

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie  
(im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, WBex)

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel  
Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

# **Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und die Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen in Abhängigkeit von ST3Gal-IV**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Janine Abisch

aus

Luckenwalde

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Markus Sperandio
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Jens Waschke
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	31.01.2019

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1 Der Rekrutierungsprozess von Leukozyten während einer Entzündung mit Bezugnahme zur Rekrutierung eosinophiler Granulozyten .....</b>	<b>2</b>
2.1.1 Die Phasen des Rekrutierungsprozesses .....	2
2.1.2 Die Bedeutung der Adhäsionsproteine während des Rekrutierungsprozesses .....	6
2.1.2.1 Selektine und Selektinliganden .....	6
2.1.2.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren .....	7
2.1.2.3 Integrine und Integrinliganden .....	11
<b>2.2 Die posttranslationale Glykosylierung .....</b>	<b>13</b>
2.2.1 Die Grundlagen der posttranslationale Glykosylierung .....	13
2.2.2 Die Sialyltransferase STGal-IV und ihre Bedeutung bei der Leukozytenrekrutierung .....	13
<b>2.3 Hypothese und Zielsetzung .....</b>	<b>15</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
<b>3.1 Versuchstiere .....</b>	<b>16</b>
3.1.1 Tiere .....	16
3.1.1.1 Genehmigung .....	16
3.1.1.2 Mausezucht .....	16
<b>3.2 Material .....</b>	<b>17</b>
3.2.1 Laborgeräte .....	17
3.2.2 Reagenzien .....	18
3.2.2.1 Chemikalien .....	18
3.2.2.2 Proteine .....	19
<b>3.3 Methodik zum Nachweis der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in <i>ex vivo</i> Mikroflussskammern .....</b>	<b>20</b>
3.3.1 Vorbereitung der Mikroflussskammern .....	20
3.3.2 Mikroflussskammerexperimente zum Nachweis der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten .....	23
3.3.3 Die exakte Fixierung eosinophiler Granulozyten mit Eosinophilfärbung in der Mikroflussskammer .....	24
3.3.4 Auswertung der Experimente mittels Lichtmikroskopie und Blutaussstrichen .....	25

3.3.5	Die exakte Ermittlung der ausgewanderten eosinophilen Granulozyten unter Berücksichtigung der relativen Anzahl eosinophiler Granulozyten.....	25
<b>3.4</b>	<b>Methodik zur Untersuchung der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen in <i>ex vivo</i> Mikroflussskammern.</b>	<b>26</b>
3.4.1	Vorbereitung der Mikroflussskammern .....	26
3.4.2	Vorbereitung der hämatopoietischen Vorläuferzellen.....	27
3.4.3	Mikroflussskammerexperiment zum Nachweis der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen .....	27
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>28</b>
<b>4.1</b>	<b>Experimentelle Validierung der Mikroflussskammerexperimente....</b>	<b>28</b>
4.1.1	Die Bedeutung des Caseins in Mikroflussskammerexperimenten	28
<b>4.2</b>	<b><i>Ex vivo</i> Mikroflussskammerexperimente zum Nachweis der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal-IV .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3</b>	<b><i>Ex vivo</i> Mikroflussskammerexperimente zur Untersuchung der Adhäsion <i>St3Gal4</i><sup>-/-</sup>-hämatopoietischer Vorläuferzellen.....</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>36</b>
<b>5.1</b>	<b><i>Ex vivo</i> Mikroflussskammerexperimente liefern reproduzierbare Daten</b>	<b>38</b>
<b>5.2</b>	<b>Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal-IV .....</b>	<b>40</b>
<b>5.3</b>	<b>Der Einfluss der Sialyltransferase ST3Gal-IV bei der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4</b>	<b>Der pathophysiologische Zusammenhang zwischen der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal-IV während einer Entzündung.....</b>	<b>50</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>64</b>
<b>9</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>65</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>68</b>

## 1 Zusammenfassung

Für die erfolgreiche Rekrutierung von Leukozyten werden spezifische Adhäsionsmoleküle gebraucht. Diese unterliegen u.a. der posttranslationalen Modifikation durch die Sialyltransferase ST3Gal-IV. Frühere Untersuchungen an *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen haben bereits gezeigt, dass es bei einem Verlust von ST3Gal-IV zu einer verminderten Rekrutierung neutrophiler Granulozyten kommt. Auf der Basis dieser Ergebnisse stellten wir die Hypothese auf, dass die CCR-3 abhängige Rekrutierungsfähigkeit eosinophiler Granulozyten sowie die CXCR-4 abhängige Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen ebenfalls von einer suffizienten posttranslationalen Modifikation durch die Sialyltransferase ST3Gal-IV abhängig ist. Zur Bestätigung dieser Hypothese verwendeten wir neben Wildtypmäusen und *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen ein etabliertes *ex vivo* Mikroflussskammersystem, das mit spezifischen Adhäsionsmolekülen beschichtet war und eine Beobachtung des Rollens und der festen Adhäsion eosinophiler Granulozyten bzw. hämatopoietischer Vorläuferzellen erlaubt. Durch Kombination unterschiedlicher rekombinanter muriner adhäsionsrelevanter Moleküle konnten wir dann das Adhäsionsverhalten eosinophiler Granulozyten und hämatopoietischer Vorläuferzellen unter dynamischen Bedingungen (Mikroflussskammer) untersuchen. Hierbei fanden wir heraus, dass der Verlust von ST3Gal-IV nicht nur eine verminderte CCL-11-abhängige Adhäsion eosinophiler Granulozyten bewirkte, sondern auch die CXCL-12 abhängige Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen reduzierte. Diese Ergebnisse können nicht nur die Entwicklung von ST3Gal-IV-Inhibitoren anregen, die eine unerwünschte Rekrutierung eosinophiler Granulozyten während inflammatorischer Prozesse (z.B. bei Allergien oder Asthma bronchiale) verhindern. Im Weiteren wäre auch denkbar, durch eine zusätzliche Behandlung hämatopoietischer Vorläuferzellen (Spenderzellen) mit ST3Gal-IV vor einer allogenen Stammzelltransplantation die Rekrutierungsrate dieser Zellen in die entsprechenden Nischen des Empfängermarkknochens zu erhöhen.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Der Rekrutierungsprozess von Leukozyten während einer Entzündung mit Bezugnahme zur Rekrutierung eosinophiler Granulozyten**

#### **2.1.1 Die Phasen des Rekrutierungsprozesses**

Die Rekrutierung von Leukozyten in entzündliches Gewebe ist ein wichtiger immunologischer Prozess, der in einer exakt definierten Kaskade von Ereignissen abläuft. Bereits im neunzehnten Jahrhundert wurden die verschiedenen Ereignisse wie Leukozytenrollen, Leukozytenadhäsion sowie Leukozytentransmigration durch die Blutgefäßwand von unterschiedlichen Pathologen beschrieben. Diese traditionellen Schritte wurden verfeinert und durch Einfangen (auch als capture bezeichnet), langsames Rollen, feste Adhäsion, Ausbreitung (spreading), intravaskuläres Kriechen (crawling), sowie parazelluläre und transzelluläre Migration erweitert (Ley, K., *et al.*, 2007). Dieser mehrstufige Prozess ist ebenfalls auf die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten übertragbar (Wardlaw, A.J., 2000). Hierbei spielen Interaktionen zwischen Endothelzellen und Leukozyten, sowie das Zusammenspiel zwischen Leukozyten, eine wichtige Rolle. Endothelzellen werden während einer Entzündung durch entzündliche Zytokine aktiviert, sodass auf diesen Reiz hin Adhäsionsmoleküle und zusätzlich Chemokine bzw. Lipidchemoattraktantien auf ihrer Oberfläche exprimiert werden (Ley, K., *et al.*, 2007).

Das Einfangen (s.u. *Abb.1 B*) spiegelt die erste Phase des Rekrutierungsprozesses von Leukozyten während einer Entzündungsreaktion wider. Dieser Prozess wird durch Selektine und ihre dazu gehörigen Liganden vermittelt. Dabei geht der auf der Oberfläche eosinophiler Granulozyten befindliche P-Selektin-Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) eine Verbindung mit dem auf der Endotheloberfläche lokalisierten P-Selektin und E-Selektin ein (Ley, K., *et al.*, 2007).

Im nächsten Schritt des Rekrutierungsprozesses beginnen die Zellen sich entlang der inflammatorisch veränderten Endothelzellschicht rollend zu bewegen (*Abb.1 D*). Wie auch beim Einfangen wird diese Phase durch das Binden der Selektine an ihre entsprechenden Selektinliganden vermittelt (Ley, K., *et al.*, 2007). Die Familie von Selektinen besteht aus P-, E- und L-Selektin. P- und E-Selektine sind auf der Oberfläche von entzündlich veränderten Endothelzellen lokalisiert. P-Selektin Glykoprotein Ligand-1(PSGL-1) befindet sich auf der Oberfläche eosinophiler Granulozyten und ist der wichtigste Selektinligand (Laudanna, C., *et al.*, 2002). P-Selektin findet man zusätzlich auf Blutplättchen. L-Selektin hingegen wird konstitutiv auf Leukozyten exprimiert (Sperandio, M., *et al.*, 2009).

Leukozytenrollen geht in langsames Rollen über (*Abb.1 D*). Dies ist eine wichtige Voraussetzung für das feste Anheften der Leukozyten. Diese Phase des Rekrutierungsprozesses wird durch Selektine, v.a. E-Selektin, und Integrine, bedingt. Dabei beträgt die typische Geschwindigkeit weniger als 5 µm pro Sekunde (Ley, K., *et al.*, 2007).

Im nachfolgenden Schritt des Rekrutierungsprozesses, dem Anheften der Leukozyten, konnten *in vitro* und *in vivo* Forschungen zeigen, dass das Leukozytenanheften durch Chemokine oder andere Chemoattraktantien getriggert und durch das Binden von Leukozytenintegrinen an Mitglieder der sogenannten Immunglobulinsuperfamilie vermittelt wird. Dazu gehören u.a. die Integrinliganden Intercellular adhesions molecule 1 (ICAM-1) und Vascular cell adhesions molecule 1 (VCAM-1), welche auf aktivierten Endothelzellen exprimiert werden (Ley, K., *et al.*, 2007).

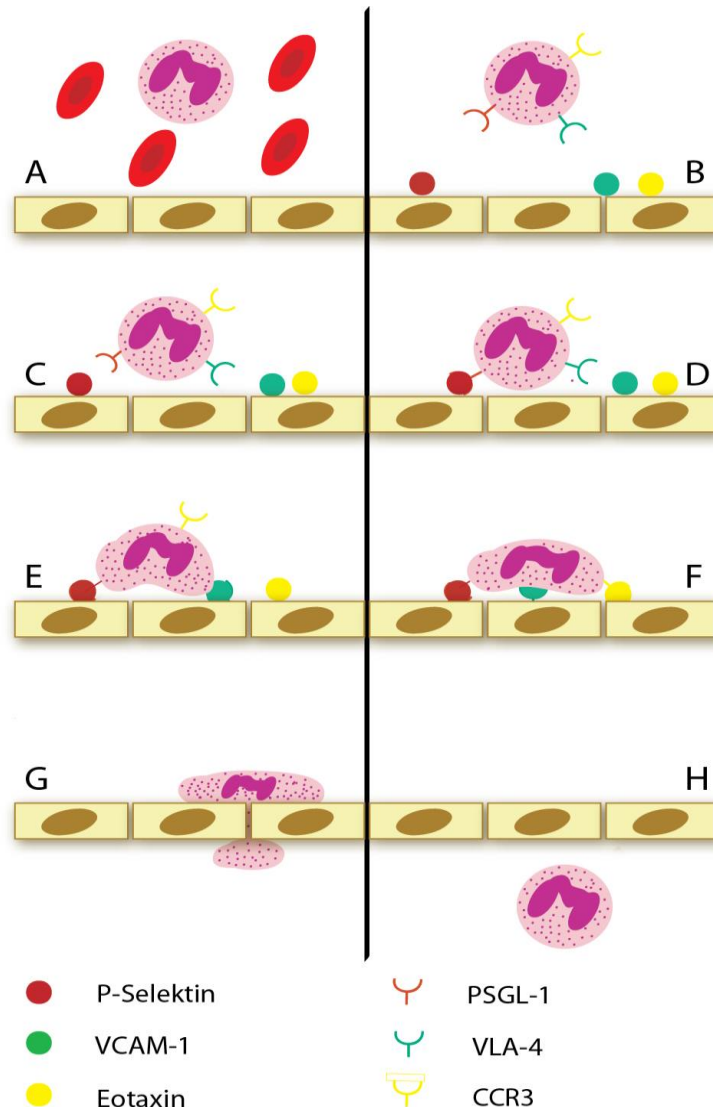
Schließlich erfolgt die feste Adhäsion (*Abb.1 E*) eosinophiler Granulozyten mit Hilfe von Integrinen. Zu diesen Integrinen gehören das alpha4beta1 Integrin (VLA 4) und die beta2 Integrine (Mac-1 und LFA-1). So bindet alpha4beta1 Integrin an VCAM-1, Lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1) und Macrophage-1 antigen(Mac-1) an ICAM-1. Durch die erhöhte Expression von ICAM-1 und/oder VCAM-1 auf dem Endothel kann die transendotheliale Zellmigration durch den parazellulären oder transzellulären Weg initiiert werden (Ley, K., *et al.*, 2007).

Nach erfolgter fester Adhäsion beginnen sich Leukozyten auszubreiten bzw. abzuflachen(*Abb.1 F*). Diese Postarrest-Modifikation wird englischsprachig als spreading bezeichnet (Ley, K., *et al.*, 2007).

Nach erfolgtem spreading kriechen die Leukozyten entlang der endothelialen Oberfläche. Dies wird durch Bindung von Leukozytenintegrinen an endotheliales ICAM-1 vermittelt (*Abb.1 F*) (Phillipson, M., *et al.*, 2006).

Die Transmigration (*Abb.1 G und H*) durch die Gefäßwand ist der letzte Schritt im Prozess der Leukozytenauswanderung in das entzündlich veränderte Gewebe. Dabei treffen die emigrierenden Immunzellen auf verschiedene und deutlich ausgeprägte Barrieren. Dazu gehören die Endothelzellschicht, die Endothelzellbasalmembran und die Perizyten. Die Migration durch die Endothelzellbarriere erfolgt in der Regel sehr schnell und liegt zeitlich gesehen bei zwei bis fünf Minuten. Dagegen dauert die Penetration der Immunzellen durch die endotheliale Basalmembran mit fünf bis fünfzehn Minuten länger. Neben der parazellulären Transmigrationsroute konnten verschiedene Forschungsergebnisse zeigen, dass auch eine transzelluläre Transmigration z.B. im ZNS, aber auch in verschiedenen anderen entzündlich veränderten Geweben stattfindet (Ley, K., *et al.*, 2007). Dennoch repräsentiert die transzelluläre Leukozytenmigration nur den Rekrutierungsweg einer Minderheit von auswandernden Zellen (ca. 5-20%) und ist v.a. bei Lymphozyten zu beobachten (Carman, C.V., *et al.*, 2004).





**Abbildung 1: Rekrutierung eosinophiler Granulozyten.** Während einer Entzündung werden frei fließende eosinophile Granulozyten im Blut (A) zunächst eingefangen (B und C). Im nachfolgenden Schritt beginnen eosinophile Granulozyten entlang der inflammatorisch veränderten Endothelzellschicht zu rollen (D- Rollen). Dieser Prozess wird durch Selektine (v.a. P-Selektin) und den dazugehörigen Liganden (v.a. PSGL-1) vermittelt. Das Rollen ist eine wichtige Voraussetzung für die anschließende feste Adhäsion (E), die durch eine Interaktion zwischen VCAM-1 und VLA-4 vermittelt und durch eine Verbindung zwischen Eotaxin-1 und CCR-3 getriggert wird. Nachfolgend kommt es zur Ausbreitung (spreading) (F), Kriechen (crawling) (G) und Transmigration eosinophiler Granulozyten (H) in das entzündete Gewebe.



### **2.1.2 Die Bedeutung der Adhäsionsproteine während des Rekrutierungsprozesses**

#### **2.1.2.1 Selektine und Selektinliganden**

Es existieren drei verschiedene Selektine, zum einem P-Selektin und zum anderen E- bzw. L-Selektin (Sperandio, M., 2009). P-Selektin wird sowohl von Endothelzellen als auch von Thrombozyten exprimiert. Es wird in Granula gespeichert und ist nach der Aktivierung der Zelle schnell an die Oberfläche mobilisierbar (Eriksson, E.E., *et al.*, 2001). Dabei interagiert es mit dem auf der Oberfläche von Leukozyten sitzenden P-Selektin Glykoprotein Liganden-1 (PSGL-1) (Sperandio, M., 2009). E-Selektin vermittelt langsames Rollen der Leukozyten während des Rekrutierungsprozesses, in dem es mit glykosylierten Liganden, die sich auf der Oberfläche von Immunzellen befinden, interagiert. E-Selektin bindet dabei an glykosyliertes CD44, E-Selektinliganden 1 (ESL-1) sowie an PSGL-1 (Sperandio, M., 2009).

Selektinliganden beinhalten eine heterogene Gruppe von Molekülen, die durch spezifische Kohlenhydratdeterminanten charakterisiert sind. Viele von ihnen enthalten das Tetrasaccharid Sialyl Lewis X (sLe<sup>x</sup>). Dieses bindet an alle Selektine (P-, E-, L-Selektin) mit niedriger Affinität. Einige Selektinliganden wie PSGL-1 sind relevant für das Vermitteln des Leukozyteneinfangens und des Leukozytenrollens während der Entzündung, andere wie GlyCAM-1 sind dagegen für das Homing von Lymphozyten in Lymphknoten involviert. Selektinliganden, die an der Entzündung beteiligt sind, werden auf den Leukozyten präsentiert. Dagegen sind Selektinliganden, die für das Lymphozytenhoming wichtig sind, auf der Oberfläche hochendothelialer Venolen (HEV) lokalisiert (Beauharnois, M.E., *et al.*, 2005).

P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1, Genname *Selplg*) ist ein stark glykosyliertes homodimeres Sialomuzin, das auf der Oberfläche verschiedener Leukozyten gebildet wird und unter statischen und dynamischen Gegebenheiten sowohl an P-, E- als auch an L-Selektin während einer Entzündungsreaktion bindet (Xia, L., *et al.*, 2002). Zu der Expression auf Leukozyten konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Endothelzellen unter bestimmten Voraussetzungen fähig sind, PSGL-1 zu bilden (Rivera-Nieves, J., *et al.*, 2006). Strukturell ist PSGL-1 ein Transmembranprotein. Der zytoplasmatische Schwanz enthält eine ERM (Ezrin, Radixin, Moesin)-Bindungsdomäne, die für die Verbindung an das Zytoskelett erforderlich ist.

