

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Ehemaliger Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**Die Rolle von *Hematopoietic Progenitor Kinase 1*
(HPK1) für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten
im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion**

Kumulative Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sascha M. Jakob
aus Immenstadt i. Allgäu
2020



**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatlerin: Prof. Dr. rer. nat. Barbara Walzog

Mitberichterstatler: Prof. Dr. med. Christian Weber

Prof. Dr. med. Michael Weis

Prof. Dr. med. Michael S. Kasparek

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 30.01.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Die akute Entzündungsreaktion	5
3.2	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)	6
3.3	Die Rekrutierung von PMN	7
3.3.1	Capturing und Rollen	8
3.3.2	Aktivierung und Adhäsion	9
3.3.3	Adhesion Strengthening und Spreading	9
3.3.4	Crawling, Transmigration und Chemotaxis.....	10
3.4	β_2 -Integrine	10
3.4.1	Molekulare Eigenschaften von β_2 -Integrinen	11
3.4.2	Die Rolle von β_2 -Integrinen für die PMN-Rekrutierung	12
3.4.3	β_2 -Integrine als bidirektionale Signalmoleküle während der PMN-Rekrutierung	12
3.5	Fragestellung	15
4	Beitrag des Autors	18
4.1	Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response	18
4.2	The Mammalian Actin-Binding Protein 1 is Critical for Spreading and Intraluminal Crawling of Neutrophils under Flow Conditions.....	18
5	Veröffentlichungen	19
5.1	Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response	19
5.2	The Mammalian Actin-Binding Protein 1 is Critical for Spreading and Intraluminal Crawling of Neutrophils under Flow Conditions.....	19
6	Literaturverzeichnis	20
7	Abkürzungsverzeichnis	25
8	Danksagung	26
9	Wissenschaftliche Beiträge	28
9.1	Publikationsliste	28
9.2	Kongressbeiträge.....	28
10	Eidesstattliche Versicherung	29

1 Zusammenfassung

Während der akuten Entzündungsreaktion werden polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) aus dem Blutstrom in entzündetes Gewebe rekrutiert. Sie durchlaufen hierbei die sogenannte Rekrutierungskaskade, eine Abfolge genauestens regulierter Interaktionen mit dem Endothel, bestehend aus Rollen, Adhäsion, *Adhesion Strengthening*, *Spreading*, *Crawling* und Extravasation.¹ Dieser mehrstufige Prozess wurde auf zellulärer Ebene detailliert beschrieben, wobei die zugrunde liegenden molekularbiologischen Regulationsmechanismen der PMN-Rekrutierung Gegenstand aktueller Forschung sind. Bekannt ist, dass die meisten Rekrutierungsschritte von den β_2 -Integrinen (CD11/CD18) *Lymphocyte Function-Associated Antigen 1* (LFA-1, CD11a/CD18) und *Macrophage Receptor 1* (Mac-1, CD11b/CD18) abhängig sind. Diese auf PMN exprimierten heterodimeren Transmembranmoleküle leiten während der Rekrutierung sowohl adhäsive Kräfte als auch biochemische Signale über die Zellmembran ins Zellinnere und liegen je nach Aktivierungsgrad in vier unterschiedlichen Konformationen mit unterschiedlicher Ligandenaffinität vor.^{2,3} *Spleen Tyrosine Kinase* (Syk) wird nach Ligandenbindung von β_2 -Integrinen im Rahmen der PMN-Rekrutierung aktiviert und spielt eine zentrale Rolle für die meisten Rekrutierungsschritte.⁴ Syk selbst hat mehrere Substrate, deren Funktionen nur teilweise charakterisiert sind.⁵ Zu den Substraten von Syk gehört das Aktin-bindende Adaptorprotein *Mammalian Actin-Binding Protein 1* (Abp1).⁶ Abp1 stabilisiert die hoch-affine β_2 -Integrin-Konformation, die für die β_2 -Integrin-vermittelte Adhäsion von PMN unter Flussbedingungen wichtig ist.⁷ *Hematopoietic Progenitor Kinase 1* (HPK1), ein Interaktionspartner des Adaptorproteins Abp1, spielt eine Rolle bei der Affinitätsregulation von β_2 -Integrinen in B- und T-Zellen.⁸⁻¹⁰ Bisher wurde die funktionelle Bedeutung von HPK1 für die Rekrutierung von PMN nicht untersucht. Die übergeordnete Fragestellung dieser Arbeit besteht in der Charakterisierung der funktionellen Rolle von HPK1 im Rahmen der β_2 -Integrin-vermittelten Rekrutierung von PMN.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Interaktion von HPK1 mit Abp1 in PMN zu überprüfen, den Effekt von HPK1 auf die Affinitätsregulation von β_2 -Integrinen zu untersuchen und die funktionelle Rolle von HPK1 für die PMN-Rekrutierung zu charakterisieren. Es konnte durch Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit *Neutrophil-Like Differentiated Human Promyelocytic Leukemia* (dHL-60) Zellen gezeigt werden, dass Abp1 konstitutiv mit HPK1 interagiert. Konfokalmikroskopische Analysen von dHL-60 Zellen zeigten eine β_2 -Integrin-vermittelte Anreicherung von HPK1 im Lamellipodium, wo eine Ko-Lokalisation von HPK1 mit Abp1 und Aktin bestand. Durchflusszytometrie mit isolierten PMN aus HPK1^{+/+} und HPK1^{-/-} Mäusen zeigte vergleichbare Oberflächenexpressionen von LFA-1 und Mac-1. Die Induktion von hoch-affinem LFA-1 durch *Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1* (CXCL1) war von HPK1 abhängig, wobei die Affinitätsregulation von Mac-1 unabhängig von HPK1 war. Dementsprechend war die LFA-1-vermittelte Induktion der Adhäsion isolierter HPK1^{-/-} PMN

