimulation der WT-Zellen häufiger in der MS/MS-Analyse detektiert werden konnten und damit eine Rolle bei der Aktivierung der Procaspase-1 spielen könnten (**Abb.14**). Diesbezüglich interessant erscheint unter anderem HSP90 (*heat shock protein 90*), welches einen Einfluss auf die Regulation des NLRP3-Inflammasoms zu haben scheint [6]. Eine direkte Interaktion mit der Procaspase-1 wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Des Weiteren konnten Proteine identifiziert werden, welche mit Autoinflammation assoziiert wurden, wie z.B. Vacuolar protein sorting-associated protein 35, Aminopeptidase B, Fatty acid syntase oder Peroxiredoxin-5 [7]. Hinsichtlich der Assoziation mit dem Zytoskelett scheinen außerdem Desmoplakin und Junction Plakoglobin interessante Interaktionspartner.

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

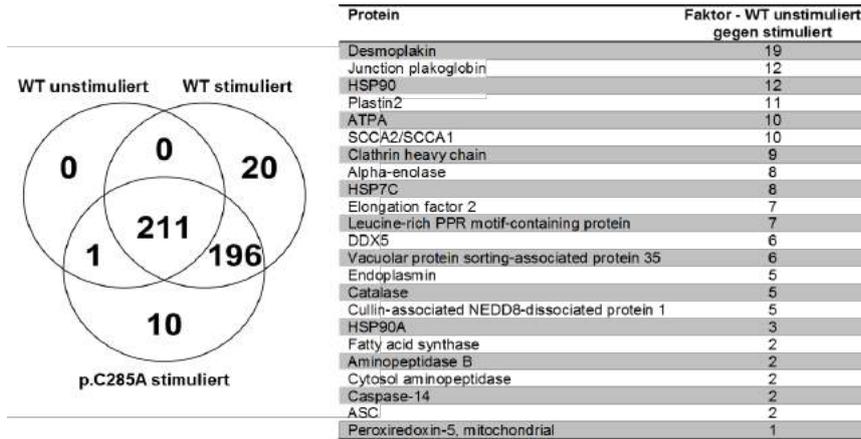


Abb.14: Ergebnisse der MS/MS-Tandemmassenspektrometrie. Venn-Diagramm, THP-1 Zellen mit shRNA-knockdown der endogenen Procaspase-1 rekonstituiert mit Procaspase-1 WT oder Varianten. Vergleich WT unstimuliert mit WT und p.C285A stimuliert. Die Tabelle zeigt identifizierte Interaktionspartner der Procaspase-1 nach Stimulation von WT Zellen

THP-1-Zellen, welche weitere *CASP1*-Varianten (p.R240Q, p.L265S) exprimieren, wiesen bei der Co-IP mit dem CARD-spezifischen Antikörper ein verringertes Interaktionsmuster auf und wurden daher in die Auswertung nicht einbezogen. Der Grund für die verringerte Interaktion könnte die Wahl des Antikörpers gegen die CARD darstellen. Eventuell werden durch selbigen weitere Interaktionsstellen an der CARD blockiert. Zusätzlich könnte die Fehlfaltung der p.L265S-Variante mögliche Interaktionsstellen an der p20-/p10-Domäne blockieren. Außerdem könnte eine Instabilität des Heterodimers mit varianter Procaspase-1 eine Rolle spielen. Annehmbar wurden in den präsentierten Daten nur Interaktionspartner identifiziert, welche mit der p20- oder p10-Domäne der Procaspase-1 interagieren.

Um das Problem der eventuellen Blockierung der Procaspase-1 CARD durch den IP-Antikörper zu umgehen, wurden im Folgenden ASC-/Procaspase-1-Specks mittels IP gegen ASC (Dynabead-Methode) isoliert und diese mit MS/MS-Tandemmassenspektrometrie untersucht, um nach weiteren Interaktionspartnern der varianten Procaspase-1 zu suchen (**Abb. 15**).