Des Weiteren befindet sich dort eine Nef-assoziierte Faktor-1 (Naf-1) Bindungsregion. Diese Bindungsregion ist wichtig für PSGL-1 induziertes Signaling (Wang, H.B., *et al.*, 2007). Die Extrazellulärdomäne trägt viele O-Glykane, unter anderem die Selektinbindungsdomäne. Die komplexe Kohlenhydratkette von PSGL-1 wird im Rahmen der posttranslationalen Glykosylierung generiert (Sperandio, M., 2006). Die Modifikationen sind nicht nur für das Rollen, sondern auch für das Einfangen bedeutsam. Als relevante Enzyme zur Generierung der Selektinligandenfunktion konnten bisher alpha(1,3) Fucosyltransferasen FucT-IV und FucT-VII, alpha(2,3) Sialyltransferasen ST3Gal-IV und ST3Gal-VI, beta(1,4) Galaktosyltransferase sowie core 2 beta1,6-N-Acetyl-Glucosaminyltransferase identifiziert werden (Sperandio, M., *et al.*, 2009).

E-Selektinligand-1 (ESL-1) ist ein 150kDa schweres Glykoprotein, welches in myeloischen Zellen exprimiert wird. ESL-1 ist in neutrophilen Granulozyten hauptsächlich im Golgi Apparat zu finden, aber auch zum Teil auf Mikrovilli der Zelloberfläche. Dadurch ist es zusätzlich extrazellulär verfügbar. ESL-1 trägt lediglich N-Glykane und keine O-Glykane (Sperandio, M., 2009). In Kooperation mit PSGL-1 und Cluster of Differentiation 44 (CD44) bildet ESL-1 die funktionell aktiven E-Selektinliganden auf neutrophilen Granulozyten (PMN). ESL-1 scheint im Gegensatz zu CD44 und PSGL-1 v.a. für die charakteristische langsame E-Selektinabhängige Rollgeschwindigkeit verantwortlich zu sein (Hidalgo, A., *et al.*, 2007).

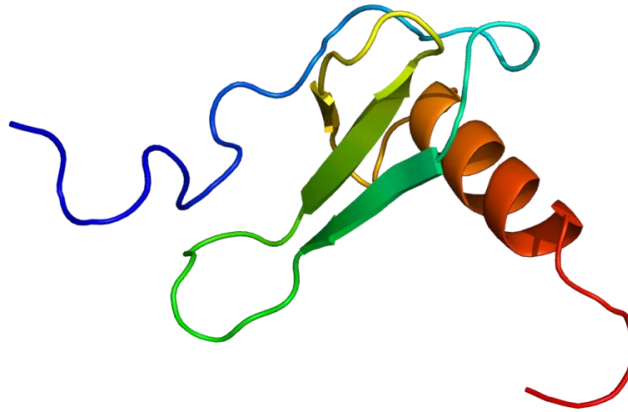
#### 2.1.2.2 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Der Name Chemokine leitet sich aus der Bezeichnung „**Chemotaktische Zytokine**“ ab. Chemokine sind eine Superfamilie von kleinen Proteinen, die an G-Protein gekoppelte Chemokinrezeptoren auf den Zielzellen binden. Mehr als 50 verschiedene Chemokine konnten bisher identifiziert werden. Als wichtige Mediatoren vermitteln sie einerseits direkt die Migration von Immunzellen in das entzündete oder verletzte Gewebe und spielen andererseits eine entscheidende Rolle in der Chemotaxis der Leukozyten. Dabei bewegen sich die Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten vom Ort der niedrigsten zum Ort der höchsten Chemokinkonzentration. Chemokine nehmen an der Organentwicklung, Embryogenese, Angiogenese/Angiostasis, Leukozytenrekrutierung, Tumorgenese und Tumormetastasierung, Neovaskulisierung, Reparatur von Wunden, bei der Immunantwort

während Infektionen, Allergien, Asthmabronchiale und bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen teil (Le, Y., *et al.*, 2004).

Eotaxin-1, das auch CCL-11 (Chemokin [C-C Motiv] Ligand) genannt wird, gehört zu der großen Familie der Chemokine. Es wird während einer Entzündung durch Endothelzellen gebildet und auf deren luminalen Oberfläche präsentiert (Ley, K., *et al.*, 2007) (Struktur siehe Abb.2). Zum ersten Mal konnte Eotaxin *in vivo* als wichtiges eosinophiles Chemokin bei allergischen Atemwegsentzündungen an Guinea Schweinen, die zuvor mit Ovalbuminaerosol behandelt worden waren, durch die Isolierung aus bronchoalveolar Flüssigkeit nachgewiesen werden (Rankin, S.M., *et al.*, 2000). Mittlerweile konnte die Eotaxin-1-abhängige Rekrutierung eosinophiler Granulozyten auch im Gastrointestinaltrakt (Ley, K., *et al.*, 2007), im Thymus, in Brustdrüsen und im Uterus belegt werden (Gouon-Evans, V., *et al.* 2000), (Rothenberg, M.E., *et al.*, 2001). Eotaxine sind endogene Mediatoren, die zu einer selektiven Akkumulation und Rekrutierung eosinophiler Granulozyten, aber nicht neutrophiler Granulozyten führen (Ley, K., *et al.*, 2007). Es können drei verschiedene Eotaxine unterschieden werden CCL-11 (Eotaxin-1), CCL-24 (Eotaxin-2) und CCL-26 (Eotaxin-3), die als Agonisten an CCR-5 und an CCR-3 oder als Antagonist an CCR-2 binden können (Ogilvie, P., *et al.*, 2001),(Ley, K., *et al.*, 2007). Eotaxin-1 weist eine hohe selektive Bindung an den Chemokinrezeptor 3 (CCR-3) auf. CCR-3 ist auf eosinophilen Granulozyten nicht aber auf neutrophilen Granulozyten und Monozyten exprimiert (Ley, K., *et al.*, 2007). Seine spezifische Bindung wird durch die strukturellen Besonderheiten des N-Terminus und der Loop-Region im quartären Eotaxin determiniert. Das Gen für CCL-11 ist *scya 11*, welches auf Chromosom 17 durch drei Exons und zwei Introns verschlüsselt ist. Die Expression von Eotaxin-1 ist stimulus- und zellspezifisch (Ley, K., *et al.*, 2007). Durch die Bindung von Eotaxin-1 an CCR-3 kommt es zur einer schnellen konzentrationsabhängigen Aktivierung der extracellular signal-regulated Kinase-2 (ERK-2) und der p38 mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) in eosinophilen Granulozyten, die die Degranulation und Chemotaxis eosinophiler Granulozyten bewirken (Kampen, G.T., *et al.*, 2000). So führt eine Injektion von Eotaxin-1 und Eotaxin-2 in die menschliche Haut direkt zur Bildung einer Papel aufgrund von Mastzellendegranulationen und anschließender Infiltration eosinophiler, basophiler und neutrophiler Granulozyten (Menzies-Gow, A., *et al.*, 2002). Zimmermann, N. und Kollegen konnten 2003 zeigen, dass Eotaxin-1 in menschlichen Lungen eine frühe allergische Reaktion auslöst (sechs Stunden) und somit mit einer zeitigen Rekrutierung eosinophiler Granulozyten

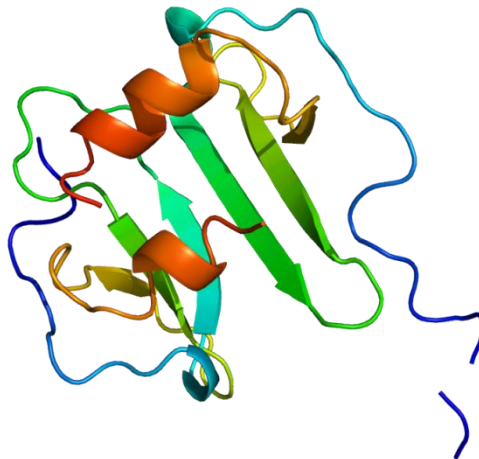
korreliert. Dagegen akkumulieren eosinophile Granulozyten unter der Einwirkung von Eotaxin-2 erst nach 24 Stunden (Zimmermann, N., *et al.*, 2003).



**Abbildung 2: Struktur von Eotaxin-1 (CCL-11)** (Crump, M.P., *et al.*, 1998)

Der Stromal-cell-derived factor 1 (SDF-1), welcher auch als CXCL-12 (CXC-Motiv-Chemokinligand 12) bezeichnet wird, ist ein kleines Zytokin, das der Chemokin CXC-Subfamilie angehört (Struktur siehe Abb.3). Das codierende Gen ist auf Chromosom 10q lokalisiert (Deloukas, P., *et al.*, 2004). CXCL-12 bindet und aktiviert die an der Zelloberfläche exprimierten Chemokinrezeptoren CXCR-4 oder CXCR-7 (Gupta, S.K., *et al.*, 2001). CXCL-12 wird von vaskuläre Endothelzellen, Bindegewebsfibroblasten und Osteoblasten gebildet (Kryczek, I., *et al.*, 2007) und steuert die Hämatopoiese, die Angiogenese, das Homing von Lymphozyten und das Wachstum von B-Zellen. Während der Embryogenese und bei der Tumormetastasierung ist CXCL-12 auch ein wichtiger Regulator für die Zellmigration (De La Luz Sierra, M., *et al.*, 2010). CXCL-12 wird u.a. durch Bindegewebszellen des Knochenmarks produziert (Ley, K., *et al.*, 2007). Diese wirken auf die Proliferation und Differenzierung der hämatopoietischen Vorläuferzellen ein. Dabei hat CXCL-12 sowohl einen Effekt auf die Proliferation von reifen als auch von unreifen Vorläuferzellen (Grafte-Faure, S., *et al.*, 2000). Des Weiteren spielt CXCL-12 eine wichtige Rolle bei der Mobilisierung hämatopoietischer Vorläuferzellen in die Blutzirkulation (De La Luz Sierra, M., *et al.*, 2010). Während der Embryogenese vermittelt CXCL-12 sowohl die Migration der hämatopoietischen Vorläuferzellen von der fetalen Leber ins Knochenmark als auch die Ausbildung von großen Blutgefäßen (Stellos, K., *et al.*, 2007). Experimente mit Knock-out Mäusen, denen CXCL-12 bzw. CXCR-4 fehlte, konnten zeigen, dass diese aufgrund

schwerwiegender Organschäden nicht lebensfähig waren und bereits pränatal bzw. innerhalb der ersten Lebensstunde verstarben(Ley, K., *et al.*, 2007).



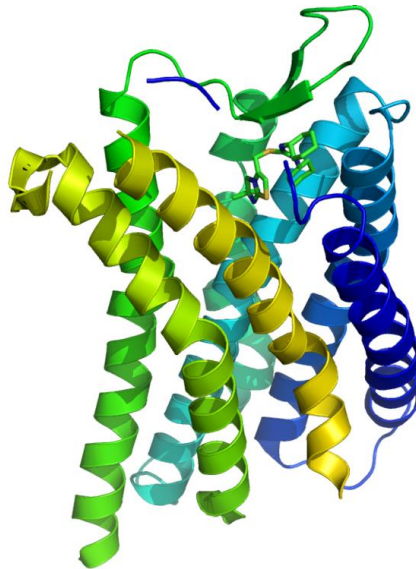
**Abbildung 3: Struktur von CXCL-12** (Dealwis, C., *et al.*, 1998)

Chemokinrezeptoren sind eine große Gruppe von G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die mit Chemokinen interagieren. Chemokinrezeptoren werden in unterschiedlichen Zelltypen gebildet und an deren Zelloberfläche exprimiert. Ihre biologische Aktivität entfalten sie v.a. im Rahmen von Zellmigrationsvorgängen und im Immunsystem (Murphy, P.M., *et al.*, 2000).

Der C-C Chemokin Rezeptor 3 (CCR-3) ist ein G-Protein gekoppelter Siebentransmembranrezeptor, der auf eosinophilen Granulozyten exprimiert wird und an Eotaxine, MCP-1 (Monozyten chemotaktisches Protein), MCP-3 und RANTES(regulated on activation T expressed and secreted) bindet (Ley, K., *et al.*, 2007). Da eosinophile Granulozyten die einzigen Leukozyten sind, die CCR-3 bilden, und Eotaxin-1 die höchste Affinität zu diesem Rezeptor besitzt, ist CCR-3 v.a. für die gezielte Rekrutierung und Migration eosinophiler Granulozyten ins Gewebe zuständig (Phillips, R.M., *et al.*, 2003).

Der CXC-Motiv Chemokinrezeptor 4 (CXCR-4) (Struktur siehe Abb.4) ist der einzige identifizierte Rezeptor für das CXC Chemokin CXCL-12. Die CXCL-12-CXCR-4 Achse hat eine wichtige biologische Bedeutung für die Wanderungseigenschaften von hämatopoietischen Vorläuferzellen (Wright, D.E., *et al.*, 2002). CXCR-4 wird sowohl auf

hämatopoietischen als auch auf nicht hämatopoietischen Tumorzellen exprimiert. Eine Überexpression von CXCR-4 in bestimmten Tumorzellen führt über die CXCR-4-CXCL-12 Achse zu Metastasierung, Angiogenese und Progression des Tumors (Tamamis, P., *et al.*, 2014).



**Abbildung 4:** Struktur von CXCR-4 (Wu, B., *et al.*, 2010)

#### 2.1.2.3 Integrine und Integrinliganden

Integrine sind Heterodimere und bestehen aus zwei Untereinheiten, der alpha und der beta Kette (Hynes, R.,*et al.*, 2002). Eosinophile Granulozyten exprimieren Mitglieder der beta1, beta2 und alpha7 Integrinfamilie (Tachimoto, H., *et al.*, 2002). Integrine gehen eine dynamische Verbindung (Evans, E.A., 2007) zwischen extrazellulären Adhäsionsmolekülen und dem intrazellulären Aktinzytoskelett ein (Humphries, M.J., 2000), und verbinden somit Zellen untereinander oder mit der Extrazellulärmatrix (Hynes, R.,*et al.*, 2002). Integrine spielen eine bedeutsame Rolle bei der Zellmigration während Entzündungen, bei Neoplasien, bei Traumata (Humphries, M.J., 2000) und besitzen eine Schlüsselrolle bei der Hämostase (Hynes, R.,*et al.*, 2002). Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten bei einer allergischen Reaktion in der Lunge oder in die Haut ist ein VLA-4/VCAM-1 abhängiger Prozess (Ley, K., *et al.*, 2007).



Very late Antigen 4 (VLA-4  $\alpha 4\beta 1$ ) ist das zentrale Integrin bei der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten. Es interagiert mit VCAM-1 auf Endothelzellen (Ley, K., *et al.*, 2007) und vermittelt auch Rollen von Immunzellen. *In vivo* unterstützt VLA-4 in Verbindung mit P-Selektin das Lymphozytenrollen in Venolen des zentralen Nervensystems (ZNS) (Kerfoot, S.M., *et al.*, 2002). Darüber hinaus kann es auch unabhängig vom Eingreifen des P-Selektins direkt eine schnelle Adhäsion vermitteln (Vajkoczy, P., *et al.*, 2001). Zudem bindet VLA-4 an verschiedene Liganden im Knochenmark, u.a. an VCAM-1, das auf Bindegewebszellen und Endothelzellen exprimiert wird (Schulz, C., *et al.*, 2009). Die adhäsive Interaktion zwischen VLA-4 und VCAM-1 ist essentiell für die Aufrechterhaltung hämatopoietischer Vorläuferzellen im Knochenmark (Priestly, G.V., *et al.*, 2007).

Das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül 1 (VCAM-1) ist ein transmembranäres Protein. Es wird in Endothelzellen der großen und kleinen Blutgefäße nach Stimulation exprimiert. VCAM-1 vermittelt mit Hilfe von VLA-4 die Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten an das vaskuläre Endothel (Ley, K., *et al.*, 2007). Die durch die Interaktion zwischen VCAM-1 und VLA-4 vermittelte Zell-Zell-Adhäsion ist ein wichtiger Regulator während der Entzündung, der Tumormetastasierung und der Entwicklung von Arteriosklerose (Ley, K., *et al.*, 2007).

## **2.2 Die posttranslationale Glykosylierung**

### **2.2.1 Die Grundlagen der posttranslationale Glykosylierung (Sialyltransferasen)**

Die posttranslationale Glykosylierung von Glykoproteinen erfolgt v.a. über N-Glykosylierung und O-Glykosylierung (Varki, A., *et al.*, 2009).

Sialinsäuren sind die einzigen negativ geladenen Zuckermoleküle und sind gewöhnlich an den Enden von Kohlenhydratgruppen zu finden (Varki, A., *et al.*, 2007). Sialyltransferasen katalysieren den Transfer einer Sialinsäure von Cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic-Säure (CMP-Sia) auf einen Kohlenhydratakzeptor. Insgesamt konnten bisher mehr als zwanzig verschiedene Sialyltransferasen bei Säugetieren identifiziert werden. Aufgrund der Akzeptorspezifität und der glykosidischen Verknüpfung werden sie in vier verschiedene Gruppen eingeteilt: beta-Galaktoside alpha2,3-Sialyltransferase (ST3Gal I-VI), beta-Galaktoside alpha2,6-Sialyltransferase (ST6Gal I und II), GalNAc alpha2,6-Sialyltransferase (ST6GalNAc I-IV) und alpha2,8-Sialyltransferase (ST8Sia I-VI) (Takashima, S., 2008). Diese Moleküle sind entweder als alpha2-3, 2-6 oder 2-8 Verbindungen mit verschiedenen Glykantypen verbunden. Die Mehrheit von Sialinsäuren sind mittels alpha2-3 Verbindungen mit Glykoproteinen verknüpft und werden beim Menschen und bei Mäusen durch sechs verschiedene alpha 2,3-Sialyltransferasen erzeugt (Sperandio, M., *et al.*, 2009).

### **2.2.2 Die Sialyltransferase ST3Gal-IV und ihre Bedeutung bei der Leukozytenrekrutierung**

Die Mitglieder der ST3Gal Familie transferieren aktivierte Sialinsäure (CMP-Sia) auf einen terminalen Galaktoserest des Zuckergerüsts. Dabei bilden sie eine alpha2,3-glykosidische Verbindung. Bisher konnten sechs Mitglieder der ST3Gal Familie identifiziert werden. Aufgrund der Aminosäuresequenz, der Substratspezifität und der Genstruktur können diese in zwei Subfamilien klassifiziert werden. Die eine der beiden Subfamilien beinhaltet ST3Gal-I und -II (Sperandio, M., 2009). Die andere besteht aus vier Mitgliedern, ST3Gal-III, -IV, -V und -VI. Bisherige Studien zeigten, dass die genetische Struktur von ST3Gal-III, -IV und -VI ähnlich sind (Takashima, S., *et al.*, 2003). Die murine ST3Gal-IV Sialyltransferase ist ein Typ II Transmembranprotein, welches im Golgi Apparat lokalisiert ist (Ellies, L.G., *et al.*, 2002).