in Flusskammerexperimenten im Vergleich zu HPK1^{+/+} PMN reduziert. Des Weiteren zeigten HPK1^{-/-} PMN in Flusskammern vermindertes *Spreading* sowie ein defektes *Adhesion Strengthening*. Der Adhäsionsdefekt von HPK1^{-/-} PMN bestätigte sich intravitalmikroskopisch am Entzündungsmodell im *M. cremaster in vivo*. In weiteren Experimenten wurde intravitalmikroskopisch sowie *in vitro* mit Flusskammern gezeigt, dass die Migration von HPK1^{-/-} PMN unter Fluss gestört war. Histologische Untersuchungen des entzündeten *M. cremaster* zeigten eine deutlich verminderte Rekrutierung von Leukozyten ins Gewebe bei HPK1^{-/-} Mäusen im Vergleich zu HPK1^{+/+} Mäusen.

In weiterführenden Untersuchungen konnte durch den Autor gezeigt werden, dass die Interaktion des Adaptorproteins Abp1 mit Aktin in dHL-60 Zellen durch β_2 -Integrin-vermittelte PMN-Adhäsion induziert werden konnte.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Adaptorprotein Abp1 in PMN konstitutiv mit HPK1 interagiert. Beide Proteine werden nach β_2 -Integrin-vermittelter Zellaktivierung im Lamellipodium angereichert, wo sie mit Aktin kolo-kalisieren. Zudem wird die Interaktion von Abp1 mit Aktin induziert. HPK1 hat einen positiv regulatorischen Effekt auf die Induktion der hoch-affinen LFA-1 Konformation, welche für die PMN-Adhäsion und weitere Rekrutierungsschritte notwendig ist. Hierbei spielt HPK1 eine funktionelle Rolle bei der Induktion der Adhäsion, beim *Spreading* sowie beim *Crawling* von PMN unter Flussbedingungen. Diese Ergebnisse zeigen somit die wichtige Bedeutung von HPK1 für die PMN-Rekrutierung im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion. Sie tragen zur weiteren Aufklärung der molekularen Regulationsmechanismen der PMN-Rekrutierung bei und können somit Grundlage zur Entwicklung zielgerichteter und selektiver anti-inflammatorischer Therapeutika sein.

2 Summary

During acute inflammation, polymorphonuclear neutrophils (PMN) are recruited from the blood stream to inflamed tissue. Hereby, PMN follow a so-called recruitment cascade, a sequence of precisely regulated interactions with the endothelium, consisting of rolling, adhesion, adhesion strengthening, spreading, crawling and extravasation.¹ This multistep process has been described in detail on a cellular level, while the underlying molecular mechanisms of PMN recruitment are subject of current research. It is known that most recruitment steps depend on the β_2 integrins (CD11/CD18) *Lymphocyte Function-Associated Antigen 1* (LFA-1, CD11a/CD18) and *Macrophage Receptor 1* (Mac-1, CD11b/CD18). These heterodimeric transmembrane molecules expressed on PMN mediate adhesive forces as well as biochemical signals during recruitment and exist in four different conformations with distinct ligand affinities depending on their activation level.^{2,3} *Spleen Tyrosine Kinase* (Syk) is activated upon ligand binding of β_2 integrins during PMN recruitment and is crucial for most recruitment steps.⁴ Syk itself has several substrates with only partially characterized functions.⁵ One of the substrates of Syk is the actin-binding adaptor protein *Mammalian Actin-Binding Protein 1* (Abp1).⁶ Recently it was shown that Abp1 is important for β_2 integrin-mediated PMN adhesion under flow conditions.⁷ Here, stable adhesion under flow requires the high-affinity β_2 integrin conformation, which is reinforced by Abp1.⁷ *Hematopoietic Progenitor Kinase 1* (HPK1), an interacting protein of the adaptor protein Abp1, is involved in the affinity regulation of β_2 integrins in B- and T-cells.⁸⁻¹⁰ So far, the functional relevance of HPK1 for PMN recruitment has not been analyzed. Therefore, the overall aim of this thesis project consists in the characterization of the functional role of HPK1 during β_2 integrin-mediated PMN recruitment.

