

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

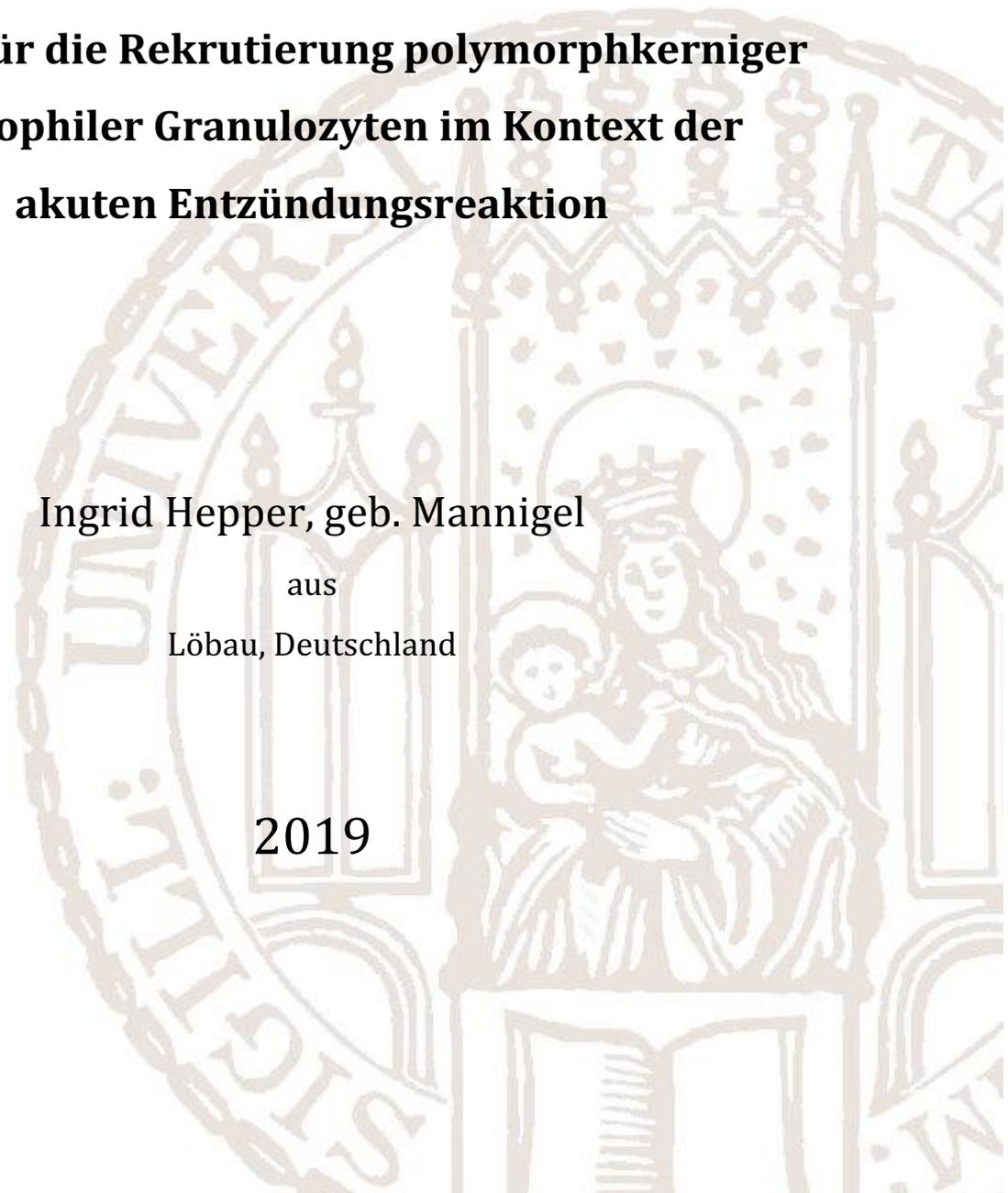
**Die Bedeutung des Aktin-bindenden Proteins
mAbp1 für die Rekrutierung polymorphkerniger
neutrophiler Granulozyten im Kontext der
akuten Entzündungsreaktion**

Ingrid Hepper, geb. Mannigel

aus

Löbau, Deutschland

2019



Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011

von Frau Prof. Dr. rer. nat. Barbara Walzog betreut und

von Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stefan Zahler von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, 28.05.2019

Ingrid Hepper

Dissertation eingereicht am: 25.07.2019

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stefan Zahler

2. Gutachterin: Prof. Dr. rer. nat. Barbara Walzog

Mündliche Prüfung am: 19.09.2019

Zusammenfassung

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) spielen eine entscheidende Rolle bei der angeborenen Immunabwehr und bei Entzündungen. Im Zuge der akuten Entzündungsreaktion werden sie durch gut charakterisierte, kaskadenartig geschaltete Prozesse aus dem Blut zum Ort der Entzündung rekrutiert. Für eine schnelle und effiziente Rekrutierung von PMN sind Adhäsionsmoleküle der β_2 -Integrin-Familie von außerordentlich großer Relevanz: Sie vermitteln über ihre Interaktion mit endothelialen Liganden, wie ICAM1, u. a. die Prozesse der festen Adhäsion von Granulozyten am Endothel, *Spreading* an das Endothel und intraluminale Migration entlang des Endothels zum Ort der Extravasation. Dabei werden Aktivität und Bindungsstärke von β_2 -Integrinen durch extrazelluläre Signale von Chemokinen durch das sogenannte *Inside-Out Signaling* moduliert. Gleichzeitig kommt es nach der Bindung von β_2 -Integrinen an einen Liganden zu intrazellulären Signalprozessen, dem *Outside-In Signaling*, die die Bindung von β_2 -Integrinen verstärken und über die Reorganisation des Zytoskeletts verschiedene Funktionen von Granulozyten während der Rekrutierung erlauben. In den Prozess des β_2 -Integrin-vermittelten *Outside-In Signalings* ist die Tyrosinkinase Syk als zentraler Regulator eines Signalkomplexes entscheidend involviert. Ein nachgeschalteter Interaktionspartner von Syk ist das Aktin-bindende Protein mAbp1. In dieser Arbeit sollte die Rolle von mAbp1 für verschiedene β_2 -Integrin-vermittelte Funktionen von neutrophilen Granulozyten während des Rekrutierungsprozesses untersucht werden.

Es konnte mittels Intravitalmikroskopie gezeigt werden, dass mAbp1 für Adhäsion und *Spreading* von Leukozyten in Venolen des entzündeten *Musculus cremaster* (*M. cremaster*) entscheidend war. Die verringerte Adhäsion und das defekte *Spreading* in Abwesenheit von mAbp1 führte zu einer dramatisch verringerten Anzahl von Leukozyten im perivaskulären Gewebe. Dies deutet daraufhin, dass mAbp1 für die effiziente Rekrutierung von Leukozyten benötigt wurde. Die gleichen Prozesse waren jedoch unter statischen *in vitro* Bedingungen auf immobilisierten β_2 -Integrin-Liganden durch das Fehlen von mAbp1 nicht beeinträchtigt. Dies konnte auch für die chemotaktische Migration von isolierten Granulozyten gezeigt werden. Die Analyse von Adhäsion und *Spreading* unter Schubspannung in Mikroflussskammern *in*

vitro bestätigte aber die *in vivo* beobachteten Defekte in Abwesenheit von mAbp1 und zeigte zusätzlich, dass das Fehlen von mAbp1 in isolierten adhärennten Granulozyten zu einer Verminderung der Resistenz gegen ansteigende Schubspannungen führte. Die Untersuchung der Migration von murinen Granulozyten und humanen Neutrophilen-ähnlichen HL-60-Zellen unter Flussbedingungen *in vitro* und im Modell des entzündeten *M. cremaster in vivo* ergab, dass in Abwesenheit von mAbp1 nicht nur die Fähigkeit zur Migration und die Migrationsgeschwindigkeit, sondern auch das Migrationsverhalten beeinträchtigt war. Das Fehlen von mAbp1 hatte zur Folge, dass Zellen unter Flussbedingungen auf dem Endothel bzw. Substrat nur noch in Richtung des Flusses migrieren konnten. Im Gegensatz dazu vermochten Wildtypzellen gegen und rechtwinklig zur Richtung des Flusses zu migrieren, was als wichtige Voraussetzung zum schnellen Auffinden von Extravasationsstellen in den Endothelzellzwischenräumen und zur effektiven Extravasation identifiziert wurde. Somit war mAbp1 anscheinend nur für β_2 -Integrin-vermittelte Funktionen unter Schubspannung von Bedeutung, aber für die entsprechende Funktionen unter statischen Bedingungen verzichtbar. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz konnte die Analyse der Bildung von β_2 -Integrin-Makroclustern mit hoher Ligandenaffinität geben. Unter Schubspannung war die durch Antikörperfärbung ermittelte Anzahl von Integrinclustern mit hoher Affinität in Neutrophilen-ähnlichen HL-60-Zellen signifikant reduziert, wenn mAbp1 mittels RNAi-Technik herunterreguliert wurde. Für Prozesse wie Adhäsion, *Spreading* und Migration unter Flussbedingungen, ist das Ausbilden von Integrinclustern und die hohe Affinität von β_2 -Integrinen essenziell, um der Schubspannung standzuhalten. Hierfür müssen die Integrine mit dem Zytoskelett verankert werden. Möglicherweise könnte mAbp1 bei diesen Prozessen beteiligt sein, indem es die durch seine Aktin-bindende Eigenschaften die β_2 -Integrine funktionell mit dem Zytoskelett verbindet und somit für die Induktion und/oder Stabilisierung der Konformation mit hoher Affinität sorgt. Als Schlussfolgerung lässt sich festhalten, dass mAbp1 eine fundamentale Funktion bei der Rekrutierung von Granulozyten hat, indem es die Prozesse der Adhäsion, des *Spreading* und der Migration über die Induktion und/oder Stabilisierung der hohen Affinität von β_2 -Integrinen unter Schubspannung ermöglicht. Hierbei könnte es ein neues Adaptermolekül sein, das die β_2 -Integrin-Funktion mit dem Aktinzytoskelett verbindet.

Abkürzungsverzeichnis

ADF	<i>Actin-depolymerizing Factor</i>
ADF-H	<i>Actin-depolymerizing Factor Homology</i>
ADP	Adenosindiphosphat
APC	<i>Antigen Presenting Cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle
Arp2/3	<i>Actin-related Protein 2/3</i>
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
Cbl	Casitas B-lineage Lymphoma, eine E3-Ubiquitinligase
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CR	<i>Complement Receptor</i> , Komplementrezeptor
DAG	Diacylglycerin
dHL-60	differenzierte HL-60 (PMN-ähnlich)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiaminetetraacetic Acid; Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein; Grün-fluoreszierendes Protein
F-Aktin	filamentöses Aktin
FBS	Fötale Bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin
G-Aktin	globuläres Aktin
G-Protein	GTP-(Guanintriphosphat-)bindendes Protein
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor, GTP-Austauschfaktor
GF	Gesichtsfeld
GPCRs	<i>G-protein-coupled Receptors</i> ; G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanintriphosphat
HBSS	Hanks' Buffered Salt Solution; Hanks' Salzlösung
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HMGB1	<i>High Mobility Group Box 1 Protein</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motiv</i>
JAMs	<i>Junctional Adhesion Molecules</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KC	Keratinocyte-derived Chemokine; CXCL1
LAD	Leukozyten-Adhäsions-Defizienz
LFA1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Mac1	<i>Macrophage Antigen 1</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MIDAS	<i>Metal Ion-dependent Adhesion Site</i>
<i>M. cremaster</i>	<i>Musculus cremaster</i>
MW	Mittelwert
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
N-WASP	neuronales Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein
NPF	<i>Nucleation Promoting Factor</i>
p85	regulatorische Untereinheit der PI3K
PAMPs	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> ; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PECAM1	<i>Platelet/Endothelial-Cell Adhesion Molecule 1</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PSGL1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i>
PSI	Plexin/Semaphorin/Integrin Domäne
RAGE	<i>Receptor of Advanced Glycation End-Products</i>
Rap1	<i>Ras-related Protein 1</i>
Rho	<i>Ras Homologue</i> , eine Tyrosinkinase

RhoA	<i>Ras Homologue A</i> , eine kleine GTPase
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; Ribonukleinsäure
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RT	Raumtemperatur
SD	<i>Standard Deviation</i> , Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
SE	<i>Standard Error</i> , Standardfehler
SH2	<i>Src Homology 2</i>
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
SLP76	<i>SH2 Domain-containing Leukocyte Protein 76</i>
SLPI	<i>Secretory Leukocyte Protease Inhibitor</i>
Syk	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i> ; Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TLRs	<i>Toll-like Receptors</i>
TM	Transmembrandomäne
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(-hydroxymethyl)-aminomethan
VCAM1	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule 1</i>
VE-Cadherin	<i>Vascular Endothelial Cadherin</i>
WASP	Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein
ZD	zytoplasmatische Domäne
β TD	β -Tail-Domäne

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die akute Entzündungsreaktion	2
1.2	Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion.....	4
1.3	Integrine: Adhäsionsmoleküle mit dualer Funktion	10
1.4	Die Tyrosinkinase Syk.....	16
1.5	Das Aktin-bindende Protein mAbp1.....	19
1.6	Zielsetzung der Arbeit	21
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Material.....	24
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	24
2.1.2	Antikörper	24
2.1.3	Mäuse.....	25
2.1.4	Zelllinien.....	26
2.1.5	Gentechnische Konstrukte.....	26
2.1.6	ICAM1(D1-2)-Fc-Fusionsprotein	27
2.1.7	Mikroskope	27
2.1.8	Flusskammern und Präzisionspumpen.....	27
2.1.9	Sonstige Materialien und Geräte	28
2.1.10	Software.....	28
2.1.11	Statistik.....	29
2.2	Methoden	29
2.2.1	Herstellung von Puffern und Standardlösungen	29
2.2.2	Zellkultur und Differenzierung von HL-60-Zellen	29
2.2.3	Isolierung von PMN aus dem Knochenmark der Maus.....	30
2.2.4	Herstellung von mAbp1 herunterregulierenden HL-60-Zellen.....	31
2.2.5	Durchflusszytometrie	31

2.2.6 Beschichtung von Plastik- und Glasoberflächen.....	32
2.2.7 Fluoreszenzfärbungen für die konfokale Mikroskopie.....	33
2.2.8 Analyse von murinen PMN und dHL-60-Zellen statischen Bedingungen..	33
2.2.9 Analyse von murinen PMN und dHL-60-Zellen unter Flussbedingungen.	35
2.2.10 Intravitalmikroskopie.....	37
2.2.11 Proteinbiochemische Methoden.....	38
3 Ergebnisse	40
3.1 Die Rolle von Syk für β_2 -Integrin-vermitteltes <i>Outside-In Signaling</i> in vitro..	40
3.2 Die Rolle von mAbp1 für Adhäsion und <i>Spreading</i> von PMN unter statischen Bedingungen.....	42
3.3 Die Rolle von mAbp1 für Adhäsion und <i>Spreading</i> von PMN <i>in vivo</i> und unter Flussbedingungen <i>in vitro</i>	46
3.4 Die Rolle von mAbp1 für die Migration von PMN unter Flussbedingungen ...	52
3.5 Die Bedeutung von mAbp1 für die Verstärkung der hochaffinen Konformation von β_2 -Integrinen unter Flussbedingungen.....	59
4 Diskussion	62
5 Literaturverzeichnis	67
6 Abbildungsverzeichnis.....	80
7 Tabellenverzeichnis.....	81
8 Danksagung.....	82
9 Anhang	83
9.1 Publikationen.....	83
9.2 Lebenslauf.....	85

1 Einleitung

Polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) fällt bei der Entzündung eine bedeutende Rolle zu: Sie sind nicht nur die ersten Zellen, die aus dem Blut rekrutiert werden, sondern sie modulieren auch die Immunantwort, indem sie Antigen-präsentierende Zellen der adaptiven Immunantwort rekrutieren, aktivieren und programmieren. Sie vermögen einerseits Mikroorganismen und beschädigte körpereigene Zellen zu eliminieren und helfen andererseits, den Heilungsprozess des Gewebes in Gang zu setzen und damit die Entzündungsreaktion erfolgreich zum Abschluss zu bringen (Nathan 2006). Durch ihre zentrale Rolle bei der Initiierung der Entzündung und ihrer Fähigkeit Mikroorganismen zu töten, haben sie jedoch unter bestimmten Umständen auch Anteil an überschießenden Entzündungsreaktionen, die Verletzung von gesundem Gewebe zur Folge haben. Diese pathologischen Prozesse sind Teil verschiedenster Erkrankungen wie der diabetischen Retinopathie, des akuten Koronarsyndroms, der Glomerulonephritis und der Arteriosklerose (Segel et al. 2011; Silvestre-Roig et al. 2019). Auf der anderen Seite führen Funktionsstörungen von PMN zu teils schwerwiegenden Beeinträchtigungen der angeborenen Immunantwort, die oft gekennzeichnet sind durch wiederkehrende und anhaltende bakterielle Infekte und Pilzkrankungen sowie rezidivierende Abszesse. Dies wird deutlich bei Leukozyten-Adhäsions-Defizienz- (LAD-) Syndromen, bei denen die Rekrutierung von Leukozyten entweder durch fehlende Adhäsionsmoleküle (LAD I und II) oder durch Aktivierungsstörung von Adhäsionsmolekülen (LAD III) beeinträchtigt ist. LAD I wird durch Mutationen in Genen verursacht, die für die CD18-Kette von Adhäsionsmolekülen der β_2 -Integrinfamilie kodieren, LAD II durch fehlende Glykosylierungen der Liganden von leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen der Selektinfamilie. Für das Krankheitsbild von LAD III sind Defekte in der Signalübertragung, die zu Aktivierung von Integrinen der Leukozyten und Thrombozyten führen, verantwortlich (Anderson & Springer 1987; Etzioni et al. 1992; Kuijpers et al. 1997; Etzioni 1999; Alon & Etzioni 2003). Die Identifizierung der zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen, die im Zuge einer Entzündungsreaktion eine Rekrutierung von Leukozyten und insbesondere PMN aus dem Blut über die Wechselwirkungen von Adhäsionsmolekülen

ermöglichen, ist von großer Bedeutung. Durch das Verständnis dieser Prozesse und pathologischer Verläufe der angeborenen Immunantwort werden Grundlagen geschaffen, um neue Therapiemöglichkeiten für entzündliche Erkrankungen zu entwickeln.

1.1 Die akute Entzündungsreaktion

Die Entzündung ist eine komplexe Antwort des Organismus auf Infektionen und Gewebsverletzung. Sie führt üblicherweise zur Infektionsabwehr und durch Reparatur und dem Wiederaufbau des Gewebes mit seinen normalen Funktionen zur Wiederherstellung der Homöostase. Die grundsätzlichen Auslöser einer akuten Entzündungsreaktion sind Infektion und Gewebsverletzung durch biologische, chemische und physikalische Noxen. In der Regel sind anhaltende simultane Signale, erzeugt durch Infektion und Gewebsverletzung, notwendig, um eine akute Entzündungsreaktion zu starten und aufrechtzuerhalten. Bei einer Gewebsverletzung im ursprünglichen Sinn, d.h. nicht durch einen aseptischen Eingriff, muss der Körper eine mit der Verletzung einhergehende Infektion verhindern, bei einer Infektion diese beseitigen und eine mögliche resultierende Gewebsverletzung beheben (Medzhitov 2008; Nathan 2006; Nathan 2002). Signale, die eine Schädigung des Gewebes anzeigen, entstehen durch defekte Zellen, deren freigesetzte intrazellulären Bestandteile die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren bewirken. Solche intrazellulären Stoffe sind z.B. ATP, Hitzeschockproteine, Kalzium-bindende Proteine der S100-Familie und der Transkriptionsfaktor *High Mobility Group box 1 Protein* (HMGB1) (Medzhitov 2008; Mariathasan & Monack 2007; Chen et al. 1999; Kol et al. 2000; Basu et al. 2000; Asea et al. 2000; Ryckman et al. 2003; Andersson et al. 2000; Scaffidi et al. 2002). Im Falle der Kalzium-bindenden Proteine der S100-Familie und HMGB1 führt dies zur Aktivierung der Entzündungsreaktion durch eine direkte Bindung der Proteine an Rezeptoren der Toll-Familie (*Toll-like Receptors*, TLRs) auf der Oberfläche von Effektorzellen wie Makrophagen bzw. über eine indirekte Interaktion mit TLRs über den Rezeptor *Receptor of Advanced Glycation End-Products* (RAGE) (Hofmann et al. 1999; Park et al. 2004). Bei mikrobiellen Infektionen wird eine Entzündung durch Virulenzfaktoren und sogenannte *Pathogen-associated Molecular Patterns* (PAMPs) induziert, die Strukturen der Mikroorganismen selbst

oder ihre sekretierten Produkte darstellen. Diese werden durch verschiedene lösliche Rezeptoren wie Komplementfaktoren, das Mannose-bindende Protein und Lipopolysaccharid- (LPS-) bindendes Protein, sowie Zelloberflächenrezeptoren wie TLRs gebunden (Janeway & Medzhitov 2002; Nathan 2002; Fraser et al. 1998).

Die ersten Signale einer Infektion oder Gewebsschädigung werden von gewebsständigen Makrophagen und Mastzellen detektiert. Sie setzen nach Aktivierung verschiedene Entzündungsmediatoren frei. Dazu gehören vasoaktive Stoffe wie Histamin, Prostaglandine und Tryptasen, die zu Vasodilatation und erhöhter Vasopermeabilität und damit zu Erwärmung, Rötung und Schwellung des betroffenen Areals führen (Benoist & Mathis 2002). Außerdem produzieren sie proinflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor α (TNF α), Interleukin-(IL-)1 und IL-6 und Chemokine und setzen proteolytische Enzyme wie Elastase und Matrixmetalloproteinasen frei (Benoist & Mathis 2002; Nathan 2002; Nathan et al. 1993). Das Gefäßendothel wird aktiviert; die extrazelluläre Matrix und Basalmembran des Endothels wird modifiziert; Leukozyten, insbesondere PMN werden aktiviert, aus dem Blut rekrutiert und im Gewebe chemotaktisch zum Entzündungsort geleitet. Von aktivierten Makrophagen und PMN produzierte Zytokine und TNF α aktivieren und locken weitere PMN an. Des Weiteren fördern sezernierte Zytokine zusammen mit Signalen von Mikroorganismen bzw. nekrotischen Zellen die Aktivierung und Differenzierung von dendritischen Zellen, professionellen Antigen-präsentierenden Zellen der adaptiven Immunantwort. Daraufhin können T- und B-Zellen der adaptiven Immunantwort aktiviert werden. (Medzhitov 2008; Nathan 2006; Nathan 2002).

Aktivierte Monozyten/Makrophagen und PMN beseitigen am Ort der Entzündung Gewebstrümmer und Pathogene durch Phagozytose. PMN vermögen die aufgenommenen Mikroorganismen durch die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*Reactive Oxygen Species*, ROS) und antibakteriellen Proteinen (z.B. Proteinase 3, Elastase, Cathepsine, Defensine, Laktoferrin und Lysozyme) zu eliminieren. Antibakterielle Proteine können aus den Granula der PMN sowohl in die Phagosomen als auch aus der Zelle hinaus ausgeschüttet werden, um dort extrazelluläre Mikroorganismen abzutöten. Dabei kommt es auch zur Schädigung des körpereigenen Gewebes (Nathan 2006; Weiss 1989; Kolaczowska & Kubes 2013; Häger et al. 2010). Die Einleitung einer Phase, in der der Körper das Gewebe reparieren kann und zur

normalen Funktion zurückfindet, ist nach der Beseitigung der Ursache der Entzündung ein notwendiger und wichtiger Schritt. Auch hier, bei der Umstellung von proinflammatorisch und nicht proliferativ zu antiinflammatorisch und proliferativ, spielen PMN und Monozyten/Makrophagen eine wichtige Rolle. So bewirkt das Phagozytieren von Zelltrümmern eine erhöhte Produktion von *Transforming Growth Factor β* (TGF β), einem Supressor der proinflammatorischen Makrophagenfunktionen und Initiator von Reparaturmechanismen (Arnold et al. 2007; Tsunawaki et al. 1988). Ebenfalls wichtig ist *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor* (SLPI), welches spät während der Entzündungsreaktion von Makrophagen, PMN und Epithelzellen produziert wird. SLPI suprimiert die Aktivierung von PMN durch TNF α , deren Produktion von ROS und inhibiert die von PMN freigesetzte Elastase. Letzteres wiederum führt zu einer höheren Konzentration an ungespaltenem Progranulin, was die Reparatur von Epithel fördert (Jin et al. 1997; Zhu et al. 2002; He et al. 2003). Eine bedeutende Rolle beim Rückgang einer Entzündungsreaktion kommt auch verschiedenen Lipidmediatoren zu wie Lipoxinen, Protektinen und Resolvinen, indem sie u.a. die Rekrutierung von PMN hemmen (Serhan 2007). Eine akute Entzündungsreaktion gilt dann als erfolgreich, wenn die Quelle der Störung beseitigt, das System von proinflammatorisch zurück auf antiinflammatorisch gesetzt und die Homöostase und Funktion des Gewebes wieder aufgenommen wurde (Nathan & Ding 2010).

1.2 Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion

Das entzündete Gefäßendothel erlaubt durch die Induktion seines proadhäsiven Charakters eine selektive Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut in das betroffene Gewebe. Die Prozesse, die letztlich zur Auswanderung der Leukozyten in das Gewebe führen, folgen einem kaskadenartigen Ablauf, der sich im Wesentlichen bei allen Leukozyten ähnelt (Abbildung 1). Man unterscheidet dabei zwischen Selektin-vermitteltem *Capturing* (auch *Tethering*; das Einfangen) und anschließendem Rollen der Leukozyten, einhergehend mit Chemokin-induzierter Aktivierung und Integrin-vermitteltem *Arrest* (Adhäsion) der Leukozyten, gefolgt von *Adhesion*

Strengthening (Stärkung der Adhäsion), *Intraluminal Crawling* (Migration im Gefäßlumen) und Transmigration (Ley et al. 2007; Alon & Ley 2008).

P- und E-Selektin werden vom entzündeten Endothel auf dessen luminaler Oberfläche exprimiert. Zusammen mit L-Selektin, welches von fast allen Leukozyten exprimiert wird, vermitteln sie das anfängliche *Capturing* und Rollen von PMN über die Bindung an glykosylierte Liganden, vor allem an *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1* (PSGL1). Dadurch kommt es zu einer Leukozyten-Endothel- (über P- und E-Selektin) oder einer Leukozyten-Leukozyten-Interaktion (über L-Selektin) (Ley et al. 2007; Alon & Ley 2008; Kolaczowska & Kubes 2013). Bindungen über Selektine sind durch schnelles Entstehen und Auflösen gekennzeichnet, was ein Rollen auf dem Endothel bei einer Schubspannung von 1 – 10 dyne/cm² im Gefäß erst ermöglicht. Die Schubspannung durch den Blutfluss bewirkt zudem Konformationsänderungen der an Liganden gebundenen Selektine. Dies führt durch eine erhöhte Affinität der Selektine zu einer Verstärkung der Bindung. Diese Eigenschaft von Selektinen unter Schubspannung wird als *Catch Bond* bezeichnet (Ley et al. 2007; Alon & Ley 2008). Infolge der Bindung von PSGL1 durch Selektine kommt es in den PMN zur Aktivierung von Signalprozessen, u. a. über die Kinasen *Spleen Tyrosine Kinase* (Syk) und *p38 Mitogen-activated Protein Kinase* (p38 MAPK). So bewirkt die Interaktion von E-Selektin mit PSGL1 über den Syk-Signalweg eine partielle Aktivierung des β_2 -Integrins *Lymphocyte Function-associated Antigen 1* (LFA1). Dieser Prozess der Aktivierung von Integrinen durch intrazelluläre Signalprozesse infolge extrazellulärer Stimuli wird *Inside-Out Signaling* genannt. Die damit einhergehende Konformationsänderung des Integrins von niedriger zu intermediärer Affinität erlaubt eine transiente Bindung von LFA1 an seinen endothelialen Liganden *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM1) und unterstützt damit das Herabsetzen der Rollgeschwindigkeit der PMN von 40 μm pro Sekunde bei P-Selektin-vermitteltem Rollen auf unter 5 μm pro Sekunde. Dieses langsame Rollen ist ein wichtiger Schritt hin zur vollen Aktivierung und festen Adhäsion der PMN und wird neben dem beschriebenen β_2 -Integrin-abhängigen Prozess auch durch E-Selektin mit Rollgeschwindigkeiten von 3 – 7 μm pro Sekunde vermittelt (Ley et al. 2007; Alon & Ley 2008; Zarbock & Ley 2008; Zarbock & Ley 2011).

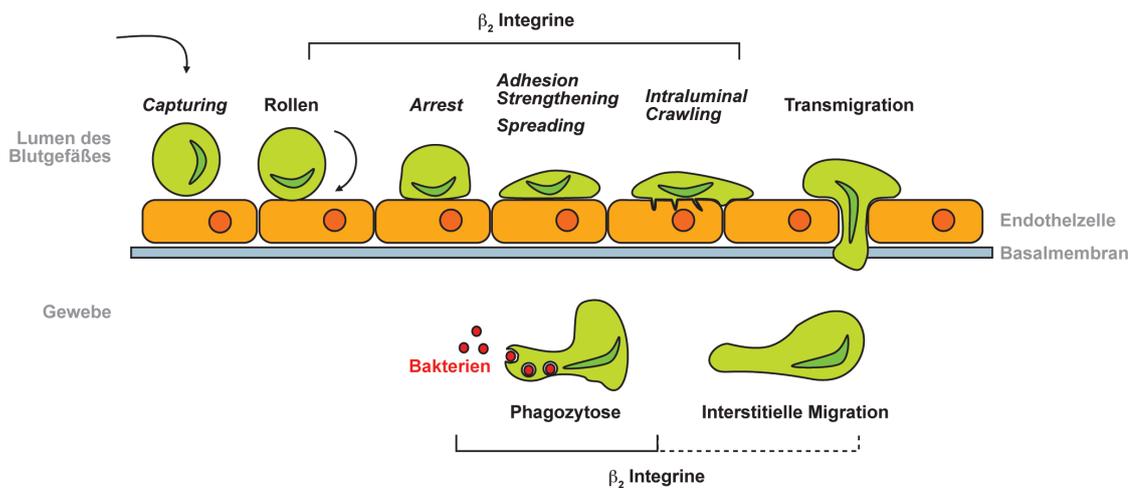


Abbildung 1 Die Rekrutierungskaskade

Schematische Darstellung der Rekrutierungskaskade von PMN (grün) aus dem Lumen des Blutgefäßes in das Gewebe. Die Abfolge von links nach rechts entspricht dem zeitlichen Verlauf: beginnend mit *Capturing* (Einfangen) und Rollen, gefolgt von *Arrest* (Adhäsion), *Adhesion Strengthening/Spreading* (Verstärkung der Adhäsion mit Abflachung der PMN), *Intraluminal Crawling* (Migration im Gefäßlumen) und schließlich der Transmigration der PMN. Im Gewebe kommt es zur chemotaktisch gesteuerten Migration der PMN zum Ort der Läsion (Interstitielle Migration). Dort erfüllen sie ihre Funktion als wichtige Effektorzellen der Entzündungsreaktion u. a. durch Beseitigung bakterieller Infektionen. β_2 -Integrin-abhängige Prozesse (langsames Rollen, Adhäsion, *Intraluminal Crawling*, Komplement-vermittelte Phagozytose) sind durch eine Klammer gekennzeichnet. Die Rolle von β_2 -Integrinen während der Interstitiellen Migration ist noch nicht geklärt. Sie scheinen aber nicht zwingend notwendig für diesen Prozess zu sein (gestrichelte Klammer), verändert nach Schymeinsky et al. 2011.