Sie umfasst 9.7kb und besteht aus 10 Exons (Takashima, S., *et al.*, 2000). Als Akzeptorsubstrat an Glykoproteinen und Oligosacchariden verwendet die Sialyltransferase ST3Gal-IV hauptsächlich Galbeta1,3GlcNAc und Galbeta1,4GlcNAc Strukturen. Dabei bevorzugt die Sialyltransferase ST3Gal-IV die Galbeta1,4GlcNAc Struktur (Sperandio, M., 2009). Um eine mögliche Beteiligung der Sialylierung für die Selektinligandenfunktion zu untersuchen, wurden Mäuse mit einem Verlust der Sialyltransferase ST3Gal-IV erzeugt (Ellies, L.G., *et al.*, 2002). Dabei zeigte sich eine verminderte Bindung der drei Selektine an ST3Gal-IV. Jedoch wurde in der Intravitalmikroskopie am entzündeten Musculus cremaster ein normales P-Selektin abhängiges Rollen und nur ein milder Defekt im E-Selektin vermittelten Leukozytenrollen nachgewiesen. Infolgedessen spielt ST3Gal-IV keine essentielle Rolle bei der Synthese von Selektinliganden (Ellies, L.G., *et al.*, 2002). Jedoch ist ST3Gal-IV in der CXCR-2 getriggerten Regulierung der festen Leukozytenanheftung involviert (Frommhold, D., *et al.*, 2008). So konnten Ellies, L.G., und Kollegen in ihren Untersuchungen an *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigen, dass die Sialyltransferase ST3Gal-IV an der Sialylierung von N-Glykanen des Sialoproteins von Willebrand Faktor beteiligt ist (Ellies, L.G., *et al.*, 2002). Auch Frommhold, D., und Kollegen wiesen in ihren Untersuchungen nach, dass unter physiologischen Flußbedingungen sowohl die CXCL-11vermittelte Adhäsion von *St3gal4*<sup>-/-</sup> neutrophilen Granulozyten, als auch die transendotheliale Migration der *St3gal4*<sup>-/-</sup> neutrophilen Granulozyten signifikant reduziert sind. In menschlichen neutrophilen Granulozyten vermindert sich durch die enzymatische Desialylation die Bindung von CXCR-2 Liganden auf der Oberfläche neutrophiler Granulozyten. Infolgedessen wird die neutrophile Degranulation ab geschwächt. Ebenfalls konnten die Ergebnisse in Mikroflussskammern reproduziert werden. Die Ergebnisse in *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen zeigten hier eine signifikant niedrigere Adhäsion neutrophiler Granulozyten als in WT-Kontrollmäusen. Letztendlich ist die CXCR-2 ausgelöste Leukozytenadhäsion während einer Entzündung stark von der ST3-Gal-IV-vermittelten posttranslationalen Sialylierung abhängig. (Frommhold, D., *et al.*, 2008).

## 2.3 Hypothese und Zielsetzung

Die posttranslationale Glykosylierung nimmt eine bedeutende Rolle bei der Leukozytenrekrutierung ein (Sperandio, M., *et al.*, 2009).

In vorausgehenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass es bei einem Verlust der Sialyltransferase ST3Gal-IV zu einer verminderten CXCR-2 abhängigen Rekrutierung, insbesondere einer reduzierten festen Adhäsion neutrophiler Granulozyten in entzündlich veränderten postkapillären Venolen kommt (Frommhold, D., *et al.* 2008), (Sperandio, M., *et al.*, 2009).

Wir stellten aufgrund dieser Ergebnisse die Hypothese auf, dass die chemokinabhängige Rekrutierungsfähigkeit eosinophiler Granulozyten und hämatopoietischer Vorläuferzellen von der Sialyltransferase ST3Gal-IV abhängig ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war somit, den Nachweis zu erbringen, dass:

- 1) ST3Gal-IV die CCR-3-CCL-11 abhängige Rekrutierung eosinophiler Granulozyten unter Flußbedingungen reguliert.
- 2) ST3Gal-IV die CXCR-4-CXCL-12 vermittelte Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen unter Flußbedingungen moduliert.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Versuchstiere**

##### **3.1.1 Tiere**

###### **3.1.1.1 Genehmigung**

Zur Durchführung des experimentellen Teils dieser Arbeit wurde der Antrag auf Ausnahmegenehmigung nach § 9 Abs. 1. Satz 4 TierSchG an die Regierung von Oberbayern am 16.11.2009 gestellt und genehmigt. Diese beinhaltet die Erlaubnis der Anlage eines Trachealtubus, die Anlage eines A.carotis- und V.jugularis-Katheters sowie die chirurgische Präparation des Kremastermuskels, um Experimente an *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen, C57Bl/6 Wildtypmäusen und *Il5*- transgenen Mäusen durchführen zu können.

###### **3.1.1.2 Mausezucht**

Die C57Bl/6 Mäuse wurden von Janvier bezogen.

Die *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse (Ellies, L.G., *et al.*, 2002) wurden von der Arbeitsgruppe Prof. Jamey Marth, Sanford Burnham Institute, San Diego, USA, zur Verfügung gestellt.

Die *Il5*- transgenen Mäuse wurden von der AG Vöhringer TU München zur Verfügung gestellt (Dent, P., *et al.*, 1990).

## 3.2 Material

### 3.2.1 Laborgeräte

**Choicestick:** EXFO Burtleigh motorized Gibraltar, Hamburg, Deutschland

**Hochpräzisionspumpe:** Harvard Apparates PHD ultra, Holliston, March-Hugstetten, Deutschland

**Intravitalmikroskop:** Olympus BX51, Model 512815/20, Olympus Objektiv sw 20x/NA 0,95, Hamburg, Deutschland

**Kamerasystem:** gekoppeltes Kamerasystem, CF8/1, Kappa, Gleichen, Deutschland

**Leucodiff:** Leucodiff 7000, Instrumentation Laboratory, New York, USA

**Magnetrührer:** IKAMAG- RH Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

**Mikroskop für die Auswertung der Leukozytencounts:** Carl Zeiss West Germany, Objektiv F40/ NA 0,65, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena Deutschland

**Mikroskop für die Auswertung der Mikroflussskammern:** Carl Zeiss Axioskop 40 mit dem Objektiv Zeiss EC- Plan Neofluar 40x/ NA 1,3 Oil, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland

**Stereomikroskop für die Präparation der Maus:** KL 1500 LCD, Olympus SZ 61, Olympus Europa GmbH, Hamburg, Deutschland

**Minishaker:** IKA MS1, Janke und Kunkel, IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

**Monitor:** Sony, Japan

**Videorecorder:** S-VHS Recorder MD 830, Panasonic, Japan

**Videozeitgenerator:** Video Timer, FOR.A Company limited, Japan

**Zentrifuge:** Hettich Rotanta LK, Radius 110mm (1000 U/min=123G, 1200 U/min=177G, 2000 U/min=491G, 3000 U/min=1105G), DJB Labcare Ltd, Buckinghamshire, Großbritannien

**Zentrifuge, klein:** Galaxy Mini, Merck eurotap, Darmstadt, Deutschland

### 3.2.2 Reagenzien

#### 3.2.2.1 Chemikalien

Aqua ad iniectabilia (Aqua, Flüssigkeit zur Auflösung und Verdünnung von Arzneimittel, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)

Bovine Serum Albumin (PAA The Cell Culture Company GmbH, Linz, Österreich, pH= 7,0)

Calciumchlorid (Merck Chemicalis GmbH, Darmstadt, Deutschland, wasserfrei, gepulvert)

Casein from bovine milk (Casein, Technical Grade Firma Sigma-Aldrich GmbH, Hamburg, Deutschland)

DMEM 1g/l Glucose ohne Glutamin (E15- 005 PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich)

Eosinophillösung (bestehend aus Eosin G, Phenol und Formaldehyd; Eosin G, für die Mikroskopie Certistain®, Merck Chemicalis KGaA, Darmstadt, Deutschland; Phenol, 77607-BioUltra, for molecular biology, TE-saturated, ~73% (T), Sigma- Aldrich St. Louis, USA; Formaldehyd 35- 37% Lösung, LABC Labortechnik, Köhler Chemie, Hennef, Deutschland)

Ethanol Emprove exp., absolute suitable use for excipient (Merck, KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Heparin- Natrium- 25 000 (Heparin, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland)

Hepes (> 99,5% titration useful pH range 6.8-8.2, Sigma Aldrich, USA)

Ketaminhydrochlorid (Ketavet, Pfitzer, Pharmacia GmbH, Berlin, Deutschland, Injektionslösung für Kleintiere)

Low Glucose (PAA The Cell Culture Company GmbH, Linz, Österreich, 1g/l, ohne l-Glutamine)

Magnesiumchlorid (Merck Chemicalis GmbH, Darmstadt, Deutschland, wasserfrei, zur Synthese)

Microscopy Hemacolor (1.Lösung- Fixierlösung mit Methanol, 2.Lösung- Farbreagenz rot mit Phosphatanion, 3.Lösung- Farbreagenz blau mit Phosphatanion und Azur, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)

Natriumchlorid (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland, isotone NaCl-Lösung 0,9%)

Phosphate Buffered Saline (Invitrogen, All GIBC6, Darmstadt, Deutschland, liquid, pH=7,4)

Türks Lösung zur Leukozytenzählung (Acetic acid gentian violett solution, Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland)

Xylazinhydrochlorid (Rompun, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland, Injektionslösung für Kleintiere, Sedativum, Analgetikum, Anästhetikum, Muskelrelaxans)

### 3.2.2.2 Proteine

BSA/PBS (PAA The Cell Culture Company GmbH, Linz, Österreich, pH=7,0; Invitrogen, All GIBC6, Darmstadt, Deutschland, liquid, pH=7,4)

Eotaxin (Recombinat Murine Eotaxin/ CCL11, PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland); E-Selektin (Recombinat Mouse E-Selectin/Fc Chimera, R&D Systems, Minneapolis, USA)

P-Selektin (Recombinat Mouse P- Selectin/CD62P Fc Chimera, R&D Systems, Minneapolis, USA)

SDF-1 (Recombinat Murin CXCL12/SDF-1alpha, PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland)



VCAM-1 (Recombinat Mouse VCAM-1/Fc Chimera, R&D Systems, Minneapolis, USA)

### **3.3 Methodik zum Nachweis der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in *ex vivo* Mikroflussskammern**

Zur Klärung der Fragestellung, inwieweit die Sialyltransferase ST3Gal- IV von Bedeutung für die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten ist, wurden *ex vivo* Mikroflussskammerexperimente durchgeführt, die auf einem von Smith und Kollegen im Jahr 2004 etablierten *ex vivo* Flusskammermodell basieren. Dabei wurden mit rekombinanten murinen Proteinen beschichtete Mikroglaskapillaren mit Vollblut von Mäusen unter standardisierten Bedingungen perfundiert. Da das Rollen und die Adhäsion während der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten von der Wirkung von rekombinantem murinen P-Selektin und VCAM-1 abhängig sind, wurden diese Proteine für die Experimente gewählt. Aufgrund der Spezifität und hohen Affinität von CCL-11 (Eotaxin-1) zu seinem Rezeptor CCR-3 und der dadurch induzierten Adhäsion eosinophiler Granulozyten wurde CCL-11 ebenfalls für die Beschichtung der Mikroflussskammern verwendet.

#### **3.3.1 Vorbereitung der Mikroflussskammern**

Zu Beginn wurden die Vitrotubes (0,04mm x 0,4mm x 40mm, VitroCom, Cat. 5004, Mountain Lakes, USA) unter Vakuumsog sowohl mit Ethanol als auch mit Aqua ad iniectabilia gereinigt (100µl Ethanol, 100µl Aqua, 100µl Aqua). Anschließend wurden diese mit rekombinanten murinen Proteinen (Recombinantes murines Eotaxin/rm CCL11, P-Selektin, Recombinantes murines P-Selectin/CD62P, Recombinat Mouse rm VCAM-1/Fc Chimera), die Rollen und Adhäsion eosinophiler Granulozyten unter dynamischen Umständen bewirken, in einer definierten Zusammensetzung in Polypropylenröhrchen (1,5ml) vermengt und unter Vakuumsog beschichtet. Aufgrund der spezifischen Proteinkombinationen konnten die unterschiedlichen Verhaltensweisen der Zellen beobachtet werden, sodass Ansatz 1 charakteristisch für die Adhäsion und Ansätze 2-4 kennzeichnend für das Rollen gewesen sind. Um unspezifische Interaktionen in den Flusskammern ausschließen zu können, wurden Kontrollkammern mit anderen Proteinzusammensetzungen gewählt (Ansatz 5). Alle Ansätze enthielten 1% BSA.

### **Adhäsionskammer**

Ansatz 1: rmEotaxin-1 (100µg/ml) + rmVCAM-1 (15µg/ml) + rmP-Selektin (20µg/ml) in 1xPBS + 0,1% BSA

### **Rollkammern**

Ansatz 2: rmVCAM-1 (15µg/ml) + rmP- Selektin (20µg/ml) in 1xPBS + 0,1% BSA

Ansatz 3: rmVCAM-1 (15µg/ml) in 1xPBS + 0,1% BSA

Ansatz 4: rmP-Selektin (20µg/ml) in 1xPBS + 0,1% BSA

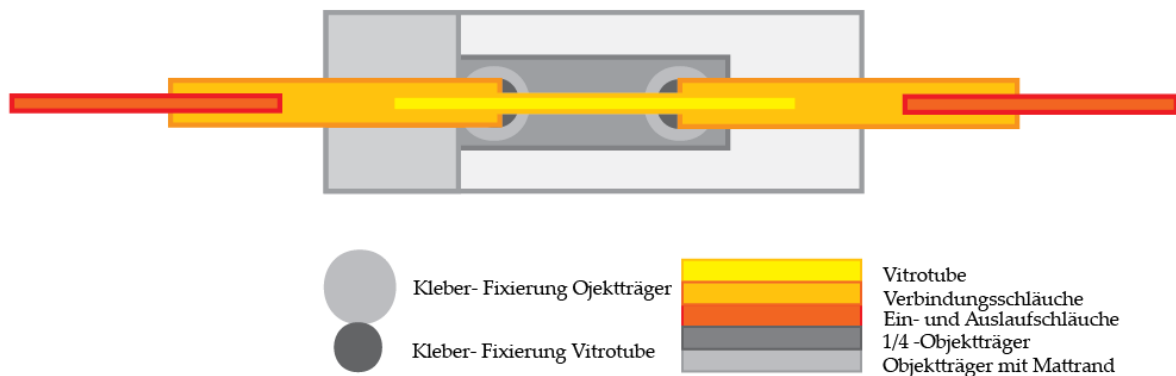
### **Kontrollkammern**

Ansatz 5: 1xPBS + 0,1% BSA

Damit die Vitrotubes stabil und plan unter den Mikroskopen liegen konnten, mussten sie auf Objektträgern mit UHU plus Sofortkleber befestigt werden. Dabei wurde ein zuvor durch einen Glasschneider geschnittenes Viertel eines ohne Mattrand belegten Objektträgers auf einem zweiten diesmal mit Mattrand bestückten Objektträger in die Mitte geklebt (*Abb. 6*).

Nachdem die fertig gecoateten Mikroflussskammern, wie in *Abbildung 6* dargestellt, auf die jeweiligen oberen Objektträger flach aufgelegt und rechtwinklig zum Mattrand mit Kleber fixiert worden sind, wurden diese über Nacht in eine Feuchtkammer bei vier Grad Celsius inkubiert. Dabei durfte kein Kontakt mit dem Wasser entstehen.

Am folgenden Tag wurden an den beiden Enden der an den Objektträgern befestigten Mikroflussskammern, wie in *Abbildung 6* gezeigt, circa drei Zentimeter lange Verbindungsschläuche mit Kleber an deren Übergängen fixiert. Der Klebevorgang wurde nach 20 Minuten wiederholt, um Undichtigkeiten während des Experimentes zu vermeiden.



**Abbildung 6: Mikroflussskammer.** Die gelb dargestellte Mikroflussskammer wurde mit unterschiedlichen Ansätzen von rekombinanten murinen Proteinen beschichtet. Die Fixierung der Mikroflussskammer erfolgte auf einem Objektträger (hellgrau). Um eine Verbindung zur Maus schaffen zu können, wurden die beiden Enden der Mikroflussskammer mit Verbindungsschläuchen (orange) verlängert und mit Kleber fixiert. In diesen Verbindungsschläuche konnten dann die Ein-/Auslaufschläuche (rot) gesteckt werden.

Um ein unspezifisches Binden eosinophiler Granulozyten zu verhindern, wurden die nun fertigen Mikroflussskammern eine Stunde nach dem zweiten Klebevorgang mit Casein 5% in PBS geblockt. Fünf Gramm Casein wurde zuvor mit 100ml PBS auf einem Magnetrührer bei mittlerer Geschwindigkeit für zwei Stunden durchmischt. Anschließend wurde das im BD Falcon Tube befindliche Casein bei 2500 Umdrehungen pro Minute für zehn Minuten zentrifugiert und das dadurch entstandene Pellet danach entsorgt.

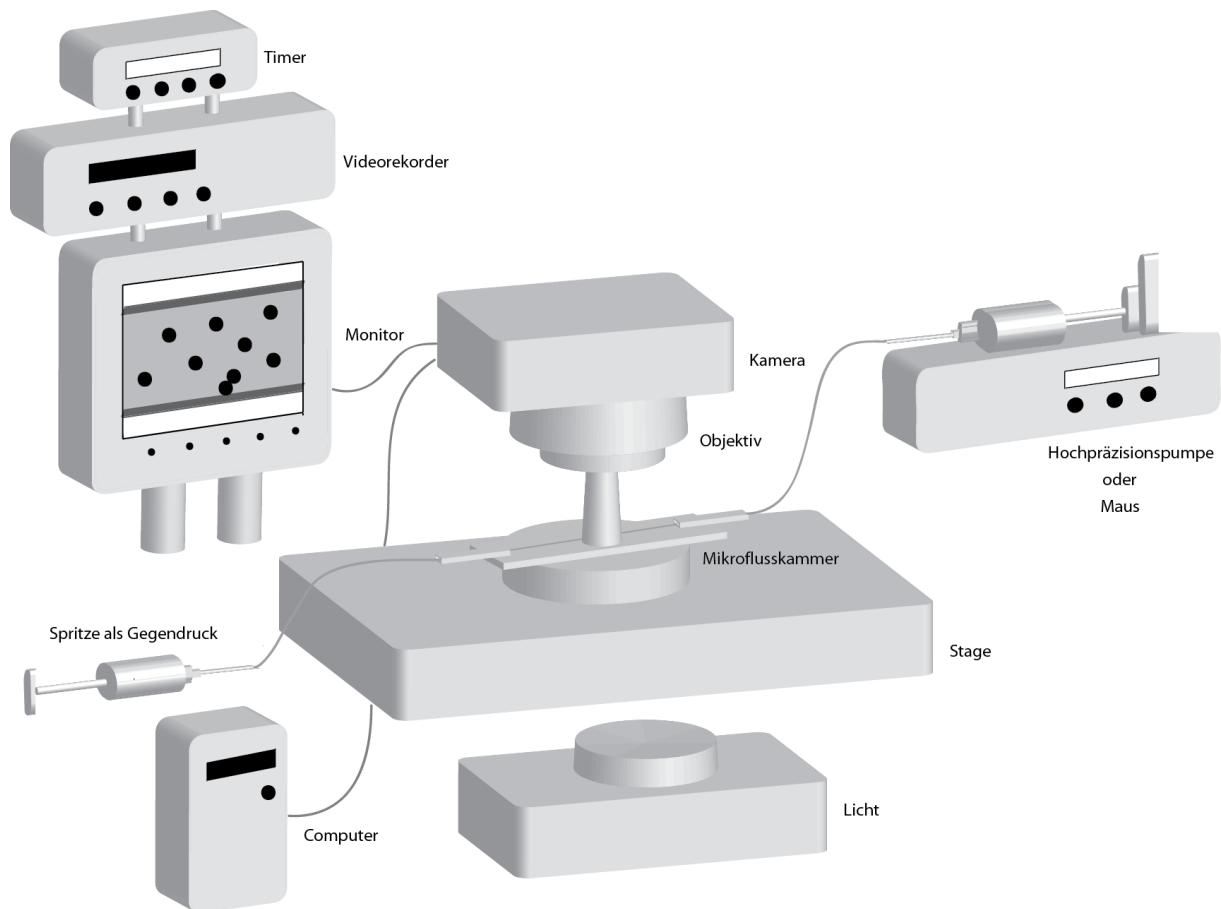
Um unspezifische Zellinteraktionen und Zellverklumpungen zu vermeiden, wurden die Mikroflussskammern nach dem Caseinblock mit einer in 0,9% NaCl-Lösung gelösten Heparin-Lösung in einer fünf Mililiter Spritze bei einer Geschwindigkeit von 0,07ml/min durchgespült.