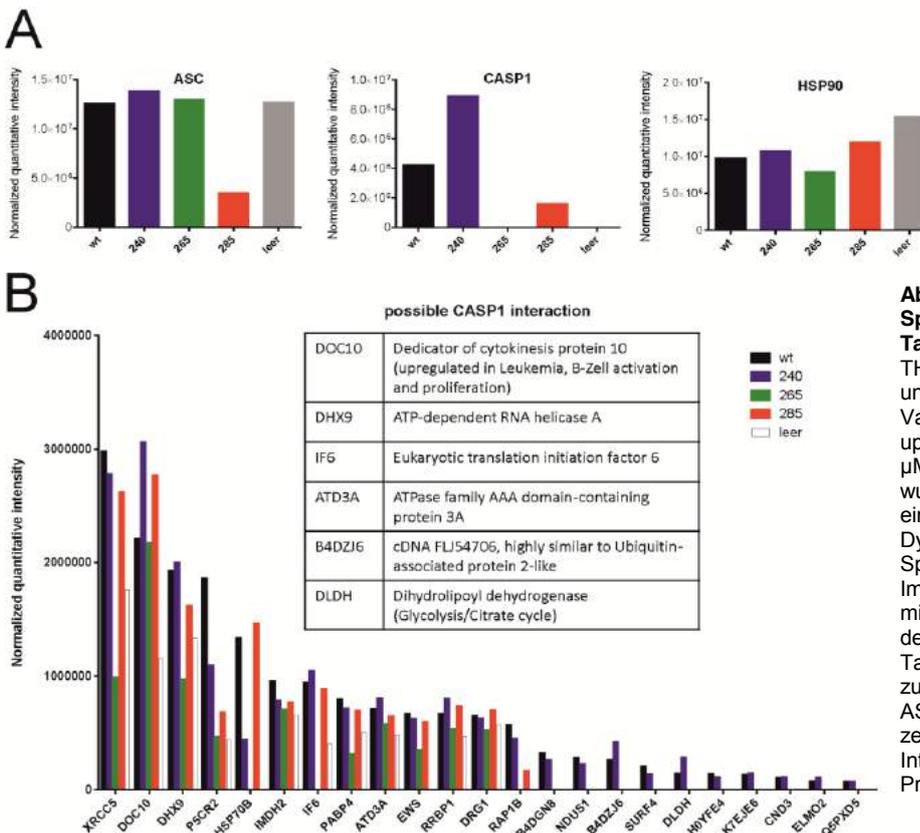


Abb.15: Ergebnisse der ASC-Speck-Analyse mittels MS/MS-Tandemmassenspektrometrie. THP-1 Zellen mit *CASP1*-knockout und Re-Expression von *CASP1*-Varianten wurden mit 100 ng/ml upLPS für 24h geprimt und mit 5 µM Nigericin stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und Proteinlysate für eine IP mit ASC-gekoppelten Dynabeads zur Isolation der Specks verwendet. Die Immunpräzipitate wurden dann mittels SDS-Page aufgetrennt und der MS/MS-Tandemmassenspektrometrie zugeführt. A, Analyse der mit ASC-gekoppelten Dynabeads. B, zeigt identifizierte Interaktionspartner der Procaspase-1 Varianten.

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Caspase-1 Varianten interagieren im Vergleich zum Caspase-1 WT vermehrt mit DOC10 (dedicator of cytokinesis protein 10) und vermindert mit DHX9 (ATP-dependent RNA helicase A), IF6 (eukaryotic translation initiation factor 6) und weiteren Kandidaten (**Abb. 15**). Diese Proteine können Ausgangspunkt für weitere Interaktionsstudien der Procaspase-1 Varianten darstellen.

Erste Untersuchungen zu Heat shock Protein 90 (HSP90) als Interaktionspartner der Procaspase-1

Mittels LC-MS/MS-Analyse wurde HSP90 als potentieller Interaktionspartner der Procaspase-1 nach Inflammasom-Stimulation detektiert.

Um diese potentielle Interaktion zu überprüfen, erfolgten Co-Immunpräzipitations-Experimente. Dafür wurden monozytäre THP-1-Zellen über Nacht mit 5 ng/ml PMA zu Makrophagen differenziert, anschließend mit 1 µg/ml upLPS für 6h geprimed und dann mit 5 mM ATP für 1h stimuliert. Die Zellen wurden danach lysiert und eine IP gezogen mit CARD Casp1-Antikörper durchgeführt. Die Immunpräzipitate wurden gemeinsam mit den Zelllysaten mittels Western Blot analysiert.