Das Rollen ermöglicht über den Kontakt mit dem Endothel die Aktivierung der PMN durch Chemokine und chemotaktisch wirksame Lipide, die vom entzündeten Endothel auf dessen Oberfläche präsentiert werden. G-Protein- (Guanintri-phosphat-bindende Proteine) gekoppelte Rezeptoren (*G-protein-coupled receptors*, GPCRs) leiten die Signale der Chemokine in die Zelle. Zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf PMN gehören neben den Chemokinrezeptoren Formylpeptidrezeptoren, die bakterielle Produkte und mitochondrielle Produkte bei Gewebsverletzungen erkennen und Rezeptoren für Chemoattraktoren wie Leukotrien B_4 , Plättchen-aktivierender Faktor und der Komplementfaktor C5a (Futosi et al. 2013). Die Ligandenbindung an die Rezeptoren bewirkt die Dissoziation und damit Aktivierung des G-Proteinkomplexes in G_α und $G_{\beta\gamma}$ (Zarbock & Ley 2008; Bokoch 1995). Die aktivierte Untereinheit des G-Proteins $G_{\beta\gamma}$ wiederum induziert die Signalweiterleitung über verschiedener Signalwege, darunter über Phospholipasen C (PLC) β_2 und β_3 und Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K). Die PLC-Isoformen β_2 und β_3 hydrolysieren

Phosphatidylinositol-(4,5)bisphosphat (PIP₂). Dabei kommt es zur Bildung von Inositoltriphosphat (IP₃), welches Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern freisetzt und Diacylglycerin (DAG), welches die Proteinkinase C (PKC) aktiviert. Ca²⁺ und aktivierte PKC-Isoformen induzieren in PMN zytotoxische Funktionen wie die Produktion von ROS (Futosi et al. 2013; Li et al. 2000; Mayer et al. 1996). Der zweite vorherrschende parallele Signalübertragungsweg über GPCRs führt zur Aktivierung der PI3K γ . Diese katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(3,4)bisphosphat (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)triphosphat (PIP₃). Die Produktion von PIP₃ führt u. a. zur Aktivierung der Proteinkinase B / Akt. Dieser Signalweg über PI3K γ ist wichtig für die Chemotaxis von PMN und die Produktion von ROS (Futosi et al. 2013; Li et al. 2000; Hirsch et al. 2000; Hannigan et al. 2002).

Für den Übergang vom Rollen zum sogenannten *Arrest*, der initialen Adhäsion, von PMN ist eine Aktivierung der β_2 -Integrine vonnöten. Diese wird ebenfalls von Endothel präsentierten Chemokinen über GPCRs der PMN induziert. Chemokine, die zu einer schnellen Integrinaktivierung führen, nennt man auch *Arrest-Chemokine*, z.B. IL-8 (CXCL8) und RANTES (CCL5) (Ley 2003; Rot & Andrian 2004) – der Prozess der Integrinaktivierung ausgelöst durch Chemokine wird als *Inside-Out Signaling* bezeichnet. Die am besten untersuchten Signalprozesse des *Inside-Out Signaling* werden durch die kleinen GTPasen *Ras-related Protein 1* (Rap1), *Ras-homologue A* (RhoA) und Rac1 reguliert. Auch hier ist der Signalweg über PLC β maßgeblich involviert. Freigesetztes intrazelluläres Ca²⁺ und gebildetes DAG aktivieren über GTP-Austauschfaktoren (GEF, *Guanine Nucleotide Exchange Factor*) die kleine GTPase Rap1A. Rap1A hat verschiedenste Effektoren deren Signale zu Integrinaktivierung und Adhäsion fördernden Prozessen führen (Kinashi & Katagiri 2004; Duchniewicz et al. 2006; Montresor et al. 2012). Die GTPasen RhoA und Rac1, welche an der Affinitätsregulierung von LFA1 beteiligt sind, werden durch die GTP-Austauschfaktoren Dock2 und Vav1 aktiviert (Laudanna et al. 1996; Giagulli et al. 2004; Montresor et al. 2012). Bei der Integrinaktivierung gehen die Integrine von der geschlossenen Konformation mit geringer Affinität in die offene Konformation mit intermediärer Affinität und letztlich hoher Affinität über. Zusätzlich kommt es zur Bildung von Makroclustern von Integrinen in der Zellmembran. Diese Mobilität der Integrine in der Membran scheint durch Signale von Chemokinen über die PI3K vermittelt zu werden (Constantin et al. 2000). Die Konformations- und

Aviditätsänderungen von Integrinen bewirkt eine feste Bindung der β_2 -Integrine an seine endothelialen Liganden, v. a. ICAM1, und damit eine Adhäsion (*Arrest*) des PMN an der Gefäßoberfläche (Ley et al. 2007; Alon & Ley 2008; Zarbock & Ley 2008).

Aktiviert Integrine können nach Bindung an ihre Liganden intrazelluläre Signale erzeugen. Diesen Prozess nennt man *Outside-In Signaling*. Bei diesem ist in PMN die Tyrosinkinase Syk maßgeblich beteiligt. Durch das Integrin-induzierte *Outside-In Signaling* kommt es auch zu einer Verstärkung der Integrin-Liganden-Bindungen selbst. Dies hat eine feste Adhäsion (*Adhesion Strengthening*) der PMN zur Folge und verringert damit das Ablösen adhärenter PMN deutlich (Ley et al. 2007). Des Weiteren bewirkt das *Outside-In Signaling* durch Aktivierung verschiedener Signalprozesse und der Induktion der Verknüpfung des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix und der Neuordnung des Zytoskeletts zelluläre Funktionen, wie Stabilisierung der festen Adhäsion, Formänderung beim Prozess des *Spreading*s (Abflachung), Migration und Initiation der Transmigration der PMN (Ley et al. 2007; Zarbock & Ley 2008). Zwischen der festen Adhäsion der PMN im Gefäßlumen und der Transmigration in das Gewebe findet ein weiterer individueller Schritt der Rekrutierung statt: die Migration von PMN im Gefäßlumen (*Intraluminal Crawling*). Dieser Schritt dient offenbar dazu, geeignete Stellen für die Auswanderung im Endothel, die sogenannten *Extravasation Sites*, zu finden und erhöht somit die Effizienz der Auswanderung von PMN. Anders als bei *Arrest* und fester Adhäsion wird das *Intraluminal Crawling* bei PMN nicht durch eine Interaktion des β_2 -Integrins LFA1 mit ICAM1, sondern durch die Interaktion des β_2 -Integrins *Macrophage Antigen 1* (Mac1) mit ICAM1 vermittelt (Schenkel et al. 2004; Phillipson et al. 2006).

Bei der Transmigration müssen PMN drei Barrieren überwinden: die Endothelzellen, die Basalmembran und die Perizyten. Die Transmigration durch die Endothelzellschicht erfolgt überwiegend parazellulär, d. h. zwischen den Endothelzellkontakten. Nur ca. 5 – 20% (abhängig vom betrachteten Gewebe und Modell) der Zellen transmigrieren transzellulär, wahrscheinlich über sogenannte *Vesiculo-vacuolar Organelles* (VVOs), eine Ansammlung von Vesikeln und Vakuolen. Ein wichtiger Schritt der parazellulären Transmigration ist das Öffnen der Endothelzellkontakte, die u. a. durch homophile Adhäsion von *Vascular Endothelial Cadherin* (VE-Cadherin)

zusammengehalten werden. Eine Ligandenbindung an Adhäsionsmoleküle in den Zellkontakten, z.B. an ICAM1, bewirkt über intrazelluläre Signalprozesse offensichtlich eine Lockerung der adhäsiven VE-Cadherin-Kontakte. An der Transmigration der PMN durch den Zellkontakt sind verschiedene Adhäsionsmoleküle beteiligt: ICAM1 und ICAM2, die an LFA1 auf den PMN binden, *Platelet/Endothelial-Cell Adhesion Molecule 1* (PECAM1) und CD99, die homophile Kontakte zu den PMN bilden und verschiedene *Junctional Adhesion Molecules* (JAMs), welche sowohl bei der Bindung an LFA1, als auch bei homophilen Kontakten beteiligt sind. Bei der transzellulären Migration generieren PMN zunächst Membranausstülpungen in die Endothelzelle. Die Bindung von endotheliale ICAM1 an Liganden bewirkt, dass ICAM1 von der luminalen Membran zu Caveolae (Caveolin-reiche Einbuchtungen der Plasmamembran) und F-Aktin- (filamentöses Aktin-) reichen Regionen und zur basalen Membran transportiert wird. Dadurch kommt es zur Bildung von *Vesiculo-Vacuolar Organelles*, die Kanäle für die PMN Transmigration bilden. Die Transmigration von PMN durch Basalmembran und Perizyten geschieht an Stellen, an denen die Expression an Matrixproteinen wie Laminin-10 oder Kollagen IV geringer als normal ist. Diese Regionen von geringerer Proteindichte fallen auch mit Lücken zwischen den Perizyten zusammen und sind somit Stellen mit geringst möglichem Widerstand für die Transmigration von PMN (Ley et al. 2007; Alcaide et al. 2009; Nourshargh et al. 2010).

Die auf die Transmigration folgende Migration von PMN im Gewebe, die interstitielle Migration, spielt sich in einer dreidimensionalen Umgebung ab. Im Gegensatz zur Migration auf einer zweidimensionalen Oberfläche, wie etwa im Blutgefäß, ist der permanente Kontakt zur Fläche und die Verbindung von Zytoskelett und extrazellulärer Matrix für die Migration in einer dreidimensionalen Umgebung offenbar nicht notwendig (Malawista & de Boisleury Chevance 1997; Hawkins et al. 2009; Lämmermann & Sixt 2009). Vielmehr könnte hier die Motilität durch Aktin-getriebene Deformationen des Zellkörpers in der dreidimensionalen Struktur erfolgen. Die Interstitielle Migration ist somit auch unabhängig von der molekularen Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (Lämmermann et al. 2008; Lämmermann & Sixt 2009; Nourshargh et al. 2010). Des Weiteren sind Integrine für die interstitielle Migration nicht zwingend notwendig (Friedl et al. 1998; Lämmermann et al. 2008). Am Ort der Entzündung angelangt werden die PMN ihrer Aufgabe zur Eliminierung

von Bakterien durch Phagozytose und Freisetzung von bakteriziden Stoffen wie ROS und der Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) gerecht (Zarbock & Ley 2008; Brinkmann et al. 2004).

1.3 Integrine: Adhäsionsmoleküle mit dualer Funktion

Integrine sind Adhäsionsmoleküle mit dualer Funktion: Sie sind maßgeblich an der Verankerung von Zellen mit der extrazellulären Matrix beteiligt und modulieren durch Aktivierung von intrazellulären Signalprozessen die Funktion von Zellen (*Outside-In Signaling*). Ihre eigene Aktivität wiederum wird durch Signale von anderen Membranrezeptoren wie GPCRs und TNF-Rezeptoren kontrolliert (*Inside-Out Signaling*) (Evans et al. 2009; Moser et al. 2009b). Integrine bilden nicht-kovalent gebundene Heterodimere aus einer α - und einer β -Untereinheit. In Säugetieren kommen 18 verschiedene α - und 8 verschiedene β -Untereinheiten vor, die sich zu 24 Integrinen zusammensetzen. Die Untereinheiten sind Typ-I-Transmembranglykoproteine – sie durchspannen einmal die Zellmembran, wobei ihr N-Terminus extra- und ihr C-Terminus intrazellulär liegt. Die Untereinheiten der Integrine besitzen eine große extrazelluläre Domäne mit ca. 800 Aminosäuren (AS). Ihre Transmembrandomäne (TM) und zytoplasmatische Domäne (ZD) sind relativ kurz mit ca. 20 AS bei der TM, bzw. üblicherweise unter 50 AS bei der ZD (Abbildung 2) (Hynes 2002; Moser et al. 2009b).

Die extrazelluläre Domäne der α -Untereinheit von ungefähr der Hälfte der Integrine von Säugetieren, darunter auch alle β_2 -Integrine, besitzt eine N-terminale I-Domäne, die bei diesen Integrinen in der Regel auch die Ligandenbindungsstelle ist (Lee et al. 1995b). An diese schließt sich eine siebenfache β -Propeller-Domäne an, die bei Integrinen ohne I-Domäne den äußeren Kopf der α -Untereinheit formt (Springer 1997; Xiong et al. 2001; Xiong et al. 2002). C-Terminal folgen *Thigh*- (Schenkel) Domäne, *Genu* (Gelenk) und zwei *Calf*- (Wade) Domänen, die das Bein darstellen. Die β -Untereinheit beginnt am äußeren Ende mit der *I-like*-Domäne, die analog zur I-Domäne der α -Untereinheit ist. Es folgen: die Hybriddomäne, eine PSI- (Plexin/Semaphorin/Integrin) Domäne, vier EGF- (*epidermal growth factor*) Domänen und

eine β -Tail-Domäne (β TD) (Abbildung 2 C) (Xiong et al. 2001; Xiong et al. 2002; Beglova et al. 2002).

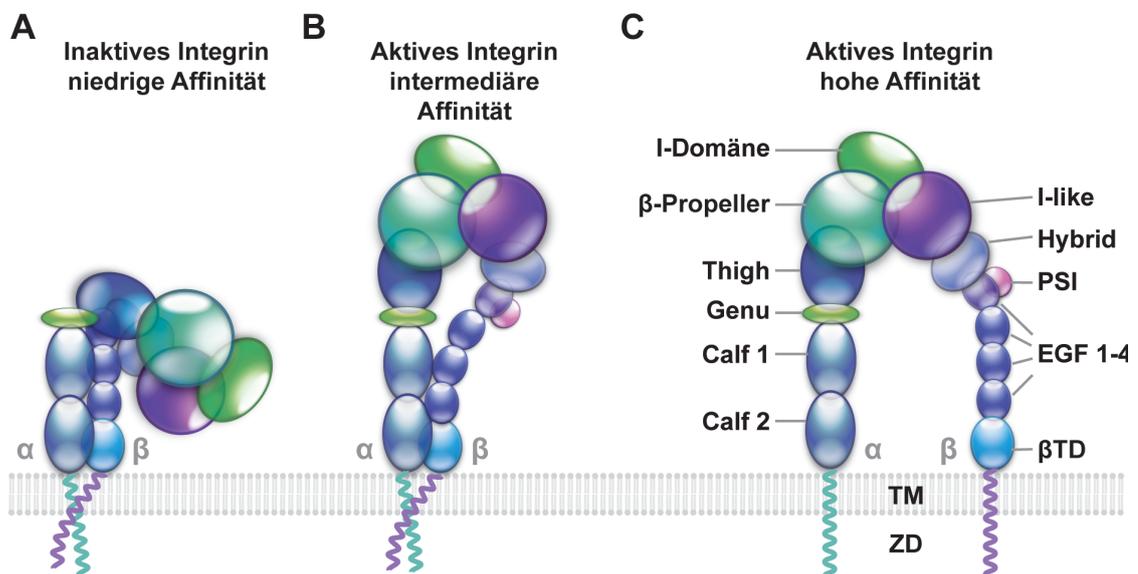


Abbildung 2 Aufbau und Konformationen von β_2 -Integrinen

(A-C) Schematische Darstellung der Struktur von Integrinen und deren drei Konformationen, aus denen die drei unterschiedlichen Affinitätszustände resultieren. Die α -Untereinheit besteht aus folgenden Domänen: I-Domäne (nur bei etwa der Hälfte der Integrine), β -Propeller, *Thigh* (Schenkel), *Genu* (Gelenk), *Calf*- (Wade) Domänen 1 und 2, Transmembran- (TM) und zytoplasmatische Domäne (ZD); die β -Untereinheit aus: *I-like*-Domäne, Hybriddomäne, PSI- (Plexin/Semaphorin/Integrin) Domäne, EGF- (*epidermal growth factor*) Domänen 1 – 4, β -Tail-Domäne (β TD), ebenfalls einer TM und einer ZD. (A) Gekrümmte Konformation mit geringer Ligandenaffinität. In dieser Konformation befinden sich inaktive Integrine. (B) Aktivierte Integrine kommen in der gestreckten Konformation mit intermediärer Affinität und (C) in der gestreckten und zusätzlich geöffneten Konformation, bei der es zur Separation der TM und ZD kommt, mit hoher Affinität zu ihren Liganden vor. Verändert nach Evans et al. 2009 und Hogg et al. 2011.

Die äußere *I-like*-Domäne ist nicht der N-Terminus der Primärstruktur der Untereinheit, sondern ist in eine Schleife der Hybriddomäne inseriert. I-Domäne und β -Propeller-Domäne der α -Untereinheit und *I-like*-Domäne der β -Untereinheit formen den Ligandenbindungskopf des Integrins (Xiong et al. 2001; Xiong et al. 2002; Hynes 2002). Die I-Domäne der α -Untereinheit enthält eine sogenannte *Metal Ion-dependent Adhesion Site* (MIDAS), eine Bindungsstelle für divalente Kationen, die bewirkt, dass nur im Beisein von divalenten Kationen eine Ligandenbindung durch Integrine erfolgen kann (Lee et al. 1995a; Qu & Leahy 1996; Emsley et al. 2000; Hynes 2002).

Für die Funktionen von Zellen ist es essenziell, dass der Aktivierungsstatus und damit die Affinität von Integrinen reguliert werden kann. Dies wird an den Beispielen des $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins auf Plättchen und den β_2 -Integrinen auf Leukozyten deutlich. Beide Integrine befinden sich normalerweise in ihrem inaktiven Status. Erst wenn es notwendig wird, dass durch Plättchenadhäsion und -aggregation eine Blutung gestillt wird, bzw. dass Leukozyten in das Gewebe rekrutiert werden, wird die aktivierte Form von Integrinen induziert (Moser et al. 2009b). In ihrer inaktiven Form mit geringer Ligandenaffinität liegen Integrine in der gekrümmten Konformation vor. Dabei ist das Integrin an der *Genu*-Domäne der α -Untereinheit zwischen *Thigh*- und *Calf-1*-Domäne und zwischen den EGF-Domänen 2 und 3 der β -Untereinheit um 135° geknickt (Abbildung 2 A). Aktivierte Integrine haben eine gestreckte Konformation, wobei die Konformation mit hoher Affinität im Gegensatz zur intermediären Affinität nur durch eine Separation der Integrinbeine, TM und ZD von α - und β -Untereinheit entsteht (Abbildung 2 B und C) (Hynes 2002; Kim et al. 2003; Moser et al. 2009b). Die aktivierte Form von Integrinen wird durch *Inside-Out Signaling* von Chemokin- und anderen Membranrezeptoren induziert. Als Effektoren kommt hierbei den Proteinfamilien der Taline und Kindline eine entscheidende Rolle zu: sie bewirken die Separation der ZD der Integrine, die für die hohe Affinität von Integrinen essenziell ist (Kim et al. 2003; Calderwood et al. 1999; Calderwood et al. 2002; Moser et al. 2009b). Infolge von *Inside-Out Signaling* werden Taline durch die aktivierte GTPase Rap1 rekrutiert, so dass sie an die ZD der β -Untereinheit binden können. Taline befinden sich in einem autoinhibierten Zustand und werden wahrscheinlich durch Bindung des Lipidmediators Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) aktiviert (Martel et al. 2001; Jaewon Han et al. 2006). Talin-1 wird benötigt, um die gestreckte Konformation des β_2 -Integrins LFA1 zu induzieren. Dies führt zur intermediären Affinität des Integrins und resultiert in Leukozytenrollen. Kindlin-3 bindet ebenfalls an die ZD der β -Untereinheit von LFA1. Für die Induktion der hohen Affinität von LFA1 durch Separation von TM und ZD von α - und β -Untereinheit, die zum *Arrest* des Leukozyten führt, sind sowohl Talin-1 als auch Kindlin-3 essenziell. (Ma et al. 2008; Moser et al. 2009a; Moser et al. 2009b; Lefort et al. 2012; Lefort & Ley 2012). Auf der anderen Seite ist bekannt, dass auch die Bindung von Liganden (z.B. die Bindung von ICAM1 an das β_2 -Integrin LFA1) über *Outside-In Signaling* die Konformation mit hoher Affinität stabilisieren kann. Die bidirektionalen

Signalprozesse am Integrin – *Inside-Out Signaling*, was zur Erhöhung der Integrinaffinität führt und *Outside-In Signaling*, was nach Ligandenbindung zur Modulierung der Zellfunktionen und Interaktion mit dem Zytoskelett führt – können gleichzeitig stattfinden und stehen in einer kooperativen Wechselwirkung zu einander (Hynes 2002; Evans et al. 2009). Neueren Untersuchungen zufolge existiert eine vierte β_2 -Integrin-Konformation. Hierbei liegt das Integrin in einer abgeknickten hochaffinen Konformation vor und bindet ICAM1 *in cis*. In dieser Konformation wird die Adhäsion *in vitro* und *in vivo* gehemmt (Fan et al. 2016; Fan et al. 2019).

Zur Familie der β_2 -Integrine gehören vier Integrine bestehend aus jeweils einer von vier α -Untereinheiten (*Cluster of Differentiation* (CD) 11a-d) und der β_2 -Untereinheit (CD18): $\alpha_L\beta_2$ -Integrin (CD11a/CD18, LFA1), $\alpha_M\beta_2$ -Integrin (CD11b/CD18, Mac1, Komplementrezeptor 3 (CR3, *Complement Receptor*)), $\alpha_X\beta_2$ -Integrin (CD11c/CD18, p150,95, CR4) und $\alpha_D\beta_2$ -Integrin (CD11d/CD18). Diese I-Domänen enthaltenden Integrine werden nur auf Leukozyten exprimiert (Luo et al. 2007; Tan 2012). Sie haben eine grundlegende Bedeutung für die Funktion des Immunsystems. Dies wird anhand des LAD I – Syndroms, bei dem durch Mutationen keine oder nur dysfunktionale β_2 -Integrine exprimiert werden, deutlich. Die Patienten leiden an lebensbedrohlichen, immer wiederkehrenden mikrobiellen Infektionen, verursacht durch eine gestörte Adhäsion und Phagozytose der Leukozyten (Anderson & Springer 1987; Hogg & Bates 2000).

Das $\alpha_L\beta_2$ -Integrin LFA1 wird auf allen Leukozyten exprimiert und hat sechs identifizierte Liganden, die alle zur Immunglobulinsuperfamilie gehören: die ICAMs 1 – 5 und JAM1 (Tan 2012). Die I-Domäne der LFA1 α -Kette bindet ICAMs 1 bis 3 mit abnehmender Affinität (ICAM1 > ICAM2 > ICAM3) (Shimaoka et al. 2001). Die am besten beschriebene Aufgabe übt LFA1 bei der Extravasation von Leukozyten aus (siehe auch Abschnitt 1.2). Die Bindung von PSGL1 an E-Selektin während des Leukozytenrollens führt zur partiellen Aktivierung von LFA1 über einen Syk-vermittelten Signalweg. LFA1 bindet mit intermediärer Affinität an ICAM1 und trägt mit Hilfe dieser Bindung zum langsamen Rollen der Leukozyten bei (Zarbock et al. 2007; Zarbock & Ley 2008). Für die Leukozytenadhäsion auf dem Endothel ist die Bindung von Chemokin-aktiviertem LFA1 mit hoher Affinität an seine ICAM-Liganden essenziell. Bei der transzellulären und parazellulären Transmigration von Leukozyten

durch die Endothelzellschicht ist LFA1 durch Interaktionen mit endotheliale ICAM und JAM1 beteiligt (Ley et al. 2007; Nourshargh et al. 2010). LFA1 ist auch entscheidend in Prozesse der adaptiven Immunantwort involviert. Es trägt zur Formung der Immunologischen Synapse zwischen T-Zelle und Antigen-präsentierender Zelle (APC, *Antigen Presenting Cell*) bei. Dabei bindet aktiviertes LFA1 der T-Zelle an ICAM1 auf der APC. Durch *Outside-In Signaling* über LFA1 wird die Aktivierungsschwelle der naiven T-Zelle durch die APC herabgesetzt. Somit kontrolliert LFA1 den Aktivierungsstatus von naiven T-Zellen (Grakoui et al. 1999; Perez et al. 2003; Tan 2012). Des Weiteren wird LFA1 für die Bindung von zytotoxischen T-Zellen und Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) an ihre Zielzellen zum Zwecke der Lyse benötigt (Davignon et al. 1981; Kohl et al. 1984; Tan 2012).

Das $\alpha_M\beta_2$ -Integrin Mac1 wurde früh als Rezeptor für den Komplementfaktor iC3b beschrieben und wird deshalb auch als Komplementrezeptor (CR) 3 bezeichnet. Mac1 wird auf myeloischen Zellen (PMN und Monozyten / Makrophagen), NK-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert. Im Unterschied zu LFA1 besitzen die zahlreichen Liganden von Mac1 keine übereinstimmenden Bindungssequenzen. Neben dem Komplementfaktor iC3b bindet Mac1 u. a. ICAM1, Fibrinogen, JAM3, RAGE, Kollagene, Heparin und bakterielles LPS (Luo et al. 2007; Tan 2012). Insbesondere auf Phagozyten ist Mac1 ein Rezeptor mit essenzieller Bedeutung für Phagozytose und Produktion von ROS (Coxon et al. 1996). Mac1 ist ebenfalls bei der Rekrutierung von Leukozyten aus dem Blut involviert, wobei hier LFA1 die mit Abstand wichtigere Rolle zufällt. Einzig beim Schritt des *Intraluminal Crawling* von PMN scheint LFA1 verzichtbar, da dieser durch Bindung von Mac1 an ICAM1 vermittelt wird (siehe auch Abschnitt 1.2) (Schenkel et al. 2004; Phillipson et al. 2006). Zusätzlich zu der dominierenden LFA1-ICAM1-vermittelten Adhäsion auf dem Endothel gibt es Hinweise auf eine Mac1- und RAGE-vermittelte Adhäsion während der akuten Entzündungsreaktion, die, abhängig vom Auslöser der Entzündung, auch zur vorherrschenden Form der Bindung bei der Adhäsion werden kann (Frommhold et al. 2010; Frommhold et al. 2011). *Outside-In Signaling* über Mac1 beeinflusst das Überleben von PMN. Hierbei kann es jedoch je nach Aktivierungsstatus von Mac1 und der Stimuli zu Apoptose-fördernden oder -verzögernden Ereignissen kommen (Walzog et al. 1997; Watson et al. 1997; Whitlock et al. 2000). Mac1 ist bei der Ausbildung der immunologischen Toleranz involviert. So inhibiert aktiviertes Mac1 auf

Dendritischen Zellen, die zu den APCs gehören, die Aktivierung von T-Zellen. In Makrophagen schwächt Mac1 die TLR-induzierte inflammatorische Antwort ab. Außerdem wurde gezeigt, dass Mac1 die Aktivierung von NK-Zellen durch Poly I:C (synthetische doppelsträngige RNA) über den TLR3 vermindert. Andererseits wurde Mac1 auch mit der Entstehung von Multipler Sklerose in Verbindung gebracht. Mac1 bindet den Hauptbestandteil der Myelinscheiden der Axone der Nervenzellen, das *Myelin Basic Protein*, und präsentiert dieses autoreaktiven T-Zellen (Tan 2012).

Das $\alpha_x\beta_2$ -Integrin kommt auf Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen, NK-Zellen und einigen Populationen von aktivierten B- und T-Zellen, nicht jedoch auf PMN vor. Seine Expression gilt als Marker für reife Dendritische Zellen. Die Liganden des $\alpha_x\beta_2$ -Integrins ähneln denen von Mac1. Es bindet iC3b und Fibrinogen. Aufgrund seiner Eigenschaft iC3b zu binden und damit die Phagozytose von iC3b-opsonisierten Partikeln zu vermitteln, wird es auch als CR4 bezeichnet. Außerdem ermöglicht es die Adhäsion von Monozyten auf Endothelzellen. Wie Mac1 könnte das $\alpha_x\beta_2$ -Integrin ebenfalls zum Entstehen von Multipler Sklerose beitragen (Luo et al. 2007; Tan 2012).

Das $\alpha_D\beta_2$ -Integrin wird auf Monozyten, Makrophagen, Eosinophilen Granulozyten und PMN exprimiert. Es bindet an ICAM3 (nicht ICAM1) und *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM1). Die Interaktion von $\alpha_D\beta_2$ -Integrin und hochreguliertem VCAM1 auf dem entzündeten Endothel kann vermutlich die Rekrutierung von Eosinophilen Granulozyten aus dem Blut vermitteln (Luo et al. 2007; Tan 2012).

Die vorherrschende Integrine auf PMN sind LFA1 und Mac1. Das nach Ligandenbindung von ihnen ausgehende *Outside-In Signaling* steuert so wichtige Funktionen wie die feste Adhäsion, das *Spreading* und die Migration bei der Rekrutierung aus dem Blut sowie die Komplement-vermittelte Phagozytose von Bakterien und die ROS-Produktion. Bei der Weiterleitung der Signale der β_2 -Integrine und bei der Stabilisierung eines Signalkomplexes kommt der Tyrosinkinase Syk eine zentrale und tragende Rolle zu (Schymeinsky et al. 2007a).

1.4 Die Tyrosinkinase Syk

Die Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinase Syk wird in Säugetieren am höchsten in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Die Expression ist jedoch nicht nur auf hämatopoetische Zellen beschränkt, sondern konnte auch in anderen Zellen wie Fibroblasten, Epithelzellen, Hepathozyten, neuronale Zellen und vaskuläre endotheliale Zellen nachgewiesen werden (Mócsai et al. 2010, Yanagi et al. 2001). Syk hat ein Molekulargewicht von 72 kDa und ist bei der Maus 629 AS und beim Menschen 635 AS lang. Am N-Terminus besteht Syk aus zwei *Src Homology 2*- (SH2-) Domänen, die dicht aufeinander folgen und durch die Interdomäne A verbunden werden. An die zweite SH2-Domäne schließt sich die Interdomäne B an, die diese SH2-Domäne von der am C-Terminus gelegenen Tyrosinkinasedomäne trennt (Abbildung 3 A). Vor allem in der Interdomäne B und der Kinasendomäne hat Syk eine große Anzahl an Tyrosinresten, die nach der Aktivierung von Syk autophosphoryliert werden und als Bindungsstellen für die verschiedenen nachgeschalteten Proteine und damit zur Signalübertragung dienen (Furlong et al. 1997; Schymeinsky et al. 2007a; Mócsai et al. 2010).

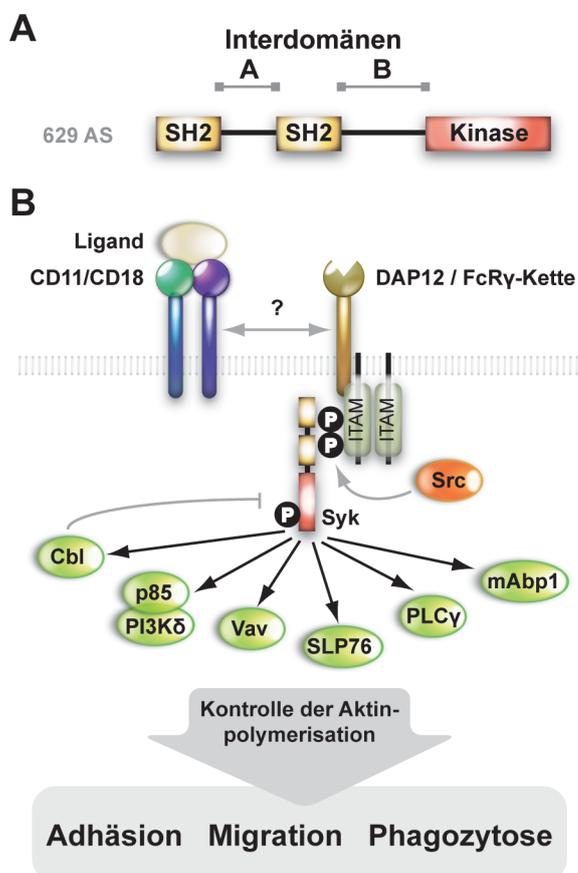


Abbildung 3 β_2 -Integrin-vermittelte Signalübertragung über Syk

(A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von Syk. N-terminal besitzt Syk zwei SH2- (*src homology 2*) Domänen. Zwischen ihnen befindet sich die Interdomäne A. C-terminal folgen Interdomäne B und die Tyrosinkinasedomäne (Kinase). (B) Schematische Darstellung der Signalübertragung über Syk. Nach Ligandenbindung an β_2 -Integrine werden ITAMs durch Src-Kinasen phosphoryliert. Syk bindet über die SH2-Domänen an die phosphorylierten Tyrosine der ITAMs und wird ebenfalls durch Src-Kinasen phosphoryliert. Aktiviertes Syk rekrutiert und aktiviert nachgeschaltete Partner (gekennzeichnet durch schwarze Pfeile). Die Signalübertragung hat vielfältige Prozesse zur Folge, die die Aktinpolymerisation und damit Adhäsion, Migration und Phagozytose von PMN kontrollieren. (B) Verändert nach Schymeinsky et al. 2007a.