Schließlich erfolgte nun die Präparation der Arteria carotis an einer narkotisierten Maus unter dem Mikroskop. Die Narkose setzte sich aus 100µl Ketavet (5mg/ml), 100µl Rompun (20mg/ml) und 800µl 0,9% NaCl Lösung zusammen, die in einer 1ml Spritze aufgezogen und gut durchgemischt wurden. Pro acht Gramm Körpergewicht der Maus wurden 100µl der Narkoselösung intraperitoneal gespritzt. Um die Atmung der Maus erleichtern zu können, wurde das Totraumvolumen reduziert, indem ein PE90 Schlauch als Tubus in die Trachea zwischen zwei benachbarten Ringknorpeln eingelegt wurde. In die Arteria carotis wurde ein PE10 Katheter eingesetzt, über den das Vollblut in die Mikroflussskammer floss.

### **3.3.2 Mikroflussskammerexperimente zum Nachweis der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten**

Mittels eines Intravitalmikroskops, welches sowohl in horizontaler als auch in vertikaler Richtung frei beweglich war, wurden die Mikroflussskammerexperimente durchgeführt. Dabei wurden die zu untersuchenden Flusskammern auf einer Petrischale fixiert, welche dann unter das Mikroskop gelegt wurden. Das Mikroskop war mit einer CCD- Kamera (Kappa CF8/1) und einem Bildschirm verbunden. Somit konnte das mit Hilfe eines Wasser-Immersions-Objektives (SW 40/0,75 NA) vergrößerte Bild, das Zellverhalten in den perfundierten Mikroflussskammern, auf dem Monitor sichtbar gemacht werden. Zudem war ein Videorecorder angeschlossen, mit dessen Hilfe über VHS-Kassetten das Beobachtete aufgezeichnet wurde. Ein Videozeitgenerator (Video Timer) diente der Zeitaufnahme. Sobald in der Mikroflussskammer ein konstanter Blutfluss zu sehen war, wurde das Experiment gestartet. Um exakte Versuchsbedingungen zu schaffen, wurde mit Hilfe der Software Microvessel Velocity die Blutflussgeschwindigkeit ermittelt, die auf drei bis sechs mm/s eingestellt wurde. Dies erfolgte durch Anheben bzw. Absenken des Auslaufschlauchs (Änderung des hydrostatischen Gegendrucks). Nach fünf Minuten Perfusion der Mikroflussskammer wurden die adhären Zellen mit einer Farblösung (bestehend aus Eosin G, Phenol und Formaldehyd) fixiert.

Zu Beginn des Experimentes wurden sowohl ein Blutausschlag auf einem Objektträger als auch ein Leukozytencount für die weitere Auswertung entnommen. Während und am Ende des Experiments wurde die Entnahme wiederholt.



**Abbildung 7:** Versuchsaufbau zur Untersuchung der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und hämatopoietischer Vorläuferzellen in Abhängigkeit von ST3Gal-IV. Zum Aufbau gehören das Intravitalmikroskop, die auf einer Petrischale fixierte Mikroflussskammer, CCD-Kamera und Bildschirm, Videorecorder, Videozeitgenerator und ein Auslaufschlauch.

### 3.3.3 Fixierung eosinophiler Granulozyten in der Mikroflussskammer

Eosinophile Granulozyten wurden mit einer Farblösung in der Mikroflussskammer fixiert. Diese besteht aus Eosin G, Phenol und Formaldehyd.

Eosin ist ein Farbstoff, der für die gelblich-rötliche Färbung eosinophiler Granulozyten verantwortlich ist. Wegen seiner konservierenden und ebenfalls färbenden Eigenschaft wird

für die Lösung auch Phenol benutzt. Formaldehyd als gängiges Fixierungsmittel in der Histotechnik findet ebenfalls Verwendung.

### **3.3.4 Auswertung der Experimente mittels Lichtmikroskopie und Blutausstriche**

Anschließend wurde die Auswertung per Mikroskop (Carl Zeiss Axioskop 40, mit Objektiv 40x/NA 1,3 Oil) durchgeführt. Dabei wurde zuvor eine Strecke von zwei Zentimeter in der Mitte der Mikroflussskammern mit einem Lineal ausgemessen, in der danach die Auszählung der adhärenenten Zellen erfolgte.

Um exakte Ergebnisse zu erhalten, wurden in der Auswertung die entnommenen Leukozytencounts und Blutausstriche berücksichtigt. Die Leukozytencounts wurden mit Türks Lösung fixiert und mit Hilfe der Neubauerzählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die getrockneten Blutausstriche wurden mit Hilfe einer Fixier- und Farblösung entwickelt (1.Lösung- Fixierlösung mit Methanol, 2.Lösung- Farbreagenz rot mit Phosphatanion, 3.Lösung- Farbreagenz blau mit Phosphatanion und Azur, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

### **3.3.5 Exakte Ermittlung der ausgewanderten eosinophilen Granulozyten unter Berücksichtigung der relativen Anzahl eosinophiler Granulozyten**

Nach der quantitativen Auszählung eosinophiler Granulozyten wurde anschließend der eosinophile Granulozyten-Adhäsionsquotient ermittelt. Dieser Quotient erlaubt eine exakte Ermittlung adhärenenter eosinophiler Granulozyten unter Berücksichtigung der Anzahl der durchflossenen Zellen in den Vitrotubes.

Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in den unterschiedlich beschichteten Mikroflussskammern erfolgte immer bei einer Wandschubspannung von  $\sim 1 \text{ dyn/cm}^2$ . Dies entspricht einer Flussgeschwindigkeit der Zellen im Blut durch die Kapillare von  $0,115 \text{ ml/min}$  bzw.  $v = 115 \mu\text{l/min}$ .

Die absolute Anzahl adhärenenter eosinophiler Granulozyten kann durch das Auszählen einer fest definierten Strecke der Mikroflussskammern erhoben werden.

Unter Verwendung der Blutflussgeschwindigkeit und des systemischen Eosinophilencounts kann die Anzahl eosinophiler Granulozyten, die in einer bestimmten Zeit durch die Kammer geflossen sind, bestimmt werden. Dieser Wert wird dann ins Verhältnis zu der Anzahl adhärenter eosinophiler Granulozyten in der Flusskammer gesetzt.



### **3.4 Methodik zur Untersuchung der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen in *ex vivo* Mikroflussskammerexperimente**

Zur Untersuchung der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen verwendeten wir wiederum das *ex vivo* Mikroflussskammersystem. Hierfür wurden Mikroglaskapillaren mit rekombinanten murinen Proteinen beschichtet. Die beschichteten Flusskammern wurden dann unter standardisierten Bedingungen mit im Medium befindlichen hämatopoietischen Vorläuferzellen perfundiert. Für die Experimente wurden die rekombinanten murinen Proteine E-Selektin und VCAM-1 ausgewählt, da diese die Rollen und die Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen unterstützen (Sperandio, M., *et al.*, 2009). Da CXCL-12 die Induktion der festen Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen vermittelt, wurde dieses rekombinante murine Protein für die Versuche ebenfalls verwendet (Kryczek, I., *et al.*, 2007). Aufgrund der unterschiedlichen Funktionen der zuvor genannten Proteine im Rekrutierungsprozess wurden verschiedene Kombinationen immobilisierter Proteine gewählt.

#### **3.4.1 Vorbereitung der Mikroflussskammern**

Die Vorbereitung erfolgte wie in 3.3.1 detailliert beschrieben. Jedoch wurden die hämatopoietischen Vorläuferzellen in Suspension mittels Pumpe durch die Flusskammern perfundiert. Die hämatopoietischen Vorläuferzellen wurden für den Versuch mittels FACS (fluorescence-activated cell sorting) Sorting isoliert. Die hämatopoietischen Vorläuferzellen waren für die Stammzellmarker c-kit und Sca-1 positiv, für den Differenzierungsmarker Lineage negativ.

#### **Adhäsionskammer**

Ansatz 1: rmSDF-1 (50µg/ml) + rmVCAM-1 (15µg/ml) + rmE-Selektin (100µg/ml) in 1xPBS + 0,1% BSA

#### **Rollkammer**

Ansatz 2: rmVCAM-1(15µg/ml) + rmE-Selektin (100µg/ml) in 1xPBS + 0,1% BSA

Ansatz 3: rmVCAM-1(15µg/ml) in 1xPBS + 0,1% BSA

Ansatz 4: rm E-Selektin (100µg/ml) in 1xPBS + 0,1% BSA

### **3.4.2 Vorbereitung der hämatopoietischen Vorläuferzellen**

Die hämatopoietischen Vorläuferzellen wurden aus dem Knochenmark von Wildtypmäusen und *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen gewonnen.

Anschließend wurden die Vorläuferzellen im PBS bei 1100 Umdrehungen pro Minute für fünf Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überschuss abpipettiert wurde, konnte das Pellet im Medium (1% BSA, 1mM Calciumchlorid, 1mM Magnesiumchlorid, 10mM Hepes) mit 200 000 Zellen/ml gelöst werden.

### **3.4.3 Mikroflussskammerexperiment zum Nachweis der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen**

Der Versuchsaufbau sowie die technischen Geräte zum Nachweis der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen entsprechen den in *Kapitel 3.2* und *3.3* beschriebenen Vorgehensweisen. Zusätzlich wurde hier eine Hochpräzisionspumpe zur Perfusion der Zellen verwendet. Nachdem das Medium mit den enthaltenen Zellen auf eine 1ml Spritze aufgezogen und in die Pumpe eingespannt worden war, konnten die hämatopoietischen Vorläuferzellen über einen ca. zehn Zentimeter langen Verbindungsschlauch zwischen Kanüle und Mikroflussskammer fließen. Mit der Flussgeschwindigkeit von 1µl/min bewegten sich die Zellen für zwanzig Minuten durch die Mikroflussskammer. Danach wurden die hämatopoietischen Vorläuferzellen durch Türks Lösung fixiert.

Die Auswertung der Flusskammerexperimente erfolgte am Mikroskop (Carl Zeiss Axioskop). Es wurde hierfür eine Strecke von zwei Zentimeter in der Mitte der Mikroflussskammern ausgemessen, in der danach die Auszählung adhärenter Zellen durchgeführt und in Bezug zur Oberfläche angegeben wurde.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Experimentelle Validierung der Mikroflussskammerexperimente

#### 4.1.1 Die Bedeutung des Caseins in Mikroflussskammerexperimenten

Um eine unspezifische Adhäsion von Leukozyten an der Oberfläche der Glaskapillaren zu verhindern, untersuchten wir in Vorexperimenten die Wirkung des Proteins Casein. Die Mikroflussskammern wurden mit Casein für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. In der mit Casein inkubierten Mikroflussskammer konnten wir dann in Perfusionsexperimenten keine unspezifische Adhäsion von Leukozyten (u.a. auch von eosinophilen Granulozyten) beobachten. Dagegen kam es in den mit PBS inkubierten Mikroflussskammern, die nicht mit Casein geblockt worden waren, zu einer sehr starken, unkontrollierten und unspezifischen Adhäsion von Leukozyten (Daten nicht dargestellt).

### 4.2 *Ex vivo* Mikroflussskammerexperimente zum Nachweis der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal4

Um die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Sialyltransferase ST3Gal-IV zu untersuchen, führten wir zunächst Vorexperimente durch.

In *Il5*-transgenen Mäusen untersuchten wir zuerst das CCL-11 abhängige Adhäsionsverhalten eosinophiler Granulozyten. Die 1990 durch Dent, L.A. und Kollegen generierten *Il5*-transgenen Mäuse zeichnen sich durch die besondere Eigenschaft aus, dass sie fähig sind, eine sehr hohe Anzahl eosinophiler Granulozyten zu bilden (>70% im peripheren Blut).

Insgesamt führten wir die Mikroflussskammerexperimente an drei *Il5*-transgenen Mäusen durch. Aufgrund der besonderen Bedeutung der Funktion von CCL-11 untersuchten wir sieben mit P-Selektin/VCAM-1/Eotaxin-1 beschichtete Mikroflussskammern. Um zu

überprüfen, ob die beobachtete Interaktion der Adhäsionskammer mit P-Selektin/VCAM-1/Eotaxin-1 spezifisch ist, wurde das Experiment auch an Kontrollflusskammern durchgeführt. Die Kontrollflusskammern waren mit der Proteinkombination P-Selektin/VCAM-1 (n=3), mit P-Selektin (n=3) und VCAM-1 (n=3) beschichtet.

Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in den unterschiedlich beschichteten Mikroflussskammern erfolgte bei einer Wandschubspannung von  $\sim 1 \text{ dyn/cm}^2$  ( $= 0,115 \text{ ml/min}$ ). Das Auszählen eosinophiler Granulozyten, die während des Experimentes rollen, wurde als rollende Leukozyten quantifiziert. Daraus ergab sich die Anzahl rollender eosinophiler Granulozyten pro FOV (field of view) nach fünf, sieben und zehn Minuten. In den mit P-Selektin/VCAM-1/Eotaxin-1 beschichteten Mikroflussskammern konnte während der zehn minütigen Versuchszeiten eine kontinuierliche Zunahme von rollenden Zellen beobachtet werden. Schließlich erfolgte die Quantifizierung aller adhärenen eosinophilen Granulozyten im Bereich eines FOVs nach fünf, sieben und zehn Minuten. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Fähigkeit eosinophiler Granulozyten unter Flußbedingungen zu adhären, sehr stark von dem Chemokin CCL-11 (Eotaxin-1) abhängig ist.

Dementsprechend präsentierte sich in der mit P-Selektin/VCAM-1/Eotaxin-1 beschichteten Mikroflussskammer das stärkste Adhäsionsverhalten eosinophiler Granulozyten, das mit zunehmender Versuchszeit kontinuierlich anstieg. Nach fünf Minuten betrug die Anzahl adhärenen eosinophiler Granulozyten im Mittelwert  $0,0016/\text{mm}^2 \pm 0,00028/\text{mm}^2$ , nach sieben Minuten  $0,002/\text{mm}^2 \pm 0,00033/\text{mm}^2$  und nach zehn Minuten  $0,0026/\text{mm}^2 \pm 0,00044/\text{mm}^2$ . In den Kontrollkammern, die mit P-Selektin und VCAM-1 beschichtet worden waren, adhärenen nach fünf Minuten  $0,001 \pm 0,00051$  eosinophile Granulozyten/ $\text{mm}^2$ , nach sieben Minuten  $0,0011 \pm 0,00064$  eosinophile Granulozyten/ $\text{mm}^2$  und nach zehn Minuten  $0,0014 \pm 0,00088$  eosinophile Granulozyten/ $\text{mm}^2$ . Dagegen kam es zu keiner Adhäsion eosinophiler Granulozyten in den mit P-Selektin beschichteten Mikroflussskammern. In einer von drei Kontrollkammern, die mit VCAM-1 bestückt waren, adhärenen nach fünf Minuten lediglich ein eosinophiler Granulozyt, sodass hier der Mittelwert  $0,000067/\text{mm}^2 \pm 0,000067/\text{mm}^2$  lag.

Letztendlich konnten diese Vorexperimente zeigen, dass eine suffiziente, feste Adhäsion und folglich eine erfolgreiche Rekrutierung eosinophiler Granulozyten vom Chemokin CCL-11 (Eotaxin-1) und dessen Chemokinrezeptor CCR-3 abhängig ist.

Da eosinophile Granulozyten lediglich 1-4% der Zellen im Differentialblutbild ausmachen, versuchten wir *IL5*-transgene Mäuse, die eine deutlich erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten im peripheren Blut aufweisen, mit *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse bzw. C57Bl/6 Mäuse zu kreuzen. Leider ist es uns aber nicht gelungen, durch Kreuzung *St3gal4*<sup>-/-</sup> *IL5* transgene Mäuse zu generieren. Daher verwendeten wir für die weiteren Untersuchungen der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse und als Kontrollen WT Mäuse.

Insgesamt untersuchten wir das Adhäsionsverhalten an vierzehn Mäusen (n=14). Hierbei handelte es sich um acht C57Bl/6 Mäuse und sechs *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse. Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in den unterschiedlich beschichteten Mikroflussskammern erfolgte bei einer Wandschubspannung von  $\sim 1 \text{ dyn/cm}^2$  ( $= 0,115 \text{ ml/min}$ ).

In Tabelle 1 ist die Anzahl der Mikroflussskammern abgebildet, die in unterschiedlicher Kombination der rekombinanten Proteine beschichtet worden sind. Die verschiedenen Flußkammern wurden anschließend mit dem Vollblut der WT-Mäuse und der *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse perfundiert.