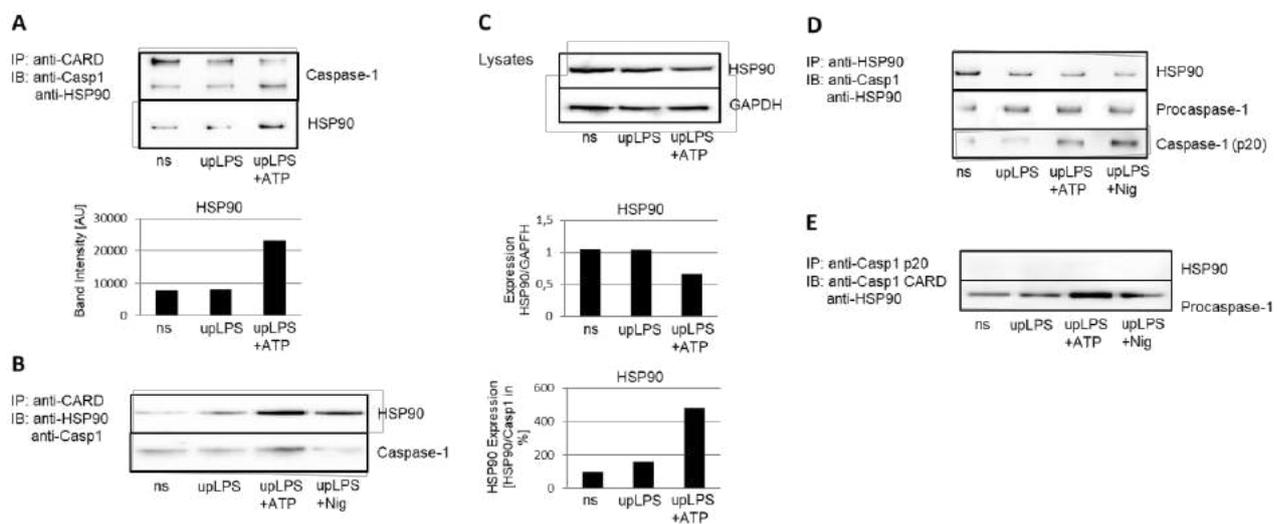


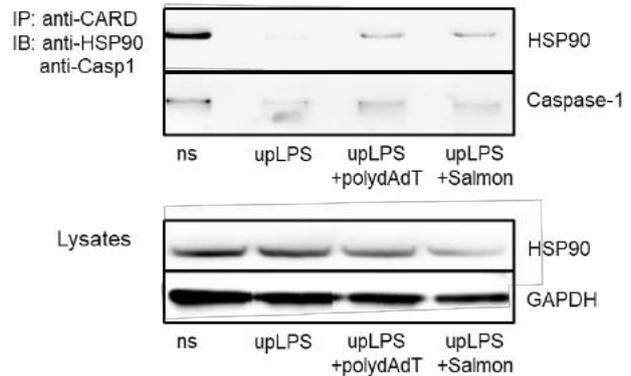
Abb.16: Co-Immunpräzipitation von HSP90 und Procaspase-1 nach NLRP3-Inflammasom-Stimulation. Monozytäre THP-1-Zellen wurden über Nacht mit 5 ng/ml PMA zu Makrophagen differenziert, mit 1 µg/ml upLPS für 6h geprimed und dann mit 5 mM ATP oder 2 µM Nigericin für 1h stimuliert. A+B) Immunpräzipitation gegen Procaspase-1 CARD (anti-CARD Antikörper) und Western Blot (IB) gegen Caspase-1 und HSP90. C) Western Blot der Lysate von (A) gegen HSP90 und GAPDH. Die Intensität der Western Blot Banden wurde densitometrisch quantifiziert und als Bandenintensität graphisch dargestellt. D) Immunpräzipitation gegen HSP90 (anti-HSP90-Antikörper) und Western Blot gegen HSP90, Procaspase-1 (CARD Antikörper) sowie Caspase-1 p20. E) Immunpräzipitation mit anti-p20 Caspase-1 Antikörper und Western Blot gegen Procaspase-1 (CARD Antikörper) und HSP90.

Die Immunpräzipitation gegen Procaspase-1 (anti-CARD Antikörper) zeigt eine vermehrte Interaktion von HSP90 mit Procaspase-1 nach NLRP3-Inflammasom-Stimulation (upLPS + ATP oder upLPS + Nigericin) (**Abb. 16A,B**). Nach IP mit anti-HSP90 Antikörper führt die NLRP3-Stimulation mit ATP oder Nigericin zu einer zunehmenden Interaktion mit aktiver Caspase-1 (p20) (**Abb. 16D**). Wird jedoch die IP mit anti-Casp1 p20 Antikörper durchgeführt, findet keine Interaktion mit HSP90 statt. Das könnte darauf hinweisen, dass der p20-Antikörper die Bindungsstelle von HSP90 blockiert.

Des Weiteren wurden THP-1 Zellen mit Aktivatoren des AIM2- und NLRC4-Inflammasomes stimuliert, um die Expression von HSP90 und Interaktion mit Procaspase-1, zu analysieren. Nach Stimulation des AIM2- und NLRC4-Inflammasoms zeigt sich eine zunehmende Interaktion von HSP90 mit Caspase-1 und eine verminderte Expression von HSP90 (**Abb. 17**), was auf eine Funktion dieses Proteins bei der Stimulation dieser Inflammasome hinweist.