In PMN ist Syk in verschiedene zelluläre Funktionen, die durch Ligandenbindung durch β_2 -Integrine und im Falle des langsamen Leukozytenrollens durch Bindung von E-Selektin an PSGL1 vermittelt werden, involviert. Bei letzterem kommt es nach Bindung von leukozytärem PSGL1 an endotheliales E-Selektin zu einem *Inside-Out Signaling* über die Tyrosinkinase Syk, welches zu einer partiellen Aktivierung von LFA1 führt. LFA1 mit intermediärer Affinität kann nun an ICAM1 auf dem Endothel binden und so zur Verminderung der Rollgeschwindigkeit beitragen. Die Signaltransduktion von Selektin-gebundenem PSGL1 läuft ganz ähnlich zur Signaltransduktion von β_2 -Integrinen, welche später näher diskutiert wird, ab: Syk wird hierbei durch ITAM tragende Adapter aktiviert (Zarbock et al. 2007; Zarbock & Ley 2008; Futosi et al. 2013). Auch für Adhäsion und *Spreading*, welche durch β_2 -Integrine vermittelt werden, ist Syk von fundamentaler Bedeutung. Syk-defiziente murine PMN zeigten nach Stimulierung mit $\text{TNF}\alpha$ keine nennenswerte Adhäsion und darauf folgendes *Spreading* (Mócsai et al. 2002). Dies konnte *in vivo* im Entzündungsmodell des *M. cremasters* bestätigt werden. Syk-defiziente Leukozyten waren nicht in der Lage, am Trauma- oder fMLP-induzierten entzündlichen Endothel fest und andauernd zu adhären und *Spreading* herbeizuführen (Schymeinsky et al. 2006; Frommhold et al. 2007). Die Freisetzung von ROS und die Degranulierung nach Bindung von β_2 -Integrinen induziert durch $\text{TNF}\alpha$, fMLP, LPS oder durch das Chemokin MIP2, nicht jedoch die adhäsionsunabhängige Stimulation von ROS-Produktion und Degranulierung durch den Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), blieben in Syk-defizienten PMN aus (Mócsai et al. 2002). Syk spielt ebenfalls eine essenzielle Rolle bei der Komplement-vermittelten Phagozytose von iC3b-opsonisierten Zymosanpartikeln und *E. coli* über Mac1 durch Neutrophilen-ähnlich differenzierte HL-60-Zellen (dHL-60) oder Syk-defiziente PMN (Shi et al. 2006; Schymeinsky et al. 2009). Letztlich ist auch die Migration als bedeutender Schritt der Rekrutierung von PMN entscheidend von der Funktion von Syk abhängig. dHL-60-Zellen mit durch RNA-Interferenztechnik herunterreguliertem Syk und Syk-defiziente murine PMN waren zu keiner zweidimensionalen chemotaktisch gerichteten Migration in der Lage. Die Relevanz *in vivo* wurde im Modell des entzündeten *M. cremasters*, einem Wundheilungsmodell der Haut und der reversen passiven

Arthus-Reaktion – einem Modell für die akute Entzündungsantwort – gezeigt. Bei allen Modellen war in Abwesenheit von Syk die Extravasation von PMN bzw. Infiltration des Gewebes durch PMN stark beeinträchtigt, was eine verlängerte Wundheilungszeit bzw. eine schwer verminderte Ödembildung und Blutung bei der Arthus-Reaktion zur Folge hatte (Schymeinsky et al. 2006; Schymeinsky et al. 2007b). Diese umfangreichen Untersuchungen machen deutlich, dass Syk von essenzieller Bedeutung für das *Outside-In Signaling* ausgehend von β_2 -Integrinen ist und hierbei als zentraler Bestandteil die Weiterleitung der Signale von β_2 -Integrinen in die Zelle ermöglicht.

Syk und die verwandte Tyrosinkinase ZAP70, die vor allem in T-Zellen und Natürlichen Killerzellen exprimiert wird, sind schon lange als essenzielle Akteure bei der Signaltransduktion von B-Zell-, T-Zell- und Fc-Rezeptoren, der klassischen Immunrezeptorsignalübertragung, bekannt. Alle diese Rezeptoren sind mit Membranproteinen assoziiert, die intrazellulär ein Motiv besitzen, das sich *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motiv*, kurz ITAM, nennt. Durch die Bindung dieser Rezeptoren an Liganden werden die ITAM-Sequenzen durch Src-Kinasen phosphoryliert, Syk und ZAP70 rekrutiert und aktiviert (Mócsai et al. 2010). Für Syk konnte jedoch auch gezeigt werden, dass es infolge von β_2 -Integrin-vermittelten Signalprozessen aktiviert wird (Yan et al. 1997). Obwohl Integrine nicht wie die klassischen Immunrezeptoren mit ITAM tragenden Membranproteinen assoziiert sind, folgt die Aktivierung von Syk durch β_2 -Integrine im Wesentlichen den Prozessen bei der klassischen Immunrezeptorsignalübertragung. Dies geschieht durch die Phosphorylierung von ITAM-Sequenzen in den Adapterproteinen DAP12 und Fc-Rezeptor- γ -Kette (FcR γ -Kette) durch Src-Kinasen. β_2 -Integrine sind nicht direkt mit diesen Adaptermolekülen assoziiert und es ist noch unklar, wie die Funktionen von β_2 -Integrinen und DAP12 und FcR γ -Kette verbunden sind. Syk kann über seine SH2-Domänen an die phosphorylierten Tyrosine der ITAM-Sequenz binden und wird initial durch Src-Kinasen phosphoryliert (Abbildung 3 B) (Mócsai et al. 2006; Mócsai et al. 2010). Durch die Bindung von Syk über beide SH2-Domänen an die ITAM-Sequenz wird der autoinhibierte Zustand von Syk aufgehoben und dessen Kinasedomäne aktiviert. Anhaltende Aktivierung von Syk erfolgt vor allem durch Autophosphorylierung *in trans* (Mócsai et al. 2010). Nach Aktivierung interagiert Syk mit

einer Reihe von Proteinen, die Signale weiterleiten und umsetzen, darunter: die PLC γ , der GEF Vav, das Adapterprotein *SH2 Domain-containing Leukocyte Protein 76* (SLP76), die E3-Ubiquitinligase *Casitas B-Lineage Lymphoma* (Cbl) und die regulatorische Untereinheit p85 der PI3K (Sada et al. 2001; Berton et al. 2005; Moon et al. 2005; Schymeinsky et al. 2006; Schymeinsky et al. 2007a; Schymeinsky et al. 2007b; Mócsai et al. 2010). Die E3-Ubiquitinligase Cbl ist ein Negativregulator von Syk und führt zur Ubiquitinierung und Degradation von Syk (Rao et al. 2002). Die anderen Moleküle tragen offenbar zur Bildung eines Signalkomplexes bei, indem Signalproteine wie PKC, p38 MAPK und *Ras Homologue-* (Rho-) Kinasen involviert sind, der die Produktion von ROS induziert und über die Kontrolle des Aktinzytoskeletts PMN Funktionen wie Adhäsion, Migration und Phagozytose ermöglicht (Abbildung 3 B) (Schymeinsky et al. 2007a; Mócsai et al. 2010). Ein weiterer möglicher Regulator in diesem Signalkomplex, von dem gezeigt werden konnte, dass er von Src- und Syk-Kinasen phosphoryliert wird, ist das Adapterprotein *Mammalian Actin-binding Protein 1* (mAbp1, HIP55, SH3P7, *Drebrin-like Protein*) (Lock et al. 1998; Larbolette et al. 1999; Jin Han et al. 2005).

1.5 Das Aktin-bindende Protein mAbp1

Das *Mammalian Actin-binding Protein 1* (mAbp1) ist ein 55 kDa großes Adapterprotein mit 433 AS und wird in Säugetieren in vielen Geweben und Zelllinien exprimiert. Anhand seiner evolutionär konservierten *Actin-depolymerizing Factor Homology-* (ADF-H-) Domäne, die der Bindung an Aktin dient, wird mAbp1 zu der Gruppe der ADF-H-Domänen enthaltenden Proteine gezählt. Diese Gruppe besteht aus drei verschiedenen Untergruppen: Der ADF/Cofilin-Familie mit *Actin-depolymerizing Factor* (ADF) und Cofilin, der Familie der Twinfiline und der Drebrin/Abp1-Familie, zu der mAbp1 gehört. Cofilin interagiert über die ADF-H-Domäne mit globulärem (G-) Aktin und F-Aktin und depolymerisiert F-Aktin vom (-)-Ende des Filaments. Twinfilin fungiert als Negativregulator der Aktinpolymerisation, indem es an inaktives Adenosindiphosphat-(ADP-) gebundenes G-Aktin bindet und damit den Austausch mit ATP, was zu aktiven G-Aktin führt, verhindert (Kessels et al. 2001; Kessels et al. 2000; Paavilainen et al. 2004; Schymeinsky et al. 2011). An die am N-Terminus gelegene ADF-H-Domäne von mAbp1 schließt sich eine helikale *Coiled-Coil*-Domäne an, die von mAbp1 zusätzlich zur ADF-H-Domäne zur F-Aktin-Bindung

benötigt wird. Am C-Terminus befinden sich eine Prolin-reiche Domäne und eine SH3-Domäne, die beide die Bindung an Interaktionspartner ermöglichen (Larbolette et al. 1999; Kessels et al. 2000; Kessels et al. 2001; Schymeinsky et al. 2011). Das Homolog zu mAbp1 in Hefe (Abp1p) hat mit mAbp1 die N-terminale ADF-H-Domäne und die C-terminalen Prolin-reiche Domäne und SH3-Domänen gemein. Zusätzlich enthält Abp1p jedoch noch zwei sogenannte *acidic* (saure) Domänen (Abbildung 4). Über diese Domänen trägt Abp1p zur Aktivierung des *Actin-related Protein* (Arp) 2/3 Komplexes bei, der die Verzweigung von Aktinfilamenten induziert, einem wichtigen Schritt bei der Aktinpolymerisation. Durch diese Eigenschaft, Arp2/3 zu aktivieren, wird Abp1p als *Nucleation Promoting Factor* (NPF) bezeichnet (Olazabal & Machesky 2001; Goode et al. 2001; Haynes et al. 2007). mAbp1 hat keine Funktion als NPF. In neuronalen Zellen konnte aber gezeigt werden, dass mAbp1 mit dem neuronalen Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein (N-WASP) interagiert. Wiscott-Aldrich-Syndrom-Proteine (WASP) besitzen ähnliche Sequenzen wie Abp1p und haben auch eine Arp2/3-aktivierende NPF-Funktion. mAbp1 könnte also über die Interaktion mit WASP/N-WASP die Dynamik von Aktin regulieren (Pinyol et al. 2007).

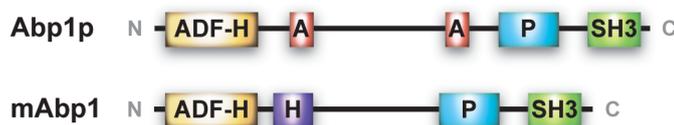


Abbildung 4 Schematischer Aufbau von mAbp1

Schematische Darstellung der Struktur von mAbp1 im Vergleich zum Homolog in Hefe Abp1p. Am N-Terminus befindet sich die ADF-H-Aktinbindungsdomäne, am C-Terminus eine Prolin-reiche (P) und eine SH3-Domäne. Beide dienen der Protein-Protein-Interaktion. C-terminal der ADF-H-Domäne enthält mAbp1 eine helikale *Coil-Coiled*-Domäne (H), die zusätzlich für eine effektive Aktinbindung benötigt wird. Das Hefe Abp1p besitzt zwei saure (*acidic*) Sequenzen (A), die für die Funktion von Abp1p als *nucleation promoting factor* (NPF) essenziell sind. Verändert nach Schymeinsky et al. 2011.

Über die Funktion von mAbp1 ist noch nicht sehr viel bekannt. mAbp1 und Abp1p sind in Rezeptor-vermittelter Endozytose und den Vesikeltransfer involviert (Goode et al. 2001; Kessels et al. 2001). Es konnte gezeigt werden, dass mAbp1 mit der großen GTPase Dynamamin interagiert und für deren Verbindung mit dem Zytoskelett

essenziell ist. Diese Verbindung war Voraussetzung für eine effiziente Vesikelendozytose (Kessels et al. 2001). In Lymphozyten ist mAbp1 essenziell für die Signalübertragung von T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren, bei dieser es auch durch Syk- und Src-Kinasen phosphoryliert wird (Larbolette et al. 1999). In T-Zellen aktiviert mAbp1 die *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), die wiederum die Freisetzung von IL-2 durch aktivierte T-Zellen reguliert. mAbp1-defiziente T-Zellen haben Defekte in der Zytokinproduktion, Reifung und Proliferation (Jin Han et al. 2005). In B-Zellen hat das Fehlen von mAbp1 einen negativen Effekt auf Antigeninternalisierung, -prozessierung und -präsentation (Onabajo et al. 2008). mAbp1-defiziente Mäuse sind lebens- und fortpflanzungsfähig. Einige der homo- und heterozygoten Mäuse litten an Splenomegalie, Hypertrophy und Insuffizienz des Herzens, Lungenödemen und -emphysemen (Jin Han et al. 2005; Connert et al. 2006). Zusätzlich war die Endozytose von primären neuronalen Zellen vermindert. Dementsprechend konnten bei mAbp1-defizienten Mäusen Verhaltensstörungen beobachtet werden. (Connert et al. 2006). Aufgrund seiner Struktur, die eine F-Aktin-bindende ADF-H-Domäne und eine SH3-Domäne mit Adapterfunktion bereithält, scheint mAbp1 ein aussichtsreicher Kandidat für die Verbindung des Aktinzytoskeletts mit einer Vielzahl anderer Proteine zu sein. mAbp1 könnte somit, wie bisherige Studien andeuten, bei einer großen Bandbreite von zellulären Funktionen ein wichtiges Instrument sein, diese mit dem Zytoskelett zu verzahnen.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In früheren Studien der Arbeitsgruppe wurden β_2 -Integrin-vermittelte Signalprozesse in PMN untersucht. Hierbei konnte die zentrale Rolle von Syk für die Weiterleitung der Signale von aktivierten β_2 -Integrinen zu Effektorproteinen und damit für Aktivierung und Rekrutierung von PMN gezeigt werden (siehe Abbildung 3 B): Die β_2 -Integrin-vermittelte Aktivierung von Syk war Voraussetzung für Adhäsion, Migration und Phagozytose von PMN *in vitro* und für eine effektive Rekrutierung von PMN *in vivo* (siehe Abschnitt 1.4) (Schymeinsky et al. 2005; Schymeinsky et al. 2006; Schymeinsky et al. 2007b; Frommhold et al. 2007; Schymeinsky et al. 2009). Ein Protein dieses von Syk regulierten Signalkomplexes ist mAbp1 (Larbolette et al.

1999), welches zusätzlich einen potenzieller Adapter zum Aktinzytoskelett darstellen könnte.

Mit Hilfe weiterführender Experimente wurde die Rolle von mAbp1 während der β_2 -Integrin-vermittelten Phagozytose von Bakterien, die mit dem Komplementfaktor iC3b opsonisiert waren, untersucht. In Neutrophilen-ähnlich differenzierten HL-60-Zellen (dHL-60) wurde *Enhanced Green Fluorescent Protein*- (EGFP-, Grün-fluoreszierendes Protein-) gekoppeltes mAbp1 dynamisch am Ort der Partikelaufnahme angereichert. Hier kolokalisierte es mit der Tyrosinkinase Syk. In Abwesenheit von Syk oder im Falle der pharmakologischen Inhibierung von Syk durch Piceatannol wurde nicht nur die Phagozytose selbst, sondern ebenso die Rekrutierung von mAbp1 zum Ort der Partikelbindung blockiert. Dort spielt es, kontrolliert durch Syk, eine bedeutende Rolle bei der β_2 -Integrin-vermittelten Phagozytose: Die Herunterregulierung von mAbp1 mittels RNA-Interferenztechnik in dHL-60-Zellen oder das Fehlen von mAbp1 in murinen PMN reduzierte die Phagozytose von iC3b-opsonisierten Bakterien drastisch. Die Relevanz dieses Ergebnisses wurde an einem Infektionsmodell *in vivo* demonstriert. Die Bekämpfung von Infektionen mit *Salmonella typhimurium* in mAbp1-defizienten Mäusen blieb ineffektiv (Schymeinsky et al. 2009).

Ähnlich wie bei der Phagozytose konnte auch bei anderen PMN-Funktionen wie der Adhäsion und der zweidimensionalen chemotaktischen Migration auf dem Mac1-Liganden Fibrinogen, eine Syk-abhängige Anreicherung von mAbp1 an der Zellfront von polarisierten dHL-60-Zellen gezeigt werden. Dort kolokalisierte mAbp1 zusätzlich zu Syk mit F-Aktin (Hepper et al. 2012).

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die funktionelle Bedeutung von mAbp1 für die Adhäsion, das *Spreading* und die Migration von PMN im Zuge der β_2 -Integrin-vermittelten Signaltransduktion untersucht werden. In Voruntersuchungen sollte zunächst die Bedeutung von Syk für Adhäsion und *Spreading* von PMN *in vitro* verifiziert werden. In weiterführenden Experimenten wurden mAbp1-defiziente Mäuse und Wildtypkontrolltiere in intravitalmikroskopischen Untersuchungen im Entzündungsmodell des *M. cremasters* eingesetzt, um die verschiedenen zellulären Schritte der Rekrutierungskaskade zu analysieren. Ihre aus dem Knochenmark isolierten PMN wurden in verschiedenen funktionellen *in vitro* Experimenten verwendet, um

die Bedeutung von mAbp1 für die Adhäsion, das *Spreading* und die zweidimensionale Migration im Detail zu untersuchen. Um die Rolle im humanen System zu analysieren, wurden Neutrophilen-ähnliche HL-60-Zellen verwendet, die mAbp1 mittels der RNA-Interferenztechnik über die Expression einer *Short Hairpin* RNA herunterregulierten. Insgesamt sollten die Untersuchungen Aufschluss über die funktionelle Rolle von mAbp1 für die Rekrutierung von PMN an den Entzündungsort geben und so zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen der akuten Entzündungsreaktion beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Amersham™ Protran® Western Blotting Nitrozellulosemembran, β -Mercaptoethanol, bovines Serumalbumin (BSA), Casein, chemilumineszentes Peroxidasesubstrat *ECL™ Detection Reagents*, Dimethylsulfoxid (DMSO), Fibrinogen aus humanem oder murinem Plasma, N-Formylmethionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Glukose, Glutaraldehydlösung, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), Kristallviolett, Natriumchlorid, Paraformaldehyd, Percoll®, Puromycin, Triton® X-100 und Tween-20 wurden über Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen. Es wurden Acrylamidlösung, Ammoniumpersulfat (APS), Bromphenolblau, Essigsäure, Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA), Glycin, Glycerin, Kalziumchlorid, Magermilchpulver, Magnesiumchlorid, Mangan(II)-chlorid, Methanol, Natriumdodecylsulfat (SDS), Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Tris (-hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) von AppliChem (Darmstadt, Deutschland) verwendet. Fötales Bovines Serum (FBS), Hanks' Salzlösung (*Hanks' Buffered Salt Solution*, HBSS), Penicillin/Streptomycin, phosphatgepufferte Kochsalzlösung (*Phosphate Buffered Saline*, PBS), Poly-L-Lysin, RPMI-1640 Medium und Trypsin/EDTA-Lösung wurden bei Biochrom (Berlin, Deutschland) bestellt. Alexa 488-konjugiertes Fibrinogen, Lipofectamine™ 2000 und Opti-MEM® I Medium wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Humanes und murines rekombinantes ICAM1 und murines P-Selektin wurden von R&D Systems (Minneapolis, MN, USA) geliefert. *Keratinocyte-derived Chemokine* (KC, CXCL1) wurde über PeproTech (Hamburg, Deutschland) bezogen. Murines TNF α wurde bei Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) bestellt. BD FACS™ *Lysing Solution* wurde von BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) bezogen.

2.1.2 Antikörper

Der monoklonale Maus anti-humanes Syk (IgG2a, Klon 4D10, sc1240), der polyklonale Kaninchen anti-Syk (N-19) und der polyklonale Ziege anti-Aktin Antikörper (I-

19, sc-1616) wurden bei Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) erworben. Der polyklonale Ziege anti-mAbp1 Antikörper (anti-Hip55, ab2836) wurde von Abcam (Cambridge, UK) bezogen. Der monoklonale Maus anti-mAbp1 Antikörper (anti-Hip55, IgG1, 612614), der monoklonale Ratte anti-Maus CD18 Antikörper (IgG, Klon Game-46), der monoklonale Phycoerythrin- (PE-) konjugierte Ratte anti-Maus CD18 Antikörper (IgG2a), der monoklonale Phycoerythrin- (PE-) konjugierte Ratte anti-Maus CD11a Antikörper (IgG2a) und der PE-konjugierte Ratte IgG2a Kontrollantikörper wurden bei BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland) bestellt. Der Fluoresceinisothiocyanat- (FITC-) konjugierte Ratte anti-Maus GR1 Antikörper, der PE-konjugierte anti-Maus CD11b Antikörper (IgG2b), der FITC-konjugierte Ratte IgG2b und der PE-konjugierte Ratte IgG2b Kontrollantikörper wurden von EuroBiosciences GmbH (Friesoythe, Deutschland) bezogen. Der monoklonale Maus anti-CD18 Antikörper (IgG, Klon MHM23) wurde bei GeneTex (San Antonio, TX, USA) erworben. Der sekundäre Peroxidase-konjugierte Antikörper aus der Ziege gegen die leichte Kette des Immunglobulins (Ig) G der Maus wurde von Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) geliefert. Der sekundäre Peroxidasegekoppelte Kaninchen anti-Ziegen-IgG Antikörper wurde bei Calbiochem (Darmstadt, Deutschland) bestellt. Die sekundären Alexa 488-konjugierten Ziege anti-Maus-IgG, Huhn anti-Kaninchen-IgG und Esel anti-Ziegen-IgG Antikörper wurden von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) geliefert. Der monoklonale Maus mAb24 Antikörper (Dransfield & Hogg 1989) gegen die hochaffine Konformation des humanen CD18 wurde großzügig von Dr. Nancy Hogg (Leukocyte Adhesion Laboratory, Cancer Research UK London Research Institute, London, UK) zur Verfügung gestellt.

2.1.3 Mäuse

Mäuse mit dem $Dbn1tm1^{Jwnd}$ Allel ($mAbp1^{-}$) (Connert et al. 2006) wurden großzügig von Herrn Prof. Dr. Jürgen Wienands (Abteilung Zelluläre und Molekulare Immunologie, Universitätsmedizin Göttingen, Georg-August-Universität, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt und homozygot ($mAbp1^{-/-}$) im BALB/c genetischen Hintergrund gehalten.

Die LFA1^{-/-}-Mäuse (Berlin-Rufenach et al. 1999) wurden freundlicherweise von Dr. Nancy Hogg (Leukocyte Adhesion Laboratory, Cancer Research UK London Research Institute, London, UK) zur Verfügung gestellt.

Knochenmarkchimären mit einem Syk^{-/-} oder Syk^{+/-} rekonstituierten hämatopoetischen System wurden großzügig von Attila Mócsai (Department of Physiology, Semmelweis University School of Medicine, Budapest, Ungarn) zur Verfügung gestellt. Die Mäuse mit dem Syk^{m1^{Tyb}} Allel (Syk⁻) (Turner et al. 1995) wurden heterozygot (Syk^{+/-}) im C57BL/6 genetischen Hintergrund gehalten. Syk^{-/-} oder Syk^{+/-}-Knochenmarkchimären wurden hergestellt, indem das letal bestrahlte Knochenmark durch hämatopoetische Stammzellen aus der fötalen Leber von Syk^{-/-} oder Syk^{+/-}-Mäusen rekonstituiert wurde (Mócsai et al. 2002).

2.1.4 Zelllinien

Die humane Zelllinie HL-60 (akute myeloische Leukämie, ACC 3), die murine Zelllinie WEHI-3B (myelomonozystische Leukämie, ACC 26) und die humane Zelllinie 293T (embryonale Nierenfibroblasten, ACC 635) wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig, Germany) zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Gentechnische Konstrukte

Die Expressionsplasmide pCMVΔR8.9 (retroviraler Verpackungsvektor) und pVSVG (Hüllprotein des Vesikulären Stomatitisvirus zur Pseudotypisierung von Retroviren) (Zufferey et al. 1997) wurden freundlicherweise von Dr. Alexandra Lepier (Institut für Physiologische Genomik, LMU, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Die lentiviralen Vektoren die für eine *Short Hairpin* (sh) Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) gegen das humane mAbp1 kodieren (MISSION[®] shRNA, fünf verschiedene shRNAs gegen mAbp1 im Set) und der lentivirale Kontrollvektor MISSION[®] non-target shRNA wurden über Sigma (Deisenhofen, Deutschland) bezogen.

2.1.6 ICAM1(D1-2)-Fc-Fusionsprotein

Das Fusionsprotein des verkürzten murinen ICAM1 mit den Domänen D1-D2 und dem humanen Fc γ 1-Fragment (Semmrich et al. 2005) wurde freundlicherweise von Dr. Melanie Laschinger (Chirurgische Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar, Technische Universität München, München, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

2.1.7 Mikroskope

Für mikroskopische Analysen wurden folgende Geräte benutzt: Konfokales Mikroskop: Zeiss LSM 410/Axiovert 135 Mikroskop mit Zeiss 63x/1.2 Wasser- und Zeiss 63x/1.4 Ölobjektiven (Zeiss, Göttingen, Deutschland); Lichtmikroskope: Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit Zeiss Plan-Apochromat 63x/1,4 Ölobjektiv, Zeiss Plan-Apochromat 20x und 10x/0,75 Luftobjektiven, einer AxioCam HR Digitalkamera und der AxioVision 4 Software (Zeiss, Göttingen, Deutschland) und Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit Zeiss Plan-Apochromat 20x und 10x/0,75 Luftobjektiven (Zeiss, Göttingen, Deutschland), Klimakammer 37°C, Coolsnap HQ2 Kamera (Roper scientific, Tucson, AZ, USA) und der Metamorph Software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (Kamera und Software installiert von Visitron Systems, Puchheim, Deutschland); Intravitalmikroskop (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Markus Sperandio, Walter Brendel Centre of Experimental Medicine, Ludwig-Maximilians-Universität, München): Leitz aufrechtes Mikroskop Modell 512815/20 mit Leitz 40x Immersionsobjektiv für Kochsalzlösung und Wasser (SW40/0.75) (Leitz, Wetzlar, Deutschland).

2.1.8 Flusskammern und Präzisionspumpen

Für die Untersuchung des Phänotyps von PMN und Leukozyten unter Schubspannung wurden folgende Flusskammern verwendet: IBIDI μ -slides VI 0.4 aus Plastik (IBIDI GmbH, Martinsried, Deutschland) und Mikroflusskammern aus Glas (20 x 200 μ m und 0,2 x 2 mm Querschnitt; VitroCom, Mountain Lake, NJ, USA) (Hepper et al. 2012; Frommhold et al. 2010; Schymeinsky et al. 2009).

Mit Hilfe folgender Präzisionspumpen konnte über Spritzen und Schläuche in den jeweiligen Kammersystemen die gewünschten Schubspannungen erzeugt werden:

Modell KDS-232 (KD Scientific, Holliston, MA, USA) und Modell 22 (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) (Hepper et al. 2012; Frommhold et al. 2010).

2.1.9 Sonstige Materialien und Geräte

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen wurden mit Hilfe folgender Geräte durchgeführt: FACScan Durchflusszytometer und FACScanto II Durchflusszytometer, beides von BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland). Das FACScanto II Durchflusszytometer wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von PD Dr. Florian Krötz zur Verfügung gestellt (Kardiologie, Medizinische Poliklinik der Universität München, Campus Innenstadt, LMU, München).

Für die Analyse des *Spreadings* wurden die PMN auf mit einem Fettstift umrandeten Arealen (Durchmesser ca. 1 cm) auf einem runden Deckgläschen (Durchmesser 4 cm) der Firma Saur (Reutlingen, Deutschland) aufgebracht (Frommhold et al. 2007).

Die chemotaktische Migration von PMN wurde in Zigmondkammern (Zigmond 1977), welche von Neuro Probe (Gaithersburg, MD, USA) bezogen wurden, beurteilt (Schymeinsky et al. 2006).

2.1.10 Software

Die folgende Software wurde zur Datenanalyse, Auswertung, Erstellung von Abbildungen und Dokumenten und Literaturverwaltung benutzt: ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij>), das Manual Tracking Tool (Fabrice Cordelieres, Institut Curie, Orsay, Frankreich) und das Chemotaxis and Migration Tool (Gerhard Trapp und Elias Horn, ibidi GmbH, Martinsried, Deutschland) (Plugins für ImageJ Software, <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins>), WinMDI (The Scripps Research Institute, LaJolla, CA, USA), SigmaStat 2.0 und SigmaPlot 8.0 (SPSS Science, Chicago, IL, USA), Adobe® Illustrator® und Photoshop® CS2 (Adobe Systems Incorporated, USA), Microsoft® Office 2008 für Mac (Microsoft Corporation) und Papers 2 für Mac (Mekentosj, Aalsmeer, Niederlanden).

2.1.11 Statistik

Die ermittelten Daten wurden als arithmetischer Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD, *standard deviation*) bzw. \pm Standardfehler (SE, *standard error*) angegeben. Auf statistische Signifikanz wurde je nach Anforderung mit Student's t-Test, dem Mann-Whitney-U-Test (Rangsummentest) oder dem einfaktoriellen Rangsummentest nach Kruskal und Wallis getestet. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde für $p < 0,05$ angenommen.

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Puffern und Standardlösungen

Puffer und Standardlösungen wurden nach Protokollen von Sambrook und Russel (Sambrook & Russel 2001) unter Verwendung von Reinstwasser hergestellt. Puffer und Lösungen wurden vor der Verwendung autoklaviert oder mit Sterilfiltern mit einer Porengröße von 0,45 μm steril filtriert.