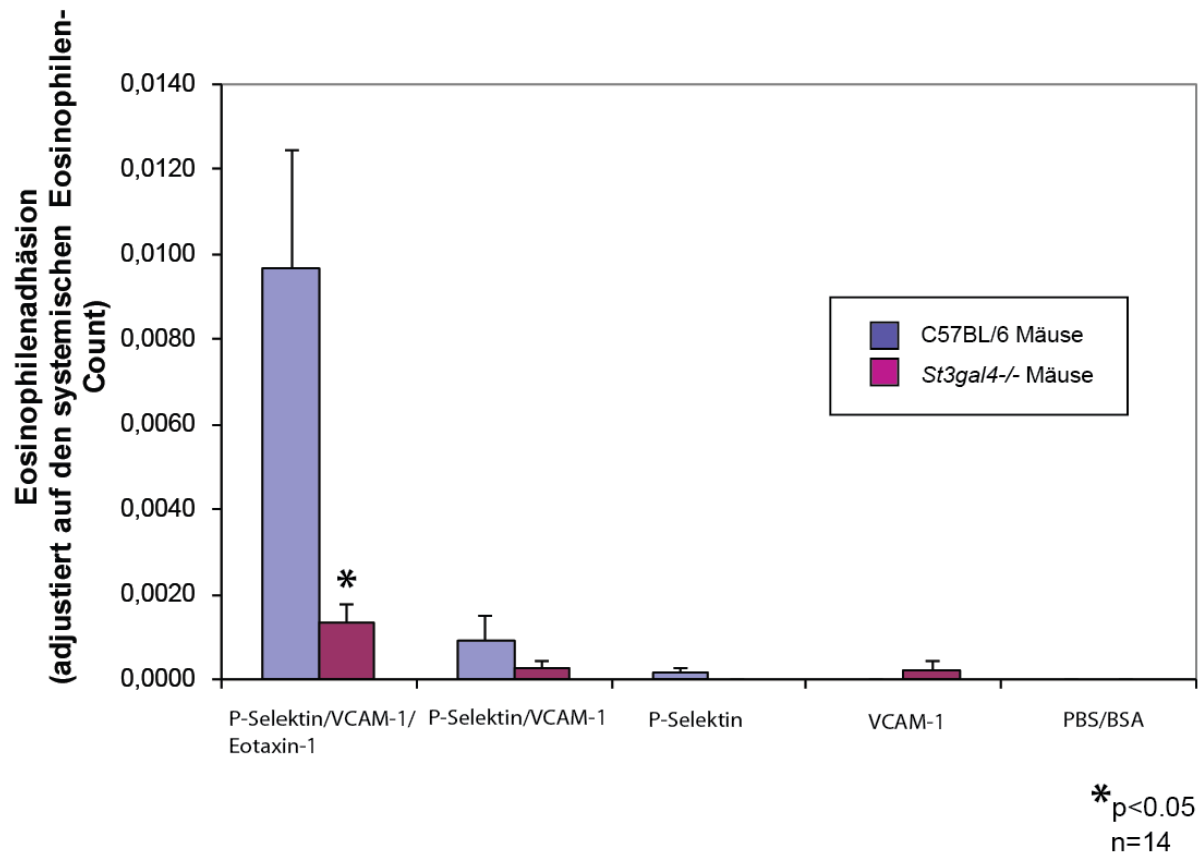
Mikroflussskammer beschichtet mit	P/VCAM-1/Eotaxin-1	P/VCAM-1	P-Selektin	VCAM-1	PBS/BSA
Anzahl der Mikroflussskammern					
<b>WT</b>	16	6	5	5	3
<b><i>St3gal4</i><sup>-/-</sup></b>	11	6	3	4	1

**Tabelle 1: Anzahl der Mikroflussskammern.** Übersicht über die Anzahl der unterschiedlich beschichteten Mikroflussskammern in Wildtypmäusen und *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen.

In den Flusskammerexperimenten konnten folgende Ergebnisse erhoben werden. Unter dem Einfluss von CCL-11 (Eotaxin-1) konnte ein verstärktes Adhäsionsverhalten in den mit P-Selektin/VCAM-1/Eotaxin-1 beschichteten Mikroflussskammern beobachtet werden (*siehe Abb.9*). Insgesamt adhärten unter Flussbedingung  $0,0097 \pm 0,0028$  eosinophile Granulozyten/mm<sup>2</sup> in den Mikroflussskammern von C57Bl/6 Mäusen und  $0,0013/\text{mm}^2 \pm 0,00046/\text{mm}^2$  eosinophile Granulozyten in *St3Gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen. Zum Vergleich adhärten in den mit P-Selektin/VCAM-1 beschichteten Mikroflussskammern unter Flussbedingung  $0,00093 \pm 0,00057$  eosinophile Granulozyten/mm<sup>2</sup> im peripheren Blut von C57Bl/6 Mäusen und  $0,00028 \pm 0,00013/\text{mm}^2$  eosinophile Granulozyten im peripheren Blut von *St3Gal4*<sup>-/-</sup>

Mäusen. In allen mit P-Selektin beschichteten Mikroflussskammern adhärierte lediglich ein eosinophiler Granulozyt in der C57Bl/6 Maus, sodass sich umgerechnet  $0,00014 \pm 0,00014$  eosinophile Granulozyten/mm<sup>2</sup> an der Mikroflussskammer festsetzten. Es kam unter der selbigen Proteinzusammensetzung zu keiner Interaktion mit der Kammerwand in den Versuchen an *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen. Zu einem ganz ähnlichen Ergebnis kam es auch in den mit VCAM-1 beschichteten Mikroflussskammern. Hier adhärierten insgesamt nur drei eosinophile Granulozyten in *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen mit einem Mittelwert von  $0,00022 \pm 0,00022$  eosinophile Granulozyten/mm<sup>2</sup>. In nicht beschichteten Kammern konnte kein einziger eosinophiler Granulozyt nachgewiesen werden. Folglich konnten wir beobachten, dass die Fähigkeit eosinophiler Granulozyten unter Flussbedingung zu adhären, sehr stark vom Vorhandensein des Chemokins CCL-11 (Eotaxin-1) abhängig gewesen war.

Unsere Aufmerksamkeit fokussierte sich vor allem auf das Adhäsionsverhalten eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit von der Sialyltransferase ST3Gal-IV. Hierfür verglichen wir die Ergebnisse aus den Adhäsionskammern der C57Bl/6 Mäuse mit denen der *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse (siehe Abb.9). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen WT-Mäusen und *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen. Hieraus kann gefolgert werden, dass nur mit Hilfe einer funktionstüchtigen Sialyltransferase ST3Gal-IV eine erfolgreiche Adhäsion erfolgen kann und daher die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten ins Gewebe gewährleistet ist. Die statistische Analyse der restlichen Kammern (P-Selektin/VCAM-1, P-Selektin, VCAM-1, PBS/BSA) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen WT Mäuse und *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen. Die Ergebnisse zeigen somit, dass *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse durch den Verlust der Sialyltransferase ST3Gal-IV ein deutlich reduziertes Adhäsionsverhalten eosinophiler Granulozyten aufweisen.



**Abbildung 9:** Das Adhäsionsverhalten eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal-IV. Adhäsionsverhalten eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal-IV. Hierbei wird das unterschiedliche Adhäsionsverhalten von St3gal4<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu C57Bl/6 Mäusen wider gegeben mit signifikant reduziertem Adhäsionsverhalten der St3gal4<sup>-/-</sup> eosinophiler Granulozyten. Zur Anzahl der Tiere und Flusskammern siehe Tabelle 1. \*p<0,05, t-Test.

### 4.3 *Ex vivo* Mikroflussskammerexperimente zur Untersuchung der Adäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen

Nachdem wir in den vorherigen Experimenten (*siehe Kapitel 4.2.*) zeigen konnten, dass die Sialyltransferase ST3Gal-IV wesentlich für eine suffiziente Adhäsion eosinophiler Granulozyten während des Rekrutierungsprozesses ist, überprüften wir nun die Hypothese, dass auch eine Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen von einer suffizienten Sialyltransferase ST3Gal-IV abhängig ist.

Für diese Versuchsreihe kooperierten wir mit Frau Dr. Silke Huber aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. David Vöhringer, vormals LMU München, die für uns mittels FACS (fluorescence-activated cell sorting) Sorting hämatopoietische Vorläuferzellen isolierte und zur Verfügung stellten.

Die Experimente wurden mit Hilfe des *ex vivo* Mikroflussskammersystems durchgeführt (*siehe Kapitel 3.4.*). Dabei wurden die Vorläuferzellen mittels einer Perfusionspumpe durch die Flußkammern perfundiert. Die Flussgeschwindigkeit, mit der die hämatopoietischen Vorläuferzellen durch die mit adhäsionsrelevanten Molekülen beschichteten Mikroflussskammern strömten, betrug 1µl/min. Das Adhäsionsverhalten hämatopoietischer Vorläuferzellen untersuchten wir an insgesamt sechs Mäusen. Dabei handelte es sich um jeweils drei C57Bl/6 Mäuse und drei *St3Gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse.

In Tabelle 2 ist die Anzahl der Mikroflussskammern abgebildet, die in unterschiedlicher Kombination mit rekombinanten murinen Proteinen beschichtet und anschließend mit hämatopoietischen Vorläuferzellen von WT und *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen perfundiert wurden.

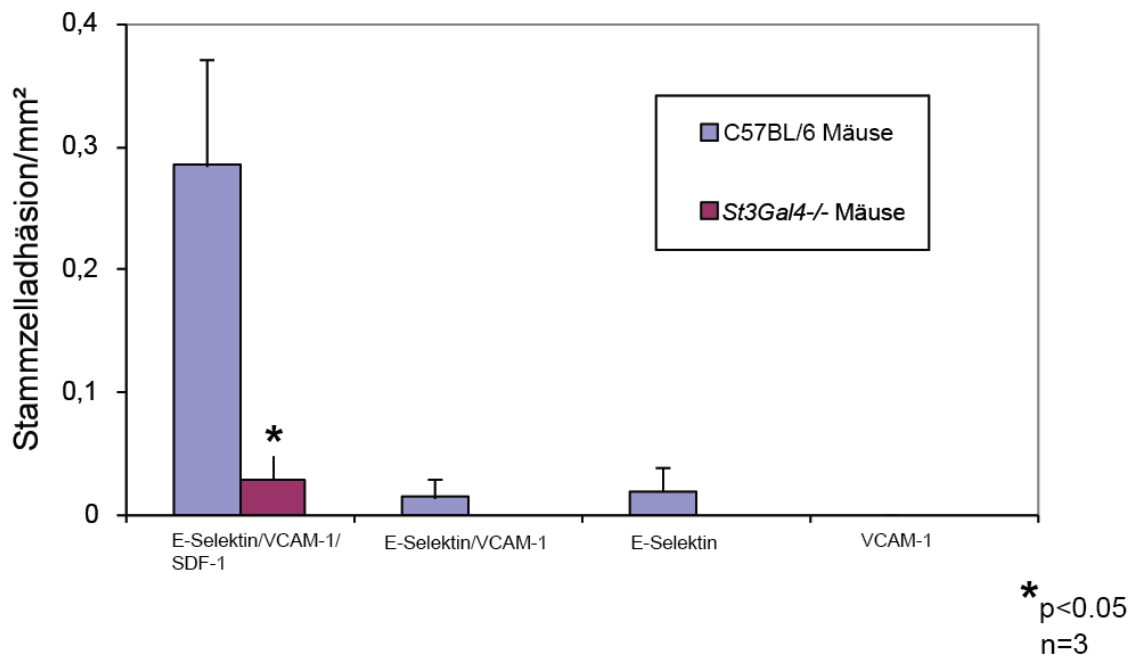
Mikroflussskammer beschichtet mit	E/VCAM-1/CXCL-12	E/VCAM-1	E-Selektin	VCAM-1
Anzahl der Mikroflussskammern				
<b>WT</b>	5	4	3	1
<b><i>St3gal4</i><sup>-/-</sup></b>	6	6	3	4



**Tabelle 2: Anzahl der Mikroflussskammern.** *Übersicht über die Anzahl der unterschiedlich beschichteten Mikroflussskammern in Wildtypmäusen und St3gal4<sup>-/-</sup> Mäusen zur Untersuchung der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen.*

Schließlich konnten mit Hilfe dieser Versuchsreihe folgende Ergebnisse ermittelt werden. Für eine suffiziente Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen ist die Anwesenheit des Chemokins CXCL-12 essenziell. Wir konnten in den Adhäsionskammern unter Einfluss von E-Selektin/VCAM-1/CXCL-12 eine deutlich erhöhte Adhärenz hämatopoietischer Vorläuferzellen beobachten. In den Mikroflussskammern der C57Bl/6 Mäuse adhärten unter Flussbedingung  $0,284 \pm 0,086$  hämatopoietische Vorläuferzellen/mm<sup>2</sup>, in den Mikroflussskammern der St3gal4<sup>-/-</sup> Mäuse dockten unter dem Einfluss derselben Proteinkombination  $0,028 \pm 0,019$  hämatopoietische Vorläuferzellen/mm<sup>2</sup> an (Abb. 10). Der Unterschied in der Adhäsion ist signifikant niedriger für St3gal4<sup>-/-</sup> Vorläuferzellen, \*p<0,05, t-Test. Im Vergleich dazu konnten wir in den weiteren Kammern bei Beschichtung mit E-Selektin/VCAM-1 lediglich  $0,014 \pm 0,01$  adhärenente hämatopoietische Vorläuferzellen/mm<sup>2</sup> in C57Bl/6 Mäusen beobachten. Die aus dem Knochenmark der St3gal4<sup>-/-</sup> Mäuse gewonnenen hämatopoietischen Vorläuferzellen reagierten unter Flussbedingung gar nicht auf diese Proteinkombination, sodass es bei keiner einzigen Zelle zu einer festen Adhäsion in den Mikroflussskammern gekommen war. In der mit E-Selektin beschichteten Mikroflussskammer adhärte nur eine hämatopoietische Vorläuferzelle der C57/Bl6 Mäuse, sodass es bei umgerechnet  $0,018 \pm 0,02$  hämatopoietischen Vorläuferzellen/mm<sup>2</sup> zu einer festen Adhäsion kam. Unter selbiger Proteinzusammensetzung konnten wir keine adhärenenten hämatopoietischen Vorläuferzellen der St3gal4<sup>-/-</sup> Mäusen bei der Auswertung ermitteln. Ein ganz ähnliches Ergebnis konnte bei der Analyse der mit VCAM-1 beschichteten Mikroflussskammern erhoben werden. Sowohl in den mit VCAM-1 bestückten Mikroflussskammern der C57Bl/6 Mäuse als auch der St3gal4<sup>-/-</sup> Mäuse kam es zu keiner Interaktion mit der Kapillarwand und dementsprechend zu keiner Adhärenz hämatopoietischer Vorläuferzellen.

Unsere Ergebnisse zeigen somit, dass die effiziente Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen von einer suffizienten Sialyltransferase ST3Gal-IV abhängig ist.



**Abbildung 10:** Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal-IV. Unterschiedliches Adhäsionsverhalten hämatopoietischer Vorläuferzellen von *St3gal4*<sup>-/-</sup> und C57Bl/6 Mäusen mit signifikant reduziertem Adhäsionsverhalten der *St3gal4*<sup>-/-</sup> hämatopoietischen Vorläuferzellen. Zur Anzahl der Flusskammern siehe Tabelle 2. \* $p < 0.05$ , *t*-Test.

## 5 Diskussion

Eosinophile Granulozyten sind an der Pathogenese zahlreicher lokaler und systemischer entzündlicher Prozesse beteiligt (Hogan, S., *et al.*, 2008). Aufgrund der Freisetzung einer großen Anzahl von Molekülen gegen einfallende Keime stellen sie eine breite Abwehrantwort bereit. Demzufolge sind sie sowohl bei bakteriellen und viralen Pathogenesen einschließlich HIV, als auch bei Abwehraufgaben gegen parasitäre Infektionen beteiligt. Verschiedene Studien evaluierten das Verhalten eosinophiler Granulozyten während akuter bakterieller Infektionen. So konnte u.a. gezeigt werden, dass während einer Bakteriämie ein inverser Zusammenhang zwischen Bakterienlast und eosinophilen Granulozyten im Blut besteht (Ramirez, G.A., *et al.*, 2018). Ferner konnte ein Zusammenhang zwischen Eosinopenie als zuverlässiger Marker einer bakteriellen Ätiologie bei Patienten mit Sepsis auf Intensivstationen erfasst werden (Davido, B., *et al.*, 2017). Ebenfalls zeigten kürzlich verschiedene Arbeitsgruppen sowohl den Zusammenhang zwischen der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und Pilzerkrankungen wie *Aspergillus fumigatus* (Guerra, E.S., *et al.*, 2017), *Paracoccidioides brasiliensis* (Braga, F.G., *et al.*, 2017), *Histoplasma capsulatum* (Kumar, R., *et al.*, 2017), als auch den Zusammenhang eosinophiler Granulozyten und Influenza A. Diese bewirken während einer Infektion mit Influenza A eine fragmentierte Degranulation von Molekülen, regulieren die Antigenpräsentation hoch und verbessern die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Antwort (Samarasinghe A.E., *et al.*, 2017). Durch die Freisetzung von Zielsubstanzen besitzen eosinophile Granulozyten die Fähigkeit, etablierte Klassifikationsparadigmen bei verschiedenen allergischen und autoimmunen Krankheiten zu verändern (Ramirez, G.A., *et al.*, 2018). Unsere Ergebnisse konnten zeigen, dass der Verlust der Sialyltransferase ST3Gal-IV die Adhäsion muriner eosinophiler Granulozyten signifikant reduziert. Dies geschieht über eine Beeinträchtigung der Chemokinrezeptor–Chemokin Achse CCR-3-CCL-11. Durch eine medikamentöse Inhibition der Sialyltransferase ST3Gal-IV könnte eine unerwünschte Rekrutierung eosinophiler Granulozyten aus dem Blutkreislauf in das inflammatorisch veränderte Gewebe, wie z.B. bei Allergien oder Asthma bronchiale, verhindert werden.

Des Weiteren offenbarten unsere *ex vivo* Mikroflusskammerergebnisse, dass der Verlust von ST3Gal-IV auch die Adhäsion hämatopoietischer Stamm- und Precursorzellen (HSPCs) signifikant reduziert. Dies erfolgt durch die Störung der Chemokinrezeptor–Chemokin Achse CXCR-4-CXCL-12. So könnte bei einer allogenen Stammzelltransplantation eine zusätzliche Behandlung der Spenderzellen mit ST3Gal-IV die Adhäsionsrate dieser in den Nischen des Empfänger Knochenmarks erhöhen. Aber auch degenerative und entzündliche Krankheiten, die das Gleichgewicht zwischen Gewebsschädigung und Gewebereparatur widerspiegeln, könnten von einer stammzellbasierten Therapie profitieren. Momentan zielen die meisten gegenwärtigen Therapien für solche Erkrankungen nur auf die entzündliche Komponente ab, ohne jedoch auf Reparaturprozesse einzuwirken. Durch direkte Beisteuerung der Bildung von neuen Zellen oder/und durch umweltbedingte trophische Effekte, die zur Rekrutierung oder Unterstützung anderer Zellen führen, die wichtig für das Rewachstum des Gewebes sind, bieten stammzellbasierte Therapien eine effektive Möglichkeit, Geweberegenerationen zu erreichen.

.