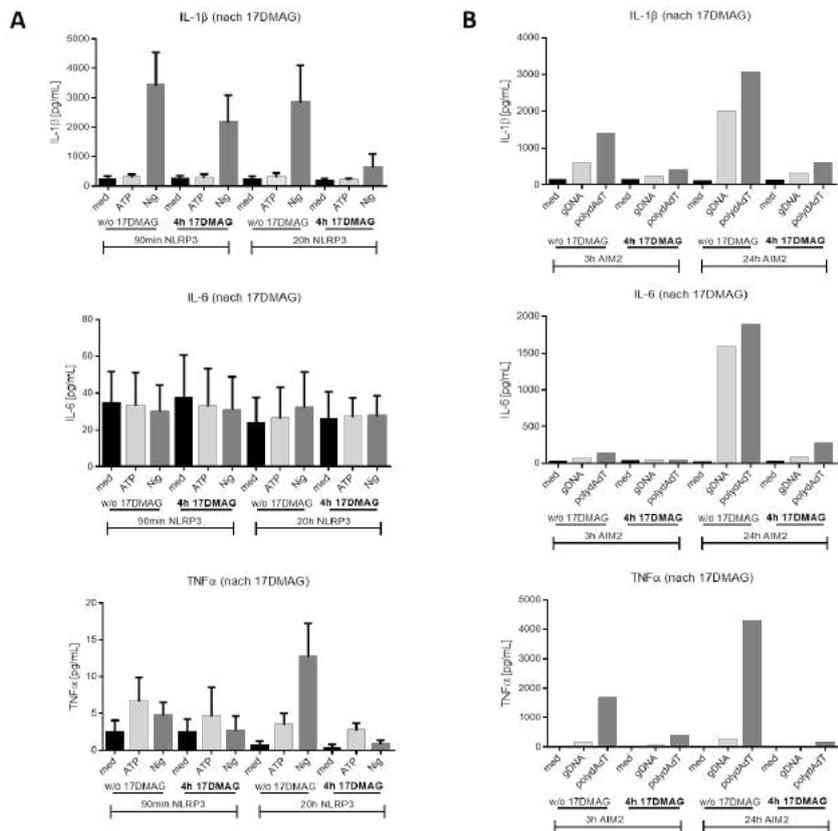
„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Abb.17: Expression von HSP90 nach AIM2- und NLRP3-Inflammasom-Stimulation. Monozytäre THP-1-Zellen wurden über Nacht mit 5 ng/ml PMA zu Makrophagen differenziert, mit 1 µg/ml upLPS für 6h geprimed und dann mit 4 µg/ml polydAdT mit Lipofectamin2000 für 3h oder durch Infektion mit *Salmonella typhimurium* (MOI 50) für 3h (nach 1h Zugabe von 400 µg/ml Gentamycin) stimuliert. Oben: Immunpräzipitation gegen Procaspase-1 CARD (anti-CARD Antikörper) und Western Blot (IB) gegen Caspase-1 und HSP90. Unten: Western Blot der Lysate (der oben aufgeführten IP) gegen HSP90 und GAPDH.



Wenn HSP90 durch Interaktion mit Caspase-1 zu einer Aktivierung von Inflammasomen und damit zu einer vermehrten IL-1 β -Freisetzung führt, sollte die Inhibierung von HSP90 zu einer abnehmenden IL-1 β -Sekretion führen. Daher führten wir Stimulationsexperimente mit dem HSP90-Inhibitor 17DMAG durch (**Abb. 18**), welcher zu einer Reduktion der IL-1 β -Sekretion nach NLRP3- und AIM2-Inflammasom-Stimulation führte.

Abb.18: Analyse der Zytokinsekretion nach NLRP3- und AIM2-Inflammasom-Stimulation und HSP90-Inhibierung mit 17DMAG. Monozytäre THP-1-Zellen wurden über Nacht mit 5ng/mL PMA differenziert, mit 100 ng/ml upLPS 24h geprimed, entweder ohne oder mit 5 µM 17DMAG für 4h behandelt und anschließend mit 15 mM ATP / 5µM Nigericin für 90min oder 2mM ATP / 1µM Nigericin 20h stimuliert und auf die Sekretion von IL-1 β , IL-6 und TNF α mittels CBA untersucht (**A**). **B**) Die AIM2-Stimulation erfolgte mit polydAdT oder gDNA (4 µg/ml mit Lipofectamine2000).



Außerdem analysierten wir den Einfluss der HSP90-Inhibierung auf die Expression der verschiedenen Inflammasom-Bestandteile nach Priming mit upLPS für 24h. Nach 3-4h 17DMAG konnte eine leichte Inhibierung von HSP90 sowie eine Inhibierung von NLRP3 beobachtet werden (**Abb. 19**).