2.2.2 Zellkultur und Differenzierung von HL-60-Zellen

Die eukaryotischen Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen oder -schalen in Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium mit 10% (v/v) FBS und Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)) bei 37°C, 5% CO₂-Gehalt und 95% Luftfeuchte im Brutschrank kultiviert. Die Zellen der in Suspension wachsenden Zelllinie HL-60 (ACC 3) wurden zum Verdünnen bei 300 g für 10 min in einem Plastikröhrchen abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und wiederum bei 300 g für 10 min abzentrifugiert. Das gewaschene Zellpellet wurde in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und die gewünschte Menge an Zellsuspension in neue Zellkulturflaschen bzw. -schalen gegeben. Die Zellen der adhärent wachsenden Zelllinien WEHI-3B (ACC 26) und 293T (ACC 635) wurden nach Entstehen eines einheitlichen Zellrasens (konfluente Zellkultur) wie folgt verdünnt: Zunächst wurde das alte Zellkulturmedium von den Zellen genommen und der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen. Um ein Ablösen der Zellen zu erreichen, wurde zu den Zellen Trypsin/EDTA(0,05%/0,02%)-Lösung gegeben und diese wenige Minuten bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem Zellkulturmedium aufgenommen, die gewünschte Menge an

Zellsuspension wurde in neue Zellkulturflaschen bzw. -schalen gegeben und anschließend mit Zellkulturmedium aufgefüllt.

Um eine PMN-ähnliche Differenzierung von HL-60-Zellen (differenzierte HL-60-Zellen, dHL-60) zu induzieren, wurden die Zellen ($1 \times 10^6/\text{ml}$) in Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium mit FBS und Penicillin/Streptomycin), welches mit 1,3% (v/v) DMSO versetzt wurde, für sechs Tage im Brutschrank kultiviert (Schymeinsky et al. 2006; Srinivasan et al. 2003).

2.2.3 Isolierung von PMN aus dem Knochenmark der Maus

Murine PMN wurden aus dem Knochenmark über einen diskontinuierlichen Dichtegradienten aus Percoll® isoliert. Zunächst wurde das Percoll® mit 0,9% (w/v) Natriumchlorid versetzt. Von dem nun isotonen Percoll® wurde mit PBS drei Verdünnungen hergestellt: 72%, 64% und 52% (v/v) Percoll®. Der diskontinuierliche Dichtegradient wurde in einem 15-ml-Röhrchen durch vorsichtiges Überschichten von jeweils 3 ml der Percoll®-Verdünnungen, ausgehend von der Verdünnung mit der höchsten Dichte (72%), hergestellt. Anschließend wurden Femur, Tibia und Humerus der getöteten Maus präpariert, die Gelenkköpfchen der Knochen abgeschnitten und das Knochenmark mit PBS mittels einer feinen Kanüle herausgespült. Das Knochenmark wurde einmal in 50 ml PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 g für 10 min) und das Pellet anschließend in 1 ml PBS aufgenommen. Die Suspension des Knochenmarks wurde vorsichtig auf den Dichtegradienten geschichtet. Die Auftrennung der Knochenmarkszellen im Dichtegradienten erfolgte durch einen Zentrifugationsschritt (1000 g für 30 min). Dabei reicherten sich die Knochenmarkszellen entsprechend ihrer Dichte an den Grenzschichten zwischen den Percoll®-Verdünnungen an. Die relativ dichten PMN konnten nun an der Grenzschicht zwischen 72% und 64% Percoll®-Verdünnung als milchige Schicht mittels einer Pipette abgenommen werden (ca. 2 – 3 ml Volumen). Nach einem Waschschrift mit 50 ml PBS wurden die isolierten PMN in 10 ml Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium mit FBS und Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und über Nacht im Brutschrank kultiviert, bevor sie zu Versuchen eingesetzt wurden. Um eine abschließende Differenzierung und Reifung der aus dem Knochenmark isolierten PMN zu erreichen, wurde dem Zellkulturmedium 20% (v/v) konditioniertes Medium einer konfluenten Kultur der

IL-3 produzierenden Zelllinie WEHI-3B (ACC 26) zugesetzt (Schymeinsky et al. 2006).

2.2.4 Herstellung von mAbp1 herunterregulierenden HL-60-Zellen

Zur Herunterregulierung von mAbp1 in HL-60-Zellen wurde die RNA-Interferenztechnik benutzt. In HL-60-Zellen wurde mittels lentiviralem Gentransfer die genetische Information für eine shRNA gegen mAbp1 stabil in das Genom integriert (Schymeinsky et al. 2009). Um Lentiviren als Genvektor zu produzieren, wurden 293T-Zellen (ACC 635) in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und mittels Lipofectamine™ 2000 mit dem transduzierenden lentiviralen Vektor MISSION® shRNA bzw. dem Kontrollvektor MISSION® non target shRNA, dem retroviralen Verpackungsvektor pCMVΔR8.9 und dem Vektor kodierend für das Hüllprotein pVSV-G (Zufferey et al. 1997) entsprechend den Angaben des Herstellers kotransfiziert. Dabei wurde ein Verhältnis der Plasmide MISSION® shRNA Vektor : pCMVΔR8.9 : pVSV-G von 1:1 bei einer Gesamtkonzentration 5 µg Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid, DNA) pro Transfektionsansatz verwendet. Während der Produktion von Viruspartikeln wurden die 293T-Zellen in RPMI-1640 Medium mit 10% (v/v) FBS und 25 mM HEPES kultiviert. Virus enthaltende Überstände wurden 24 und 48 Stunden nach Transfektion der 293T-Zellen geerntet. Im Folgenden wurden nun die HL-60-Zellen in RPMI-1640 Medium mit 10% (v/v) FBS und 25 mM HEPES mit 33% (v/v) Virus enthaltenden Überstand für 24 Stunden kultiviert und anschließend wieder in Zellkulturmedium (RPMI-1640 Medium mit FBS und Penicillin/Streptomycin) aufgenommen. Zur Selektion von transduzierten HL-60-Zellen wurde dem Medium Puromycin zugesetzt, da die MISSION® shRNA Vektoren über ein Puromycinresistenzgen verfügen. Nach ca. zwei Wochen wurden durch Subklonierung Einzelzellklone der transduzierten HL-60-Zellen herangezogen. Die Effizienz der Herunterregulierung der Expression von mAbp1 wurde mittels Westernblottechnik ermittelt (Schymeinsky et al. 2006; Schymeinsky et al. 2009).

2.2.5 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrischen Analysen der Oberflächenexpression von Integrinen und dem Granulozytenmarker GR1 wurden isolierte murine PMN ($2,5 \times 10^5$ pro

Probe) in 250 µl 0,9% (w/v) NaCl mit 20 mM HEPES (pH 7,2), 0,25% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Glukose, 1,2 mM Ca²⁺ und 1 mM Mg²⁺ aufgenommen. Gegebenenfalls wurden den Proben Stimuli zugesetzt (je nach Angabe in der finalen Konzentration von: 100 ng/ml KC, 100 ng/ml murines TNFα oder 3 µM fMLP). Um die basale Expression von Integrinen zu untersuchen, blieben die Zellen unstimuliert. Während der Stimulation der Zellen bei 37°C für 30 min wurden die Zellen mit dem FITC-gekoppelten Ratte anti-Maus GR1 Antikörper, dem PE-gekoppelten Ratte anti-Maus CD18 Antikörper, dem PE-gekoppelten Ratte anti-Maus CD11b Antikörper, dem PE-gekoppelten Ratte anti-Maus CD11a Antikörper, dem PE-gekoppelten IgG2a oder FITC bzw. PE-gekoppelten IgG2b Isotypenkontrollantikörper inkubiert. Die Antikörper wurden in einer finalen Konzentration von 1:50 eingesetzt. Nach der Inkubation wurden die Proben auf Eis gestellt, um zelluläre Prozesse abzustoppen. Die Proben wurden mit der BD FACS™ Lysing Solution nach Angaben des Herstellers fixiert und dreimal mit PBS gewaschen. Die Fluoreszenz wurde mit dem Durchflusszytometer BD FACScanto™ II bzw. dem BD FACScan™ gemessen. Die Daten wurden mit der Software WinMDI analysiert (Schymeinsky et al. 2009).

Für die Untersuchung der Fibrinogenbindungseigenschaften von murinen PMN wurden 2 x 10⁵ Zellen in oben genannten Puffer aufgenommen und für 20 min bei 37°C mit 150 µg/ml Alexa 488-konjugiertem Fibrinogen inkubiert. Dabei wurden die Zellen mit 3 mM Mn²⁺ oder 100 ng/ml murinem TNFα stimuliert oder blieben unstimuliert. Um mittels Entzugs von divalenten Kationen die Bindung von Fibrinogen durch Integrine zu verhindern, wurde den Negativkontrollen 2 mM EDTA zugesetzt. Nach der Inkubation wurden die PMN auf Eis gelagert, dreimal mit PBS gewaschen und die Fluoreszenz sofort durchflusszytometrisch wie oben beschrieben analysiert (Schymeinsky et al. 2009).

2.2.6 Beschichtung von Plastik- und Glasoberflächen

Um bestimmte Plastik- oder Glasoberflächen, wie etwa von Flusskammern, Mikrotiterplatten oder Deckgläschen, mit Proteinen bzw. Peptiden zu beschichten, wurden die gewünschten Oberflächenmoleküle auf die erforderliche Konzentration mit PBS verdünnt und auf die Plastik- bzw. Glasoberfläche gegeben. Die Beschichtung erfolgte in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur für zwei Stunden oder bei

4°C über Nacht. Vor der Verwendung im Versuch wurden die Oberflächen mit PBS gewaschen. Die Oberflächen der Mikroflussskammern aus Glas (20 x 200 µm und 0,2 x 2 mm Querschnitt, VitroCom) wurden nach dem Beschichten zusätzlich über Nacht mit 10% (w/v) Casein geblockt (Hepper et al. 2012; Frommhold et al. 2010; Schymeinsky et al. 2009).

2.2.7 Fluoreszenzfärbungen für die konfokale Mikroskopie

Antikörperfärbungen zur Analyse mittels konfokaler Mikroskopie wurden wie folgt durchgeführt: Die zu untersuchenden Zellen wurden mit 3,7% (v/v) Formaldehyd fixiert und danach mit 0,2% (v/v) Tween 20 in PBS für 2 min bei RT permeabilisiert. Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und mit 1% (w/v) BSA in PBS über Nacht bei 4°C geblockt. Primäre Antikörper wurden je nach Angaben des Herstellers verdünnt und die Zellen mit ihnen inkubiert. Vor und nach der Inkubation mit einem Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörper wurden die Zellen gewaschen und anschließend bis zur mikroskopischen Untersuchung unter Lichtabschluss bei 4°C aufbewahrt.

2.2.8 Analyse von murinen PMN und dHL-60-Zellen statischen Bedingungen

Adhäsion

Zur Analyse der Adhäsion wurden murine PMN (1×10^5 pro Probe) in 50 µl Adhäsionsmedium (0,9% (w/v) NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,2), 0,25% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Glukose, 1,2 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+}) aufgenommen und in Triplikaten in 96-Loch-Mikrotiterplatten, welche mit murinem Fibrinogen (50 µg/ml) oder murinem ICAM1 (5 µg/ml) beschichtet waren, gegeben. Die Zellen wurden zum Absetzen aus der Suspension 5 - 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 100 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ oder 1 mM Mn^{2+} stimuliert, indem zu den Zellen 50 µl Adhäsionsmedium mit 2-fach konzentriertem Stimulus gegeben wurde. Die Zellen wurden mit dem Stimulus bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärente Zellen zu entfernen und mit 1% (v/v) Glutaraldehyd in PBS fixiert und mit gereinigtem Wasser gewaschen. Nach dem Trocknen der fixierten Zellen wurden diese mit 0,1% (w/v) Kristallviolett für 30 min bei RT angefärbt. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit Wasser

gewaschen bis alle Reste des Farbstoffes beseitigt waren. Die gefärbten Zellen wurden in 100 µl 10% (v/v) Essigsäure lysiert. Die Adsorption wurde bei 590 nm in einem *Microplate-Reader* (Tecan, Crailsheim, Deutschland) analysiert. Um die Anzahl adhärenter Zellen abzuschätzen, wurden die Daten mit einem Standard auf Poly-L-Lysin mit bekannten Zellzahlen verglichen. Zellen auf Poly-L-Lysin wurden vor dem Fixieren nicht gewaschen, um sicher zu gehen, dass alle eingesetzten Zellen haften blieben (Frommhold et al. 2007).

Spreading

Zur Analyse von *Spreading* wurden isolierte murine PMN (1×10^5 pro Probe) in 50 µl Adhäsionsmedium (0,9% (w/v) NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,2), 0,25% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Glukose, 1,2 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+}) aufgenommen und auf Deckgläschen (Durchmesser 40 mm, Saur), welche mit murinem Fibrinogen (50 µg/ml) beschichtet waren, gegeben. Die Zellen wurden zum Absetzen aus der Suspension 5 - 10 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 100 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ oder 1 mM Mn^{2+} stimuliert, indem zu den Zellen 50 µl Adhäsionsmedium mit 2-fach konzentriertem Stimulus gegeben wurde. Die Zellen wurden mit dem Stimulus bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, um nicht-adhärenente Zellen zu entfernen und mit 3,7% (v/v) Formaldehyd in PBS fixiert. Mikroskopische Aufnahmen wurden mittels des Zeiss Axiovert 200M Mikroskops mit einem Plan-Apochromat 63x/1,4 Ölobjectiv (Zeiss, Göttingen, Germany) erstellt. Die Fläche der Zellen (100 Zellen pro Probe) wurde mit Hilfe der ImageJ Software ermittelt und so das *Spreading* der Zellen beurteilt (Frommhold et al. 2007).

Chemotaxis

Die chemotaktische Migration isolierter muriner PMN in einem Gradienten von 10 µM fMLP wurde auf immobilisiertem murinem Fibrinogen (50 µg/ml) oder murinem ICAM1 (12,5 µg/ml) in Zigmond-Kammern (Zigmond 1977) bei 37°C für 12 min analysiert. Zeitrafferaufnahmen wurden mit einer Bildrate von 1 Bild/10 s mit Hilfe eines Zeiss Axiovert 200M Mikroskops mit Plan-Apochromat 20x/0,75 oder 10x/0,25 Luftobjektiven (Zeiss), Klimakammer, Coolsnap HQ2 Kamera (Roper scientific) und der Metamorph Software (Molecular Devices) aufgenommen. Anhand der Zeitrafferaufnahmen wurde die chemotaktische Migration unter Zuhilfenahme

der Module Manual Tracking und Chemotaxis and Migration Tool der ImageJ Software durch Analyse des Migrationsverhaltens der einzelnen Zellen beurteilt (Schymeinsky et al. 2006).

2.2.9 Analyse von murinen PMN und dHL-60-Zellen unter Flussbedingungen

Spreading

Um das *Spreading* von isolierten PMN aus dem Knochenmark von Mäusen in einer Flusskammer zu untersuchen, wurden IBIDI μ -slides VI 0.4 (IBIDI GmbH, Martinsried, Deutschland) mit murinem Fibrinogen (50 $\mu\text{g/ml}$) oder murinem ICAM1 (12.5 $\mu\text{g/ml}$) beschichtet. Die Flusskammern wurden mit 3×10^5 PMN pro Probe befüllt. Als Medium wurde HBSS mit 20 mM HEPES (pH 7,2), 0,25% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Glukose, 1,2 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+} , welches zur Aktivierung der murinen PMN 1 μM fMLP enthielt, verwendet. In diesem Medium wurden die PMN für 10 min bei 37°C in der Flusskammer inkubiert, um eine Adhäsion der PMN auf dem Substrat zu ermöglichen. Danach wurde mittels einer Präzisionspumpe (Modell KDS-232, KD Scientific) eine Schubspannung von 1 dyne/cm^2 erzeugt. Nach 10 min wurden die Proben mit 3,7% (v/v) Formaldehyd in PBS fixiert. Mikroskopische Aufnahmen wurden mittels des Zeiss Axiovert 200M Mikroskops mit einem Plan-Apochromat 63x/1,4 Öljektiv hergestellt. Das *Spreading* der PMN wurde durch Ausmessen der Zellfläche von 100 Zellen pro Probe mit Hilfe der ImageJ Software ermittelt (Hepper et al. 2012).

β_2 -Integrin-Cluster

Für die Analyse von β_2 -Integrin-Clustern von dHL-60-Zellen unter Flussbedingungen wurde der gleiche Versuchsaufbau verwendet wie unter Kapitel 2.2.9 *Spreading* beschrieben. Die Flusskammern wurden mit humanem ICAM1 (12.5 $\mu\text{g/ml}$) beschichtet. dHL-60-Zellen wurden mit 100 nM fMLP stimuliert und einer Schubspannung von 0,5 dyne/cm^2 ausgesetzt. Nach dem Fixieren der Zellen wurden diese mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt (Schymeinsky et al. 2009).

Mechanotaxis

Die Migration unter Flussbedingungen (*Crawling*) von dHL-60-Zellen und murinen PMN wurde in IBIDI μ slides VI 0.4 (IBIDI GmbH) oder Glasflusskammern (0.2 x 2 mm Querschnitt, VitroCom) analysiert. Die Kammern waren je nach Fragestellung

mit humanem ICAM1 (12,5 µg/ml) oder murinem ICAM1 (12,5 µg/ml) allein oder mit einer Kombination aus murinem P-Selektin (20 µg/ml), murinem ICAM1 (12,5 µg/ml) und KC (15 µg/ml) beschichtet. 3×10^5 Zellen pro Probe wurden in HBSS mit 20 mM HEPES (pH 7,2), 0,25% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Glukose, 1,2 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+} in die Kammern gefüllt. Gegebenenfalls wurde dem Medium fMLP (100 nM bei dHL-60-Zellen und 1 µM bei murinen PMN) als Stimulus zugesetzt. Um eine Adhäsion zu ermöglichen, wurden die Zellen zunächst 10 min bei 37°C inkubiert. Erst danach wurde die Schubspannung (1 dyne/cm²) angelegt. Mit Hilfe des Zeiss Axiovert 200M Mikroskop mit einem Zeiss Plan-Apochromat 20x/0,75 Luftobjektiv bzw. des Leitz Mikroskops Modell 512815/20 mit einem Leitz 40x/0,75 Immersionsobjektiv wurden Zeitrafferaufnahmen der Zellen mit einer Bildrate von 1 Bild/5 s über 10 min bei 37°C hergestellt. Anhand der Zeitrafferaufnahmen wurde das *Crawling* unter zur Hilfenahme der Module *Manual Tracking* und *Chemotaxis and Migration Tool* der ImageJ Software durch Analyse des Migrationsverhaltens der einzelnen Zellen beurteilt (Hepper et al. 2012; Frommhold et al. 2010; Schymeinsky et al. 2009).

Adhäsion

Ex vivo Mikroflussskammern (20 x 200 µm Querschnitt, VitroCom) wurden wie beschrieben verwendet (Smith, M.L. et al. 2004). Die mit murinem P-Selektin (20 µg/ml), murinem ICAM1 (15 µg/ml) und murinem KC (15 µg/ml) beschichtet waren, wurden mit Schläuchen aus Polyethylen verbunden. Die Schläuche wurden in die *Arteria carotis* von mAbp1^{-/-} oder mAbp1^{+/+}-Mäusen inseriert. Mikroskopische Aufnahmen wurden mit einem modifiziertem Olympus BX51 Mikroskop (LaVision Biotec, Braunschweig, Deutschland) mit einem Kochsalz-Immersionsobjektiv (SW 20/ 0,95 NA, Olympus) angefertigt. Bilder wurden für 8 min mit einer CCD-Videokamera (Modell CF8/1; Kappa, Gleichen, Deutschland) über einen Panasonic S-VHS-Rekorder aufgenommen (Schymeinsky et al. 2009; Smith, M.L. et al. 2004).

Der gleiche Versuchsaufbau mit Mikroflussskammern (0,2 x 2 mm Querschnitt, VitroCom) wurde verwendet, um die Resistenz der Adhäsion von isolierten murinen PMN aus mAbp1^{-/-} oder mAbp1^{+/+}-Mäusen gegen ansteigende Schubspannungen zu testen. Die beschichteten Flusskammern (siehe 2.2.9 Adhäsion in *ex vivo* Mikroflussskammern) wurden mit Hilfe einer Präzisionspumpe (Model 22, Harvard

Apparatus) mit 1×10^6 PMN / ml Adhäsionsmedium (0,9% (w/v) NaCl, 20 mM HEPES (pH 7,2), 0,25% (w/v) BSA, 0,1% (w/v) Glukose, 1,2 mM Ca^{2+} und 1 mM Mg^{2+}) befüllt. Die Pumpe wurde für 4 min gestoppt, um den Zellen ein Absetzen auf das Substrat in der Flusskammer zu ermöglichen. Anschließend wurde mit Hilfe der Pumpe eine Schubspannung von $0,1 \text{ dyne/cm}^2$ angelegt. Nicht adhärenente PMN wurden weggespült. Die verbleibende Zellzahl pro Gesichtsfeld (GF) wurde 100% gesetzt. Die Schubspannung wurde alle 30 s auf 0,5; 1; 1,5; 2; 4; 8 und 16 dyne/cm^2 erhöht. Die Anzahl adhärenenter Zellen wurden später für jedes Level anhand der Videoaufnahmen bestimmt (Hepper et al. 2012; Frommhold et al. 2010).

2.2.10 Intravitalmikroskopie

Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen am Modell des entzündeten *M. cremaster* der Maus wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Sperandio (Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie, Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, LMU, München) und mit Dr. David Frommhold (Institut für Neonatologie, Kinder- und Jugendmedizinzentrum, Universität von Heidelberg, Heidelberg) durchgeführt. Die Intravitalmikroskopie und die Aufnahmen wurden mit einem Leitz Mikroskop Modell 512815/20 inklusive Leitz 40x/0,75 Immersionsobjektiv ausgeführt. Mikrovaskuläre Parameter wurden mit Hilfe eines digitalen Bildprozessierungssystems gemessen (Pries 1988). Um die Adhäsion von Leukozyten zu untersuchen, wurde den Mäusen 2 bis 4 Stunden vor der Intravitalmikroskopie 500 ng $\text{TNF}\alpha$ intraskrotal injiziert. Um das *Spreading* von Leukozyten zu studieren, wurde der *M. cremaster* mit $1 \mu\text{M}$ fMLP in Bicarbonat gepufferter Kochsalzlösung superfundiert (Frommhold et al. 2007). Die Anzahl adhärenenter Leukozyten wurde wie beschrieben bestimmt. Leukozyten wurden als adhärenent erachtet, wenn sie für mehr als 30 s am gleichen Platz hafteten (Sperandio et al. 2006). Das *Spreading* von Leukozyten gegen die Gefäßwand wurde als Abnahme des perpendikulären Zelldurchmessers gemessen (Frommhold et al. 2007). Die intraluminale Migration von Leukozyten wurde im $\text{TNF}\alpha$ stimuliertem *M. cremaster* untersucht. Migration wurde als eine Fortbewegung einer Zelle um mindestens den Zelldurchmesser während des Beobachtungszeitrahmens von 10 min definiert. Anhand der Zeitrafferaufnahmen wurde das *Crawling* unter Zuhilfenahme der Module

Manual Tracking und *Chemotaxis and Migration Tool* der ImageJ Software durch Analyse des Migrationsverhaltens der einzelnen Zellen beurteilt. Der Prozentsatz von Zellen, die in Flussrichtung migrieren, wurde als die Anzahl von Leukozyten definiert, die in einem Winkel von 60° in die Richtung des Blutflusses in der Venole migrierten und zur Gesamtzahl migrierender Leukozyten in dem Gefäßabschnitt (100%) ins Verhältnis gesetzt.

2.2.11 Proteinbiochemische Methoden

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die zu analysierenden Proteinproben wurden anhand ihres molekularen Gewichtes und ihrer Ladung mittels *Sodium-Dodecyl-Sulfate*-(SDS-)PAGE unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt (Lämmler 1970). 1×10^6 isolierte murine PMN oder dHL-60-Zellen wurden in 300 µl Probenpuffer (6% (w/v) SDS, 30% (v/v) Glycerin, 18% (v/v) β-Mercaptoethanol und 0,02% (w/v) Bromphenolblau in 600 mM Tris/HCl (pH 6,8)) aufgenommen und anschließend bei 95°C für 5 min erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Die Proteinlysate und *PageRuler™ Prestained Protein ladder* wurden auf ein Polyacrylamid-Gel bestehend aus einem 3%igen Sammelgel (3% (v/v) Acrylamid, 0,1% (v/v) SDS, 0,05% (v/v) Ammoniumpersulfat und 0,05% (v/v) TEMED in 125 mM Tris/HCl (pH 6,8)) und einem 10%igen Trenngel (10% (v/v) Acrylamid, 0,1% (v/v) SDS, 0,05% (v/v) Ammoniumpersulfat und 0,05% (v/v) TEMED in 375 mM Tris/HCl (pH 8,9)) geladen. Die Elektrophorese wurde in einem Tris-Glycin-SDS-Elektrophoresepuffer (0,1% (v/v) SDS, 250 mM Tris, 1,92 M Glycin) bei einer Spannung von 80 bis 120 V durchgeführt.

Semi-Dry-Westernblot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinproben wurden mit Hilfe der *Semi-Dry*-Westernblottechnik eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer wurde bei einer Stromstärke von 0,9 mA/cm² Gelfläche für 120 min mittels Transverpuffer (0,037% (v/v) SDS, 20% (v/v) Methanol, 48 mM Tris, 39 mM Glycin) durchgeführt.

Immunologischer Proteinnachweis

Nach dem Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran wurde diese für 60 min in Blockierungslösung (5% (w/v) Magermilchpulver in *Tris Buffered Saline* (TBS; 25 mM Tris, 150 mM NaCl) mit 0,02% Tween (TBS-T)) auf einem Schüttler

inkubiert. Die Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung und Blockierungslösung laut Angaben des Herstellers) erfolgte über Nacht bei 4°C. Der Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper wurde verdünnt in TBS-T für 30 bis 60 min auf die Membran gegeben. Die gebundenen Antikörper auf der Membran wurden durch Chemilumineszenz mit Hilfe des Peroxidasesubstrates *ECL™ Detection Reagents* (Amersham Life Sciences, Braunschweig) und dem Detektionssystem von Hamamatsu mit CCD-Kamera (Hamamatsu 1394 ORCA-ERA) detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Die Rolle von Syk für β_2 -Integrin-vermitteltes *Outside-In Signaling* in vitro

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Syk entscheidend in Signalprozesse in PMN involviert ist und dadurch wichtig für PMN-Funktionen wie Adhäsion, Spreading, Degranulation und ROS-Produktion *in vitro* (Mócsai et al. 2002) und für Adhäsion und *Spreading* von Leukozyten an das entzündete Endothel *in vivo* ist (Frommhold et al. 2007). Hier wurde Syk jedoch nicht für Integrin-unabhängige Prozesse, die durch Signale von GPRCs ausgelöst werden wie ROS-Produktion und Degranulation nach Stimulation mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP benötigt (Mócsai et al. 2003). Interessanterweise war jedoch die Verstärkung dieser Antworten durch eine β_2 -Integrin-Bindung an immobilisierte Liganden in Abwesenheit von Syk vermindert. Diese Ergebnisse führten zu der Annahmen, dass Syk nicht für Signalprozesse über GPRCs und damit nicht für Integrin-vermitteltes *Inside-Out Signaling*, sondern nur für *Outside-In Signaling* benötigt wird (Mócsai et al. 2002; Mócsai et al. 2003). Dies sollte nun in den folgenden *in vitro* Untersuchungen zu Adhäsion und Spreading von murinen PMN bestätigt werden. Zur Aktivierung der β_2 -Integrine, ohne Beteiligung eines *Inside-Out Signalings*, wurde $MnCl_2$ eingesetzt. Es ist bekannt, dass Mn^{2+} -Ionen die Konformation von β_2 -Integrinen mit hoher Affinität induzieren und stabilisieren (Diamond & Springer 1994).

Isolierte PMN von Syk^{-/-} und Syk^{+/+}-Knochenmarkchimären wurden zunächst auf ihre Expression von Syk mittels Westernblottechnik untersucht. In Syk^{-/-}-PMN konnte im Gegensatz zu Syk^{+/+}-PMN kein Syk detektiert werden (Abbildung 5 A). Die Rekonstitution des Knochenmarks durch Syk-defiziente Zellen war offenbar erfolgreich. Zur Analyse der Adhäsionsfähigkeit wurden isolierte Syk^{-/-} und Syk^{+/+}-PMN auf immobilisiertes Fibrinogen, einem Liganden des β_2 -Integrins Mac1, gegeben und in Beisein von 1 mM Mn^{2+} für 30 min bei 37°C inkubiert (Abbildung 5 B). Mn^{2+} konnte den Anteil adhärenter Syk^{+/+}-PMN an allen eingesetzten Zellen von $10,8 \pm 2,5\%$ bei unstimulierten PMN auf $38,8 \pm 24,9\%$ signifikant erhöhen. Im Gegensatz dazu konnte die basale Adhäsion von Syk^{-/-}-PMN ($6,1 \pm 3,8\%$) durch

Stimulation mit Mn^{2+} nicht signifikant erhöht werden ($12,8 \pm 7,6\%$). Zusätzlich war auch die Adhäsion unstimulierter PMN in der Abwesenheit von Syk im Vergleich zu $Syk^{+/+}$ -PMN vermindert (Abbildung 5 B).

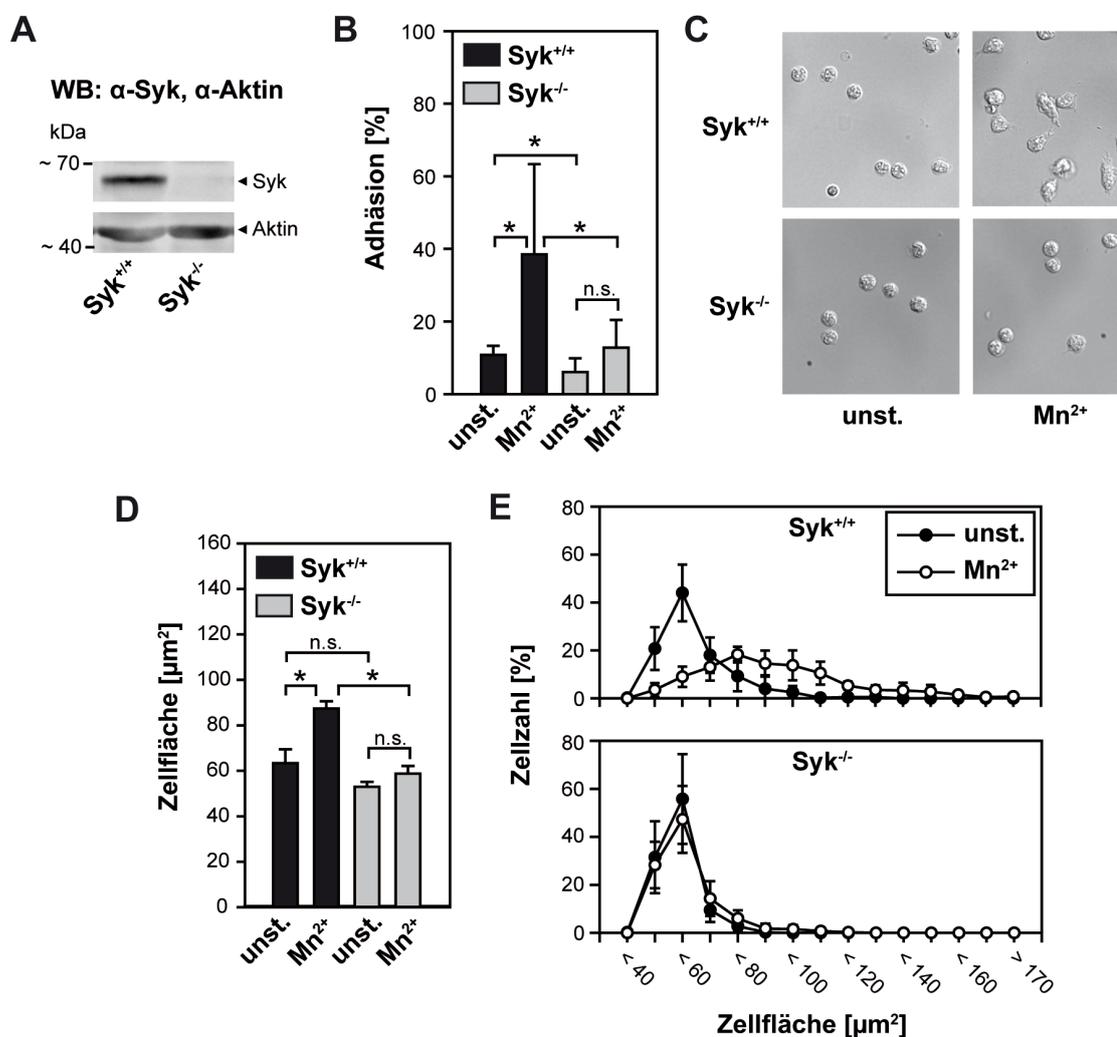


Abbildung 5 Die Abwesenheit von Syk beeinträchtigt die Adhäsion und Spreading von PMN.