## **5.1 *Ex vivo* Mikroflussskammerexperimente liefern reproduzierbare Daten**

Das *ex vivo* Mikroflussskammerexperiment ist ein dynamischer Adhäsionsassay, der von Smith und Kollegen 2004 (Smith, M.L., *et al.*, 2004) entwickelt, durch Sperandio und Kollegen 2006 (Sperandio, M., *et al.*, 2006) modifiziert und in der Literatur inzwischen vielfach beschrieben und validiert worden ist (Pruenster, M., *et al.*, 2015). Mit dieser Methode können *in vivo* Verhältnisse simuliert und der Rekrutierungsprozess von Leukozyten analysiert werden. Die Reproduzierbarkeit der Experimente wurde durch die einheitliche Festlegung der Flussbedingungen gewährleistet. Dabei wurde die Hämodynamik postkapillärer Venolen, in denen die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten normalerweise stattfindet, simuliert (Lawrence, M.B., *et al.*, 2001). Es wurde eine Flussgeschwindigkeit von 0,115ml/min gewählt, wodurch in den Flusskammern eine Wandschubspannung von 1 bis 1,5 dyn/cm<sup>2</sup> herrschte. Dies entspricht den physiologischen Verhältnissen in postkapillären Venolen (Smith, M.L., *et al.*, 2004). Zudem erlaubt das Modell aufgrund der verschiedenen Proteinkombinationen, mit denen die Mikroflussskammern beschichtet worden sind, die einzelnen Phasen des Rekrutierungsprozesses nachzuahmen und anschließend separat zu analysieren. Durch die Verwendung von Vollblut werden bei diesem Modell auch die Funktionalität und die Beeinflussung von rheologischen Komponenten berücksichtigt. Diese haben *in vivo* und *in vitro* einen großen Einfluss auf die Rekrutierung von Granulozyten (Zarbock, A., *et al.*, 2009). Im Vergleich zu anderen Methoden wie ELISA oder der Durchflusszytometrie, die sich durch ihre einfache Durchführbarkeit und kostengünstige Materialien hervorheben, ist die Methode der *ex vivo* Mikroflussskammerexperimente keine statische Methode. Bisher existierte das kommerziell erhältliche Flusskammersystem „Parallel Plate Flow Chamber System“, das jedoch durch eine komplexere Handhabung charakterisiert ist und größere Probenvolumina aufgrund eines höheren Totraumvolumens benötigt (Lawrence, M.B., *et al.*, 1987). Letztendlich können die Ergebnisse, die durch Mikroflussskammerexperimente erhoben werden, auf physiologische Verhältnisse übertragen werden. Jedoch handelt es sich um ein *ex vivo* Modell, welches die physiologischen Bedingungen nur nährungsweise simulieren kann. So beinhalten die beschichteten Mikroflussskammern, die die Endothelzellschicht nachahmen, nur eine ausgewählte Anzahl an rekombinanten murinen Proteinen. Ferner kann nicht sicher gestellt werden, inwiefern die

Proteine gleichmäßig in den Mikrogaskapillaren verteilt wurden. Mögliche Schwankungen in der Rezeptordichte wurden berücksichtigt, indem wir für die Auswertung der Glaskapillaren eine Strecke von 2cm wählten.

Unter Berücksichtigung dieser Voraussetzungen sind die beiden Versuchsgruppen (C57Bl/6, sowie *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse) den gleichen standardisierten Bedingungen ausgesetzt worden, sodass die Ergebnisse miteinander verglichen werden konnten.

## **5.2 Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal-IV**

Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten ist ein immunologischer Prozess, der in einer spezifischen Kaskade von Ereignissen abläuft und von verschiedensten Interaktionen zwischen Endothelzellen und eosinophilen Granulozyten abhängig ist. Dieses Zusammenspiel wird u.a. durch Chemokinrezeptoren und ihren dazugehörigen Liganden determiniert, und setzt spezifische Interaktionen zwischen den Akteuren voraus (Gerard, C., *et al.*, 2001). Das spezifische Zusammenwirken zwischen Chemokinrezeptor und Chemokinligand wird u.a. durch die posttranslationale Modifikation der Chemokinrezeptoren beeinflusst (Frommhold, D., *et al.*, 2008). Einer dieser Chemokinrezeptoren ist CCR-3, der u.a. an der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt ist.

Unser Ziel war es einerseits zu zeigen, dass die Adhäsion eosinophiler Granulozyten von CCR-3 abhängig ist und andererseits nachzuweisen, dass die Bildung des CCR-3 der posttranslationalen Sialylierung unterliegt. Wir untersuchten die CCR-3 abhängige Adhäsion eosinophiler Granulozyten in einem reduktionistischen System, in welchem alle endothelialen Akteure bekannt gewesen waren. Dazu verwendeten wir das *ex vivo* Mikroflussskammersystem, deren Flusskammeroberflächen mit rekombinanten murinen Proteinen (rmP-Selektin, rmVCAM-1 und rmCCL-11) beschichtet wurden (Frommhold, D., *et al.*, 2008). Um die Wirkung der einzelnen murinen rekombinanten Proteine und deren Interaktionen während der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten zu untersuchen, wurden die Mikroflussskammern mit unterschiedlichen rekombinanten murinen Proteinzusammensetzungen beschichtet. Hierbei wurden Adhäsionskammern (rmCCL-11/rmVCAM-1/rmP-Selektin) von Rollkammern (rmVCAM-1/rmP-Selektin, rmVCAM-1, rmP-Selektin) und Kontrollkammern (PBS/0,1%BSA) unterschieden und miteinander verglichen. Diese wurden sowohl mit dem Vollblut der lebenden *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse, als auch mit dem Vollblut der lebenden WT-Mäuse perfundiert. In den mit rmCCL-11/rmVCAM-1/rmP-Selektin beschichteten Mikroflussskammern kam es im Vergleich zu den Rollkammern (rmVCAM-1/rmP-Selektin, rmVCAM-1, rmP-Selektin) und Kontrollkammern (PBS/0,1%BSA) zu einer signifikant erhöhten Anzahl adhärenter eosinophiler Granulozyten.

Diese Ergebnisse konnten sowohl in den Adhäsionskammern der WT-Mäuse als auch in den Adhäsionskammern der *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse reproduziert werden. Nicht nur in den Roll- sondern auch in den Kontrollkammern fehlte der rekombinate murine Chemokinligand CCL-11. Folglich kam es zu keiner Interaktion mit dem auf der Oberfläche der murinen eosinophilen Granulozyten exprimierten CCR-3. Eine Adhäsion eosinophiler Granulozyten auf den beschichteten Roll- und Kontrollkammern wurde so verhindert. Schließlich konnten die erhobenen Resultate der *ex vivo* Mikroflussskammerexperimente bestätigen, dass die Adhäsion eosinophiler Granulozyten von CCR-3 abhängig ist. Somit reproduzieren unsere Ergebnisse die bereits von Phillips, R.M., und Kollegen erhobenen Daten (Phillips, R.M., *et al.*, 2003). Um die Spezifität der Interaktion zwischen CCR-3, der ausschließlich von eosinophilen Granulozyten gebildet und exprimiert wird, und den entsprechenden Chemokinliganden zu erhöhen, verwendeten wir für die Beschichtung der Mikroflussskammern CCL-11, der die höchste Affinität zu CCR-3 aufweist (Ley, K., *et al.*, 2007), (Phillips, R.M., *et al.*, 2003). Diese spezifische Interaktion auf der Chemokinrezeptor–Chemokin Achse CCR-3-CCL-11 konnte bereits im Gastrointestinaltrakt (Ley, K., *et al.*, 2007), (Blanchard, C., *et al.*, 2017), (Zhang, M., *et al.*, 2017), im Thymus (Gouon-Evans, V., *et al.* 2000), (Rothenberg, M.E., *et al.*, 2001), in Brustdrüsen und im Uterus belegt werden (Marchial, T., *et al.*, 2017). Letztendlich spiegeln unsere Ergebnisse die gezielte Rekrutierung eosinophiler Granulozyten wider.

Auf Grundlage dieser Voraussetzungen untersuchten wir das Adhäsionsverhalten eosinophiler Granulozyten in Abhängigkeit der posttranslationalen Sialylierung des CCR-3, die durch die Sialyltransferase ST3Gal-IV vermittelt wird. Solch eine Sialyltransferase katalysiert den Transfer einer aktivierten Sialinsäure Cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic-Säure (CMP-Sia) auf einen terminalen Kohlenhydratakzeptor (Takashima, S., 2008), unter Bildung einer alpha2,3-glykosidischen Verbindung (Sperandio, M., *et al.*, 2009). Unsere *ex vivo* Mikroflussskammerexperimente konnten zeigen, dass in den Adhäsionskammern (rmP-Selektin, rmVCAM-1 und rmCCL-11), die mit dem Vollblut der *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen perfundiert wurden, die Anzahl der adhärenen eosinophilen Granulozyten signifikant niedriger als in den identisch beschichteten Adhäsionskammern, die mit Vollblut der WT-Mäusen perfundiert wurden, waren. Folglich sind die CCR-3 getriggerten Adhäsionen eosinophiler Granulozyten stark von der posttranslationalen Sialylierung, abhängig. Diese Ergebnisse unterstützen stark die Hypothese, dass CCR-3 vermittelte Vorgänge zur festen



Adhäsion eosinophiler Granulozyten führen und in *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen beeinträchtigt sind. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse, dass der Adhäsionsdefekt auf eosinophilen Granulozyten lokalisiert ist. Bisher untersuchten Studien nur das Adhäsionsverhalten neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal-IV. Hier konnte mit Hilfe der *ex vivo* Mikroflussskammerexperimente nachgewiesen werden, dass in Mikroflussskammern der *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen die Anzahl der adhärenenten neutrophilen Granulozyten signifikant niedriger gewesen war als in Mikroflussskammern der WT-Mäuse. Die posttranslationale Modifikation der Sialyltransferase ST3Gal-IV beeinflusst hierbei die CXCL-11-CXCR-2 Achse. Anschließende Untersuchungen konnten zeigen, dass die transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten in *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen ebenfalls signifikant reduziert ist (Frommhold, D., *et al.*, 2008). Ferner analysierten Ellies, L.G., und Kollegen das Leukozytenrollen im entzündeten Musculus cremaster mit Hilfe der Intravitalmikroskopie. Hierbei konnte kein Zusammenhang zwischen der Selektinligandensynthese und das Fehlen der Sialyltransferase ST3Gal-IV hergestellt werden. Das Leukozytenrollen war in *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht beeinträchtigt (Ellies, L.G., *et al.*, 2002). Ebenso konnten weitere Studien zeigen, dass die Rekrutierung myeloider Zellen abhängig von der Sialyltransferase ST3Gal-IV ist. Sowohl in Tumornekrose-alpha stimulierten Endothel, als auch in *ex vivo* Mikroflussskammern und in der Intravitalmikroskopie der Aa. Carotiden konnte beobachtet werden, dass *St3Gal4*<sup>-/-</sup> Myeloidzellen ein deutlich reduziertes Bindungsverhalten zu Ccl5 zeigten. Infolgedessen war die Ccl5-getriggerte Integrinaktivierung vermindert und somit die Rekrutierung der myeloiden Zellen in das Gewebe deutlich reduziert. Dieser wichtige Aspekt spielt in der Entstehung der Atherosklerose eine bedeutende Rolle (Döring, Y., *et al.*, 2014). Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass die posttranslationale Sialylierung ein regulierender Mechanismus ist, der die Chemokin getriggerte Rekrutierung einiger Leukozytensubpopulationen bedingt. Allerdings bleibt es momentan unklar, wie zelltypische Expressionen verschiedener Sialyltransferasen bei der Chemokinrezeptor-vermittelten Leukozytenadhäsion mitwirken. Für die ST3Gal Sialyltransferasefamilie sind sechs verschiedene Isoenzyme beschrieben worden (Sperandio, M., 2006). Vorherige Studien über ST3Gal Sialyltransferasen haben die unterschiedlichen Substratspezifitäten und Gewebeexpressionen verschiedener Isoenzyme deutlich gemacht (Harduin-Lepers, A., *et al.*, 2001). ST3Gal-IV teilt Substratspezifität meistens mit ST3Gal-VI und, in einem geringen Maße, mit ST3Gal-III. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass ST3Gal-VI (außerdem

ST3Gal-IV) auch in die Regulation Chemokinrezeptor getriggelter Leukozytenadhäsion involviert sein könnte. Zukünftige Studien mit *St3gal6* <sup>-/-</sup> Mäusen und *St3gal6* <sup>-/-</sup>/*St3gal4* <sup>-/-</sup> Mäusen werden helfen, die Rolle der Sialylierung auf die Chemokinrezeptorfunktion weiter aufzuklären (Frommhold, D., *et al.*, 2008).

Aufgrund dieser Ergebnisse könnte zukünftig die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien bei eosinophil-abhängigen Krankheiten in Betracht gezogen und initiiert werden. Eine medikamentöse Inhibition der Sialyltransferase ST3Gal-IV könnte, beispielsweise, die unerwünschte Rekrutierung eosinophiler Granulozyten während inflammatorischer Prozesse, wie z.B. bei Allergien, Atopischen Dermatitis (Guttman-Yassky, E., *et al.*, 2017), (Furie, M., *et al.*, 2017), Asthma bronchiale (Yancey S.W., *et al.*, 2017), (Casciano, J., *et al.*, 2017) oder die Entwicklung Autoimmunerkrankungen (Cipriani, F., *et al.*, 2017), verhindern. Ferner könnte durch die Inhibition der Sialyltransferase ST3Gal-IV die Fähigkeit eosinophiler Granulozyten etablierte Klassifikationsparadigmen bei verschiedenen allergischen und autoimmunen Krankheiten zu verändern, verloren gehen (Ramirez, G.A., *et al.*, 2018).

Eosinophile Granulozyten sind sowohl bei myeloischen malignen Erkrankungen als auch bei lymphatischen malignen Erkrankungen beteiligt. Sofern infektiöse oder immunologische Erkrankungen als Ursache für eine persistierende Hypereosinophilie ausgeschlossen werden können, werden hämatoonkologische Erkrankungen vermutet (Ramirez, G.A., *et al.*, 2018). Bisher konnten unterschiedliche pathogenetische Mechanismen die Beteiligung eosinophiler Granulozyten an hämatologisch klonalen Erkrankungen zeigen. In myeloischen Erkrankungen liegen genetische Defekte (Punktmutation, Chromosomenrearrangement) in hämatopoietischen Stammzellen vor. Hierbei sind hauptsächlich die Tyrosinkinase-Gene betroffen. Infolgedessen kommt es zur Dysregulation des Zellsignallings und der Proliferation mit einer Zunahme eosinophiler Granulozyten (Reiter, A., *et al.*, 2017). Lymphoproliferative Erkrankungen oder lymphatische Leukämien werden durch eine oder mehrere Defekte verursacht, die eine Zunahme von Lymphozyten oder Blasten bedingen. Eosinophile Granulozyten stellen einen Teil der Mikroumwelt für diese Zellen dar (Ramirez, G.A., *et al.*, 2018). Als Komponenten der immunologischen Mikroumwelt besitzen eosinophile Granulozyten die Fähigkeit Entstehung und Progression von Tumoren zu modulieren. In Abhängigkeit des Umgebungsmilieus schütten sie entweder nichtkarzinogene (z.B. TNF-alpha, IL-6, kationische Proteine) oder karzinogene Moleküle aus. Infolgedessen besitzen sie

in einigen Neoplasien eine antikanzernogene Rolle (z.B. Melanomen, gastralen, kolorektalen, oralen und Prostatakarzinomen), und in anderen eine prokarzinogene ( z.B. Hodgkin Lymphom, Cervix-CA)(Varricchi, G., *et al.*, 2017). Aufgrund der eosinophilen Expansion bei genetischen Mutationen führte die World Health Organization eine neue Kategorie ein, die als “Myeloid/lymphoid neoplasms with eosinophilia and rearrangement of *PDGFRA*, *PDGFRB*, or *FGFR1*, or with *PCMI-JAK2*” bezeichnet wird (Arber, D.A., *et al.*, 2016). Ein weiterer wichtiger Aspekt in der Entstehung von Tumoren in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal-IV gelang kürzlich Pan, Y., und Kollegen. Diese konnten den Zusammenhang zwischen den Einfluss der Mikro-RNA auf die Sialyltransferase ST3Gal-IV und die Entstehung eines Nierenzellkarzinoms (RCC) herstellen. Mikro-RNA ist bedeutsam in der Modulierung, Proliferation, Invasion, Metastasierung und Apoptose von Krebszellen. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Mikro-RNA-Konzentration von miR-193a-3p und miR-224signifikant höher in Nierenzellkarzinomgewebe und den entsprechenden Zellreihen gewesen ist. Im Gegensatz dazu war die Konzentration von ST3Gal-IV in nicht Tumorgewebe deutlich höher als im Tumorgewebe. Schließlich ist die Expression von ST3Gal-IV negativ korrelierend zu Mikro-RNA miR-193a-3p and miR-224. Auf Grundlage dieser Ergebnisse bewirkt die Inhibition der Sialyltransferase ST3Gal-IV die Zunahme der Tumorzellproliferation und Migration durch den Konzentrationsanstieg der Mikro-RNA miR-193a-3p and miR-224 (Pan, Y., *et al.*, 2018).

Letztlich könnten diese neuen Erkenntnisse dazu beitragen neue therapeutische Strategien in der Behandlung von Tumoren durch die Hemmung/ Aktivierung der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten zu entwickeln.

Schließlich liefern unsere Ergebnisse einen neuen Nachweis für eine wichtige Rolle der Sialyltransferasen ST3Gal-IV bei den CCR-3 vermittelten Adhäsionen eosinophiler Granulozyten. Dadurch kann die Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien in der Therapie von CCR-3 vermittelten Krankheiten initiiert werden. Diese Ergebnisse sollten auch für weitere Studien zur Aufklärung der Rolle von posttranslationalen Sialylation/ Glykosylation von Chemokinrezeptorfunktionendienen.

### **5.3 Der Einfluss der Sialyltransferase ST3Gal-IV bei der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen**

Weltweit leiden eine Vielzahl von Menschen unter degenerativen und entzündlichen Krankheiten wie z.B. an Osteoporose, COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease), Arthritis, Atherosklerose, entzündliche Darmerkrankungen und Multiple Sklerose. Die klinische Manifestation chronischer Erkrankungen, aber auch akut entzündlicher Erkrankungen, wie myokardialer Infarkt und apoplektischer Insult, spiegeln das Gleichgewicht zwischen Gewebsschädigung und Gewebereparatur wider. Die meisten gegenwärtigen Therapien für diese Erkrankungen zielen meist auf die entzündliche Komponente ab, ohne jedoch auf den Reparaturprozess einzuwirken (Sackstein, R., 2012). Stammzellbasierte Therapien bieten u.a. eine effektive Gelegenheit auch Geweberegenerationen zu erreichen, entweder durch direkte Beisteuerung der Bildung von neuen Zellen oder/und durch umweltbedingte trophische Effekte. Diese führen zur Rekrutierung oder Unterstützung anderer Zellen, die wichtig für das erneute Wachstum des Gewebes sind. Stammzellen haben, in Abhängigkeit vom Stammzellentyp, immunmodulierende wirksame Effekte während Entzündungsreaktionen. Folglich ist das Ziel aller zellbasierten Therapeutika Methoden zu entwickeln, die die Expression und Aktivität von molekularen Effektoren optimieren und demzufolge die physiologische Rekrutierung intravaskulär verabreichter Stammzellen zu verbessern (Sackstein, R., 2012).