In detail, this thesis project was aimed at the verification of the interaction of HPK1 and Abp1 in PMN, at the analysis of the effect of HPK1 on affinity regulation of β_2 integrins and at the characterization of the functional role of HPK1 for PMN recruitment. Co-immunoprecipitation experiments with *Neutrophil-Like Differentiated Human Promyelocytic Leukemia* (dHL-60) cells showed that Abp1 constitutively interacted with HPK1. Confocal microscopy of dHL-60 cells revealed a β_2 integrin-mediated enrichment of HPK1 at the lamellipodium where HPK1 co-localized with Abp1 and actin. Flow cytometry using isolated PMN from HPK1^{+/+} and HPK1^{-/-} mice showed similar surface expression levels of LFA-1 and Mac-1. The induction of high-affinity LFA-1 by *Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 1* (CXCL1) was dependent on HPK1, whereas affinity regulation of Mac-1 was independent of HPK1. Accordingly, LFA-1-mediated induction of adhesion of isolated HPK1^{-/-} PMN was reduced in flow chamber experiments compared to HPK1^{+/+} PMN. Moreover, HPK1^{-/-} PMN showed reduced spreading and defective adhesion strengthening in flow chambers. The adhesion defect of HPK1^{-/-} PMN was confirmed *in vivo* by means of intravital microscopy of the inflamed *M. cremaster*. In further experiments, using intravital microscopy as well as *in vitro* flow chambers, it was

shown that crawling of HPK1^{-/-} PMN under flow was disturbed. Histological analysis of the inflamed *M. cremaster* showed markedly decreased leukocyte recruitment to the tissue in HPK1^{-/-} mice compared to HPK1^{+/+} animals.

In further experiments it could be shown by the author that the interaction of the adaptor protein Abp1 with actin was induced upon β_2 integrin-mediated PMN adhesion in dHL-60 cells.

In summary, this study shows that the adaptor protein Abp1 constitutively interacts with HPK1 in PMN. Upon β_2 integrin-mediated cell activation, both proteins are enriched at the lamellipodium co-localizing with actin. Further, the interaction between Abp1 and actin is induced. HPK1 has a positive regulatory effect on the induction of the high-affinity LFA-1 conformation, which is necessary for PMN adhesion and further recruitment steps. HPK1 plays a functional role for the induction of adhesion, spreading and crawling of PMN under flow conditions. These results characterize the important role of HPK1 for PMN recruitment during acute inflammation. The identification of the molecular mechanisms of PMN recruitment may represent the basis for the development of novel and selective anti-inflammatory therapies.

3 Einleitung

Das Überleben des menschlichen Organismus setzt die Möglichkeit voraus, eingedrungene Mikroorganismen und schädliche Noxen, aber auch bereits geschädigte körpereigene Zellen effektiv eliminieren zu können.¹¹ Dies gewährleistet die akute Entzündungsreaktion, die Leukozyten und Plasmaproteine, welche im Blut zirkulieren, an den Herd der Entzündung rekrutiert, so dass geschädigte Zellen sowie die Ursache der Zellschädigung beseitigt und ein Reparaturprozess eingeleitet werden können.^{11,12} Diese in erster Linie protektive physiologische Reaktion des Organismus bedarf jedoch einer präzisen zeitlichen, räumlichen und quantitativen Koordination, da eine unkontrollierte Entzündung zu Gewebeschädigung führen kann.¹² Im Folgenden soll ein Überblick über die Rekrutierung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion gegeben werden. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der Rekrutierung von PMN sind Gegenstand aktueller Forschung. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass *Hematopoietic Progenitor Kinase 1* (HPK1) eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von PMN bei der akuten Entzündungsreaktion spielt.