(A) Analyse der Syk-Expression von isolierten $Syk^{+/+}$ - und $Syk^{-/-}$ -PMN (1×10^6 PMN pro Probe) mittels Westernblottechnik. Als Ladekontrolle diente die Menge an Aktin. Syk wurde mit dem polyklonalen Kaninchen anti-Syk Antikörper und Aktin mit dem polyklonalen Ziege anti-Aktin Antikörper detektiert. In $Syk^{-/-}$ -PMN konnte kein Syk detektiert werden. Die Abbildung ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. (B-E) Adhäsion und Spreading von isolierten $Syk^{-/-}$ (grau) und $Syk^{+/+}$ - (schwarz) PMN ohne Stimulation (unst.) und nach Stimulation mit 1 mM Mn^{2+} bei 37°C für 30 min auf immobilisiertem murinem Fibrinogen. Adhärenz $Syk^{-/-}$ oder $Syk^{+/+}$ -PMN in Prozent der anfänglich eingesetzten Zellzahl (1×10^5) (B). Mikroskopische Aufnahmen (C), Zunahme der Zellfläche infolge von Spreading in μm^2 (D) und Häufigkeitsverteilung der Zellfläche (E) von adhärenz $Syk^{-/-}$ und $Syk^{+/+}$ -PMN. Adhäsion und Spreading von PMN waren in Abwesenheit von Syk beeinträchtigt. $n = 7$ $Syk^{-/-}$ -Mäuse, $n = 5$ $Syk^{+/+}$ -Mäuse, MW \pm SD. (B). Aufnahmen sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente. Balken = 10 μm (C). $n = 400$ PMN von 4 Mäusen (D, E), MW \pm SE (D), MW \pm SD (E). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$), n.s., nicht signifikant.

Das Vermögen von PMN, sich nach Adhäsion an Liganden abzuflachen – das sogenannte *Spreading* – wurde ebenfalls auf immobilisiertem Fibrinogen mit und ohne Stimulation durch Mn^{2+} (1 mM) untersucht (Abbildung 5 C-E). Nach Stimulation mit Mn^{2+} für 30 min konnte *Spreading* bei $Syk^{+/-}$ -PMN beobachtet und quantifiziert werden. Die Zellfläche vergrößerte sich von $60 \pm 5 \mu m^2$ bei der unstimulierten Kontrolle auf $89 \pm 3 \mu m^2$ mit Mn^{2+} (Abbildung 5 C und D). Dahingegen konnte die Aktivierung der β_2 -Integrine durch Mn^{2+} bei den wenigen adhärenen $Syk^{-/-}$ -PMN kein wesentliches *Spreading* induzieren ($53 \pm 2 \mu m^2$ Zellfläche ohne Mn^{2+} gegenüber $56 \pm 3 \mu m^2$ mit Mn^{2+}) (Abbildung 5 C und D). Die Analyse der Häufigkeitsverteilung der Zellfläche ergab, dass die Mehrheit der $Syk^{-/-}$ -PMN nicht in der Lage war, auf der Fibrinogen-beschichteten Oberfläche annähernd *Spreading* zu induzieren. Die Daten bestätigen, dass auch in diesen reduktionistischen *in vitro* Systemen Syk für die β_2 -Integrin-vermittelten Funktionen von Zellen unentbehrlich ist und seinen Zweck als Mediator des *Outside-In Signalings* erfüllt.

3.2 Die Rolle von mAbp1 für Adhäsion und *Spreading* von PMN unter statischen Bedingungen

mAbp1 ist ein nachgeordneter Interaktionspartner von Syk und wird in Leukozyten im Zuge β_2 -Integrin-vermittelter Signalprozesse von Syk phosphoryliert (Larbolette et al. 1999). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob mAbp1 wie Syk ebenfalls an den β_2 -Integrin-vermittelten Prozessen Adhäsion und *Spreading* beteiligt ist. Um einen eventuellen Phänotyp möglichst allein dem Fehlen von mAbp1 zuzuschreiben, wurden PMN aus $mAbp1^{-/-}$ -Mäusen vergleichend zu PMN aus Wildtypmäusen verwendet und charakterisiert. Die Analyse von isolierten PMN mittels Westernblottechnik zeigte, dass die genetische Ablation von mAbp1 keinen Einfluss auf die Expression und Stabilität von Syk in $mAbp1^{-/-}$ -PMN im Vergleich zu $mAbp1^{+/-}$ -PMN hatte (Abbildung 6 A). Als nächstes wurde die Oberflächenexpression des β_2 -Integrins Mac1 (CD18/CD11b) und des Differenzierungsmarkers GR1 auf PMN mittels Antikörperfärbung und durchflusszytometrischer Analyse untersucht. Die basale Expression aller drei Oberflächenantigene war auf unstimulierten $mAbp1^{-/-}$ - und $mAbp1^{+/-}$ -PMN nahezu identisch (Abbildung 6 B).

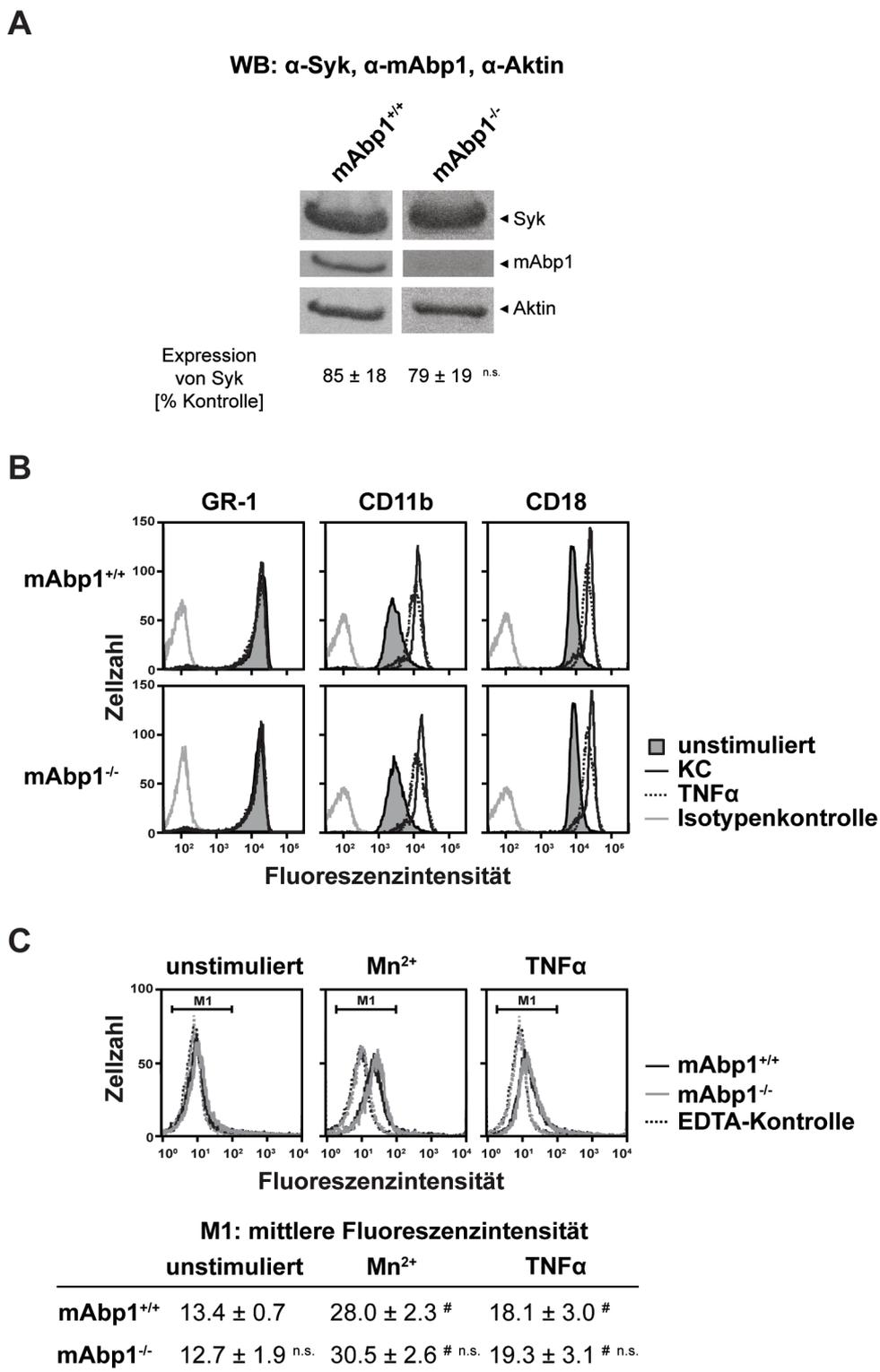


Abbildung 6 Die Abwesenheit von mAbp1 hatte keinen Effekt auf die Expression von Syk und die Oberflächenexpression, Hochregulierung und das Fibrinogenbindungsvermogen von Integrinen.

(A) Westernblotanalyse der mAbp1- und Syk-Expression von isolierten mAbp1^{-/-}- und mAbp1^{+/+}-PMN (1x10⁶ PMN pro Probe). Syk wurde mit dem polyklonalen Kaninchen anti-Syk Antikörper, mAbp1 mit dem polyklonalen Ziege anti-mAbp1 Antikörper und Aktin mit dem polyklonalen Ziege anti-Aktin Antikörper detektiert. Die Expression von Syk wurde semiquantitativ ermittelt.

Proteinmengen von Syk wurden auf die Aktin-Ladekontrolle normiert und relativ zu einer mAbp1^{+/+} Probe (Kontrolle) angegeben. Die Expression von Syk blieb in Abwesenheit von mAbp1 unbeeinflusst. $n = 5$, MW \pm SD, n.s., nicht signifikant. **(B)** Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von GR1, CD11b und CD18 auf mAbp1^{-/-} und mAbp1^{+/+}-PMN ohne Stimulation (unstimuliert) oder nach Stimulation mit KC (100 ng/ml) oder TNF α (100 ng/ml). Die Oberflächenexpression von GR1, CD11b und CD18 war in Abwesenheit von mAbp1 nicht beeinträchtigt. Das Fehlen von mAbp1 hatte keinen Einfluss auf die Hochregulierung von CD11b und CD18 nach Stimulation. Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. **(C)** Durchflusszytometrische Analyse der Bindung von Alexa 488-konjugiertem Fibrinogen an mAbp1^{-/-} und mAbp1^{+/+}-PMN nach Inkubation bei 37°C für 20 min unter Zusatz von EDTA (2 mM) als Negativkontrolle (EDTA-Kontrolle), Stimulation mit Mn²⁺ (3 mM) oder TNF α (100 ng/ml) oder ohne Stimulation (unstimuliert). Angegeben ist die mittlere Fluoreszenzintensität innerhalb des Markers M1. mAbp1 hat keinen Einfluss auf das Bindungsvermögen von Fibrinogen durch Integrine. $n = 4$, MW \pm SD, # kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber der unstimulierten Kontrolle, n.s., nicht signifikant gegenüber der Wildtypkontrolle.

Auch die Hochregulierung der Oberflächenexpression von CD11b und CD18 aus intrazellulären Speichern durch die Stimulation der PMN mit KC (100 ng/ml) oder TNF α (100 ng/ml) war nach 30 min in mAbp1^{-/-}-PMN genauso effektiv wie in mAbp1^{+/+}-PMN (Abbildung 6 B). Diese Daten zeigen, dass das Fehlen von mAbp1 keinen Einfluss auf die Reifung und Differenzierung von PMN hat und das in Abwesenheit von mAbp1 die Oberflächenexpression und Mobilisierung von CD11b und CD18 nicht beeinträchtigt ist. Um zu testen, ob mAbp1 eventuell für die Aktivierung von Integrinen benötigt wird, wurde das Bindungsvermögen von Fibrinogen durch aktivierte PMN durchflusszytometrisch untersucht. Dazu wurden isolierte PMN mit Alexa 488-konjugiertem Fibrinogen, einem Liganden von Mac1, inkubiert und mit Mn²⁺ (3 mM) oder TNF α (100 ng/ml) zusätzlich stimuliert. Die Fibrinogenbindung konnte im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle oder Negativkontrolle (EDTA) durch die Stimulation in mAbp1^{-/-} und mAbp1^{+/+}-PMN in gleichem Maße erhöht werden (Abbildung 6 C). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass für die Aktivierung des β_2 -Integrins Mac1 mAbp1 nicht benötigt wird. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Voraussetzungen für PMN-Funktionen wie Adhäsion und *Spreading* offenbar nicht durch die genetische Ablation von mAbp1 beeinträchtigt sind.

Nun wurden unter statischen *in vitro* Bedingungen die Fähigkeit von isolierten PMN aus mAbp1^{-/-} und mAbp1^{+/+}-Mäusen zur Adhäsion und zum *Spreading* auf dem Mac1-Liganden Fibrinogen oder ICAM1, einem Liganden für die β_2 -Integrin Mac1 und LFA1, untersucht.

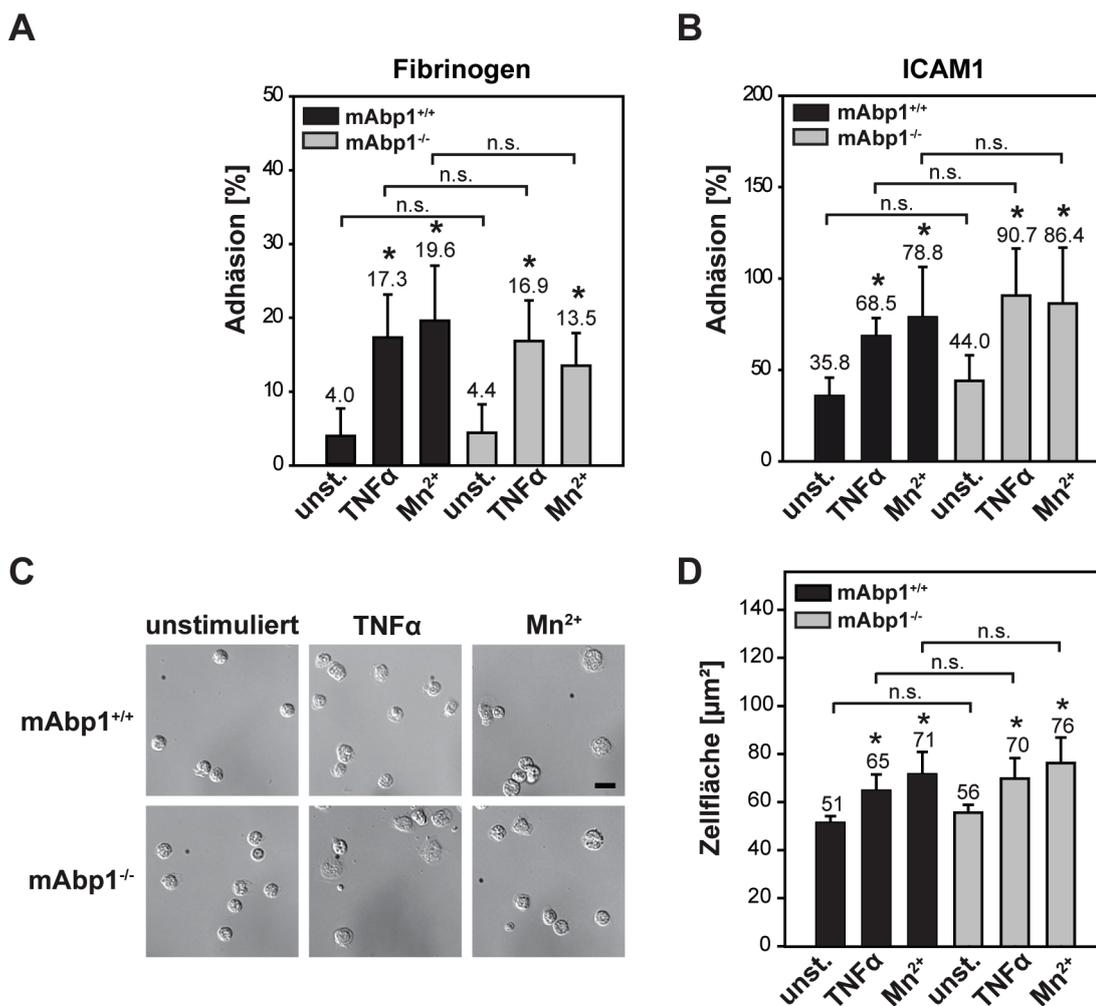


Abbildung 7 Das Fehlen von mAbp1 hatte keine Auswirkungen auf Adhäsion und *Spreading* von PMN unter statischen Bedingungen.

(A-D) Adhäsion und *Spreading* von isolierten mAbp1 $^{-/-}$ (grau) und mAbp1 $^{+/+}$ (schwarz) PMN ohne Stimulation (unst.) und mit Stimulation mit TNF α (100 ng/ml) oder Mn $^{2+}$ (1 mM) bei 37°C für 30 min. Adhärenz mAbp1 $^{-/-}$ oder mAbp1 $^{+/+}$ -PMN in Prozent der anfänglich eingesetzten Zellzahl (1×10^5) auf immobilisiertem murinem Fibrinogen (A) oder murinem ICAM1 (B). Mikroskopische Aufnahmen (C) und Zunahme der Zellfläche infolge von *Spreading* in μm^2 (D) auf immobilisiertem murinem Fibrinogen. (A-D) Adhäsion und *Spreading* von PMN waren in Abwesenheit von mAbp1 unter statischen Bedingungen nicht beeinträchtigt. $n = 4$ mAbp1 $^{-/-}$ -Mäuse, $n = 5$ mAbp1 $^{+/+}$ -Mäuse, MW \pm SD. (A, B). Aufnahmen sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente. Balken = 10 μm (C). $n = 400$ PMN von 4 Mäusen, MW \pm SE (D). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber der unstimulierten Kontrolle, n.s., nicht signifikant.

Nach Aktivierung der Integrine durch eine Inkubation mit TNF α (100 ng/ml) oder Mn $^{2+}$ (1 mM) konnte sowohl bei mAbp1 $^{+/+}$ -Kontroll-PMN, als auch bei mAbp1 $^{-/-}$ -PMN ein signifikanter Anstieg der Anzahl adhärenter Zellen auf Fibrinogen oder ICAM1 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nachgewiesen werden. Dabei war die Anzahl adhärenter PMN in Abwesenheit von mAbp1 auf dem gleichen Level wie

bei der Wildtypkontrolle (Abbildung 7 A und B). Ebenso war auch das *Spreading* von isolierten PMN auf immobilisiertem Fibrinogen nach Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/ml) oder Mn^{2+} (1 mM) in Abwesenheit von mAbp1 im Vergleich zur Wildtypkontrolle nicht verändert (Abbildung 7 C und D). Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass – im Gegensatz zu Syk – mAbp1 nicht für β_2 -Integrin-vermittelte Adhäsion und *Spreading* von PMN unter statischen *in vitro* Bedingungen benötigt wird.

3.3 Die Rolle von mAbp1 für Adhäsion und *Spreading* von PMN *in vivo* und unter Flussbedingungen *in vitro*

Es stellte sich die Frage, ob mAbp1 möglicherweise an der Leukozytenrekrutierung *in vivo* beteiligt sein könnte. Diese Frage sollte durch Intravitalmikroskopie am Modell des entzündeten *M. cremaster* der Maus untersucht werden. Dies geschah in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Markus Sperandio (Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie, Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin, LMU, München) und mit Dr. David Frommhold (Institut für Neonatologie, Kinder- und Jugendmedizinzentrum, Universität von Heidelberg, Heidelberg). Es wurde Leukozytenrollen und –adhäsion in $\text{TNF}\alpha$ stimulierten postkapillären Venolen des *M. cremaster* von mAbp1^{-/-} und mAbp1^{+/+}-Mäusen untersucht. Die hämodynamischen Parameter in den Venolen waren bei den beiden Gruppen vergleichbar (Tabelle I).

Tabelle I Hämodynamische Parameter in Venolen des $\text{TNF}\alpha$ stimulierten *M. cremaster*

Alle Werte sind MW \pm SE. n.s., nicht signifikant.

	Mäuse (n)	Venolen (n)	Durchmesser (μm)	Geschwindigkeit (Mittelachse) ($\mu\text{m/s}$)	Schub- geschwindigkeit (Wand) (s^{-1})	Systemische Leukozytenzahl (μl^{-1})
Abp1 ^{+/+}	5	27	35 \pm 1	1400 \pm 80	1000 \pm 70	2600 \pm 400
Abp1 ^{-/-}	5	33	32 \pm 1	1600 \pm 140	1200 \pm 140	2400 \pm 200
			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Zwei Stunden nach der intraskrotalen Injektion von TNF α konnte kein Unterschied bei P- und E-Selektin-vermitteltem Leukozytenrollen (Sperandio et al. 2006) und bei β_2 -Integrin-vermitteltem langsamen Rollen (Zarbock et al. 2007) zwischen mAbp1 $^{-/-}$ - und mAbp1 $^{+/+}$ -Mäusen festgestellt werden (Schymeinsky et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass mAbp1 für diese Prozesse entbehrlich ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des statischen *in vitro* Versuchs zum Adhäsionsvermögen, war die Adhäsion der Leukozyten an der entzündeten Gefäßwand in Abwesenheit von mAbp1 hier im Vergleich zur Kontrolle drastisch reduziert (175 ± 16 Zellen/mm 2 in mAbp1 $^{-/-}$ -Mäusen zu 815 ± 71 Zellen/mm 2 in mAbp1 $^{+/+}$ -Mäusen) (Abbildung 8 A). Die verminderte Adhäsion der Leukozyten in mAbp1 $^{-/-}$ -Mäusen hatte im Vergleich zu mAbp1 $^{+/+}$ -Mäusen auch eine signifikant verringerte Anzahl an perivaskulären Leukozyten im Gewebe des *M. cremaster* zur Folge, wie die histologische Präparation der TNF α stimulierten *M. cremaster* zeigte (Schymeinsky et al. 2009). mAbp1 war also unter *in vivo* Bedingungen, ganz im Gegenteil zu statischen *in vitro* Bedingungen, essenziell für die Adhäsion von Leukozyten im Gefäß und die Akkumulation im Gewebe.

Um zu untersuchen, ob der Adhäsionsdefekt *in vivo* durch ein Fehlen von leukozytärem oder endothelalem mAbp1 verursacht wurde, wurden Leukozyten aus dem Vollblut von mAbp1 $^{-/-}$ - und mAbp1 $^{+/+}$ -Mäusen in einer autoperfundierten *ex vivo* Mikroflussskammer untersucht. Mit Hilfe der Mikroflussskammer war es möglich, das Verhalten von Leukozyten in einer Umgebung, ohne den Einfluss des Gefäßendothels zu untersuchen. Die Flusskammern wurden mit P-Selektin (um Leukozytenrollen zu ermöglichen), mit dem Chemokin KC (um die Leukozyten zu aktivieren) und ICAM1 (um eine β_2 -Integrin-vermittelte Adhäsion zu erlauben) beschichtet. Die Blutflussgeschwindigkeit in den Kammern war zwischen mAbp1 $^{-/-}$ - und mAbp1 $^{+/+}$ -Mäusen vergleichbar ($1,5 \pm 0,1$ mm/s in mAbp1 $^{-/-}$ -Mäusen und $1,6 \pm 0,04$ mm/s in mAbp1 $^{+/+}$ -Mäusen). Nach acht Minuten Perfusion war die Anzahl adhärenter Leukozyten in Kammern beschichtet mit P-Selektin, KC und ICAM1 von mAbp1 $^{-/-}$ -Mäusen (6 ± 2 Zellen/Gesichtsfeld (GF)) signifikant geringer als die von mAbp1 $^{+/+}$ -Mäusen (11 ± 3 Zellen/GF) (Abbildung 8). In Kontrollflusskammern ohne Beschichtung oder mit Beschichtungen nur mit einem Teil der drei Proteine war erwartungsgemäß keine wesentliche Adhäsion von Leukozyten zu erkennen. Da der *in vivo* beobachtete dramatische Adhäsionsdefekt in mAbp1 $^{-/-}$ -Mäusen sich auch in

der Mikroflussskammer zeigt, liegt es nahe, dass für die Adhäsion unter Flussbedingungen mAbp1 in Leukozyten unentbehrlich ist.

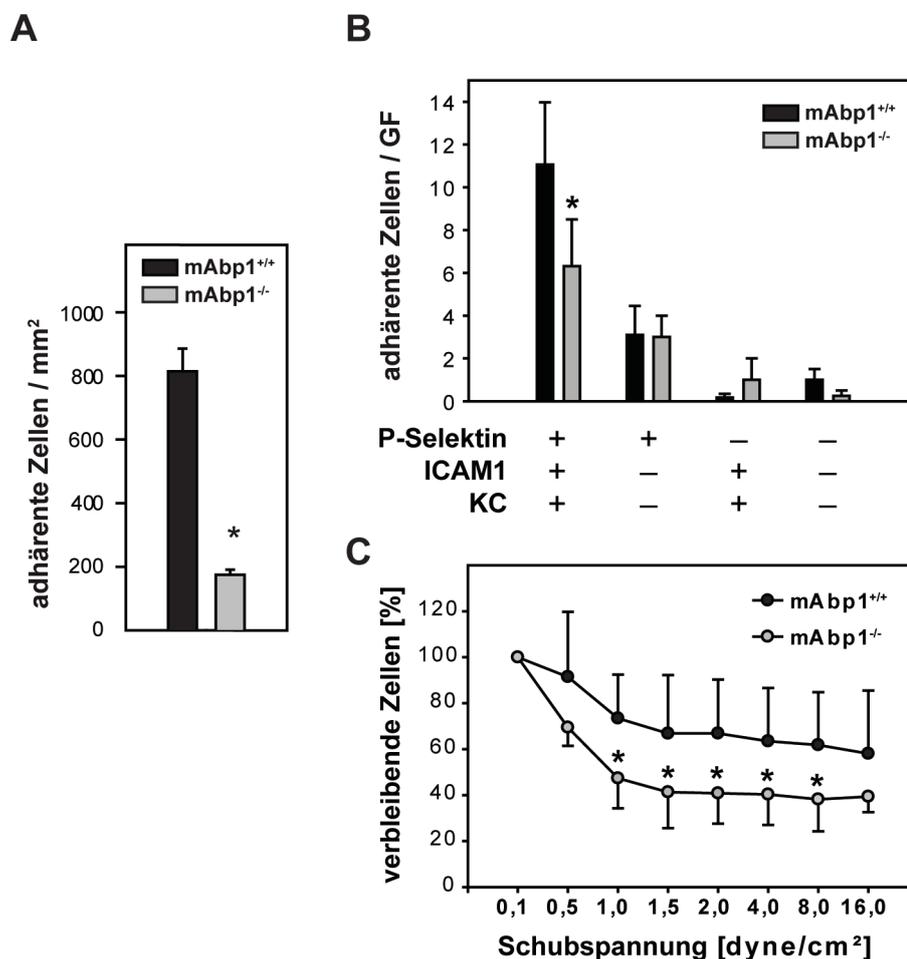


Abbildung 8 Die Abwesenheit von mAbp1 beeinträchtigt die Adhäsion von PMN unter Flussbedingungen

(A) Intravitalmikroskopische Analyse der Adhäsion von Leukozyten in TNF α stimulierten Venolen des *M. cremaster* von mAbp1^{-/-}-Mäusen (grau, $n = 33$ in 5 Mäusen) und mAbp1^{+/+}-Mäusen (schwarz, $n = 27$ in 5 Mäusen). MW adhärenter Zellen pro mm² \pm SE. **(B)** Analyse der Adhäsion von Leukozyten in einer *ex-vivo*-Mikroflussskammer. Die Mikroflussskammer wurde mit P-Selektin, ICAM1 und KC, einzeln oder in Kombination, beschichtet und mit Vollblut von mAbp1^{-/-}-Mäusen (grau, $n = 5$) oder mAbp1^{+/+}-Mäusen (schwarz, $n = 9$) perfundiert. MW adhärenter Zellen pro Gesichtsfeld (GF) \pm SE. **(C)** Analyse der Resistenz der Adhäsion von isolierten mAbp1^{-/-} (grau) und mAbp1^{+/+}-PMN (schwarz) gegenüber ansteigender Schubspannung in einer mit P-Selektin-, ICAM1- und KC-beschichteten Mikroflussskammer. Die anfängliche Anzahl adhärenter Zellen bei einer Schubspannung von 0,1 dyne/cm² wurde auf 100% gesetzt. MW der verbleibenden Anzahl von Zellen relativ zur Anfangszellzahl pro GF in % \pm SD, $n = 5$. * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber der Wildtypkontrolle. **(A-C)** Adhäsion und Resistenz gegen Schubspannung von PMN war in Abwesenheit von mAbp1 unter Flussbedingungen herabgesetzt.

Ob mAbp1 unter Flussbedingungen nicht nur für die Induktion der Adhäsion, sondern auch für die Fähigkeit von PMN Schubspannung zu widerstehen, wichtig ist, wurde *in vitro* an isolierten PMN von mAbp1^{-/-} und mAbp1^{+/+}-Mäusen in Flusskammern getestet. Die Flusskammern waren mit P-Selektin, KC und ICAM1 beschichtet und wurden mit PMN befüllt. Während einer Inkubationszeit von 4 min ohne Anlegen einer Schubspannung konnten sich die PMN absetzen und adhären werden. Anschließend wurde über eine Präzisionspumpe eine initiale Schubspannung von 0,1 dyne/cm² angelegt und die verbleibenden adhären PMN pro GF wurden als 100% definiert. Die Schubspannung wurde alle 30 s erhöht und die Anzahl verbleibender Zellen ermittelt. Die Auswertung ließ erkennen, dass insbesondere bei moderaten Schubspannungen bis 1,5 dyne/cm², wie sie in Venolen vorkommen, der Widerstand von mAbp1^{-/-}-PMN gegen die Schubspannung kleiner ist als bei mAbp1^{+/+}-PMN und die Anzahl adhären Zellen hier drastisch abnimmt (Abbildung 8 C). Daraus lässt sich schließen, dass mAbp1 ebenfalls wichtig ist, um die Adhäsion von PMN gegen die Schubspannung zu stabilisieren. Diese Abhängigkeit des Adhäsionsdefektes in Abwesenheit von mAbp1 von einer vorhandenen Schubspannung konnte auch durch die Analyse der *in vivo* Daten bestätigt werden. Diese zeigten, dass bei einer hohen Schubgeschwindigkeit der relative Adhäsionsdefekt in mAbp1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu mAbp1^{+/+}-Mäusen noch ausgeprägter wurde (Schymeinsky et al. 2009).