Unser Ziel ist es gewesen einerseits zu zeigen, dass die Adhäsion von hämatopoietischen Vorläuferzellen durch CXCR-4 vermittelt wird und andererseits, dass die CXCR-4 getriggerte Adhäsion stark von der posttranslationalen Sialylierung durch die Sialyltransferase ST3Gal-IV abhängig ist. Die Rekrutierung von zirkulierenden hämatopoietischen Vorläuferzellen beinhaltet einen koordinierten Ablauf von Ereignissen. Charakteristisch binden hämatopoietische Vorläuferzellen an der Endotheloberfläche. Diese adhäsiven Kontakte werden durch Moleküle vermittelt, die als „homing receptors“ bezeichnet werden. Sie sind für den direkten Gewebetropismus von zirkulierenden hämatopoietischen Vorläuferzellen in das betreffende Zielgewebe verantwortlich. Letztlich wird die Rekrutierungskaskade durch eine Kombination von „homing receptors“ und Chemokinrezeptoren vermittelt (Sackstein, R.,

2012). In einem reduktionistischen System, in welchem alle endotheliale Akteure bekannt gewesen sind, untersuchten wir die CXCR-4 abhängige Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen. Hierzu verwendeten wir das *ex vivo* Mikroflussskammersystem. Die Oberflächen der Mikroflussskammern wurden mit unterschiedlichen rekombinanten murinen Proteinzusammensetzungen beschichtet, umso die Wirkung der einzelnen murinen rekombinanten Proteine und deren Interaktion während der Adhäsion von hämatopoietischen Vorläuferzellen zu analysieren. Hierbei unterschieden wir zwischen Adhäsionskammern (rmCXCL-12/rm VCAM-1/rmE-Selektin) und Kontrollkammern (rmVCAM-1/rmE-Selektin, rmVCAM-1, rmE-Selektin), die wir anschließend miteinander verglichen. Die hämatopoietischen Vorläuferzellen wurden mittels FACS Sorting, sowohl aus dem Knochenmark der *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse, als auch aus dem Knochenmark der WT- Mäuse isoliert. Anschließend erfolgte die Perfusion der hämatopoietischen Vorläuferzellen mittels Pumpe durch die Mikroflussskammern. Im Vergleich zu den Kontrollkammern (rmVCAM-1/rmE-Selektin, rmVCAM-1, rmE-Selektin) kam es in den mit CXCL-12/rm VCAM-1/rmE-Selektin beschichteten Mikroflussskammern zu einer signifikant erhöhten Anzahl von adhärenenten hämatopoietischen Vorläuferzellen. Dieses Ergebnis konnte sowohl in den Adhäsionskammern der WT-Mäuse als auch in den Adhäsionskammern der *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäuse beobachtet werden. Aufgrund des fehlenden rekombinanten murinen CXCL-12 in den Kontrollkammern erfolgte keine Interaktion mit dem auf der Oberfläche der murinen hämatopoietischen Vorläuferzellen exprimierten CXCR-4. Die erhobenen Resultate unserer *ex vivo* Mikroflussskammerexperimente konnten somit belegen, dass die Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen von CXCR-4 abhängig ist. Letztlich unterstützen unsere Ergebnisse u.a. die bereits von Kryczek, I., und Kollegen erhobenen Daten (Kryczek, I., *et al.*, 2007). Weitere Studien zeigten, dass die HSPC-Migration in das Knochenmark von der Expression von E-Selektinliganden in Kombination mit dem Chemokinrezeptor CXCR-4 und VLA-4 auf der Oberfläche der HSPCs abhängig ist (Gerard, C., *et al.*, 2001). Unter anderem deckten intravitalmikroskopische Untersuchungen in Mäusen auf, dass das Homing von HSPC in das Knochenmark durch der Interaktion zwischen CXCR-4 und CXCL-12 determiniert wird (Gerard, C., *et al.*, 2001), (Sackstein, R., 2012).

Auf Grundlage dieser Voraussetzungen untersuchten wir das Adhäsionsverhalten hämatopoietischer Vorläuferzellen in Abhängigkeit der posttranslationalen Sialylierung des CXCR-4, die durch die Sialyltransferase ST3Gal-IV vermittelt wird. Unsere *ex vivo*

Mikroflusskammerexperimente zeigten, dass die Anzahl adhärenter hämatopoietischer Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark der WT- Mäuse gewonnen wurden, signifikant höher in den Adhäsionskammern (rmE-Selektin, rmVCAM-1 und rmSDF-1) waren, als die Anzahl der adhärenen hämatopoietischen Vorläuferzellen, die aus dem Knochenmark der *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen gewonnen wurden. Diese Ergebnisse unterstützen stark die Hypothese, dass CXCR-4 vermittelte Vorgänge zur festen Adhäsion von HSPCs führen und in *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen beeinträchtigt sind. Daraus resultiert, dass die CXCR-4 getriggerte Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen stark von der posttranslationalen Sialylierung mittels der Sialyltransferase ST3Gal-IV abhängig ist und diese somit die CXCR-4-CXCL-12 Achse beeinflusst. Zusätzlich zeigen die Resultate, dass der Adhäsionsdefekt auf der Oberfläche der HSPC lokalisiert ist. Zwar weisen unsere erhobenen Ergebnisse darauf hin, dass die posttranslationale Sialylierung ein neu regulierender Mechanismus ist, der durch die Chemokin getriggerte Rekrutierung einiger HSPCs bedingt sein könnte. Allerdings bleibt es momentan unklar wie zelltypische Expressionen verschiedener Sialyltransferasen bei der Chemokinrezeptor-vermittelten HSPC-Adhäsion mitwirken. Ferner konnten Studien zeigen, dass CXCR-4 auf der Oberfläche von HSPCs nicht nur eine Schlüsselrolle in der Hämatopoiese, sondern auch in der Organogenese, in der Entwicklung und Organisation des Immunsystems (Burger, J.A., *et al.*, 2006) und während der Reparatur und Regeneration von Gewebe spielt (Tamamis, P., *et al.*, 2014). Während der Organogenese entsteht durch die Interaktion zwischen CXCL-12 und CXCR-4 eine pleiotrope Aktivität, die nicht nur die hämatopoietische, sondern auch die neurale, vaskuläre, kardiale und craniofaciale Organogenese beeinflusst. Bei einem Verlust einer dieser Bindungspartner kommt es zu schwerwiegenden Organschäden, die bereits pränatal zu einem Fruchttod oder zum Exitus innerhalb der ersten Lebensstunden führen (Ley, K., *et al.*, 2007). Die Ergebnisse der Untersuchungen von Grafte-Faure, S., und Kollegen konnten zusätzlich zeigen, dass CXCR-4 u.a. auch auf der Oberfläche von Bindegewebszellen des Knochenmarks produziert werden. Diese wirken und beeinflussen die Proliferation und Differenzierung der hämatopoietischen Vorläuferzellen (Grafte-Faure, S., *et al.*, 2000).

Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte zeigen, dass nicht nur ein Defekt der Sialyltransferase ST3Gal-IV zu einer verminderten Adhäsion von HSPC führt, sondern auch der Verlust der Sialyltransferase ST3Gal-III. Ein Defekt dieser Sialyltransferase ist verantwortlich für die Entwicklung des West Syndroms. Dieses altersabhängige-epileptische-

enzephalopatische Syndrom führt zur intellektuelle Regression der Patienten. Diese Studie konnte sowohl, die molekularen, als auch zellulären Mechanismen als Ursache für die Entstehung dieser genetisch bedingten Erkrankung aufdecken (van Diepen, L., *et al.*, 2018).

Bereits Gerard, C., und Kollegen wiesen 2001 daraufhin, dass die Wiederherstellung einer effektiven Hämatopoiese nach einer Stammzelltransplantation von der Fähigkeit der infundierten HSPCs in das Knochenmark einzuwandern, abhängig ist (Gerard, C., *et al.*, 2001). Neuere Studien konnten ebenfalls wie auch unsere Untersuchungen zeigen, dass das Homing von HSPC in die hämatopoietischen Mikroumwelt von der posttranslationalen Modifikation abhängig ist. Robinson, S.N., und Kollegen wiesen nach, dass verschiedene leukozytäre Antigene ein verspätetes Anwachsen hämatopoietischer Stammzellen während der Stammzelltransplantation verursachen. Als Ursache hierfür nennen sie u.a. einen niedrigen Anteil von Fucosyltransferase. Dies verhindert eine erfolgreiche Adhäsion von HSPCs an die Endotheloberfläche des Knochenmarks (Robinson, S.N., *et al.*, 2017). Die Expression von Fucosyltransferase 6 begünstigt einen signifikanten Anstieg von E-Selektinliganden auf der Zelloberfläche. Experimente zeigten, dass eine Behandlung der HSPCs mit Fucosyltransferase vor einer Stammzelltransplantation sowohl zu einer verbesserten Bindungs- und Rollinteraktion als auch zur einer vermehrten Extravasation in das Endothel unter Flussbedingungen führt (Lee, J., *et al.*, 2017). Die bereits erwähnte hämatopoietische Mikroumwelt im Knochenmark benötigt HSPCs zur Weiterentwicklung. Diese individuelle Mikroumwelt wird als Nische bezeichnet und befindet sich im erwachsenen Knochenmark in sinusoidalen perivaskulären Arealen (vaskuläre Nischen) oder im Trabekelendosteum (osteoblastische Nischen) (Morrison, S.J., *et al.*, 2008). Nicht nur im Knochenmark existieren die Nischen der HSPCs, sondern auch im extramedullären Gewebe (Majka, S.M., *et al.*, 2003). Die von Schulz, C., und Kollegen erhobenen Ergebnisse zeigten, dass ein Wegfall des CXCL12-CXCR4 vermittelten Zellsignaling zu einer schnellen Mobilisation von HSPC aus den Nischen des Knochenmarks führt (Schulz, C., *et al.*, 2009).

Letztendlich offenbaren die erhobenen Ergebnisse dieser Promotionsarbeit, dass es unter dem Wegfall der Sialyltransferase ST3Gal-IV zu einer signifikanten Reduktion der Adhäsion HSPCs aus *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen kam. Die veränderte posttranslationale Modifikation in *St3gal4*<sup>-/-</sup> Mäusen führt durch den Verlust der Sialyltransferase ST3Gal-IV zu einer neuen, abweichenden Modifikation und Modulation in

der Funktion von CXCR-4. Da die Adhäsion von HSPC über die CXCR4-CXCL12-Achse erfolgt, führt die posttranslationale Modifikation der Sialyltransferase ST3Gal-IV zu einer verminderten Auswanderung von HSPCs in das Knochenmark. Jedoch könnte bei einer allogenen Stammzelltransplantation eine zusätzliche Behandlung der Spenderzellen mit ST3Gal-IV die Adhäsionsrate erhöhen, da die Erholung der Hämatopoiese nach einer Transplantation von der Fähigkeit der infundierten HSPCs, in das Knochenmark zu rekrutieren, abhängig ist. Diese Ergebnisse sollten schließlich auch für weitere Studien zur Aufklärung der Rolle von posttranslationaler Sialylierung/ Glykosylation von Chemokinrezeptorfunktionen dienen.



#### **5.4 Der pathophysiologische Zusammenhang zwischen der Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und der Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen in Abhängigkeit der Sialyltransferase ST3Gal-IV während einer Entzündung**

Forschungsgruppen konnten zeigen, dass hämatopoietische Vorläuferzellen in entzündlich verändertes Gewebe rekrutieren, u.a. bei allergischen Erkrankungen. Die hämatopoietischen Vorläuferzellen bedienen sich dabei des gleichen Rekrutierungsprozesses und der gleichen Rekrutierungsmoleküle wie es bei Immunzellen bereits bekannt ist. Dabei verwenden HSPC für die Auswanderung in das periphere Gewebe ähnliche Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren, wie sie für das Homing in das Knochenmark benutzen (u.a. PSGL-1, VLA-4) (Blanchet, M.R., *et al.*, 2009). Zudem zeigten mehrere Studien die potentielle Rolle von frühen hämatopoietischen Progenitorzellen und hämatopoietischen Stammzellen (HSPC) in der Entstehung von Allergien und Entzündungen. So besitzen HSPC die Möglichkeit, ins entzündlich veränderte Gewebe einzuwandern und sich anschließend zu differenzieren (Blanchet, M.R., *et al.*, 2009).

Während der Entwicklung einer Atemwegsinfektion erhöhen sich die Vorläuferzellen im Knochenmark. Studien wiesen daraufhin, dass es 24 Stunden nach Beginn der Infektion zu einer Zunahme eosinophiler Vorläuferzellen im Knochenmark kam. Dies korreliert mit dem Anstieg eosinophiler Granulozyten im Blut und im Gewebe. Ebenso konnten Spitzenwerte in der Produktion von IL-5 und Eotaxin-1 nachgewiesen werden (Blanchet, M.R., *et al.*, 2008). Durch die erhöhte Bildung des Schlüsselzytokins Interleukin 5 kommt es sowohl zum vermehrten Wachstum und Differenzierung als auch zu einer gesteigerten Reifung, Rekrutierung und Aktivierung eosinophiler Granulozyten während der Entzündung (Hogan, S.P., *et al.*, 2008). Durch die vermehrte Herstellung von Eotaxin-1 wird die Rekrutierung und Migration eosinophiler Granulozyten zusätzlich gefördert (Philips, R.M., *et al.*, 2003). Andere Studien konnten den Zusammenhang herstellen, dass Zytokine und Chemokine, die während

einer Entzündung gebildet werden, die Rekrutierung und den Verkehr eosinophiler Vorläuferzellen beeinflussen (Sehmi, R., *et al.*, 2003).

Interessanterweise ist die Rekrutierung hämatopoietischer Vorläuferzellen nicht nur bei der Entstehung von Allergien, sondern auch bei der Entwicklung chronischer Entzündungen beteiligt. Sobald sich hämatopoietische Vorläuferzellen zu reifen Immunzellen *in situ* differenzieren, besitzen sie die Möglichkeit die Chronifizierung einer Erkrankung zu beeinflussen (Wright, D.E., *et al.*, 2001).

Weiterhin besitzen hämatopoietische Vorläuferzellen nicht nur die Fähigkeit aus dem Knochenmark in das entzündliche Gewebe auszuwandern, sondern auch über das Kreislaufsystem in Leber, Lunge, Dünndarm und Nieren. Ferner konnten hämatopoietische Vorläuferzellen in thorakalen Lymphgängen gefunden werden (Massberg, S., *et al.*, 2007). Sie können nicht nur in die bereits genannten Organe rekrutieren, sondern besitzen zusätzlich die Fähigkeit der Rezirkulation zwischen Knochenmark, Blut, extramedullären Gewebe und Lymphkompartiment (Schulz, C., *et al.*, 2009).

## 6 Abkürzungsverzeichnis

C57Bl6	C57 black 6
CCL	C-C Chemokinligand
CCL-11	Eotaxin-1
CCL-24	Eotaxin-2
CCL-26	Eotaxin-3
CCR	C-C Chemokinrezeptor
CCR-2	C-C Chemokinrezeptor 2
CCR-3	C-C Chemokinrezeptor 3
CCR-5	C-C Chemokinrezeptor 5
CD	Cluster of Differentiation
CD44	Cluster of Differentiation 44
CMP-Sia	Cytidine-5'-monophospho-N-acetylneuraminic-Säure
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CXCL	C-X-C Chemokinligand
CXCL-12	C-X-C Chemokinligand 12
CXCR	C-X-C Chemokinrezeptor
CXCR-4	C-X-C Chemokinrezeptor 4

ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK-2	Extrazelluläre signal-regulierte Kinase-2
ERM	Ezrin, Radixin, Moesin
ESL-1	E-Selektin Ligand-1
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FOV	Field of view
Fuct	Fukosyltransferase
Fuct4	Fukosyltransferase 4
Fut7	Fukosyltransferase 7
Gal	Galaktose
GalNAc	N-Acetylgalaktosamin
GlcNAc-T	Beta 1,6-N-Acetylglukosaminyltransferase
HSCP	Hämatopoetischen Stammzellen und Precursorzellen
ICAM-1	Intercellular adhesions molecule 1
LFA-1	Lymphocyte function associated antigen 1
mAbs	Monoklonalen Antikörper
Mac-1	Macrophage-1 antigen
MAPK	Mitogenaktivierten Proteinkinase
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein 1

MCP-2	Monozyten chemotaktisches Protein 2
MCP-3	Monozyten chemotaktisches Protein 3
Naf-1	Nef-assoziiierter Faktor-1
NaCl	Natriumchlorid
PMN	Neutrophiler Granulozyt
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand 1
RANTES	Regulated on activation T expressed and secreted
RCC	Renal Cell Carcinom
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
sLe <sup>x</sup>	Sialyl Lewis X
TierSchG	Tierschutzgesetz
TNF	Tumornekrosefaktor
VCAM-1	Vascular cell adhesions molecule 1
VLA-4	Very late Antigen 4
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7 Literaturverzeichnis

Arber, D.A., Orazi, A., Hasserjian, R., The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016. **127**:2391–2405.

Aulakh, G.K., Petri, B., Wojcik, K.M., Colarusso, P., Lee, J.J., Patel, K.D., Inhibiting focal adhesion kinase (FAK) blocks IL-4 induced VCAM-1 expression and eosinophil recruitment in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol*. 2018. **104**:147-158.

Beauharnois, M.E., Linnquist, K.C., Marathe, D., Vanderslice, P., Xia, J., Matta, K.L., Neelamegham, S., Affinity and kinetics of sialyl Lewis-X and core-2 based oligosaccharides binding to L- and P-selectin. *Biochemistry*. 2005. **44**:9507-9519.

Blanchard, C., Simon, D., Schoepfer, A., Straumann, A., Simon, H.-U., Eosinophilic esophagitis: unclear roles of IgE and eosinophils. *Journal of Internal Medicine*. 2017. **281**:448–457.

Blanchet, M.R., Maltby, S., Haddon, D.J., Merckens, H., Zbytnuik, L., McNagny, K.M., CD34 facilitates the development of allergic asthma. *Blood*. 2007. **110**:2005-12.

Braga, F.G., Ruas, L.P., Pereira, R.M., Lima, X.T., Antunes, E., Mamoni, R.L., Blotta, M.H.S.L. Functional and phenotypic evaluation of eosinophils from patients with the acute form of paracoccidioidomycosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017. **11**:e0005601.

Burger, J. A., Kipps, T. J. CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood*. 2006. **107**:1761–1767.

Buzzeo, M.P., Yang, J., Casella, G., Reddy, V., Hematopoietic stem cell mobilization with G-CSF induces innate inflammation yet suppresses adaptive immune gene expression as revealed by microarray analysis. *Exp Hematol*. 2007. **35**:1456-65.

Casciano, J., Krishnan, J., Dotiwala, Z., Li, C., Sun, S.X. Clinical and economic burden of elevated blood eosinophils in patients with and without uncontrolled asthma. *Journal of Managed Care and Specialty Pharmacy*. 2017. **23**:85–91.