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

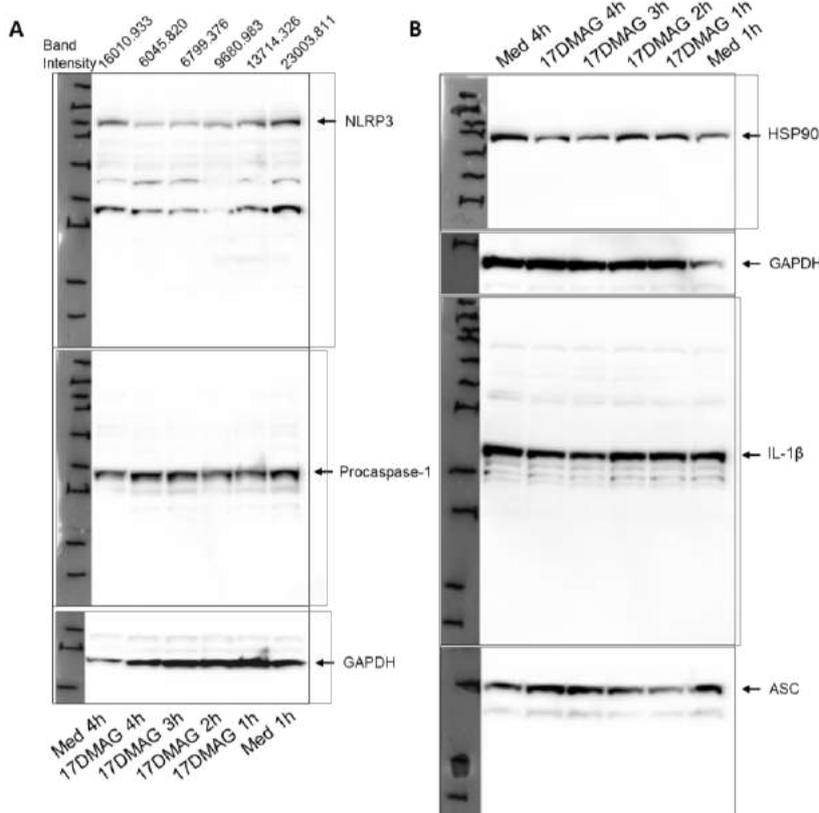


Abb.19: HSP90-Inhibierung mit 17DMAG. Monozytäre THP-1-Zellen wurden über Nacht mit 5ng/mL PMA differenziert und anschließend mit 100 ng/ml upLPS 24h geprimed. Es erfolgte ein Mediumwechsel mit 5 μ M 17DMAG oder ohne Inhibitor. Die Lysate wurden dann mittels Western Blot auf die Expression der Inflammasom-Bestandteile (NLRP3, ASC, Procaspase-1), HSP90 und der Effektor (IL-1 β) analysiert.

Weitere Analysen der Caspase-1/HSP90-Interaktion sind für Folgeprojekte geplant.

2.4. Welchen Einfluss haben CASP1-Varianten auf die Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und damit andere Signalwege?

Zurückliegend konnten wir zeigen, dass bei einigen Patienten mit *CASP1*-Varianten TNF α und IL-6 im Serum erhöht sind. Nun stellt sich die Frage, welche weiteren proinflammatorischen Zytokine bei diesen Patienten freigesetzt werden und einen Beitrag zum inflammatorischen Krankheitsbild leisten können.

Daher wurden nach Inflammasom-Stimulation, parallel zu den Analysen der in die Pyroptosom-Bildung involvierten Proteine, die Proteinexpression (Translation) in der Zelle und die Zytokinfreisetzung in den Zellkulturüberstand analysiert, um so ein umfassendes Bild über die involvierten Signalwege zu erhalten.

Dafür wurden die neu generierten THP-1/*CASP1* knock-out-Zellen mit PMA zu Makrophagen differenziert und dann mit upLPS geprimed und mit Inflammasom-Stimuli (z.B. Nigericin, MSU, polyAdT) aktiviert und auf die Zytokin-Freisetzung in den Zellkulturüberstand mittels Cytometric Bead Array (CBA) untersucht. Die CBA-Analysen zeigten, dass sich die IL-1 β Freisetzung durch die verschiedenen *CASP1*-Varianten proportional zur Restaktivität der *CASP1*-Varianten (**Abb. 5 und 6**) verhält und deutlich niedriger ist im Vergleich zum WT. IL-8 ist bei allen *CASP1*-Varianten im Vergleich zum WT erhöht, was die Theorie unterstützt, dass *CASP1*-Varianten alternative proinflammatorische Signalwege aktivieren.