3.1 Die akute Entzündungsreaktion

Man unterscheidet die akute und die chronische Form der Entzündung. Während die chronische Entzündung über Jahre aktiv sein kann, ist die akute Entzündungsreaktion durch einen in der Regel auf wenige Tage begrenzten Verlauf und die überwiegende Rekrutierung von PMN gekennzeichnet.¹¹ Verschiedene schädigende Reize können zur Entstehung einer akuten Entzündungsreaktion führen.^{11,12} Hierzu gehören in erster Linie biologische Noxen aufgrund von Infektionen, beispielsweise durch Bakterien, Pilze, Viren oder Parasiten. Zudem kann eine Entzündung durch Gewebenekrose, Fremdkörper oder Hypersensitivitätsreaktionen ausgelöst werden. Nekrosen entstehen beispielsweise aufgrund physikalischer Noxen wie Verletzungen, chemischer Noxen oder durch Ischämie. Die initiale Erkennung von Infektionen oder Nekrosen erfolgt hauptsächlich durch im Gewebe ansässige Makrophagen, Dendritische Zellen und Mastzellen, welche daraufhin eine Reihe verschiedener Entzündungsmediatoren sezernieren.^{11,13} Zusätzlich setzen nekrotische Zellen sogenannte *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs) frei.¹⁴ Diese freigesetzten Mediatoren verursachen sowohl eine vaskuläre als auch eine leukozytäre Antwort. Es kommt zu lokaler Vasodilatation und Permeabilitätserhöhung des Endothels sowie zur Rekrutierung von PMN an den Entzündungsherd.¹¹

Schon vor circa 2000 Jahren wurden die fünf Kardinalsymptome der Entzündung – Überwärmung (*calor*), Rötung (*rubor*), Schwellung (*tumor*), Schmerz (*dolor*) und Funktionseinschränkung (*functio laesa*) – in Teilen von Celsus beschrieben und etwas später durch Galen ergänzt.¹⁵ Heute lässt sich nachvollziehen, dass Überwärmung und Rötung durch eine

lokale Hyperämie im Zuge der Vasodilatation im entzündeten Gewebe hervorgerufen werden.¹⁶ Die Permeabilitätserhöhung des Endothels wiederum führt zur Ausbildung eines Entzündungsexudats und zur ödematösen Schwellung des Gewebes.¹⁶ Schmerz und Funktionseinschränkung werden unter anderem durch die Ausbildung des Ödems sowie durch freigesetzte Entzündungsmediatoren verursacht.¹⁶

3.2 Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)

Im Jahr 1880 beschrieb Paul Ehrlich anhand morphologischer Kriterien erstmals eine Untergruppe von Leukozyten, die durch „polymorphe Kernfiguren“ und zytoplasmatische „Granulationen“ gekennzeichnet waren.¹⁷ Diese mittlerweile als Granulozyten bezeichnete Leukozytenfamilie unterteilte er anhand unterschiedlicher Färbereigenschaften in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten.¹⁷ Polymorphkernige neutrophile Granulozyten, auch „*Neutrophile*“ genannt, sind heute als wichtige Säule der angeborenen zellulären Immunantwort wohlbekannt.^{18,19} Täglich werden etwa $1 - 2 \times 10^{11}$ PMN im Knochenmark eines Erwachsenen produziert.²⁰ Die 7 – 10 µm messenden terminal ausdifferenzierten PMN verharren für vier bis sechs Tage im Knochenmark bevor sie in den Blutkreislauf eintreten, wo sie mit etwa 50 – 70% die größte Fraktion der Leukozyten ausmachen.^{18,21,22} Im Falle einer Infektion kann die Knochenmarkreserve, bestehend aus etwa 6×10^{11} PMN, schnell mobilisiert werden.²³

Als zentrale Effektorzellen der angeborenen Immunität bilden PMN die erste Abwehrlinie gegen eingedrungene Pathogene.²⁴ Im Fall einer akuten lokalen Entzündungsreaktion werden PMN aus nahegelegenen Gefäßen ins Gewebe rekrutiert und migrieren dann chemotaktisch entlang eines Gradienten aus löslichen Chemokinen zum Entzündungsherd.^{25,26} Zur Abtötung von dort befindlichen Pathogenen verfügen PMN prinzipiell über drei Mechanismen. Hierzu zählen die Degranulation von antimikrobiellen Proteinen und Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen sowie die Phagozytose und die Ausbildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs).²⁷⁻³⁰ Nach der Bekämpfung lokaler Infektionen leiten PMN im Gewebe schließlich ihre Apoptose ein und werden von Makrophagen beseitigt.^{31,32} Dies ist für die effiziente Limitierung der Entzündungsreaktion von Bedeutung.³²

Die Lebensdauer eines sich in der Zirkulation befindlichen PMN, welcher nicht an einer Entzündungsreaktion teilnimmt, beträgt weniger als einen Tag.³³ Die 2010 berichtete Langlebigkeit von fünf Tagen³⁴ wurde von mehreren Arbeitsgruppen als methodische Überschätzung eingestuft.^{33,35,36} Jedoch können Zytokine, Wachstumsfaktoren und auch bakterielle Faktoren die Lebenszeit aktivierter PMN während einer Entzündung auf das Vielfache verlängern.^{23,37-39} Alternde PMN leiten auch ohne vorherige Extravasation konstitutiv die Apoptose ein und werden in Knochenmark, Milz und Leber von Makrophagen beseitigt.⁴⁰⁻⁴³