Carman, C.V., Springer, T.A., A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J.Cell. Biol.* 2004. **167**:377-388.

Cipriani, F., Marzatico, A., Ricci, G., Autoimmune diseases involving skin and intestinal mucosa are more frequent in adolescents and young adults suffering from atopic dermatitis. *The Journal of Dermatology.* 2017. **44**:1341–1348.

Davido, B., Makhloufi S., Matt M., Changes in eosinophil count during bacterial infection: revisiting an old marker to assess the efficacy of antimicrobial therapy. *International Journal of Infectious Diseases.* 2017. **61**:62–66.

Dent, P.,Lavoinnie, A., Nakielnny, S., Caudwell, F.B., Watt, P., Cohen, P., The molecular mechanism by which insulin stimulates glycogen synthesis in mammalian skeletal muscle.*Nature.*1990.**348**:302-8.

De La Luz Sierra, M., Yang, F., Narazaki, M., Salvucci, O., Davis, D., Yarchoan, R., Zhang, H.H., Fales, H., Tosato, G. , Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood.* 2010. **103**:2452–2459.

Deloukas, P., Earthrowl, M.E., Grafham, D.V. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 10.*Nature.* 2004. **429**:375–81.

Döring, Y., Noels, H., Mandl, M., Kramp, B., Neideck, C., Lievens, D., Drechsler, M., Megens, R.T., Tilstam, P.V., Langer, M., Hartwig, H., Theelen, W., Marth, J.D., Sperandio, M., Soehnlein, O., Weber, C.,Deficiency of the sialyltransferase St3Gal4 reduces Ccl5-mediated myeloid cell recruitment and arrest: short communication.*Circ Res.* 2014 **114**:976-81.

Ellies, L.G., Sperandio, M., Underhill, G.H., Yousif, J., Smith, M., Priatel, J.J., Kansas, G.S., Ley, K., Marth, J.D., Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation. *Blood.* 2002. **100**:3618-3625.

Eriksson, E.E., Xie, X., Werr, J., Thoren, P., Lindbom, L., Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J. Exp. Med.* 2001. **194**:205-218.

Evans, E.A., Calderwood, D.A., Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science*. 2007. **316**:1148-53.

Frommhold, D., Ludwig, A., Bixel, M.G., Zarbock, A., Babushkina, I., Weissinger, M., Cauwenberghs, S., Ellies, L.G., Marth, J.D., Beck-Sickinger, A.G., Sixt, M., Lange-Sperandio, B., Zernecke, A., Brandt, E., Weber, C., Vestweber, D., Ley, K., Sperandio, M., Sialyltransferase ST3Gal-IV controls CXCR2-mediated firm leukocyte arrest during inflammation. *J. Exp. Med.* 2008. **205**:1435-1446.

Furie, M., Chiba, T., Tsuji, G., Atopic dermatitis: immune deviation, barrier dysfunction, IgE autoreactivity and new therapies. *Allergology International*. 2017. **66**:398–403.

Ge, X.N., Bastan, I., Dileepan, M., Greenberg, Y., Ha, S.G., Stehen, K.A., Bernlohr, D.A., Rao, S.P., Sriramarao, P., FABP4 regulates eosinophil recruitment and activation in allergic airway inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2018. **315**:L227-L240.

Gerard, C., Rollins B.J., Chemokines and disease. *Nat. Immunol.* 2001. **2**:108-115.

Grafte-Faure, S., Leveque, C., Ketata, E., Jean, P., Vasse, M., Soria, C., Vannier, J.P., Recruitment of primitive peripheral blood cells: synergism of interleukin 12 with interleukin 6 and stromal cell-derived FACTOR-1. *Cytokine*. 2000. **12**:1-7.

Guerra, E.S., Lee, C.K., Specht, C.A., Yadav, B., Huang, H., Akalin, A., Central role of IL-23 and IL-17 producing eosinophils as immunomodulatory effector cells in acute pulmonary aspergillosis and allergic asthma. *PLoS pathogens*. 2017. **13**.

Guttman-Yassky, E., Krueger, J.G., Atopic dermatitis and psoriasis: two different immune diseases or one spectrum? *Current Opinion in Immunology*. 2017. **48**:68–73.

Harduin- Lepers, A., Vallejo-Ruiz, V., Krzewinski-Recchi M.A., Samyn-Petit B., Julien S., Delannoy, P., The human sialyltransferase family. *Biochimie*. 2001. **83**:727-737.

Hidalgo, A., Peired, A.J., Wild, M.K., Vestweber, D., Frenette, P.S., Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*. 2007. **26**:477-489.



Hogan, S.P., Rosenberg, H.F., Moqbel, R., Phipps, S., Foster, P.S., Lacy, P., Kay, A.B., Rothenberg, M.E., Eosinophils: biological properties and role in health and disease. *Clin Exp Allergy*. 2008. **38**:709-50.

Humphries, M.J., *Integrin structure*. *Biochem. Soc. Trans.* 2000. **28**:311–339.

Hynes, R., Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. 2002. **110**:673-87.

Kampen, G.T., Stafford, S., Adachi, T., Jinguan, T., Quan, S., Grant, J.A., Skov, P.S., Poulsen, L.K., Alam, R., Eotaxin induces degranulation and chemotaxis of eosinophils through the activation of ERK2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *Blood*. 2000. **95**:1911–1917.

Kerfoot, S.M., Kubes, P., Overlapping roles of P-selectin and alpha4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol*. 2002. **169**:1000-1006.

Kryczek, I., Wie, S., Keller, E., Liu, R., Zou, W., Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis. *Am. J. Physiol., Cell Physiol*. 2007. **292**: 987–995.

Kumar, R., Sharma, P., Dey, P., Thapa, B. R. An unusual cause of fever, generalized lymphadenopathy and eosinophilia in a HCV-positive 6-year-old boy. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2017. **33**:130–132.

Laudanna, C., Kim, J.Y., Constantin, G., Butcher, E., Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. *Immunol. Rev*. 2002. **186**:37-46.

Le, Y., Zhou, Y., Iribarren, P., Wang, J., Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease. *Cellular & Molecular Immunology*. 2004. **1**:95-104

Lee, J., Dykstra, B., Spencer, J.A., Kenney, L.L., Greiner, D.L., Shultz, L.D., Brehm, M.A., Lin, C.P., Sackstein, R., Rossi, D.J., mRNA-mediated glycoengineering ameliorates deficient homing of human stem cell-derived hematopoietic progenitors. *J Clin Invest*. 2017. **127** :2433-2437.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol*. 2007. **7**:678-689.

Majka, S.M., Jackson, K.A., Kienstra, K.A., Majesky, M.W., Goodell, M.A., Hirschi, K.K., Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration.*J Clin Invest.*2003. **111**:71-9.

Marichal, T., Mesnil, C., Bureau, F. Homeostatic eosinophils: characteristics and functions. *Frontiers in Medicine.* 2017. **4**.

Massberg, S., Schaerli, P., Knezevic-Maramica, I., Köllnberger, M., Tubo, N., Moseman, E.A., Huff, I.V., Junt, T., Wagers, A.J., Mazo, I.B., von Andrian, U.H., Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues.*Cell.*2007. **131**:994-1008.

Menzies-Gow, A., Ying, S., Sabroe, I., Stubbs, V.L., Soler, D., Williams, T.J., Kay, A.B., Eotaxin (CCL11) and eotaxin-2 (CCL24) induce recruitment of eosinophils, basophils, neutrophils, and macrophages as well as features of early- and late-phase allergic reactions following cutaneous injection in human atopic and nonatopic volunteers.*J Immunol.*2002. **169**:2712-8.

Morrison, S.J., Spradling, A.C., Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life.*Cell.*2008. **132**:598-611.

Murphy, P.M.,Baggiolini, M.,Charo, I.F.,Hébert, C.A.,Horuk, R.,Matsushima, K.,Miller, L.H.,Oppenheim, J.J.,Power, C.A., International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev.*2000. **52**: 145-76.

Ogilvie, P., Bardi, G., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Uguccioni, M., Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5. *Blood*2001. **97**:1920–1924.

Pan, Y., Hu, J., Ma, J., Qi, X., Zhou, H., Miao, X., Zheng, W., Jia, L.,MiR-193a-3p and miR-224 mediate renal cell carcinoma progression by targeting alpha-2,3-sialyltransferase IV and the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway.*Mol Carcinog.* 2018. **57**:1067-1077.

Phillips, R.M., Stubbs, V.E., Henson, M.R., Williams, T.J., Pease, J.E., Sabroe, I., Variations in eosinophil chemokine responses: an investigation of CCR1 and CCR3 function, expression in atopy, and identification of a functional CCR1 promoter.*J Immunol.*2003. **170**:6190-201.

Phillipson, M., Heit, B., Colarussa, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., Kubes, P., Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J. Exp. Med.* 2006. **203**:2569-2575.

Pick, R., Brechtefeld, D., Walzog, B., Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation. *Mol Immunol.* 2013 **55**:70-5.

Priestley, G.V., Ulyanova, T., Papayannopoulou, T., Sustained alterations in biodistribution of stem/progenitor cells in Tie2Cre<sup>+</sup> alpha4(f/f) mice are hematopoietic cell autonomous. *Blood.* 2007. **109**:109-11.

Pruenster, M., Kurz, A.R., Chung, K.J., Cao-Ehlker, X., Bieber, S., Nussbaum, C.F., Bierschenk, S., Eggersmann T.K., Rohwedder, I., Heinig, K., Immler, R., Moser, M., Koedel, U., Gran, S., McEver R.P., Vestweber, D., Verschoor, A., Leanderson, T., Chavakis, T., Roth, J., Vogl, T., Sperandio, M., Extracellular MRP8/14 is a regulator of beta2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. *Nat Commun.* 2015. **6**:6915.

Ramirez, G.A., Yacoub, M.R., Ripa, M., Mannina, D., Cariddi, A., Saporiti, N., Ciceri, F., Castagna, A., Colombo, G, Dagna, L., Eosinophils from Physiology to Disease: A Comprehensive Review. *Biomed Res Int.* 2018. **2018**:9095275

Rankin, S.M., Conroy, D.M., Williams, T.J., Eotaxin and eosinophil recruitment: implications for human disease. *Mol Med Today.* 2000. **6**:20-7.

Rao, S.P., Ge, X.N., Sriramaraio, P, Regulation of Eosinophil Recruitment and Activation by Galectins in Allergic Asthma. *Front Med (Lausanne).* 2017. **4**:68.

Reiter, A., Gotlib, J., Myeloid neoplasms with eosinophilia. *Blood.* 2017. **129**:704–714.

Rivera-Nieves, J., Burcin, T.L., Olson, T.S., Morris, M.A., McDuffie, M., Cominelli, F., Ley, K., Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis. *J. Exp. Med.* 2006. **203**:907-917.

Robinson, S.N., Thomas, M.W., Simmons, P.J., Lu, J., Yang, H., Javni, J.A., Shpall, E.J., Zweidler-Mckay, P.A., Non-fucosylated CB CD34<sup>+</sup> cells represent a good target for enforced

fucosylation to improve engraftment following cord blood transplantation. *Cytotherapy*. 2017 **19**:285-292.

Rothenberg, M.E., Mishra, A., Brandt, E.B., Hogan, S.P., Gastrointestinal eosinophils in health and disease. *Adv Immunol*.2001. **78**:291-328.

Sackstein, R., Engineering cellular trafficking via glycosyltransferase-programmed stereosubstitution. *Ann N Y Acad Sci*.2012. **1253**:193-200.

Samarasinghe, A.E., Melo, R.C.N., Duan, S., Eosinophils promote antiviral immunity in mice infected with influenza A virus. *The Journal of Immunology*. 2017. **198**:3214–3226.

Schulz, C., von Andrian, U.H., Massberg, S., Hematopoietic stem and progenitor cells: their mobilization and homing to bone marrow and peripheral tissue. *Immunol Res*.2009. **44**:160-8.

Sehmi, R., Dorman, S., Baatjes, A., Watson, R., Foley, R., Ying, S., Robinson, D.S., Kay, A.B., O'Byrne, P.M., Denburg, J.A., Allergen-induced fluctuation in CC chemokine receptor 3 expression on bone marrow CD34+ cells from asthmatic subjects: significance for mobilization of haemopoietic progenitor cells in allergic inflammation. *Immunology*.2003. **109**:536-46.

Simons ,C.M., Stratton, C.W., Kim ,A.S., Peripheral blood eosinophilia as a clue to the diagnosis of an occult *Coccidioides* infection. *Human Pathology*. 2011. **42**:449–453.

Smith, M.L., Sperandio, M., Galkina, E.V., Ley, K., Autoperfused mouse flow chamber reveals synergistic neutrophil accumulation through P-selectin and E-selectin. *J. Leukoc. Biol*. 2004. **76**:985-993.

Sperandio, M., Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *FEBS J*. 2006. **273**:4377-4389.

Sperandio M., Frommhold, D., Babushika, I., Ellies, L.G., Olson, T.S., Smith, M.L., Fritzscheing, B., Pauly, E., Smith, D.F., Nobiling, R., Linderkamp, O., Marth, J.D., Ley, K., Alpha2,3-sialyltransferase-IV is essential for L-selectin ligand function in inflammation. *Eur. J. Immunol*. 2006. **36**:3207-3215.

Sperandio, M., Gleissner, C.A., Ley, K., Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunol. Rev.* 2009. **230**:97-113.

Stellos, K., Gawaz, M., Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment. *Semin Thromb Hemost.* 2007. **33**:159-64.

Tachimoto, H., Ebisawa, M., Bochner, B.S., Cross-talk between integrins and chemokines that influences eosinophil adhesion and migration. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002. **128**:18-20.

Takashima, S., Characterization of mouse sialyltransferase genes: their evolution and diversity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2008. **72**:1155-1167.

Tamamis, P., Floudas, C.A., Elucidating a key component of cancer metastasis: CXCL12 (SDF-1 $\alpha$ ) binding to CXCR4. *J Chem Inf Model.* 2014. **54**:1174–88.

van Diepen, L., Buettner, F.F.R., Hoffmann, D., Thiesler, C.T., von Bohlen-Halbach, O., von Bohlen-Halbach, V., Jensen, L.R., Steinemann, D., Edvardson, S., Elpeleg, O., Schambach, A., Gerardy-Schahn, R., Kuss, A.W.. A patient-specific induced pluripotent stem cell model for West syndrome caused by ST3GAL3 deficiency. *Eur J Hum Genet.* 2018.

Vajkoczy, P., Laschinger, M., Engelhardt, B., Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-, independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. *J. Clin. Invest.* 2001. **108**:557-565.

Varki, A., Cummings, R.D., Esko, J.D., Freeze, H.H., Stanley, P., Bertozzi, C.R., Hart, G.W., Etzler, M.E., *Essentials of glycobiology, 2nd edn.* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009.

Varricchi, G., Galdiero, M.R., Loffredo, S., Lucarini, V., Marone, G., Mattei, F., Marone, G.<sup>1</sup>, Schiavoni, G., Eosinophils: The unsung unbekannte heroes in cancer? *Oncoimmunology.* 2017. **7**:e1393134.

Vestweber, D., Blanks, J.E., Mechanisms that regulate the function of the selectines and their ligands. *Physiol. Rev.* 1999. **79**:181-213.

Wang, H.B., Wang, J.T., Zhang, L., Geng, Z.H., Xu, W.L., Xu, T., Huo, Y., Zhu, X., Plow, E.F., Chen, M., Geng, J.G., P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation. *Nat. Immunol.* 2007. **8**:882-892.

Wardlaw, A.J., The role of adhesion in eosinophil function. *Chem Immunol.* 2000. **78**:93-111.

Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A.P., Johnson, F.L., Weissman, I.L., Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science.* 2001. **294**:1933-6.

Wu, B., Chien, E.Y., Mol, C.D., Fenalti, G., Liu, W., Katritch, V., Abagyan, R., Brooun, A., Wells, P., Bi, F.C., Hamel, D.J., Kuhn, P., Handel, T.M., Cherezov, V., Stevens, R.C. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science.* 2010. **330**:1066-107.

Xia, L., Sperandio, M., Yago, T., McDaniel, J.M., Cummings, R.D., Pearson-White, S., Ley, K., McEver, R.P., P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J. Clin. Invest.* 2002. **109**:939-950.

Yancey, S.W., Keene, O.N., Albers, F.C., Biomarkers for severe eosinophilic asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2017. **140**:1509–1518.

Zarbock, A., Ley, K., Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation* 2009. **16**:31-42.

Zhang, M., Li, Y., Eosinophilic gastroenteritis: a state-of-the-art review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 2017. **32**:64–72.

Zimmermann, N., King, N.E., Laporte, J., Yang, M., Mishra, A., Pope, S.M., Muntel, E.E., Witte, D.P., Pegg, A.A., Foster, P.S., Hamid, Q., Rothenberg, M.E., Dissection of experimental asthma with DNA microarray analysis identifies arginase in asthma pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 2003. **111**:1863-1874.

Zimmermann, N., Hershey, G.K., Foster, P.S., Rothenberg, M.E., Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol.* 2003. **111**:227-42.



## **8 Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst meinem wissenschaftlichen und klinischen Lehrer Prof. Dr. Markus Sperandio, Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München, für seine stets konstruktive Unterstützung meiner klinischen und wissenschaftlichen Laufbahn sowie für die Diskussionen und Anregungen im Laufe der Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit. Gleichmaßen bin ich der Ludwig-Maximilians-Universität für das Stipendium „Förderung für Forschung und Lehre“ für die Förderung der dargestellten Untersuchungen zu Dank verpflichtet.

Mein Dank gilt ferner den verschiedenen Kollegen, die an Einzelprojekten der Arbeit mitgewirkt haben. Insbesondere möchte ich an dieser Stelle Frau Dr. Silke Huber (FACS der hämatopoietischen Vorläuferzellen) und unserer medizinisch-technischen Assistentin Frau Susanne Bierschenk (das Unterrichten der Methoden) hervorheben. Ich möchte mich bei Frau S. Bierschenk herzlich für die fachkundigen Ratschläge, für ihre Geduld, Hilfsbereitschaft und ihr außerordentliches Engagement bedanken.

Nichtzuletzt danke ich meinen Lebenspartner Dr. Christian Zechel für die weitreichende, hervorragende, unermüdlichen und anhaltende Unterstützung, für seine Geduld und Hilfsbereitschaft, für die zahlreichen Meinungsaustausche und Anregungen im Laufe des Erstellens dieser Dissertation sowie meinen Eltern Annette und Jens Abisch, und meinen Kindern für ihre ermutigende, liebevolle und grenzenlose Unterstützung.



## 9 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Versicherung

Abisch, Janine

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

"Die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten und die Adhäsion hämatopoietischer Vorläuferzellen in Abhängigkeit von ST3Gal-IV"

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

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

Berlin, 21.02.2019

Janine Abisch

(Ort, Datum)

(Unterschrift Doktorandin/Doktorand)

Eidesstattliche Versicherung Stand: 31.01.2013