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

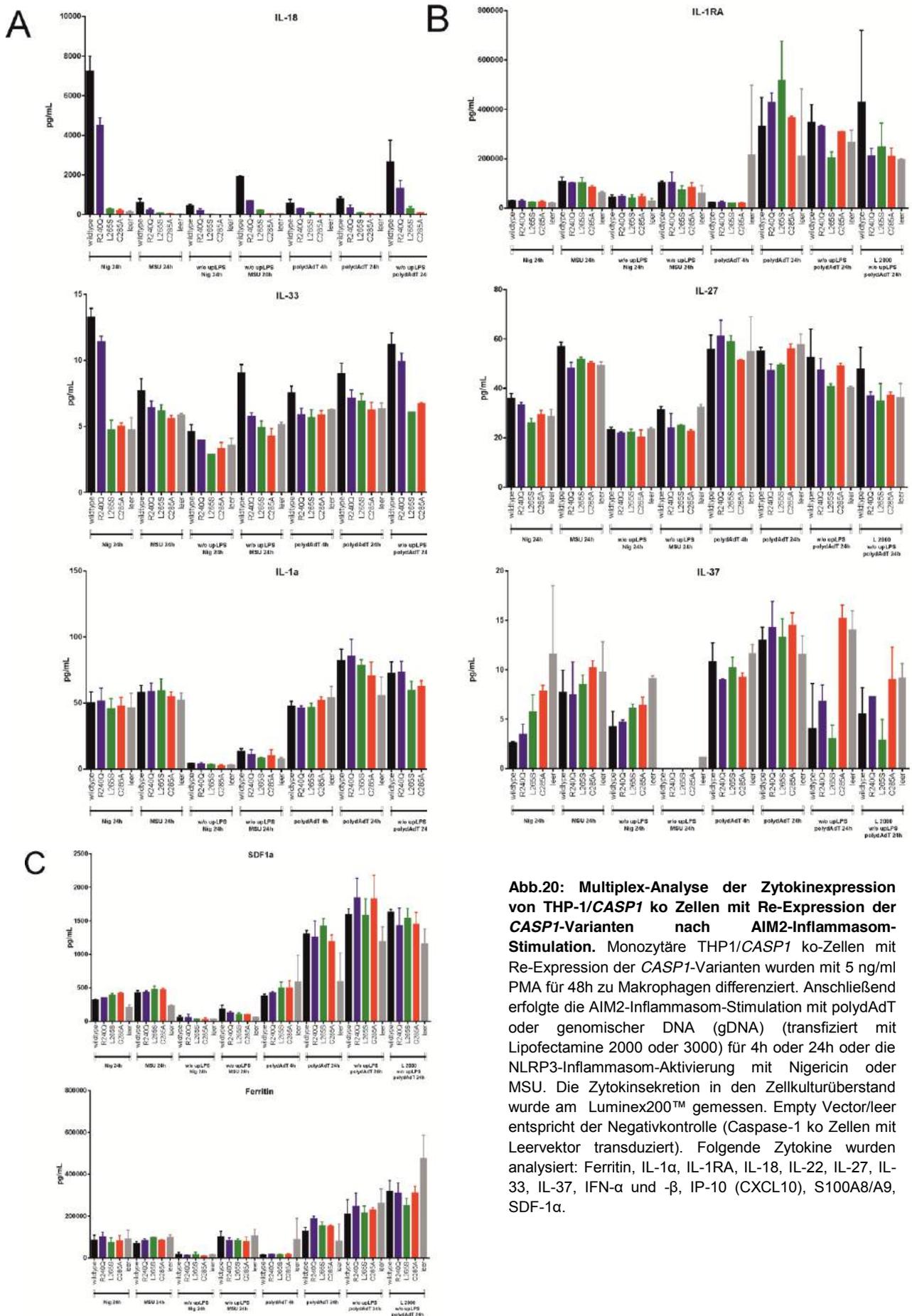


Abb.20: Multiplex-Analyse der Zytokinexpression von THP-1/CASP1 ko Zellen mit Re-Expression der CASP1-Varianten nach AIM2-Inflammasom-Stimulation. Monozytäre THP1/CASP1 ko-Zellen mit Re-Expression der CASP1-Varianten wurden mit 5 ng/ml PMA für 48h zu Makrophagen differenziert. Anschließend erfolgte die AIM2-Inflammasom-Stimulation mit polydAdT oder genomischer DNA (gDNA) (transfiziert mit Lipofectamine 2000 oder 3000) für 4h oder 24h oder die NLRP3-Inflammasom-Aktivierung mit Nigericin oder MSU. Die Zytokinsekretion in den Zellkulturüberstand wurde am Luminex200™ gemessen. Empty Vector/leer entspricht der Negativkontrolle (Caspase-1 ko Zellen mit Leervektor transduziert). Folgende Zytokine wurden analysiert: Ferritin, IL-1α, IL-1RA, IL-18, IL-22, IL-27, IL-33, IL-37, IFN-α und -β, IP-10 (CXCL10), S100A8/A9, SDF-1α.