Lange Zeit wurden PMN als primitive unspezifische Phagozyten angesehen, während ihnen heute neben ihrer Schlüsselrolle bei der Abwehr von Bakterien und Pilzen und der Ausbildung der akuten Entzündungsreaktion weitere hochkomplexe Funktionen zugeschrieben werden.⁴⁴ So sind PMN beispielsweise am Wundheilungsprozess beteiligt, sie regulieren Antworten des adaptiven Immunsystems und sie spielen eine Rolle bei der Beendigung der Entzündungsreaktion.^{18,24} Aus pathophysiologischer Sicht sind PMN an der Entstehung verschiedener Krankheiten beteiligt. Hierzu gehören inflammatorische Erkrankungen wie Chronisch Obstruktive Lungenerkrankung (COPD) oder Rheumatoide Arthritis, bei denen es durch eine überschießende Rekrutierung von PMN zur Ausbildung einer chronischen Entzündung kommt.²⁷ Neben weiteren Autoimmunerkrankungen und auch onkologischen Erkrankungen spielen PMN neueren Erkenntnissen zufolge auch eine Rolle bei der Entstehung von Allergien, Anaphylaxie, Diabetes, Arteriosklerose und Thrombosen und bei der Tumormetastasierung.⁴⁴⁻⁴⁷

3.3 Die Rekrutierung von PMN

Bei Kontakt mit entzündetem Endothel werden PMN durch eine Reihe molekularer Mechanismen aktiviert und verlassen schließlich das Blutgefäß an umschriebenen Stellen, von wo aus sie zum Entzündungsherd migrieren.¹ Diese Rekrutierung von PMN aus dem Blutstrom ins Gewebe folgt einem charakteristischen Mehrstufenmodell, das als Rekrutierungskaskade bezeichnet wird und bevorzugt in postkapillären Venolen stattfindet.¹ Die sequentiellen Rekrutierungsschritte beinhalten *Capturing*, Rollen, Adhäsion, *Adhesion Strengthening / Spreading*, *(Intraluminal) Crawling*, Transmigration und *Abluminal Crawling* (Abbildung 1).^{1,48}

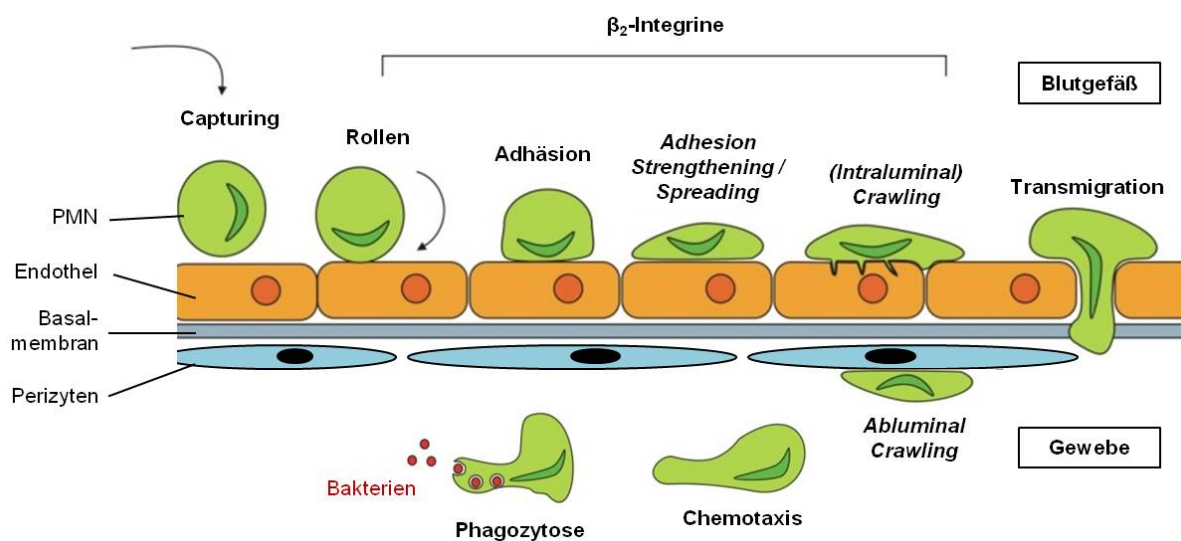


Abbildung 1: Rekrutierungskaskade der PMN auf dem Weg vom Blutgefäß in das Gewebe während der akuten Entzündungsreaktion (modifiziert nach Schymeinsky et al., 2011).⁴⁹