Zur Untersuchung eines möglichen Einflusses von mAbp1 auf das *Spreading* von Leukozyten *in vivo*, wurden intravitalmikroskopische Analysen der Venolen des *M. cremaster* während der stimulierenden Superfusion des *M. cremaster* mit dem bakteriellen Tripeptid fMLP durchgeführt. Die hämodynamische Parameter Durchmesser, Geschwindigkeit und Schubgeschwindigkeit in den untersuchten Venolen von mAbp1^{-/-}-Mäusen und mAbp1^{+/+}-Mäusen waren zwischen den Gruppen vergleichbar (Tabelle II). In dieser Versuchsgruppe hatten mAbp1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu mAbp1^{+/+}-Mäusen eine signifikant höhere Anzahl an systemischen Leukozyten (Tabelle II). Jedoch hatte diese offenbar keinen Einfluss, da sich sowohl die Adhäsion als auch die korrigierte Adhäsionseffizienz (Anzahl adhären Leukozyten pro mm² / systemische Leukozytenzahl pro µl) von Leukozyten in mAbp1^{-/-}-Mäusen vor der Stimulation mit fMLP nicht signifikant von denen in mAbp1^{+/+}-Mäusen unterschied (Daten nicht gezeigt). In Übereinstimmung mit dem Adhäsionsdefekt in

Abwesenheit von mAbp1 der im Modell des TNF α -stimulierten *M. cremaster* festgestellt wurde, wurde in mAbp1^{-/-}-Mäusen nahezu keine Erhöhung der Adhäsion durch fMLP-Superfusion im Gegensatz zu mAbp1^{+/+}-Mäusen induziert (Daten nicht gezeigt).

Tabelle II Hämodynamische Parameter in Venolen des fMLP stimulierten *M. cremaster*

Alle Werte sind MW \pm SE. n.s., nicht signifikant.

	Mäuse (n)	Venolen (n)	Durchmesser (μm)	Geschwindigkeit (Mittelachse) ($\mu\text{m/s}$)	Schub- geschwindigkeit (Wand) (s^{-1})	Systemische Leukozytenzahl (μl^{-1})
Abp1 ^{+/+}	7	26	29 \pm 1	1750 \pm 120	1500 \pm 90	5100 \pm 300
Abp1 ^{-/-}	6	19	31 \pm 1	1700 \pm 120	1400 \pm 100	7300 \pm 200
			n.s.	n.s.	n.s.	p < 0,05

Das *Spreading* wurde *in vivo* durch die Abnahme des Zelldurchmessers ermittelt, da sich die Zellen gegen die Gefäßwand abflachen. Ähnlich wie die Adhäsion war auch das Zelldurchmesser adhärenter Leukozyten in Abwesenheit von mAbp1 im Vergleich zur mAbp1^{+/+}-Kontrolle vor der Stimulation mit fMLP (Prä) nicht beeinflusst (Abbildung 9 A, 6,41 \pm 0,10 μm bei mAbp1^{-/-}-Mäusen und 6,44 \pm 0,13 μm bei mAbp1^{+/+}-Mäusen). Während der Superfusion mit fMLP konnte in mAbp1^{+/+}-Mäusen eine kontinuierliche Reduktion des Zelldurchmessers und damit ein *Spreading* auf 5,15 \pm 0,11 μm nach 15 min beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte in mAbp1^{-/-}-Mäusen kein *Spreading* detektiert werden. Der Zelldurchmesser blieb über die Zeit nahezu gleich und betrug nach 15 min Superfusion 6,53 \pm 0,13 μm (Abbildung 9). Dies zeigt deutlich, dass *in vivo* mAbp1 neben der Adhäsion auch für das *Spreading* von Bedeutung ist.

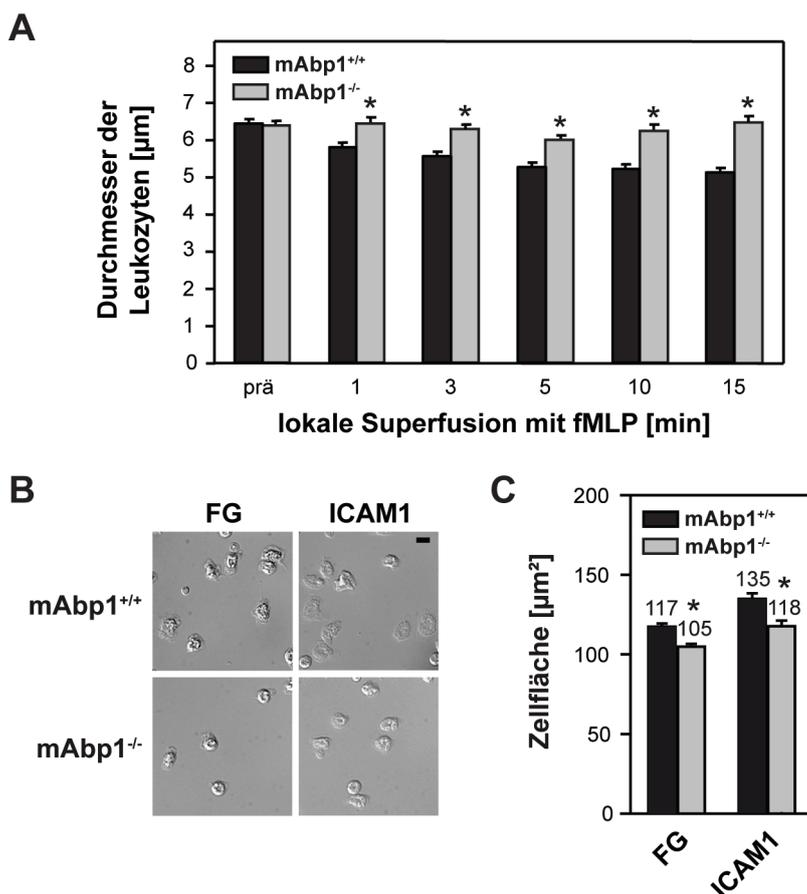


Abbildung 9 Die Abwesenheit von mAbp1 beeinträchtigte das *Spreading* von PMN unter Flussbedingungen

A) Intravitalmikroskopische Analyse des *Spreadings* von Leukozyten in fMLP stimulierten Venolen des *M. cremaster* von mAbp1^{-/-}-Mäusen (grau, $n = 19$ in 6 Mäusen) und mAbp1^{+/+}-Mäusen (schwarz, $n = 26$ in 7 Mäusen). Eine Abnahme des Zelldurchmessers deutet *Spreading* gegen die Endothelwand an. MW des Zelldurchmessers \pm SE. **(B, C)** *Spreading* von fMLP (1 μ M) stimulierten PMN auf immobilisiertem murinen Fibrinogen und murinen ICAM1 unter Flussbedingungen (1 dyne/cm²). Mikroskopische Aufnahmen **(B)** und Zunahme der Zellfläche infolge von *Spreading* in μ m² **(C)**. **(A-C)** *Spreading* von PMN war in Abwesenheit von mAbp1 unter Flussbedingungen beeinträchtigt. Aufnahmen sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente. Balken = 10 μ m (B). $n = 400$ PMN von 4 Mäusen, MW \pm SE (C). * kennzeichnet einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) gegenüber der Wildtypkontrolle.

Um die Ergebnisse auch *in vitro* zu bestätigen, wurde der Einfluss von mAbp1 auf das *Spreading* an isolierten mAbp1^{-/-}- und mAbp1^{+/+}-PMN in Flusskammern mit einer angelegten Schubspannung von 1 dyne/cm² untersucht (Abbildung 9 B und C). Durch die Sicht von unten auf die Zelle, bedeutet hier eine Zunahme der Zellfläche einer adhären Zelle ein *Spreading* der Zelle auf dem Substrat. Im Vergleich zu mAbp1^{+/+}-PMN war die Zellfläche von mAbp1^{-/-}-PMN auf immobilisiertem murinen Fibrinogen oder murinen ICAM1 nach Stimulation mit fMLP unter Schubspannung

signifikant kleiner. mAbp1 hat also auch unter artifizialen *in vitro* Bedingungen unter Schubspannung einen Einfluss auf das *Spreading* von PMN auf β_2 -Integrin-Substraten.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass mAbp1 *in vivo* und unter Flussbedingungen *in vitro* entscheidend zu den β_2 -Integrin-vermittelten PMN-Funktionen Adhäsion und *Spreading* beiträgt und dass es offenbar unabdingbar für den Widerstand adhärenter PMN gegen die auftretenden Kräfte durch Schubspannung ist.

3.4 Die Rolle von mAbp1 für die Migration von PMN unter Flussbedingungen

Da mAbp1 offenbar in verschiedene Funktionen während der β_2 -Integrin-vermittelten Rekrutierung von PMN involviert ist, wurde auch die Migration von isolierten mAbp1^{-/-} und mAbp1^{+/+}-PMN unter Schubspannung (1 dyne/cm²) in Flusskammern untersucht. Eine große Anzahl von mAbp1^{+/+}-PMN zeigten auf immobilisiertem murinem ICAM1 ein aktives Migrationsverhalten. Dahingegen war die Mehrheit der mAbp1^{-/-}-PMN zwar motil, zeigten aber keine effektive Migration (Abbildung 10 A). Die quantitative Analyse ergab, dass in Abwesenheit von mAbp1 der Prozentsatz migrierender Zellen $53,4 \pm 22,8\%$ in mAbp1^{+/+}-PMN auf $31,5 \pm 12,9\%$ in mAbp1^{-/-}-PMN signifikant gesenkt wurde (Abbildung 10 B). Wenn als Substrat ein trunkiertes ICAM1 (ICAM1 D1-2) eingesetzt wurde, welchem die Bindungsdomänen für das β_2 -Integrin Mac1 fehlt (Semmrich et al. 2005), hatte dies zur Folge, dass der Prozentsatz migrierender mAbp1^{+/+}-PMN wesentlich reduziert wurde. Er war sogar ähnlich gering wie bei mAbp1^{-/-} PMN auf dem gleichen Substrat oder auf ICAM1 (Abbildung 10 C). In dieser Versuchsgruppe war eine zelluläre Interaktion nur über eine Bindung von LFA1 an ICAM1 möglich. Diese Ergebnisse deuten an, dass die Migration von PMN unter Schubspannung nur durch Mac1 vermittelt wird. Um dies zu bestätigen wurden die Versuche auf ICAM1 mit LFA1^{-/-}-PMN wiederholt.

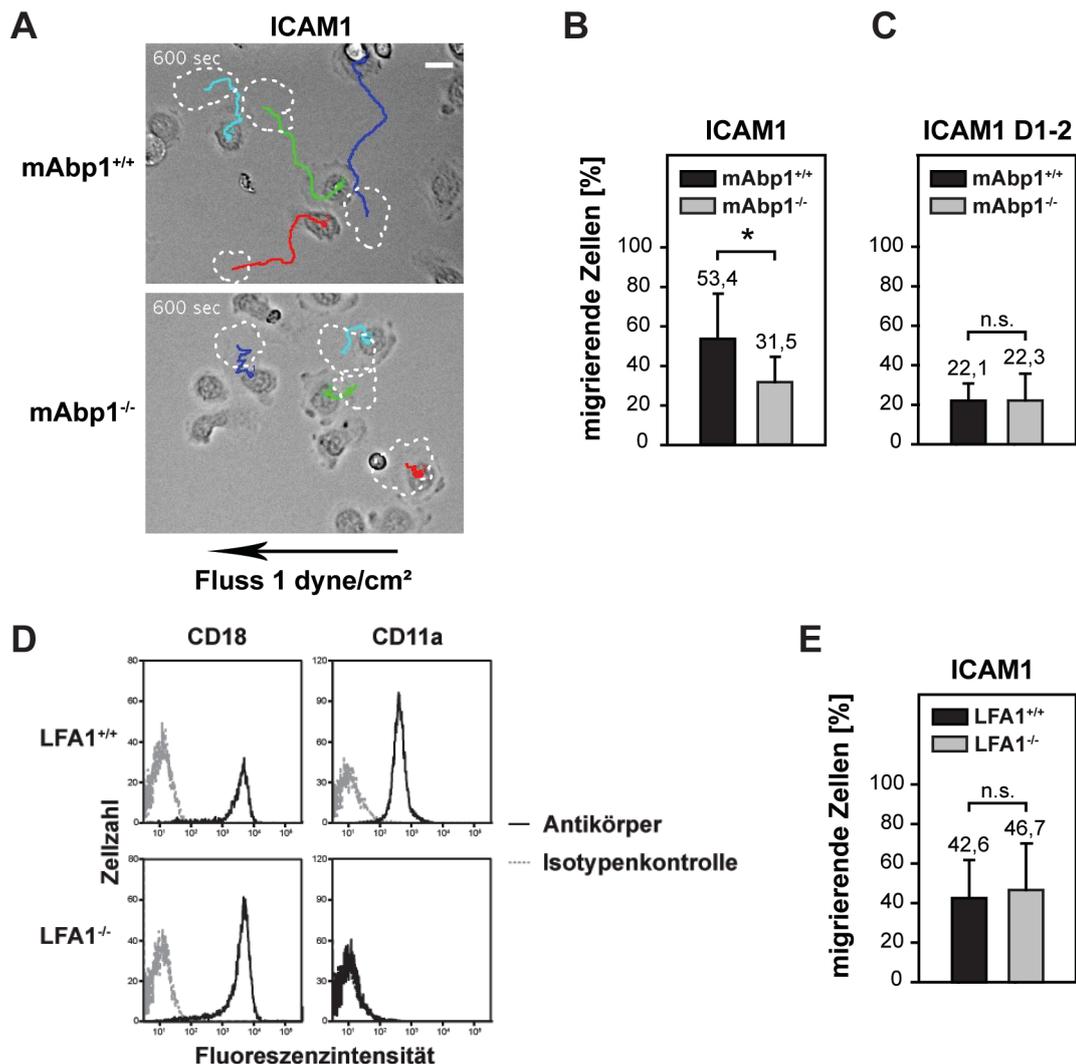


Abbildung 10 mAbp1 ist wichtig für die Mac1-vermittelte Migration von isolierten PMN unter Flussbedingungen

(A-C) Analyse der Migration von isolierten mAbp1^{-/-} und mAbp1^{+/+}-PMN nach Stimulation mit fMLP (1 μ M) unter Schubspannung (1 dyne/cm²) in Flusskammern, beschichtet mit murinem ICAM1 oder einem trunkiertem murinem ICAM1 ohne die Mac1-Bindungsdomäne (ICAM D1-2) (je 12,5 μ g/ml). (A) Mikroskopische Aufnahmen und Verlauf der Migration einzelner PMN auf ICAM1. Die Flussrichtung ist durch einen Pfeil angegeben. Mikroskopische Aufnahmen wurden vom Zeitpunkt 600 s nach Start der Schubspannung genommen. Gestrichelte Umrisse zeigen die Position der PMN zum Zeitpunkt 0 s an. Aufnahmen und eingezeichnete Verläufe der Migration sind repräsentativ für sieben unabhängige Experimente. Balken = 10 μ m. (B, C) Quantitative Analyse der Anzahl migrierender PMN auf ICAM1 (B) und ICAM1 (D1-2) (C). PMN wurden als migrierend angesehen, wenn sie innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 10 min mindestens um ihren Zelldurchmesser migrierten. $n = 7$ (B). $n = 5$ (C). MW \pm SD, * zeigt einen signifikanten Unterschied an ($p < 0,05$), n.s., nicht signifikant. (A, B) In Abwesenheit von mAbp1 wurde die Fähigkeit von PMN unter Flussbedingungen auf immobilisiertem ICAM zu migrieren reduziert. (C) Die Migration von mAbp1^{+/+}-PMN wurde durch Verwendung von trunkiertem ICAM1 (D1-2) stark reduziert. (D) Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von LFA1 (CD18/CD11a) auf LFA1^{-/-} und LFA1^{+/+}-PMN. Bei LFA1^{-/-}-PMN war keine Oberflächenexpression der CD11a Kette von LFA1 zu detektieren. Daten sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. (E) Quantitative Analyse der Anzahl migrierender LFA1^{-/-} und LFA1^{+/+}-PMN unter den oben beschriebenen Versuchsbedingungen. LFA1 wurde nicht für die Migration von PMN unter Flussbedingungen auf ICAM1 benötigt. $n = 4$, MW \pm SD, n.s., nicht signifikant.

Die durchflusszytometrische Analyse von isolierten PMN aus LFA1^{-/-} und LFA1^{+/+}-Mäusen zeigte, dass wie zu erwarten bei LFA1^{-/-}-PMN die Expression der CD11a-Kette von LFA1 im Gegensatz zu den wildtypischen PMN nicht nachzuweisen war (Abbildung 10 D). Hier war also eine Interaktion mit ICAM1 nur noch über Mac1 möglich. Konsistent mit den obigen Ergebnissen war die Migration von isolierten PMN aus LFA1^{-/-}-Mäusen nicht beeinträchtigt im Vergleich zu LFA1^{+/+}-PMN (Abbildung 10 D).

Zur detaillierten Analyse der Migration von isolierten murinen PMN wurden Flusskammern beschichtet mit P-Selektin, KC und ICAM1 verwendet. Nach Anlegen einer Schubspannung von 1 dyne/cm² für 10 min war nicht nur der Anteil der migrierenden Zellen vermindert, sondern auch die Migrationsgeschwindigkeit der mAbp1^{-/-}-PMN, bei denen noch Migration beobachtet werden konnte. Sie wurde signifikant von 1,9 ± 0,8 µm/min in mAbp1^{+/+}-PMN auf 1,4 ± 0,8 µm/min in mAbp1^{-/-}-PMN reduziert (Abbildung 11 A). Die Berechnung der Häufigkeitsverteilung der Migrationsgeschwindigkeiten ergab ein noch klareres Bild. Die Häufigkeitsverteilungen unterschieden sich zwischen den beiden Gruppen dahingegen, dass mAbp1^{+/+}-PMN mehrheitlich mit Geschwindigkeiten > 2 µm/min migrierten, wohingegen mAbp1^{-/-}-PMN überwiegend nur mit einer Geschwindigkeit < 2 µm/min zu migrieren vermochten (Abbildung 11 B).

Um die intraluminale Migration *in vivo* zu untersuchen, wurden intravitalmikroskopische Experimente an TNF α stimulierten Venolen des *M. cremaster* von mAbp1^{-/-} and mAbp1^{+/+}-Mäusen durchgeführt. Interessanterweise ergab die Auswertung der Migrationsverläufe von Leukozyten, dass adhärenente Leukozyten von mAbp1^{+/+}-Mäusen vorrangig gegen oder rechtwinkelig zur Richtung des Blutflusses auf dem entzündeten Endothel migrieren (Abbildung 11 C). Dieses Resultat stimmt mit den Erkenntnissen von Phillipson et al. überein, wonach mechanotaktische Migration von murinen PMN *in vivo* und *in vitro* unter Schubspannung vorwiegend rechtwinkelig zum Fluss gerichtet ist, wahrscheinlich um endotheliale Zellkontakte auf kürzestem Weg zu erreichen (Phillipson et al. 2009). Im Gegensatz zu Leukozyten in mAbp1^{+/+}-Mäusen migrierte ein Großteil von mAbp1^{-/-}-Leukozyten mit dem Blutfluss. Die quantitative Analyse des Prozentsatzes an Leukozyten, deren Migrationsvektoren in einem Winkel von 60° in Richtung des Blutflusses lagen, zeigte das die

Anzahl von in Flussrichtung migrierenden Leukozyten von $26,0 \pm 6,4\%$ in $mAbp1^{+/+}$ -Mäusen auf $46,3 \pm 6,2\%$ in $mAbp1^{-/-}$ -Mäusen signifikant erhöht wurde (Abbildung 11 D).

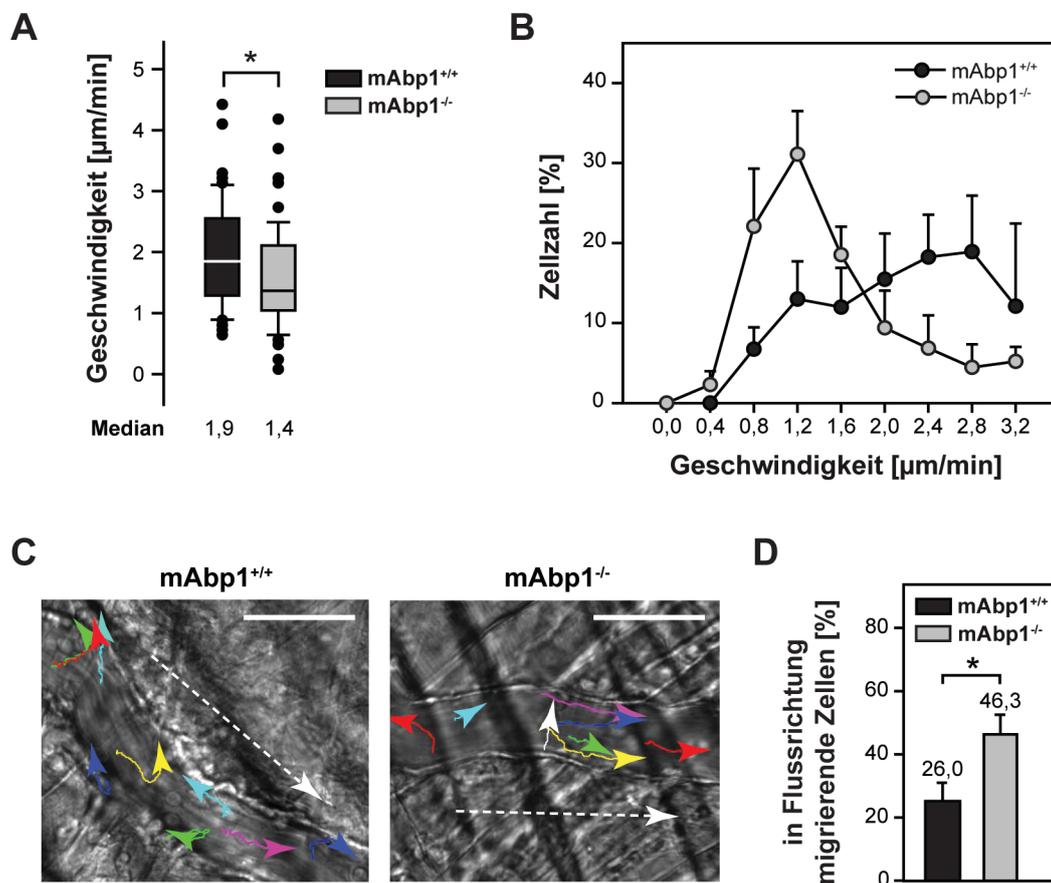


Abbildung 11 mAbp1 beeinflusst das Migrationsverhalten von PMN unter Flussbedingungen

(A, B) Migrationsgeschwindigkeit isolierter $mAbp1^{-/-}$ und $mAbp1^{+/+}$ -PMN unter Schubspannung (1 dyne/cm^2) in einer Flusskammer, beschichtet mit murinem P-Selektin (20 µg/ml), murinem ICAM1 ($12,5 \text{ µg/ml}$) und KC (15 µg/ml). Die Migrationsgeschwindigkeit von PMN wurde durch das Fehlen von mAbp1 reduziert. *Box-Whisker-Plot* der Geschwindigkeiten \pm SD, der Median ist angegeben (A). Häufigkeitsverteilung der Geschwindigkeiten (B). $n = 60$ $mAbp1^{+/+}$ -PMN und $n = 90$ $mAbp1^{-/-}$ -PMN aus 3 unabhängigen Experimenten. * zeigt einen signifikanten Unterschied an ($p < 0,05$). **(C)** Intravitalmikroskopische Analyse der intraluminale Migration von Leukozyten in $mAbp1^{-/-}$ und $mAbp1^{+/+}$ -Mäusen. Mikroskopische Aufnahmen und Migrationsverläufe einzelner Leukozyten, die entlang des entzündeten Endothels migrieren. Farbige Pfeile kennzeichnen die Migrationsverläufe. Gestrichelte Pfeile geben die Richtung des Blutflusses an. Aufnahmen und Migrationsverläufe sind repräsentativ für 4 ($mAbp1^{+/+}$) bzw. 5 ($mAbp1^{-/-}$) Experimente. Balken = 50 µm . **(D)** Quantitative Analyse der Anzahl von Leukozyten, die in einem Winkel von 60° in Richtung des Blutflusses migrieren. Zellen wurden als migrierend angesehen, wenn sie innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 10 min mindestens um ihren Zelldurchmesser migrierten. $n = 157$ Leukozyten in 13 Venolen von 4 $mAbp1^{+/+}$ -Mäusen, $n = 189$ Leukozyten in 15 Venolen von 5 $mAbp1^{-/-}$ -Mäusen, MW \pm SE. * zeigt einen signifikanten Unterschied an ($p < 0,05$). **(A-D)** Die Abwesenheit von mAbp1 reduziert die Geschwindigkeit migrierender PMN unter Flussbedingungen und beeinträchtigt die Fähigkeit von Leukozyten gegen oder im rechten Winkel zur Flussrichtung zu migrieren *in vivo*.

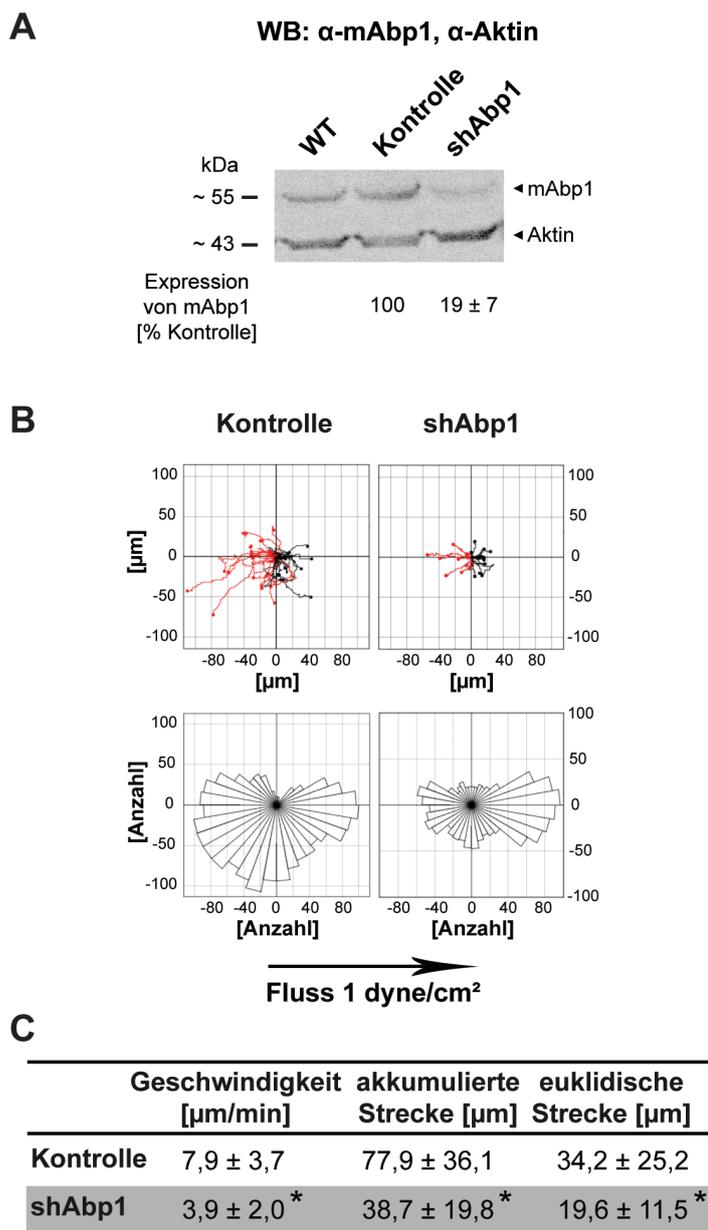


Abbildung 12 Die Herunterregulierung von mAbp1 mittels siRNA-Technik beeinflusst die mechanotaktische Migration von dHL-60-Zellen unter Flussbedingungen

(A) Repräsentative Westernblotanalyse von Wildtyp-HL-60-Zellen (WT) und von HL-60-Zellklonen, die stabil eine shRNA gegen mAbp1 (shAbp1) bzw. eine Kontroll-RNA (Kontrolle) exprimieren. Angegeben sind die Ergebnisse der semiquantitativen Analyse der mAbp1-Expression in shAbp1-Zellen relativ zur Kontrolle. mAbp1 wurde mit dem polyklonalen Ziege anti-mAbp1 Antikörper und Aktin mit dem polyklonalen Ziege anti-Aktin Antikörper detektiert. Die Proteinlevel von mAbp1 wurden auf die Aktin-Ladekontrolle normiert. Durch siRNA-Technik konnte die Expression von mAbp1 effektiv herunter reguliert werden. $n = 3$, MW \pm SD. **(B, C)** Migrationsverläufe und Migrationsparameter von migrierenden dHL-60-Zellen in einer Flusskammer auf immobilisiertem humanen ICAM1 (12,5 μ g/ml) nach Stimulation mit fMLP (100 nM) unter Schubspannung (1 dyne/cm² für 10 min). Die Richtung des Flusses ist durch einen Pfeil angezeigt. Die finalen Positionen der Zellen, relativ zu ihrem Startpunkt, sind durch einen gefüllten Kreis gekennzeichnet (B, obere Abbildungen). Im Rosendiagramm (B, untere Abbildungen) ist die Fläche eines Sektors proportional zur Frequenz der jeweiligen Migrationsvektoren. Die Herunterregulierung von mAbp1 durch RNAi-Technik (shAbp1) setzt im Vergleich zur Kontrolle die Migrationsgeschwindigkeit und -strecke herab und senkt die Anzahl der Zellen, die gegen die Richtung des Flusses migrieren. $n = 4$ (Kontrolle), $n = 5$ (shAbp1), MW \pm SD. * zeigt einen signifikanten Unterschied an ($p < 0,05$).

Zusätzlich wurde die mechanotaktische Migration auch im humanen System untersucht. Um den Einfluss von mAbp1 hier zu charakterisieren, wurden dHL-60-Zellen verwendet, die die mAbp1-Expression mittels RNAi-Technik herunterregulierten (shAbp1). Die Analyse von shAbp1-Zellen mittels Westernblottechnik im Vergleich zu wildtypischen dHL-60-Zellen oder dHL-60-Kontrollzellen (Kontrolle), die eine randomisierte shRNA exprimieren, ergab, dass in shAbp1-Zellen die Expression von mAbp1 effektiv auf einen Wert von $19 \pm 7\%$ im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert werden konnte (Abbildung 12 A). Unter einer Schubspannung von 1 dyne/cm^2 war die Migrationsgeschwindigkeit von shAbp1-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen auf immobilisiertem humanem ICAM1 signifikant reduziert (Abbildung 12 C). Dies ähnelt den Ergebnissen, die mit murinen PMN erzielt wurden und resultiert in einer verminderten akkumulierten und euklidischen Migrationsstrecke in shAbp1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 12 B und C). Des Weiteren ergab die Analyse der Migrationsverläufe und der Häufigkeitsverteilung der Richtung von Migrationsvektoren im Rosendiagramm, dass die Herunterregulierung von mAbp1 die Fähigkeit von dHL-60-Zellen, gegen und rechtwinklig zur Flussrichtung zu migrieren, wie sie bei Kontrollzellen beobachtet werden konnte, aufhob (Abbildung 12 B). Hiermit konnten die *in vivo* Ergebnisse von Mäusen im humanen System bestätigt werden.

Um festzustellen, ob mAbp1 auch für die chemotaktische Migration eine bedeutende Rolle spielt, wurden isolierte mAbp1^{-/-} and mAbp1^{+/-}-PMN in einem Gradienten von $10 \mu\text{M}$ fMLP in Zigmond-Chemotaxiskammern untersucht. Die Abwesenheit von mAbp1 hatte keinerlei Effekt auf die chemotaktische Migrationsrichtung, auf die Migrationsgeschwindigkeit, noch auf die akkumulierte und euklidische Migrationsstrecken von PMN auf immobilisiertem Fibrinogen oder ICAM1 im Vergleich zu mAbp1^{+/-}-PMN (Abbildung 13 A bis C). Offenbar wurde mAbp1 für die chemotaktische Migration unter statischen *in vitro* Bedingungen nicht benötigt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse implizieren, dass mAbp1 für die eine effiziente Mac1-abhängige mechanotaktische Migration unter Schubspannung unabdingbar ist, jedoch keinen Effekt auf die chemotaktische Migration unter statischen Bedingungen hat.