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Die generierten Zellkulturüberstände wurden für nachfolgende Multiplex-Analysen verwendet. Die Messung der Multiplex-Assays erfolgte am Luminex200™. Folgende Zytokine wurden analysiert: Ferritin, IL-1 α , IL-1RA, IL-18, IL-22, IL-27, IL-33, IL-37, IFN- α und - β , IP-10 (CXCL10), S100A8/A9, SDF-1 α .

IL-18 und IL-33 wurden, wie zu erwarten, durch *CASP1*-Varianten mit reduzierter enzymatischer Aktivität vermindert freigesetzt (**Abb. 20A**). IL-1 α (**Abb. 20A**) und IL-1RA (**Abb. 20B**) zeigten keine Unterschiede bei der NLRP3-Stimulation, wurden jedoch bei längerer Stimulation mit polydAdT (24h, AIM2-Inflammasom) vermindert freigesetzt.

IL-27 zeigte eine verminderte Freisetzung nach NLRP3-Stimulation abhängig von der enzymatischen *CASP1*-Restaktivität (**Abb. 20B**). IL-37 zeigte eine erhöhte Freisetzung nach NLRP3-Stimulation (**Abb. 20B**).

SDF-1 α , welches für Zell-Migration notwendig ist, zeigte nach NLRP3- und AIM2-Stimulation einen Trend zu vermehrter Freisetzung durch die *CASP1*-Varianten, was nicht verwundert, da Caspase-1 für die Produktion von SDF-1 α notwendig ist (**Abb. 20C**).

Ferritin, als Zelltodmarker, zeigte äquivalent zu den LDH-Messungen keine Unterschiede zwischen den *CASP1*-Varianten (**Abb. 20C**).

IFN- α und - β waren nur bei LPS-Transfektion erhöht. IP-10 Werte lagen oberhalb des Messbereiches und konnten daher nicht ausgewertet werden und IL-22 zeigte inkonstante Werte (Daten nicht gezeigt).

3. Zusammenfassung

Die von unserer Arbeitsgruppe kürzlich beschriebenen **Mutationen im *CASP1*-Gen** führen aufgrund einer alterierten Proteinstruktur zu einer reduzierten oder komplett fehlenden enzymatischen Aktivität der Caspase-1, was die bei den Patienten auftretenden Fieberschübe und systemische Entzündungsreaktionen nicht erklärt, im Gegenteil eine verminderte Entzündungsreaktion erwarten ließe. Der Einfluss von *CASP1*-Varianten auf zytomechanische Eigenschaften der bei der Entzündungsreaktion beteiligten Immunzellen und deren Verwendbarkeit als diagnostischer Marker lagen im Fokus dieser Arbeit. Neben den Effekten auf zytomechanische Eigenschaften von Immunzellen interessierte uns, ob *CASP1*-Varianten weitere/zusätzliche Interaktionspartner ins Inflammasom rekrutieren und dadurch zur Aktivierung alternativer pro-inflammatorischer Signalwege beitragen, und ob *CASP1*-Varianten auch auf weitere Vorgänge des proinflammatorischen Zelltodes Einfluss nehmen und damit direkt auf die beteiligten Immunzellen einwirken können.

Mit den hier aufgeführten Arbeiten konnten wir zeigen, dass:

- natürlich vorkommende *CASP1*-Varianten den proinflammatorischen Zelltod („Pyroptosen-bildung“) und die Verformbarkeit von humanen Monozyten/Makrophagen, nicht jedoch die Proliferation und Phagozytose beeinflussen.
- *CASP1*-Varianten zu einer verbesserten Verformbarkeit von Monozyten/Makrophagen führen; eine verbesserte Verformbarkeit der Monozyten/Makrophagen mit *CASP1*-Varianten könnte dazu beitragen, dass diese Zellen besser ins Gewebe migrieren und dort dann zu vermehrter Entzündung führen.

Zusätzlich etablierten wir ein neues Zellsystem (THP1/Casp1 knock-out Zelllinien mit Re-Expression der WT-Procaspase-1 oder der *CASP1*-Varianten), welches für die weiteren

„Veränderte Immunzellmechanik in der Pathogenese und Diagnostik autoinflammatorischer Erkrankungen“

Untersuchungen verwendet wurde. Dies diente dazu, den Einfluss der Wildtyp-Caspase-1 (welche beim shRNA knock down noch zu 10-20% vorhanden ist) auf die Untersuchungsergebnisse zu minimieren. Diese Zelllinien wurden charakterisiert und auf ihre Funktionalität überprüft. RT-DC-Messungen mit diesen Zellen bestätigten die zuvor erhobenen Ergebnisse, zeigten sich jedoch recht störanfällig und konnten nur geringe Unterschiede detektieren. Insbesondere führte die Inflammasom-Stimulation zur Induktion des pro-inflammatorischen Zelltodes (Pyroptose), was wahrscheinlich die Zell-Verformbarkeit maßgeblich beeinflusst bzw. die Zellen bereits zerstört.