Die akute Entzündungsreaktion wird eingeleitet, wenn im Gewebe ansässige Immunzellen Entzündungsmediatoren freisetzen, nachdem sie durch biochemische Signale Pathogene oder Nekrosen im umliegenden Gewebe wahrgenommen haben.¹¹⁻¹³ Wichtige Vertreter dieser freigesetzten proinflammatorischen Mediatoren sind neben vasoaktiven Substanzen wie Histamin vor allem inflammatorische Zytokine wie *Tumor-Necrosis Factor- α* (TNF- α) oder Interleukin-1 (IL-1) und verschiedene Chemokine.¹¹⁻¹³ Spezifische Rezeptoren der Endothelzellen erkennen vasoaktive Substanzen und Zytokine, was zur Aktivierung des Endothels führt.¹⁶ Das aktivierte Endothel exprimiert daraufhin auf der luminalen Zelloberfläche verschiedene Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, E-Selektin, *Intercellular Adhesion Molecule-1* (ICAM-1) und *Vascular Cell-Adhesion Molecule 1* (VCAM1).¹⁶ Zudem werden auch Chemokine wie *Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 8* (CXCL8, auch IL-8, entsprechend CXCL1 in Mäusen), welche entweder vom Endothel selbst synthetisiert werden oder von anderen Zellen stammen, luminal präsentiert (Abbildung 2).^{11,16,18,50,51} Diese endotheliale Aktivierung ist Voraussetzung für den effektiven Ablauf der PMN-Rekrutierung.

3.3.1 *Capturing* und Rollen

Am Beginn der Rekrutierungskaskade steht das sogenannte *Capturing*, das initiale Abfangen im Blut zirkulierender PMN durch das aktivierte Endothel.¹ Ein wichtiger Mechanismus ist hierbei die als Margination bezeichnete Akkumulation von Leukozyten in der Peripherie des laminaren Blutstroms.^{1,11} Sobald PMN in Kontakt mit aktiviertem Endothel treten, können sie über transiente Bindungen oberflächlich exprimierter Moleküle auf den Endothelzellen entlang rollen, wobei sie passiv vom Blutstrom angetrieben werden (Abbildung 2).¹ Es wird zwischen dem anfänglich schnellen und dem darauffolgenden langsamen Rollen unterschieden.¹ Das schnelle Rollen (ca. 40 $\mu\text{m/s}$) wird durch Selektine vermittelt, eine Proteinfamilie bestehend aus drei Adhäsionsmolekülen.^{11,52,53} P-Selektin wird von Thrombozyten und von Endothelzellen exprimiert.^{11,52} E-Selektin wird nach Induktion der Transkription durch TNF- α oder IL-1 ebenfalls von aktivierten Endothelzellen präsentiert.^{11,16,52} L-Selektin hingegen wird von den meisten Leukozyten exprimiert und trägt zum sekundären *Capturing* zirkulierender PMN durch bereits adhärenente PMN bei.^{1,52,54,55} Als Ligand für alle Selektine spielt *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1* (PSGL-1) eine zentrale Rolle, welches auf den meisten Leukozyten und bestimmten Endothelzellen exprimiert ist.^{1,52,54} Für langsames Rollen (ca. 5 $\mu\text{m/s}$) sowie die darauffolgenden Rekrutierungsschritte bedarf es weiterer Adhäsionsmoleküle aus der Familie der β_2 -Integrine, welche auf PMN exprimiert werden.⁵³ Von besonderer Bedeutung sind die β_2 -Integrine *Lymphocyte Function-Associated Antigen 1* (LFA-1) und *Macrophage Receptor 1* (Mac-1).⁵⁶ β_2 -Integrine existieren in vier verschiedenen Konformationszuständen, welche die Affinität zu ihren Liganden beeinflussen.^{2,3} Durch die Bindung von PSGL-1 an E- oder P-Selektin kommt es während des Rollens zu einer partiellen Aktivierung der β_2 -Integrine mittels *Inside-Out-Signaling* und

damit zu einer Affinitätssteigerung von der niedrig-affinen Konformation zu der intermediär-affinen Konformation von LFA-1.⁵⁷⁻⁶⁰ Intermediär-affines LFA-1 kann nun transiente Bindungen mit ICAM-1, einem auf aktivierten Endothelzellen exprimierten Liganden, eingehen und dadurch verlangsamtes Rollen vermitteln.¹