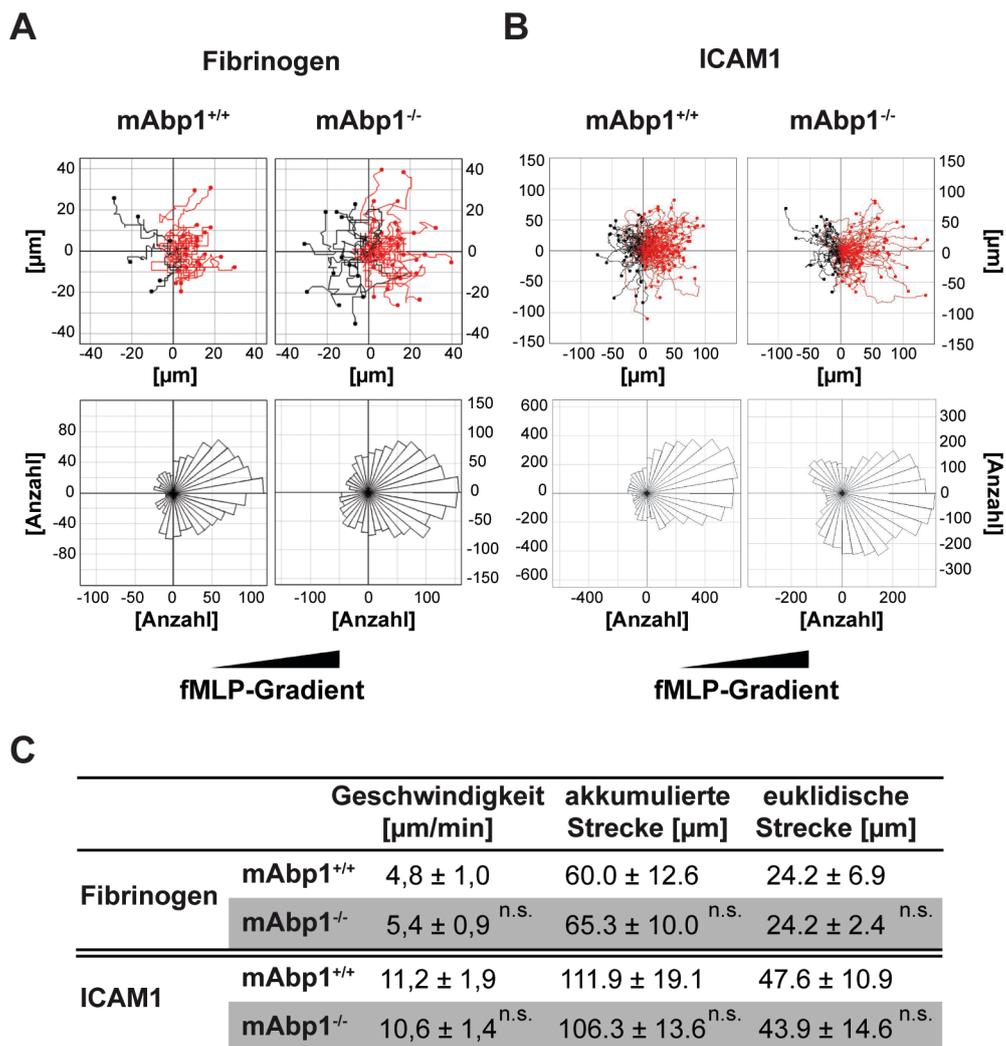


Abbildung 13 Die Abwesenheit von mAbp1 hatte keinen Einfluss auf die chemotaktische Migration von PMN unter statischen Bedingungen

(A-C) Migrationsverläufe und Migrationsparameter von isolierten murinen mAbp1^{-/-} und mAbp1^{+/+}-PMN auf immobilisiertem murinem Fibrinogen (50 µg/ml) oder ICAM1 (12,5 µg/ml) als Antwort auf einen 10 µM fMLP-Gradienten (▲). Die finalen Positionen der Zellen, relativ zu ihrem Startpunkt, sind durch einen gefüllten Kreis gekennzeichnet (A und B, obere Abbildungen). Im Rosendiagramm (A und B, untere Abbildungen) ist die Fläche eines Sektors proportional zur Frequenz der jeweiligen Migrationsvektoren. Unter statischen Bedingungen war die chemotaktische Migration zwischen beiden Gruppen vergleichbar. $n = 4$ (Fibrinogen), $n = 3$ (ICAM1), MW ± SD. n.s., nicht signifikant.

3.5 Die Bedeutung von mAbp1 für die Verstärkung der hochaffinen Konformation von β_2 -Integrinen unter Flussbedingungen

Offensichtlich übt mAbp1 nur unter Flussbedingungen für β_2 -Integrin-vermittelte Funktionen von PMN eine tragende Rolle aus. Für Adhäsion, die Verstärkung der Adhäsion und Motilität unter Flussbedingungen ist eine komplexe Regulierung der Integrinaffinität und -avidität über die Bildung von Integrin-Clustern mit hoher Ligandenaffinität essenziell (Kim et al. 2004; Kinashi 2005; Alon & Dustin 2007). Um einen möglichen Einfluss von mAbp1 auf die Bildung von CD18-Clustern zu untersuchen, wurde die Clusterbildung mittels Antikörperfärbung und anschließender konfokaler Mikroskopie von murinen PMN oder dHL-60-Zellen untersucht und die Anzahl der CD18-positiven Makrocluster pro Zelle bestimmt. Nach Stimulation mit 1 μ M fMLP konnte in murinen mAbp1^{-/-}-PMN und in mAbp1^{+/+}-PMN in gleichem Maße die Bildung von CD18-Clustern auf immobilisiertem Fibrinogen nachgewiesen werden (Abbildung 14 A und B). Ähnliche Resultate wurden mit mAbp1^{-/-}-PMN und mAbp1^{+/+}-PMN auf immobilisiertem ICAM1 nach Stimulation mit 100 ng/ml KC erzielt (Daten nicht gezeigt). Diese Ergebnisse bestätigend, konnte auch in dHL-60-Zellen auf ICAM1 kein Effekt durch Herunterregulierung der Expression von mAbp1 durch RNAi-Technik (shAbp1) auf die Anzahl von CD18-Clustern im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 14 C). Diese Befunde legen nahe, dass unter statischen Bedingungen mAbp1 keinen Einfluss auf die Bildung von β_2 -Integrin-Clustern hat. Da die β_2 -Integrin-Konformation mit hoher Affinität entscheidend für Adhäsion unter Flussbedingungen ist (Alon & Dustin 2007), wurde ein monoklonaler Antikörper benutzt (mAb24), der explizit nur an die geöffnete Konformation von β_2 -Integrinen mit hoher Affinität binden kann (Dransfield & Hogg 1989; Smith, A. et al. 2007). Auch hier hatte die Herunterregulierung von mAbp1 in shAbp1-Zellen nach Stimulation der Adhäsion auf ICAM1 unter statischen Bedingungen im Vergleich zur Kontrolle keinen Einfluss auf die Anzahl mAb24-positiver CD18-Cluster mit hoher Affinität (Abbildung 14 D).

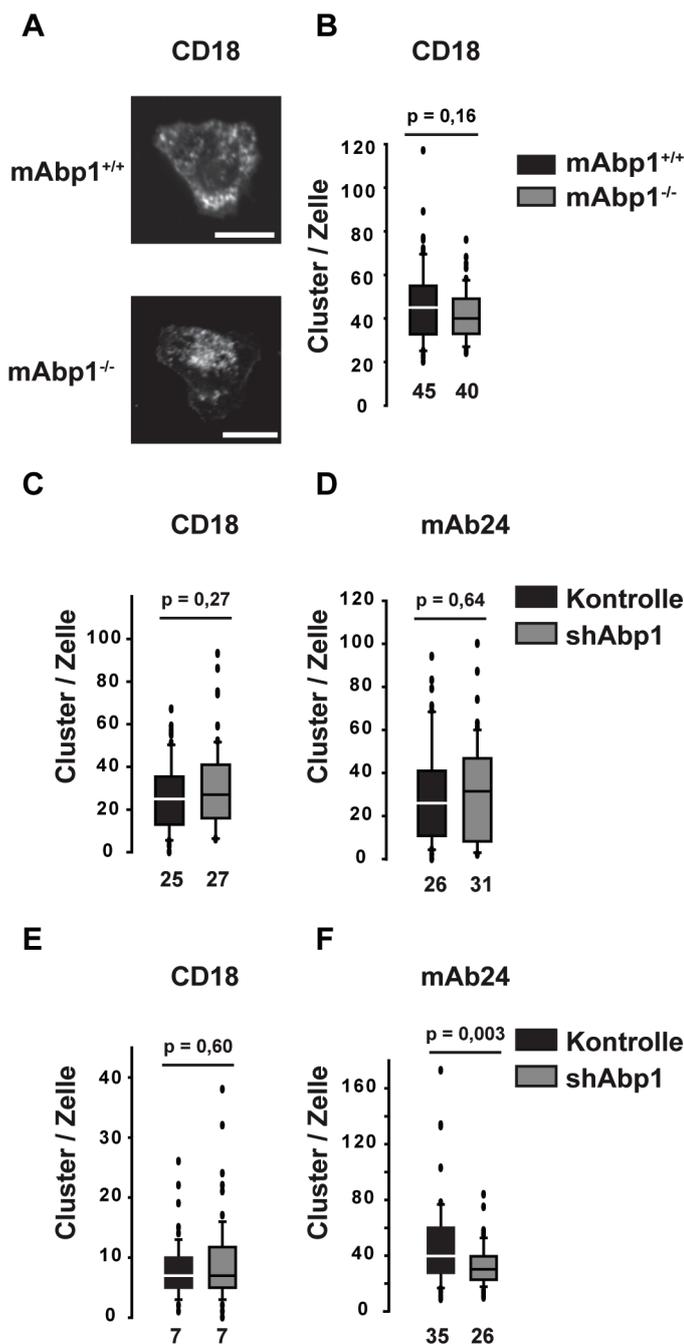


Abbildung 14 mAbp1 hatte einen positiven Effekt auf die Konformation mit hoher Affinität von β_2 -Integrinen

(A, B) Analyse von CD18-Clustern von isolierten murinen mAbp1^{-/-} und mAbp1^{+/+}-PMN nach Stimulation mit 1 μ M fMLP auf immobilisiertem ICAM1 (12,5 μ g/ml) unter statischen Bedingungen. Konfokale mikroskopische Aufnahmen (A) und *Box-Whisker-Plot* der Anzahl an CD18-positiven Clustern, unabhängig von ihrer Konformation (CD18) (B). Mediane sind angegeben. $n = 3$ (C-E) Analyse von CD18-Clustern von mAbp1-shRNA exprimierenden dHL-60-Zellen (shAbp1) oder dHL-60-Kontrollzellen (Kontrolle) nach Stimulation mit 100 nM fMLP auf immobilisiertem ICAM1 (12,5 μ g/ml) unter statischen Bedingungen (C, D) oder Flussbedingungen (0,5 dyne/cm², E, F). *Box-Whisker-Plot* der Anzahl an CD18-positiven Clustern, unabhängig von ihrer Konformation (CD18) (C, E) und *Box-Whisker-Plot* der Anzahl an CD18-positiven Clustern in ihrer Konformation mit hoher Affinität (mAb24) (D, F). Mediane sind angegeben. $n = 3$.

Schließlich wurde die Bildung von CD18-Clustern bei einer angelegten Schubspannung von 0,5 dyne/cm² für 10 min in Flusskammern untersucht. Wie bei statischen Bedingungen wurde die Bildung von CD18-Clustern unter Flussbedingungen nicht durch das Herunterregulieren von mAbp1 in shAbp1-Zellen beeinträchtigt (Abbildung 14 E). Jedoch konnte bei der Anzahl mAb24-positiver Cluster, also von CD18-Clustern mit hoher Affinität, eine signifikante Reduktion in shAbp1-Zellen unter Flussbedingungen im Vergleich zu Kontrollzellen detektiert werden (Abbildung 14 F). Dieses wichtige Ergebnis impliziert, dass mAbp1 für die Induktion und/oder Stabilisierung der β_2 -Integrin-Konformation mit hoher Affinität von Bedeutung ist und könnte die Defekte bei Adhäsion, *Spreading* und Migration in Abwesenheit von mAbp1 unter Flussbedingungen erklären.

4 Diskussion

Die Tyrosinkinase Syk ist für verschiedene β_2 -Integrin-vermittelte Funktionen von PMN wichtig (Mócsai et al. 2010). Syk ist bei der Aktivierung von Integrinen, dem *Inside-Out Signaling*, involviert. Es konnte gezeigt werden, dass Syk an der Induktion der intermediären Affinität von LFA1 infolge der Bindung von PSGL1 beteiligt ist. Syk ist jedoch insbesondere bei der β_2 -Integrin-vermittelten Signaltransduktion, dem *Outside-In Signaling*, von Bedeutung. (Mócsai et al. 2002; Mócsai et al. 2003; Zarbock et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die *in vivo* Relevanz von Syk während der Leukozytenrekrutierung für die β_2 -Integrin-vermittelte Induktion der festen Adhäsion und des *Spreadings*, welche wichtig für eine effiziente Leukozytenextravasation waren, dokumentiert werden (Frommhold et al. 2007). Die *in vitro* Experimente auf immobilisiertem Fibrinogen, die im Zuge dieser Dissertation durchgeführt wurden, konnten bestätigen, dass Syk für β_2 -Integrin-vermittelte Adhäsion und *Spreading* benötigt wurde. Dies ist insofern zu berücksichtigen, als dass die Adhäsion und das *Spreading* in Abwesenheit von Syk beeinträchtigt waren, obwohl die Aktivierung der β_2 -Integrine unabhängig von *Inside-Out Signaling* durch Mn^{2+} induziert wurde. Das bestätigt die vorrangige Funktion von Syk beim β_2 -Integrin-vermittelten *Outside-In Signaling*. Die in dieser Arbeit untersuchten Funktionen des Syk-Interaktionspartners mAbp1 (Larbolette et al. 1999) sind demzufolge ebenfalls dem Prozess des β_2 -Integrin-vermittelten *Outside-In Signalings* über Syk zuzuordnen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf eine bedeutende Rolle von mAbp1 für die β_2 -Integrin-vermittelten PMN-Funktionen Adhäsion, *Spreading* und intraluminale Migration unter Flussbedingungen hin. Dies war jedoch weder durch eine verminderte Expression von β_2 -Integrinen, noch durch Defekte bei der Mobilisierung von β_2 -Integrinen aus intrazellulären Granula und Vesikeln oder Differenzierungsdefekten von PMN begründet. Das Fehlen von mAbp1 hatte einen ausgeprägten Defekt in Leukozytenadhäsion und *-Spreading* am entzündeten Endothel von $TNF\alpha$ und fMLP stimulierten Venolen des *M. cremaster* von mAbp1^{-/-}-Mäusen zur Folge. Dabei waren P- und E-Selektin-vermittelte Rollen in mAbp1^{-/-}-Mäusen nicht betroffen. Dies

deutet darauf hin, dass initiale Prozesse der Leukozytenrekrutierung, wie Rollen, nicht durch ein Fehlen von mAbp1 beeinträchtigt waren und somit die Voraussetzungen für eine effiziente Adhäsion an das Endothel gegeben waren. Im Gegensatz zum dramatischen Effekt *in vivo* in Abwesenheit von mAbp1, waren β_2 -Integrin-vermittelte Adhäsion und *Spreading* in statischen *in vitro* Versuchen in mAbp1^{-/-}-PMN im Vergleich zur Wildtypkontrolle in keiner Weise beeinträchtigt. Dies steht auch im Kontrast zu der unverzichtbaren Rolle von Syk für β_2 -Integrin-vermittelte Prozesse, als dass Adhäsion und *Spreading* von Syk^{-/-}-PMN auch unter statischen Bedingungen vermindert waren. Diese Tatsache impliziert, dass mAbp1 nicht generell für β_2 -Integrin-vermittelte Funktionen, die mit *Outside-In Signaling* verbunden werden, wichtig ist. Die Flusskammerversuche mit murinem Vollblut oder isolierten PMN konnten aber bestätigen, dass für die *in vivo* beobachteten Adhäsions- und *Spreading*-Defekte das Fehlen von mAbp1 in PMN verantwortlich war. Auch unter reduktionistischen *in vitro* Bedingungen, ohne den Einfluss des Endothels, waren hier Adhäsion und *Spreading* in Abwesenheit von mAbp1 vermindert. Weiterführende Analysen ergaben, dass mAbp1 offensichtlich wichtig für die Resistenz von PMN gegen Schubspannung unter Flussbedingungen war. Dies könnte die Auswirkungen des Defekts in der Induktion der Adhäsion in Abwesenheit von mAbp1, wie er im Modell des fMLP-stimulierten *M. cremasters* beobachtet werden konnte, noch verstärken. Die biologische Konsequenz einer ineffektiven Leukozytenrekrutierung konnte anhand der dramatisch verminderten Akkumulation von Leukozyten im Gewebe des entzündeten *M. cremaster* gezeigt werden. Im Gegensatz zu Syk, scheint die Funktion von mAbp1 nur unter Bedingungen einer äußeren Krafteinwirkung, wie unter Schubspannung, benötigt zu werden.

Die intraluminale Migration (*Intraluminal Crawling*) ist ein individueller Prozess während der Rekrutierung von PMN und Monozyten, der sich zwischen die Verstärkung der Adhäsion mit *Spreading* und die Transmigration einfügt. Die intraluminale Migration beruht auf der Interaktion des β_2 -Integrins Mac1 mit endotheliale ICAM1 (Schenkel et al. 2004; Phillipson et al. 2006; Phillipson et al. 2009; Frommhold et al. 2010). Dies war auch in dem experimentellen Aufbau in dieser Arbeit der Fall, da das Migrationsvermögen von isolierten PMN unter Schubspannung abhängig von einer Interaktion von ICAM mit Mac1 war, aber nicht durch die Abwesenheit von LFA1 beeinträchtigt wurde. Da das Migrationsvermögen und die

Migrationsgeschwindigkeit von mAbp1^{-/-}-PMN auf ICAM1 unter Schubspannung ebenfalls reduziert waren, könnte mAbp1 möglicherweise bei Mac1-vermittelten PMN-Funktionen beteiligt sein, die auf die initiale Adhäsion, den *Arrest*, in der Rekrutierungskaskade folgen. Im humanen System, unter Verwendung von dHL-60-Zellen in Flusskammern, war die Migrationsgeschwindigkeit nach Herunterregulierung von mAbp1 mittels RNAi-Technik ebenfalls vermindert. Die interessanteste Beobachtung war jedoch, dass die Herunterregulierung von mAbp1 in dHL-60-Zellen *in vitro* oder die Abwesenheit von mAbp1 in Leukozyten *in vivo*, die Fähigkeit der Zellen gegen oder rechtwinkelig zur Richtung des Flusses zu migrieren, aufhob. Im Gegensatz dazu konnte dies bei der Mehrheit der dHL-60-Kontrollzellen bzw. mAbp1^{+/+}-Leukozyten beobachtet werden. *In vivo* oder unter Flussbedingungen *in vitro* wurde bereits gezeigt, dass dieses Migrationsverhalten bei PMN dem Normalfall zu entspricht, um durch rechtwinkeliges Migrieren zur Flussrichtung möglichst auf kurzer Distanz zu einer potentiellen Auswanderungsstelle an Endothelzellkontakten zu gelangen. Rechtwinkeliges Migrieren ist offenbar ein Werkzeug zur effizienten Auswanderung von PMN. Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Beteiligung von mAbp1 an einer effizienten Migration von PMN unter Flussbedingungen ähneln den Beobachtungen an Vav^{-/-}-PMN (Phillipson et al. 2006; Phillipson et al. 2009). Vav wurde schon früher mit der Migration von PMN in Verbindung gebracht und es wurde gezeigt, dass dieses Molekül Teil eines Signalkomplexes, reguliert von Syk, ist (Schymeinsky et al. 2006). Die Familie der Vav-Proteine sind GEFs die Rho/Rac-GTPasen aktivieren und an verschiedenen Prozessen beteiligt sind, die eine Reorganisation des Aktinzytoskeletts benötigen wie Phagozytose und *Spreading* (Swat & Fujikawa 2005). Die Rho-GTPase Cdc42 ist ein bekannter Aktivator von WASP und N-WASP, welche wiederum die Funktion des Arp2/3-Komplexes, Aktinfilamente zu verzweigen, kontrollieren. Sie üben eine Funktion als NPF aus (Stradal & Scita 2006). Auch für mAbp1 wurde gezeigt, dass es mit der GTPase Cdc42 kooperiert und möglicherweise über N-WASP/WASP Arp2/3 aktiviert und zur Kontrolle der Aktinpolymerisation beitragen könnte (Stradal & Scita 2006; Pinyol et al. 2007). Man könnte also spekulieren, dass mAbp1 und Vav als Teil des gleichen Signalkomplexes, kontrolliert von Syk, in ähnliche Prozesse zur Kontrolle des Aktinzytoskeletts während β_2 -Integrin-vermittelten PMN-Funktionen involviert sind oder dabei sogar kooperieren. Dies ist natürlich hypothetisch und müsste erst untersucht werden.

Dennoch konnte in unserer Arbeitsgruppe mittels Koimmunopräzipitation gezeigt werden, dass die an mAbp1 gebundene Menge an Aktin nach β_2 -Integrin-vermittelter Adhäsion signifikant zunahm (Hepper et al. 2012). Dies lässt den Schluss zu, dass eine funktionelle Verbindung von β_2 -Integrin-Funktion mit der Aktin-Bindungs-fähigkeit von mAbp1 besteht.

Die Analyse der chemotaktischen Migration von mAbp1^{-/-}-PMN unter statischen Bedingungen konnte keinen Unterschied zur Migration von Wildtyp-PMN zeigen. Da auch Adhäsion und *Spreading* unter statischen Bedingungen durch das Fehlen von mAbp1 nicht beeinträchtigt waren, ist es wahrscheinlich, dass mAbp1 nur bei Prozessen erforderlich ist, die für β_2 -Integrin-vermittelte Funktionen unter Schubspannung essenziell sind. Für feste Adhäsion, *Spreading* und Migration unter Flussbedingungen ist die Verstärkung der β_2 -Integrin-Konformation mit hoher Affinität und das Bilden von β_2 -Integrin-Makroclustern essenziell (Kim et al. 2004; Kinashi 2005; Alon & Dustin 2007). In Übereinstimmung mit dem fehlenden Einfluss von mAbp1 auf β_2 -Integrin-Funktionen unter statischen Bedingungen, war hier auch die Ausbildung von CD18-Clustern oder mAb24-positiven CD18-Clustern mit hoher Affinität in mAbp1^{-/-}-PMN oder shAbp1-Zellen nicht beeinträchtigt. Unter Flussbedingungen war jedoch die Anzahl mAb24-positiver Cluster pro Zelle signifikant reduziert. Die β_2 -Integrin-Konformation mit hoher Affinität ist für die Verstärkung der Adhäsion und für weitere Schritte während der Rekrutierung von PMN unter Schubspannung unabdingbar (Luo et al. 2007). Somit könnte die reduzierte Anzahl von β_2 -Integrin-Clustern mit hoher Affinität in der Abwesenheit von mAbp1 die beobachteten Defekte der β_2 -Integrin-vermittelten PMN-Funktionen *in vivo* und unter Flussbedingungen *in vitro* erklären. In Jurkat-T-Zellen wird LFA1 erst nach Bindung seines Liganden ICAM1 durch zytoskelettale Regulatoren mit dem Aktinzytoskelett verbunden und somit in der Zellmembran fixiert (Cairo et al. 2006). Die Verankerung von Integrinen mit dem Aktinzytoskelett ist eine wesentliche Voraussetzung für den Widerstand gegen Schubspannung. Die verschiedenen Konformationen von β_2 -Integrinen befinden sich in einem Gleichgewicht, welches wahrscheinlich durch externe Kräfte, wie sie unter Schubspannung in einem Gefäß auftreten, in Richtung hohe Affinität verschoben wird. (Luo et al. 2007; Alon & Dustin 2007). mAbp1 könnte nun dabei helfen, eben dieses Gleichgewicht von β_2 -Integrinen zu regulieren und über

eine funktionelle Verbindung zum Aktinzytoskelett die hohe Affinität von β_2 -Integrinen zu induzieren und/oder zu stabilisieren.

Eine wachsende Anzahl von Hinweisen deutet darauf hin, dass mechanische Kräfte für die Entwicklung von fokalen adhäsiven Arealen über die Rekrutierung zusätzlicher Proteine wichtig sind. Hierbei kann es sich um Kräfte handeln, wie sie bei der Aktinpolymerisation innerhalb der Zelle entstehen, oder um von außen wirkende Kräfte wie die Schubspannung (Geiger et al. 2009). Es könnte also möglich sein, dass mAbp1, aufgrund seiner Aktin-bindenden Eigenschaften, ein neuer Bestandteil des Proteinnetzwerkes ist, welches für die Verbindung der Liganden-gebundenen β_2 -Integrine mit dem Zytoskelett essenziell ist. Diese Verbindung ist die Voraussetzung, um Schubspannungen, die während Adhäsion, *Spreading* und Migration bei der Leukozytenrekrutierung auftreten, zu widerstehen. Die Daten lassen weiterhin den Schluss zu, dass mAbp1 eher bei Einwirkung von externen Kräften, wie Schubspannung, als bei internen Kräften, wie sie durch Aktinpolymerisation bei Adhäsion, *Spreading* und Migration unter statischen Bedingungen auftreten, seine Funktion erfüllt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mAbp1 unter Flussbedingungen während des β_2 -Integrin-vermitteltem *Outside-In Signaling* über Syk essenziell für die PMN-Funktionen Adhäsion, *Spreading* und Migration war. Unter statischen Bedingungen, d.h. ohne Einwirkung einer externen Kraft auf die Integrine, war mAbp1 für β_2 -Integrin-vermittelte Zellfunktionen verzichtbar. Vielmehr schien mAbp1 unter Schubspannung die Induktion und/oder Stabilisierung der hohen Affinität von β_2 -Integrinen zu unterstützen, welches eine Voraussetzung für den Widerstand gegen Kräfte durch Schubspannung war. mAbp1 könnte in die Verschiebung des Gleichgewichtes von Integrinen zu der hohen Affinität involviert sein. Dementsprechend scheint mAbp1 für die Übertragung von mechanischer Kraft des Liganden-gebundenen β_2 -Integrins zum Aktinzytoskelett wichtig zu sein, was nur für Adhäsion, *Spreading* und Migration von PMN während der Rekrutierung zum Ort der Entzündung ausschlaggebend war. Insgesamt zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass das Adapterprotein mAbp1 einen wichtigen molekularen Faktor für die Funktion von PMN im Kontext der angeborenen Immunabwehr darstellt.

5 Literaturverzeichnis

- Alcaide, P., Auerbach, S., Luscinskas, F.W., 2009. Neutrophil recruitment under shear flow: it's all about endothelial cell rings and gaps. *Microcirculation* 16(1): 43–57.
- Alon, R. & Dustin, M.L., 2007. Force as a facilitator of integrin conformational changes during leukocyte arrest on blood vessels and antigen-presenting cells. *Immunity* 26(1): 17–27.
- Alon, R. & Etzioni, A., 2003. LAD-III, a novel group of leukocyte integrin activation deficiencies. *Trends in Immunology* 24(10): 561–566.
- Alon, R. & Ley, K., 2008. Cells on the run: shear-regulated integrin activation in leukocyte rolling and arrest on endothelial cells. *Current Opinion in Cell Biology* 20(5): 525–532.
- Anderson, D.C. & Springer, T.A., 1987. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annual Review of Medicine* 38: 175–194.
- Andersson, U., Wang, H., Palmblad, K., Aveberger, A.C., Bloom, O., Erlandsson-Harris, H., Janson, A., Kokkola, R., Zhang, M., Yang, H., Tracey, K.J., 2000. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *The Journal of Experimental Medicine* 192(4): 565–570.
- Arnold, L., Henry, A., Poron, F., Baba-Amer, Y., van Rooijen, N., Plonquet, A., Gherardi, R.K., Chazaud, B., 2007. Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis. *The Journal of Experimental Medicine* 204(5): 1057–1069.
- Asea, A., Kraeft, S.K., Kurt-Jones, E.A., Stevenson, M.A., Chen, L.B., Finberg, R.W., Koo, G.C., Calderwood, S.K., 2000. HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nature Medicine* 6(4): 435–442.
- Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M., Srivastava, P.K., 2000. Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *International Immunology* 12(11): 1539–1546.
- Beglova, N., Blacklow, S.C., Takagi, J., Springer, T.A., 2002. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nature Structural Biology* 9(4): 282–287.
- Benoist, C. & Mathis, D., 2002. Mast cells in autoimmune disease. *Nature* 420(6917): 875–878.

- Berlin-Rufenach, C., Otto, F., Mathies, M., Westermann, J., Owen, M.J., Hamann, A., Hogg, N., 1999. Lymphocyte migration in lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice. *The Journal of Experimental Medicine* 189(9): 1467–1478.
- Berton, G., Mócsai, A., Lowell, C.A., 2005. Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation. *Trends in Immunology* 26(4): 208–214.
- Bokoch, G.M., 1995. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 86(5): 1649–1660.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A., 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303(5663):1532-5.
- Cairo, C.W., Mirchev, R., Golan, D.E., 2006. Cytoskeletal regulation couples LFA-1 conformational changes to receptor lateral mobility and clustering. *Immunity* 25(2): 297–308.
- Calderwood, D.A., Yan, B., de Pereda, J.M., Alvarez, B.G., Fujioka, Y., Liddington, R.C., Ginsberg, M.H., 2002. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *The Journal of Biological Chemistry* 277(24): 21749–21758.
- Calderwood, D.A., Zent, R., Grant, R., Rees, D.J., Hynes, R.O., Ginsberg, M.H., 1999. The Talin head domain binds to integrin beta subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *The Journal of Biological Chemistry* 274(40): 28071–28074.
- Chen, W., Syldath, U., Bellmann, K., Burkart, V., Kolb, H., 1999. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *Journal of Immunology* 162(6): 3212–3219.
- Connert, S., Wienand, S., Thiel, C., Krikunova, M., Glyvuk, N., Tsytsyura, Y., Hilfiker-Kleiner, D., Bartsch, J.W., Klingauf, J., Wienands, J., 2006. SH3P7/mAbp1 deficiency leads to tissue and behavioral abnormalities and impaired vesicle transport. *The EMBO Journal* 25(8): 1611–1622.
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J.Y., Butcher, E.C., Laudanna, C., 2000. Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 13(6): 759–769.
- Coxon, A., Rieu, P., Barkalow, F.J., Askari, S., Sharpe, A.H., von Andrian, U.H., Arnaout, M.A., Mayadas, T.N., 1996. A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity* 5(6): 653–666.
- Davignon, D., Martz, E., Reynolds, T., Kürzinger, K., Springer, T.A., 1981. Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1): a surface antigen distinct from Lyt-2,3 that participates in T lymphocyte-mediated killing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(7): 4535–4539.