Daher schlussfolgern wir, dass der Einsatz der RT-DC-Messung für die Diagnostik von pro-inflammatorischen Krankheitsbildern, die zu einer vermehrten Entzündungsreaktion durch Induktion des Inflammasoms führen, für die klinische Routine nicht geeignet erscheint.

Des Weiteren gelang es uns mit Hilfe der Tandem-Massenspektrometrie neue Interaktionspartner der Caspase-1 zu identifizieren und einen ersten Kandidaten (HSP90) weiter zu untersuchen. Aufgrund der Verwendung eines CARD-Antikörpers in diesen Untersuchungen, wurden in den präsentierten Daten annehmbar nur Interaktionspartner identifiziert, welche mit der p20- oder p10-Domäne der Procaspase-1 interagieren. Daher wurden in einer zusätzlichen Analyse ASC-/Procaspase-1-Specks mittels Immunpräzipitation gegen ASC isoliert und diese mit MS/MS-Tandemmassenspektrometrie untersucht, um nach weiteren Interaktionspartnern der varianten Procaspase-1 zu suchen. Die Ergebnisse dieser Analysen wurden ebenfalls dargestellt und könnten Ausgangspunkt für weiter Untersuchungen von Caspase-1-Interaktionspartnern darstellen.

Zytokin-Expressions-Analysen konnten bestätigen, dass sich die IL-1 β , IL-18, IL-27 und IL-33 Freisetzung durch die verschiedenen *CASP1*-Varianten proportional zur Restaktivität der *CASP1*-Varianten verhält und deutlich niedriger ist als beim WT. IL-37 und IL-8 wurden proportional zur sinkenden Restaktivität der *CASP1*-Varianten nach NLRP3-Stimulation im Vergleich zum WT vermehrt freigesetzt, was die Theorie unterstützt, dass *CASP1*-Varianten alternative pro-inflammatorische Signalwege aktivieren.

Literatur

- [1] F. Kapplusch, F. Schulze, S. Rabe-Matschewsky, S. Russ, M. Herbig, M.C. Heymann, K. Schoepf, R. Stein, U. Range, A. Rosen-Wolff, S. Winkler, C.M. Hedrich, J. Guck, S.R. Hofmann, CASP1 variants influence subcellular caspase-1 localization, pyroptosome formation, pro-inflammatory cell death and macrophage deformability, *Clin Immunol*, (2019).
- [2] P.J. Baker, S.L. Masters, Generation of Genetic Knockouts in Myeloid Cell Lines Using a Lentiviral CRISPR/Cas9 System, *Methods Mol Biol*, 1714 (2018) 41-55.
- [3] S.L. Masters, V. Lagou, I. Jeru, P.J. Baker, L. Van Eyck, D.A. Parry, D. Lawless, D. De Nardo, J.E. Garcia-Perez, L.F. Dagley, C.L. Holley, J. Dooley, F. Moghaddas, E. Pasciuto, P.Y. Jeandel, R. Sciot, D. Lyras, A.I. Webb, S.E. Nicholson, L. De Somer, E. van Nieuwenhove, J. Ruuth-Praz, B. Copin, E. Cochet, M. Medlej-Hashim, A. Megarbane, K. Schroder, S. Savic, A. Goris, S. Amselem, C. Wouters, A. Liston, Familial autoinflammation with neutrophilic dermatosis reveals a regulatory mechanism of pyrin activation, *Sci Transl Med*, 8 (2016) 332ra345.
- [4] M. Rayamajhi, Y. Zhang, E.A. Miao, Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity, *Methods Mol Biol*, 1040 (2013) 85-90.
- [5] M.C. Heymann, S. Rabe, S. Ruß, F. Kapplusch, F. Schulze, R. Stein, S. Winkler, C.M. Hedrich, A. Rosen-Wolff, S.R. Hofmann, Fluorescent tags influence the enzymatic activity and subcellular localization of procaspase-1, *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, 160 (2015) 172–179.
- [6] A. Mayor, F. Martinon, T. De Smedt, V. Petrilli, J. Tschopp, A crucial function of SGT1 and HSP90 in inflammasome activity links mammalian and plant innate immune responses, *Nat Immunol*, 8 (2007) 497-503.
- [7] E.S. Marshall, H.M. Elshekiha, M.A. Hakimi, R.J. Flynn, *Toxoplasma gondii* peroxiredoxin promotes altered macrophage function, caspase-1-dependent IL-1 β secretion enhances parasite replication, *Vet Res*, 42 (2011) 80.