3.3.2 Aktivierung und Adhäsion

Die Aktivierung von PMN während des Rollens erfolgt jedoch nicht allein durch die Bindung von PSGL-1 an endotheliale Selektine, sondern insbesondere auch durch Chemokine.¹ Einige Chemokine wie CXCL1 werden, gebunden an Glykosaminoglykane, auf der luminalen Zelloberfläche von aktivierten Endothelzellen präsentiert, wo sie von rollenden PMN mittels spezifischer Chemokinrezeptoren, wie *CXC Chemokine Receptor 2* (CXCR2), erkannt werden können.^{1,60-62} Hierbei handelt es sich um membranständige *G Protein-Coupled Receptors* (GPCR) auf PMN, welche bei Aktivierung ebenfalls durch *Inside-Out-Signaling* zu einer weiteren Konformationsänderung der β_2 -Integrine führen.^{1,60} LFA-1 wird dadurch in einen hoch-affinen Zustand versetzt, was dem Adhäsionsmolekül erlaubt, stabile Bindungen mit ICAM-1 einzugehen und somit die feste Adhäsion von aktivierten PMN auf dem entzündeten Endothel zu induzieren.^{1,60,63} Dieser sehr schnell ablaufende Prozess wird auch als *Arrest* im Sinne von Stillstand bezeichnet. Das β_2 -Integrin Mac-1 bindet ebenfalls an ICAM-1, spielt jedoch bei der Induktion der Adhäsion eine untergeordnete Rolle.⁶⁴

3.3.3 Adhesion Strengthening und Spreading

Nach dem initialen *Arrest* der PMN kommt es zum sogenannten *Adhesion Strengthening*.¹ Dieser Prozess ist im Hinblick auf die Rekrutierung von großer Bedeutung für adhärenente PMN, welche sonst durch die vom Blutstrom erzeugten Scherkräfte schnell wieder abgelöst werden würden.⁶⁵ Das *Adhesion Strengthening* wird durch die stabile Substratbindung von LFA-1 induziert, welches in diesem Fall nicht nur als Adhäsionsmolekül dient, sondern als Signalrezeptor im Rahmen des *Outside-In-Signaling* auch Informationen in die Zelle überträgt (Abbildung 3).^{1,53,63,66} In Folge dieser zusätzlichen β_2 -Integrin-vermittelten PMN-Aktivierung kommt es unter anderem zu einer Veränderung des Aktin-Zytoskeletts sowie zur Ausbildung von LFA-1-Clustern und dadurch zu einer Stabilisierung der Adhäsion.^{4,67-70} Außerdem führt die Reorganisation des Aktins zu einer Abflachung der PMN auf dem Endothel, was als *Spreading* bezeichnet wird.⁷¹ Dieser Vorgang führt dazu, dass sich einerseits die Kontaktfläche zwischen PMN und Endothelzelle vergrößert und sich andererseits die durch den Blutstrom erzeugte Schubspannung auf PMN verringert.¹ Zusätzlich kommt es während des β_2 -Integrin-vermittelten *Spreadings* zur Polarisierung der PMN unter Ausbildung eines Lamellipodiums und eines Uropods.⁷²

3.3.4 *Crawling*, Transmigration und Chemotaxis

Im weiteren Verlauf der Rekrutierung migrieren polarisierte PMN aktiv auf der Oberfläche des Endothels zu geeigneten Stellen für die nachfolgend stattfindende Transmigration.⁷³ Da dieses (*Intraluminal*) *Crawling* im Blutstrom erfolgt, wird es auch als *Mechanotactic Crawling* bezeichnet.⁷⁴ Das *Crawling* wird hauptsächlich durch Interaktionen von Mac-1 und endotheliale ICAM-1 vermittelt.⁷³ Hoch-affines LFA-1 scheint zudem für die Erkennung der Blutflussrichtung und damit für die Richtungsgebung der Migration eine wichtige Rolle zu spielen.⁷⁵ Die Transmigration von PMN durch die endotheliale Barriere der venösen Gefäßwand kann trans- oder parazellulär erfolgen, wobei die parazelluläre Route von PMN bevorzugt wird.^{73,76} Neben den β_2 -Integrinen LFA-1 und Mac-1 spielt das β_1 -Integrin *Very Late Antigen-4* (VLA-4) eine wichtige Rolle bei der Transmigration.¹⁸ Anschließend durchwandern PMN die Basalmembran und begeben sich durch interstitielle chemotaktische Migration zum Herd der Entzündung.⁷⁷ Es wurde beobachtet, dass PMN β_2 -Integrin-vermittelt entlang des Perizytennetzwerks umliegender Gefäße das Gewebe schnell und direkt durchwandern können, was als *Abluminal Crawling* bezeichnet wird.⁴⁸ Bei der Chemotaxis folgen PMN einem Konzentrationsgradienten aus Chemokinen, wie beispielsweise dem bakteriellen Abbauprodukt N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP).²⁵ Neuere Untersuchungen zeigen, dass insbesondere immobilisierte Chemokingradienten haptotaktisch die Migration von Leukozyten im Gewebe steuern.⁷⁷ Die Migration im dreidimensionalen Gewebe kann im Gegensatz zum zweidimensionalen *Crawling* unter Fluss unabhängig von β_2 -Integrinen erfolgen.⁷⁸