- Diamond, M.S. & Springer, T.A., 1994. The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Current Biology* 4(6): 506–517.
- Dransfield, I., & Hogg, N., 1989. Regulated expression of Mg²⁺ binding epitope on leukocyte integrin alpha subunits. *The EMBO Journal* 8(12): 3759–3765.
- Duchniewicz, M., Zemojtel, T., Kolanczyk, M., Grossmann, S., Scheele, J.S., Zwartkruis, F.J., 2006. Rap1A-deficient T and B cells show impaired integrin-mediated cell adhesion. *Molecular and Cellular Biology* 26(2): 643–653.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J., Liddington, R.C., 2000. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1. *Cell* 101(1): 47–56.
- Etzioni, A., 1999. Loss of endothelial surface expression of E-selectin--a third LAD syndrome. *Blood* 94(11): 3956.
- Etzioni, A., Frydman, M., Pollack, S., Avidor, I., Phillips, M.L., Paulson, J.C., Gershoni-Baruch, R., 1992. Brief report: recurrent severe infections caused by a novel leukocyte adhesion deficiency. *The New England Journal of Medicine* 327(25): 1789–1792.
- Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., De Filippo, K., Jones, K., McDowall, A., Hogg, N., 2009. Integrins in immunity. *Journal of Cell Science* 122: 215–225.
- Fan, Z., McArdle, S., Marki, A., Mikulski, Z., Gutierrez, E., Engelhardt, B., Deutsch, U., Ginsberg, M., Groisman, A., Ley, K., 2016. Neutrophil recruitment limited by high-affinity bent β 2 integrin binding ligand in cis. *Nature Communications* 2016 7: 12658.
- Fan, Z., Kiosses, W.B., Sun, H., Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Zajonc, D.M., Arnaout, M.A., Gutierrez, E., Groisman, A., Ginsberg, M.H., Ley, K., 2019. High-Affinity Bent β 2-Integrin Molecules in Arresting Neutrophils Face Each Other through Binding to ICAMs In cis. *Cell Reports* 26(1): 119-130
- Fraser, I.P., Koziel, H., Ezekowitz, R.A., 1998. The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Seminars in Immunology* 10(5): 363–372.
- Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., Zänker, K.S., 1998. CD4+ T lymphocytes migrating in three-dimensional collagen lattices lack focal adhesions and utilize beta1 integrin-independent strategies for polarization, interaction with collagen fibers and locomotion. *European Journal of Immunology*, 28(8): 2331–2343.
- Frommhold, D., Kamphues, A., Hepper, I., Pruenster, M., Lukic, I. K., Socher, I., Zablot-skaya, V., Buschmann, K., Lange-Sperandio, B., Schymeinsky, J., Ryschich, E., Poeschl, J., Kupatt, C., Nawroth, P.P., Moser, M., Walzog, B., Bierhaus, A., Sperandio, M., 2010. RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo *Blood* 116(5): 841–849.

-
- Frommhold, D., Kamphues, A., Dannenberg, S., Buschmann, K., Zablotskaya, V., Tschada, R., Lange-Sperandio, B., Nawroth, P.P., Poeschl, J., Bierhaus, A., Sperandio, M., 2011. RAGE and ICAM-1 differentially control leukocyte recruitment during acute inflammation in a stimulus-dependent manner. *BMC Immunology* 12: 56.
- Frommhold, D., Mannigel, I., Schymeinsky, J., Mócsai, A., Poeschl, J., Walzog, B., Sperandio, M., 2007. Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo *BMC Immunology*, 8, 31.
- Furlong, M. T., Mahrenholz, A. M., Kim, K. H., Ashendel, C. L., Harrison, M. L., Geahlen, R. L., 1997. Identification of the major sites of autophosphorylation of the murine protein-tyrosine kinase Syk. *Biochimica et Biophysica Acta* 1355(2): 177–190.
- Futosi, K., Fodor, S., Mócsai, A., 2013. International Immunopharmacology. *International Immunopharmacology* 17(3): 638–650.
- Geiger, B., Spatz, J.P., Bershadsky, A.D., 2009. Environmental sensing through focal adhesions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(1): 21–33.
- Giagulli, C., Scarpini, E., Ottoboni, L., Narumiya, S., Butcher, E.C., Constantin, G., Laudanna, C., 2004. RhoA and zeta PKC control distinct modalities of LFA-1 activation by chemokines: critical role of LFA-1 affinity triggering in lymphocyte in vivo homing. *Immunity* 20(1): 25–35.
- Goode, B. L., Rodal, A. A., Barnes, G., Drubin, D. G., 2001. Activation of the Arp2/3 complex by the actin filament binding protein Abp1p. *The Journal of Cell Biology* 153(3): 627–634.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., Dustin, M.L., 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285(5425): 221–227.
- Han, Jaewon, Lim, C.J., Watanabe, N., Soriani, A., Ratnikov, B., Calderwood, D.A., Puzon-McLaughlin, W., Lafuente, E.M., Boussiotis, V.A., Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., 2006. Reconstructing and deconstructing agonist-induced activation of integrin alphaIIb beta3. *Current Biology* 16(18): 1796–1806.
- Han, Jin, Shui, J.-W., Zhang, X., Zheng, B., Han, S., Tan, T.-H., 2005. HIP-55 is important for T-cell proliferation, cytokine production, and immune responses. *Molecular and Cellular Biology* 25(16), 6869–6878.
- Hannigan, M., Zhan, L., Li, Z., Ai, Y., Wu, D., Huang, C.K., 2002. Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(6): 3603–3608.
- Hawkins, R.J., Piel, M., Faure-Andre, G., Lennon-Dumenil, A.M., Joanny, J.F., Prost, J., Voituriez, R., 2009. Pushing off the walls: a mechanism of cell motility in confinement. *Physical Review Letters* 102(5): 058103.
-

- Haynes, J., Garcia, B., Stollar, E. J., Rath, A., Andrews, B. J., Davidson, A. R., 2007. The biologically relevant targets and binding affinity requirements for the function of the yeast actin-binding protein 1 Src-homology 3 domain vary with genetic context. *Genetics* 176(1): 193–208.
- Häger, M., Cowland, J.B., Borregaard, N., 2010. Neutrophil granules in health and disease. *Journal of Internal Medicine* 268(1): 25–34.
- He, Z., Ong, C.H., Halper, J., Bateman, A., 2003. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nature Medicine* 9(2): 225–229.
- Hepper, I., Schymeinsky, J., Weckbach, L.T., Jakob, S.M., Frommhold, D., Sixt, M., Laschinger, M., Sperandio, M., Walzog, B., 2012. The Mammalian Actin-Binding Protein 1 Is Critical for Spreading and Intraluminal Crawling of Neutrophils under Flow Conditions. *The Journal of Immunology* 188(9): 4590–4601.
- Hirsch, E., Katanaev, V.L., Garlanda, C., Azzolino, O., Pirola, L., Silengo, L., Sozzani, S., Mantovani, A., Altruda, F., Wymann, M.P., 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science* 287(5455): 1049–1053.
- Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M.F., Slattery, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., Schmidt, A.M., 1999. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97(7): 889–901.
- Hogg, N. & Bates, P.A., 2000. Genetic analysis of integrin function in man: LAD-1 and other syndromes. *Matrix Biology* 19(3): 211–222.
- Hogg, N., Patzak, I., Willenbrock, F., 2011. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nature Reviews Immunology* 11(6): 416–26.
- Hynes, R.O., 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110(6): 673–687.
- Janeway, C.A. & Medzhitov, R., 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20: 197–216.
- Jin, F.Y., Nathan, C., Radzioch, D., Ding, A., 1997. Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell* 88(3): 417–426.
- Kessels, M.M., Engqvist-Goldstein, A.E., Drubin, D.G., Qualmann, B., 2001. Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *The Journal of Cell Biology* 153(2): 351–366.

- Kessels, M.M., Engqvist-Goldstein, A.E., Drubin, D.G., 2000. Association of mouse actin-binding protein 1 (mAbp1/SH3P7), an Src kinase target, with dynamic regions of the cortical actin cytoskeleton in response to Rac1 activation. *Molecular Biology of the Cell* 11(1): 393–412.
- Kim, M., Carman, C.V., Yang, W., Salas, A., Springer, T.A., 2004. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin $\{\alpha\}L\{\beta\}2$. *The Journal of Cell Biology* 167(6): 1241–1253.
- Kim, M., Carman, C.V., Springer, T.A., 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science* 301(5640): 1720–1725.
- Kinashi, T., 2005. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature reviews Immunology* 5(7): 546–559.
- Kinashi, T. & Katagiri, K., 2004. Regulation of lymphocyte adhesion and migration by the small GTPase Rap1 and its effector molecule, RAPL. *Immunology Letters* 93(1): 1–5.
- Kohl, S., Springer, T.A., Schmalstieg, F.C., Loo, L.S., Anderson, D.C., 1984. Defective natural killer cytotoxicity and polymorphonuclear leukocyte antibody-dependent cellular cytotoxicity in patients with LFA-1/OKM-1 deficiency. *Journal of Immunology* 133(6): 2972–2978.
- Kol, A., Lichtman, A.H., Finberg, R.W., Libby, P., Kurt-Jones, E.A., 2000. Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells. *Journal of Immunology* 164(1): 13–17.
- Kolaczowska, E. & Kubes, P., 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 13(3): 159–175.
- Kuijpers, T.W., Van Lier, R.A., Hamann, D., de Boer, M., Thung, L.Y., Weening, R.S., Verhoeven, A.J., Roos, D., 1997. Leukocyte adhesion deficiency type 1 (LAD-1)/variant. A novel immunodeficiency syndrome characterized by dysfunctional beta2 integrins. *Journal of Clinical Investigation* 100(7): 1725–1733.
- Lämmermann, T. & Sixt, M., 2009. Mechanical modes of “amoeboid” cell migration. *Current Opinion in Cell Biology* 21(5): 636–644.
- Lämmermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Söldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Förster, R., Critchley, D.R., Fässler, R., Sixt, M., 2008. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 453(7191): 51–55.
- Lämmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680–685.
- Larbolette, O., Wollscheid, B., Schweikert, J., Nielsen, P.J., Wienands, J., 1999. SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors. *Molecular and Cellular Biology* 19(2): 1539–1546.

- Laudanna, C., Campbell, J.J., Butcher, E.C., 1996. Role of Rho in chemoattractant-activated leukocyte adhesion through integrins. *Science* 271(5251): 981–983.
- Lee, J.O., Rieu, P., Arnaout, M.A., Liddington, R., 1995a. Crystal structure of the A domain from the alpha subunit of integrin CR3 (CD11b/CD18). *Cell* 80(4): 631–638.
- Lee, J.O., Bankston, L.A., Arnaout, M.A., Liddington, R.C., 1995b. Two conformations of the integrin A-domain (I-domain): a pathway for activation? *Structure* 3(12): 1333–1340.
- Lefort, C.T., Rossaint, J., Moser, M., Petrich, B.G., Zarbock, A., Monkley, S.J., Critchley, D.R., Ginsberg, M.H., Fässler, R., Ley, K., 2012. Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood* 119(18): 4275–82.
- Lefort, C.T. & Ley, K., 2012. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Frontiers in Immunology* 3: 157.
- Ley, K., 2003. Arrest chemokines. *Microcirculation* 10(3-4): 289–295.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature Reviews Immunology* 7(9): 678–689.
- Li, Z., Jiang, H., Xie, W., Zhang, Z., Smrcka, A.V., Wu, D., 2000. Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science* 287(5455): 1046–1049.
- Lock, P., Abram, C.L., Gibson, T., Courtneidge, S.A., 1998. A new method for isolating tyrosine kinase substrates used to identify fish, an SH3 and PX domain-containing protein, and Src substrate. *The EMBO Journal* 17(15): 4346–4357.
- Luo, B.-H., Carman, C.V., Springer, T.A., 2007. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annual Review of Immunology* 25: 619–647.
- Ma, Y.Q., Qin, J., Wu, C., Plow, E.F., 2008. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *The Journal of Cell Biology* 181(3): 439–446.
- Malawista, S.E. & de Boisfleury Chevance, A., 1997. Random locomotion and chemotaxis of human blood polymorphonuclear leukocytes (PMN) in the presence of EDTA: PMN in close quarters require neither leukocyte integrins nor external divalent cations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(21): 11577–11582.
- Mariathasan, S. & Monack, D.M., 2007. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 7(1): 31–40.

- Martel, V., Racaud-Sultan, C., Dupe, S., Marie, C., Paulhe, F., Galmiche, A., Block, M.R., Albiges-Rizo, C., 2001. Conformation, localization, and integrin binding of talin depend on its interaction with phosphoinositides. *The Journal of Biological Chemistry* 276(24): 21217–21227.
- Mayer, A.M., Brenic, S., Glaser, K.B., 1996. Pharmacological targeting of signaling pathways in protein kinase C-stimulated superoxide generation in neutrophil-like HL-60 cells: effect of phorbol ester, arachidonic acid and inhibitors of kinase(s), phosphatase(s) and phospholipase A2. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 279(2): 633–644.
- Medzhitov, R., 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature* 454(7203): 428–435.
- Montresor, A., Toffali, L., Constantin, G., Laudanna, C., 2012. Chemokines and the signaling modules regulating integrin affinity. *Frontiers in Immunology* 3: 127.
- Moon, K.D., Post, C.B., Durden, D.L., Zhou, Q., De, P., Harrison, M.L., Geahlen, R.L., 2005. Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 280(2): 1543–1551.
- Moser, M., Bauer, M., Schmid, S., Ruppert, R., Schmidt, S., Sixt, M., Wang, H.V., Sperandio, M., Fässler, R., 2009a. Kindlin-3 is required for beta2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nature Medicine* 15(3): 300–305.
- Moser, M., Legate, K.R., Zent, R., Fässler, R., 2009b. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* 324(5929): 895–899.
- Mócsai, A., Zhang, H., Jakus, Z., Kitaura, J., Kawakami, T., Lowell, C.A., 2003. G-protein-coupled receptor signaling in Syk-deficient neutrophils and mast cells. *Blood* 101(10): 155–4163.
- Mócsai, A., Abram, C.L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L.L., Lowell, C.A., 2006. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nature Immunology* 7(12): 1326–1333.
- Mócsai, A., Zhou, M., Meng, F., Tybulewicz, V.L., Lowell, C.A., 2002. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 16(4): 547–558.
- Mócsai, A., Ruland, J., Tybulewicz, V.L., 2010. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nature Reviews Immunology* 10(6): 387–402.
- Nathan, C., 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology* 6(3): 173–182.
- Nathan, C., 2002. Points of control in inflammation. *Nature* 420(6917): 846–852.
- Nathan, C. & Ding, A., 2010. Nonresolving Inflammation. *Cell* 140(6): 871–882.

- Nathan, C., Xie, Q.W., Halbwachs-Mecarelli, L., Jin, W.W., 1993. Albumin inhibits neutrophil spreading and hydrogen peroxide release by blocking the shedding of CD43 (sialophorin, leukosialin). *The Journal of Cell Biology* 122(1): 243–256.
- Nourshargh, S., Hordijk, P.L., Sixt, M., 2010. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(5): 366–78.
- Olazabal, I.M. & Machesky, L.M., 2001. Abp1p and cortactin, new “hand-holds” for actin. *The Journal of Cell Biology* 154(4): 679–682.
- Onabajo, O.O., Seeley, M.K., Kale, A., Qualmann, B., Kessels, M., Han, J., Tan, T.-H., Song, W., 2008. Actin-binding protein 1 regulates B cell receptor-mediated antigen processing and presentation in response to B cell receptor activation. *Journal of Immunology* 180(10): 6685–6695.
- Paavilainen, V.O., Bertling, E., Falck, S., Lappalainen, P., 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends in Cell Biology* 14(7): 386–394.
- Park, J.S., Svetkauskaite, D., He, Q., Kim, J.Y., Strassheim, D., Ishizaka, A., Abraham, E., 2004. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *The Journal of Biological Chemistry* 279(9): 7370–7377.
- Perez, O.D., Mitchell, D., Jager, G.C., South, S., Murriel, C., McBride, J., Herzenberg, L.A., Kinoshita, S., Nolan, G.P., 2003. Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nature Immunology* 4(11): 1083–1092.
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., Kubes, P. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of Experimental Medicine* 203(12): 2569–2575.
- Phillipson, M., Heit, B., Parsons, S. A., Petri, B., Mullaly, S. C., Colarusso, P., Gower, R. M., Neely, G., Simon, S.I., Kubes, P., 2009. Vav1 is essential for mechanotactic crawling and migration of neutrophils out of the inflamed microvasculature. *The Journal of Immunology* 182(11): 6870–6878.
- Pinyol, R., Haeckel, A., Ritter, A., Qualmann, B., Kessels, M.M., 2007. Regulation of N-WASP and the Arp2/3 complex by Abp1 controls neuronal morphology. *PloS one* 2(5): e400.
- Pries, A.R., 1988. A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *International Journal of Microcirculation, Clinical and Experimental* 7(4): 327–345.
- Qu, A. & Leahy, D.J., 1996. The role of the divalent cation in the structure of the I domain from the CD11a/CD18 integrin. *Structure* 4(8): 931–942.

- Rao, N., Ghosh, A.K., Douillard, P., Andoniou, C.E., Zhou, P., Band, H., 2002. An essential role of ubiquitination in Cbl-mediated negative regulation of the Src-family kinase Fyn. *Signal Transduction* 2(1-2): 29–39.
- Rot, A. & von Andrian, U.H., 2004. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annual Review of Immunology* 22: 891–928.
- Ryckman, C., Vandal, K., Rouleau, P., Talbot, M., Tessier, P.A., 2003. Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *Journal of Immunology* 170(6): 3233–3242.
- Sada, K., Takano, T., Yanagi, S., Yamamura, H., 2001. Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase. *Journal of Biochemistry* 130(2): 177–186.
- Sambrook, J., & Russell, D. W., 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Scaffidi, P., Misteli, T., Bianchi, M.E., 2002. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 418(6894): 191–195.
- Schenkel, A.R., Mamdouh, Z., Muller, W.A., 2004. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nature Immunology* 5(4): 393–400.
- Schymeinsky, J., Gerstl, R., Mannigel, I., Niedung, K., Frommhold, D., Panthel, K., Heesemann, J., Sixt, M., Quast, T., Kolanus, W., Mocsai, A., Wienands, J., Sperandio, M., Walzog, B., 2009. A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo. *Blood* 114(19): 4209–4220.
- Schymeinsky, J., Sindrilaru, A., Frommhold, D., Sperandio, M., Gerstl, R., Then, C., Mócsai, A., Scharffetter-Kochanek, K., Walzog, B., 2006. The Vav binding site of the non-receptor tyrosine kinase Syk at Tyr 348 is critical for beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated neutrophil migration. *Blood* 108(12): 3919–3927.
- Schymeinsky, J., Mócsai, A., Walzog, B., 2007a. Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thrombosis and Haemostasis* 98(2): 262–273.
- Schymeinsky, J., Sperandio, M., Walzog, B., 2011. The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology. *Trends in Cell Biology* 21(4): 247–55.
- Schymeinsky, J., Then, C., Walzog, B., 2005. The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. *Journal of Cellular Physiology* 204(2): 614–622.

- Schymeinsky, J., Then, C., Sindrilaru, A., Gerstl, R., Jakus, Z., Tybulewicz, V.L., Scharffetter-Kochanek, K., Walzog, B., 2007b. Syk-mediated translocation of PI3Kdelta to the leading edge controls lamellipodium formation and migration of leukocytes. *PLoS one* 2(11): e1132.
- Segel, G.B., Halterman, M.W., Lichtman, M.A., 2011. The paradox of the neutrophil's role in tissue injury. *Journal of Leukocyte Biology* 89(3): 359–372.
- Semmrich, M., Smith, A., Feterowski, C., Beer, S., Engelhardt, B., Busch, D.H., Bartsch, B., Laschinger, M., Hogg, N., Pfeffer, K., Holzmann, B., 2005. Importance of integrin LFA-1 deactivation for the generation of immune responses. *The Journal of Experimental Medicine* 201(12): 1987–1998.
- Serhan, C.N., 2007. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual Review of Immunology* 25: 101–137.
- Shi, Y., Tohyama, Y., Kadono, T., He, J., Miah, S.M.S., Hazama, R., Tanaka, C., Tohyama, K., Yamamura, H., 2006. Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. *Blood* 107(11): 4554–4562.
- Shimaoka, M., Lu, C., Palframan, R.T., von Andrian, U.H., McCormack, A., Takagi, J., Springer, T.A., 2001. Reversibly locking a protein fold in an active conformation with a disulfide bond: integrin alphaL I domains with high affinity and antagonist activity in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11): 6009–6014.
- Silvestre-Roig, C., Braster, Q., Wichapong, K., Lee, E.Y., Teulon, J.M., Berrebeh, N., Winter, J., Adrover, J.M., Santos, G.S., Froese, A., Lemnitzer, P., Ortega-Gómez, A., Chevre, R., Marschner, J., Schumski, A., Winter, C., Perez-Olivares, L., Pan, C., Paulin, N., Schoufour, T., Hartwig, H., González-Ramos, S., Kamp, F., Megens, R.T.A., Mowen, K.A., Gunzer, M., Maegdefessel, L., Hackeng, T., Lutgens, E., Daemen, M., von Blume, J., Anders, H.J., Nikolaev, V.O., Pellequer, J.L., Weber, C., Hidalgo, A., Nicolaes, G.A.F., Wong, G.C.L., Soehnlein, O., 2019. Externalized histone H4 orchestrates chronic inflammation by inducing lytic cell death. *Nature* 569(7755):236-240.
- Smith, A., Stanley, P., Jones, K., Svensson, L., McDowall, A., Hogg, N., 2007. The role of the integrin LFA-1 in T-lymphocyte migration. *Immunological Reviews* 218: 135–146.
- Smith, M.L., Sperandio, M., Galkina, E.V., Ley, K., 2004. Autoperfused mouse flow chamber reveals synergistic neutrophil accumulation through P-selectin and E-selectin. *Journal of Leukocyte Biology* 76(5): 985–993.
- Sperandio, M., Pickard, J., Unnikrishnan, S., Acton, S.T., Ley, K., 2006. Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro. *Methods in Enzymology* 416: 346–371.
- Springer, T.A., 1997. Folding of the N-terminal, ligand-binding region of integrin alpha-subunits into a beta-propeller domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(1): 65–72.

- Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D., Bourne, H.R., 2003. Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *The Journal of Cell Biology* 160(3): 375-385.
- Stradal, T.E.B. & Scita, G., 2006. Protein complexes regulating Arp2/3-mediated actin assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 18(1): 4-10.
- Swat, W., & Fujikawa, K., 2005. The Vav family: at the crossroads of signaling pathways. *Immunologic Research* 32(1-3): 259-265.
- Tan, S.M., 2012. The leucocyte $\beta 2$ (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. *Bioscience Reports* 32(3): 241-269.
- Turner, M., Mee, P. J., Costello, P. S., Williams, O., Price, A. A., Duddy, L. P., Furlong, M. T., Geahlen, R.L., Tybulewicz, V.L., 1995. Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk. *Nature* 378(6554): 298-302.
- Tsunawaki, S., Sporn, M., Ding, A., Nathan, C., 1988. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334(6179): 260-262.
- Walzog, B., Jeblonski, F., Zakrzewicz, A., Gaehtgens, P., 1997. Beta2 integrins (CD11/CD18) promote apoptosis of human neutrophils. *FASEB Journal* 11(13): 1177-1186.
- Watson, R.W., Rotstein, O.D., Nathens, A.B., Parodo, J., Marshall, J.C., 1997. Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. *Journal of Immunology* 158(2): 945-953.
- Weiss, S.J., 1989. Tissue Destruction by Neutrophils. *New England Journal of Medicine* 320(6): 365-376.
- Whitlock, B.B., Gardai, S., Fadok, V., Bratton, D., Henson, P.M., 2000. Differential roles for alpha(M)beta(2) integrin clustering or activation in the control of apoptosis via regulation of akt and ERK survival mechanisms. *The Journal of Cell Biology* 151(6): 1305-1320.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Zhang, R., Joachimiak, A., Frech, M., Goodman, S.L., Arnaout, M.A., 2002. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 296(5565): 151-155.
- Xiong, J.P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D.L., Joachimiak, A., Goodman, S.L., Arnaout, M.A., 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* 294(5541): 339-345.
- Yan, S.R., Huang, M., Berton, G., 1997. Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *Journal of Immunology* 158(4): 1902-1910.

- Yanagi, S., Inatome, R., Takano, T., Yamamura, H., 2001. Syk expression and novel function in a wide variety of tissues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 288(3): 495-8.
- Zarbock, A. & Ley, K., 2008. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *The American Journal of Pathology* 172(1): 1-7.
- Zarbock, A. & Ley, K., 2011. Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 510(2): 112-119.
- Zarbock, A., Lowell, C.A., Ley, K., 2007. Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity* 26(6): 773-783.
- Zhu, J., Nathan, C., Jin, W., Sim, D., Ashcroft, G.S., Wahl, S.M., Lacomis, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wright, C.D., Ding, A., 2002. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell* 111(6): 867-878.
- Zigmond, S.H., 1977. Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors. *The Journal of Cell Biology* 75(2 Pt 1): 606-616.
- Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., Trono, D., 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nature Biotechnology* 15(9): 871-875.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Die Rekrutierungskaskade	6
Abbildung 2	Aufbau und Konformationen von β_2 -Integrinen.....	11
Abbildung 3	β_2 -Integrin-vermittelte Signalübertragung über Syk	16
Abbildung 4	Schematischer Aufbau von mAbp1.....	20
Abbildung 5	Die Abwesenheit von Syk beeinträchtigte Adhäsion und <i>Spreading</i> von PMN.	41
Abbildung 6	Die Abwesenheit von mAbp1 hatte keinen Effekt auf die Expression von Syk und die Oberflächenexpression, Hochregulierung und das Fibrinogenbindungsvermögen von Integrinen.	43
Abbildung 7	Das Fehlen von mAbp1 hatte keine Auswirkungen auf Adhäsion und <i>Spreading</i> von PMN unter statischen Bedingungen.....	45
Abbildung 8	Die Abwesenheit von mAbp1 beeinträchtigte die Adhäsion von PMN unter Flussbedingungen	48
Abbildung 9	Die Abwesenheit von mAbp1 beeinträchtigte das <i>Spreading</i> von PMN unter Flussbedingungen	51
Abbildung 10	mAbp1 ist wichtig für die Mac1-vermittelte Migration von isolierten PMN unter Flussbedingungen.....	53
Abbildung 11	mAbp1 beeinflusst das Migrationsverhalten von PMN unter Flussbedingungen	55

Abbildung 12	Die Herunterregulierung von mAbp1 mittels siRNA-Technik beeinflusst die mechanotaktische Migration von dHL-60-Zellen unter Flussbedingungen.....	56
Abbildung 13	Die Abwesenheit von mAbp1 hatte keinen Einfluss auf die chemotaktische Migration von PMN unter statischen Bedingungen.....	58
Abbildung 14	mAbp1 hatte einen positiven Effekt auf die Konformation mit hoher Affinität von β_2 -Integrinen.....	60

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle I	Hämodynamische Parameter in Venolen des TNF α stimulierten <i>M. cremaster</i>	46
Tabelle II	Hämodynamische Parameter in Venolen des fMLP stimulierten <i>M. cremaster</i>	50

8 Danksagung

Keine wissenschaftliche Arbeit entsteht ohne Hilfe. Dafür bedanke ich mich als erstes und besonders bei Frau Prof. Dr. Barbara Walzog für die Möglichkeit, diese interessante Arbeit durchzuführen, ihr Engagement bei der Betreuung der Arbeit durch zahlreiche Anregungen, Diskussion und nützliche Kritik und der Förderung meiner wissenschaftlichen Laufbahn.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Zahler für die Bereitschaft, die Aufgabe des Gutachters und Vertreters an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität München zu übernehmen.

Vielen herzlichen Dank an Herrn PD Dr. Jürgen Schymeinsky für die großartige Betreuung meiner Arbeit, die Unterstützung und ständige Diskussionsbereitschaft und an Frau Katy Niedung für die hervorragende technische Unterstützung bei Experimenten und im Labor.

Ein großes Dankeschön geht an alle jetzigen und ehemaligen Mitarbeiter der AG Prof. Walzog für ihre Hilfsbereitschaft und die herzliche Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich Dr. med. Ludwig Weckbach für die Unterstützung bei den *in vivo* Experimenten danken.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Markus Sperandio (Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, LMU, München) und Herrn Dr. David Frommhold (Institut für Neonatologie, Kinder- und Jugendmedizinzentrum, Universität von Heidelberg) inklusive ihrer Arbeitsgruppen für die Kooperation bei den *in vivo* Experimenten.

Für die finanzielle Förderung dieser Arbeit über das Projekt Wa1048/2-3 möchte ich die Deutsche Forschungsgemeinschaft dankend erwähnen.

Mein herzlichster Dank gilt meinem Ehemann Felix für die Unterstützung, den Zuspruch und den Halt, der immer und verlässlich da war.

9 Anhang

9.1 Publikationen

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit wurde publiziert in *The Journal of Immunology*:

Hepper, I., Schymeinsky, J., Weckbach, L.T., Jakob, S.M., Frommhold, D., Sixt, M., Lashinger, M., Sperandio, M., Walzog, B., 2012. The Mammalian Actin-Binding Protein 1 Is Critical for Spreading and Intraluminal Crawling of Neutrophils under Flow Conditions. *The Journal of Immunology*, 188(9):4590–4601.

in *Blood*:

Schymeinsky, J., Gerstl, R., **Mannigel, I.**, Niedung, K., Frommhold, D., Panthel, K., Heesemann, J., Sixt, M., Quast, T., Kolanus, W., Mócsai, A., Wienands, J., Sperandio, M., Walzog, B., 2009. A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo. *Blood*, 114(19):4209-20.

und in *BMC Immunology*:

Frommhold, D., **Mannigel, I.**, Schymeinsky, J., Mócsai, A., Poeschl, J., Walzog, B., Sperandio, M., 2007. Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo. *BMC Immunology*, 8:31.

Weitere Publikationen

Souza-Almeida, G., D'Avila, H., Almeida, P.E., Luna-Gomes, T., Liechocki, S., Walzog, B., **Hepper, I.**, Castro-Faria-Neto, H.C., Bozza, P.T., Bandeira-Melo, C., Maya-Monteiro, C.M., 2018. Leptin Mediates In Vivo Neutrophil Migration: Involvement of Tumor Necrosis Factor-Alpha and CXCL1. *Frontiers in Immunology*, 9:111.

Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Brühl, M.L., Gärtner, F., Khandoga, A.G., Legate, K.R., Pless, R., **Hepper, I.**, Lauber, K., Walzog, B., Massberg, S., 2013. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nature Immunology*, 14(1):41-51.

Frommhold, D., Kamphues, A., **Hepper, I.**, Pruenster, M., Lukic, I.K., Socher, I., Zablot-skaya, V., Buschmann, K., Lange-Sperandio, B., Schymeinsky, J., Ryschich, E., Poeschl, J., Kupatt, C., Nawroth, P.P., Moser, M., Walzog, B., Bierhaus, A., Sperandio, M., 2010. RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood*, 116(5):841-9.

Mannigel, I., Stange, A., Zentgraf, H., Lindemann, D., 2007. Correct capsid assembly mediated by a conserved YXXLGL motif in prototype foamy virus Gag is essential for infectivity and reverse transcription of the viral genome. *Journal of Virology*, 81(7):3317-26.

Stange, A., **Mannigel, I.**, Peters, K., Heinkelein, M., Stanke, N., Cartellieri, M., Göttlinger, H., Rethwilm, A., Zentgraf, H., Lindemann, D., 2005. Characterization of prototype foamy virus gag late assembly domain motifs and their role in particle egress and infectivity. *Journal of Virology*, 79(9):5466-76.

Wissenschaftliche Präsentationen

- 04/2009 43rd Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation (ESCI)
Frankfurt am Main, Deutschland
Posterpräsentation
- 10/2009 Joint Meeting 2009 of the German Society for Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB) and the Swiss Society for Microcirculation (SSM)
Bern, Schweiz
Vortrag in der Young Investigator Award Session
- 10/2011 Joint Meeting 2011 of the European Society of Microcirculation (ESM) and the German Society of Microcirculation and Vascular Biology (GfMVB)
München, Deutschland
Posterpräsentation

9.2 Lebenslauf