3.4 β_2 -Integrine

Die Integrin-Rezeptor-Familie ist eine Gruppe aus heterodimeren Transmembranmolekülen, die jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammengesetzt sind.⁷⁹ Bekannt sind 8 β - und 18 α -Untereinheiten, die sich zu insgesamt 24 verschiedenen Integrinen mit spezifischen, nicht-redundanten Funktionen zusammen setzen.⁷⁹ Integrine sind insbesondere beteiligt an Zelladhäsionen durch Interaktionen mit Liganden der extrazellulären Matrix oder mit Rezeptoren benachbarter Zellen.⁷⁹ Außerdem dienen Integrine als bidirektionale Signalrezeptoren und können sowohl als Rezeptor wie auch als Effektor Signale über die Zellmembran leiten.⁷⁹ Diese Signale wiederum beeinflussen wichtige zelluläre Prozesse wie beispielsweise Proliferation, Apoptose, Polarisierung, Differenzierung und Genexpression.⁷⁹ Die Untergruppe der β_2 -Integrine nimmt bei der Rekrutierung von PMN eine zentrale Rolle ein.^{80,81}

3.4.1 Molekulare Eigenschaften von β_2 -Integrinen

Die Gruppe der β_2 -Integrine wird spezifisch von Leukozyten exprimiert und umfasst vier Moleküle.⁸² Sie setzen sich jeweils aus der gemeinsamen β -Untereinheit *Cluster Of Differentiation* 18 (CD18) und einer von vier verschiedenen α -Untereinheiten (CD11a, CD11b, CD11c, CD11d) über nicht-kovalente Bindungen zusammen. Die vier verschiedenen β_2 -Integrine werden als LFA-1 (CD11a/CD18; $\alpha_L\beta_2$ -Integrin), Mac-1 (CD11b/CD18; $\alpha_M\beta_2$ -Integrin), p150,95 (CD11c/CD18, $\alpha_X\beta_2$ -Integrin) und $\alpha_D\beta_2$ -Integrin (CD11d/CD18) bezeichnet.³ Die β_2 -Integrin-Expression auf PMN beschränkt sich fast ausschließlich auf LFA-1 und Mac-1, weshalb die β_2 -Integrine CD11c/CD18 und CD11d/CD18 im Folgenden nicht weiter berücksichtigt werden.⁸² Die Oberflächenexpression von LFA-1 auf PMN ist konstant, wobei die Mac-1-Expression kurzfristig durch PMN-Aktivierung erhöht werden kann, indem sekretorische Vesikel in die Zellmembran integriert werden.⁸³ Die Untereinheiten der β_2 -Integrine besitzen je eine kurze zytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne und eine große extrazelluläre Domäne (Abbildung 2). Die N-terminalen Enden der extrazellulären Domänen der beiden Untereinheiten bilden den sogenannten Kopfteil des Integrins.⁸² Hier befindet sich innerhalb der α -Untereinheit auch die I-Domäne mit der *Metal-Ion-Dependent Adhesion Site* (MIDAS), welche die einzige Bindungsstelle für Liganden darstellt und zur Ligandenbindung auf die Anwesenheit bivalenter Kationen angewiesen ist.⁸² Die kurzen intrazellulären Domänen verfügen über multiple Bindungsstellen für Adapter- und Signalmoleküle und können so mit dem Zytoskelett interagieren.^{82,84} Es sind sechs Liganden von LFA-1 bekannt, welche vor allem von Endothelzellen exprimiert werden: ICAMs 1 – 5 und *Junctional Adhesion Molecule-1* (JAM-1).⁸² Mac-1 dagegen ist deutlich unspezifischer und bindet eine Reihe unterschiedlicher Proteine wie Fibrinogen, ICAM-1 und andere Vertreter der ICAM-Familie, Gerinnungsfaktoren, Heparin, Kollagene, aktivierte Komplementproteine wie *Inactivated Complement Component 3b* (iC3b) und mikrobielle Saccharide.⁸²

Eine Besonderheit der β_2 -Integrine ist, dass sie in vier verschiedenen Konformationszuständen vorliegen können, welche wiederum mit unterschiedlich starken Ligandenaffinitäten einhergehen: Bei der niedrig-affinen (auch inaktiven) β_2 -Integrin-Konformation ist die extrazelluläre Domäne V-förmig abgeknickt, so dass der Kopfteil mit inaktiver MIDAS in Richtung der Zellmembran deutet.³ Beim Übergang in die intermediär-affine β_2 -Integrin-Konformation wird die extrazelluläre Domäne ähnlich einem Klappmesser gestreckt und die inaktive MIDAS dadurch von der Membran wegbewegt, was eine bessere Ligandenbindung ermöglicht.³ Beim Übergang in die hoch-affine β_2 -Integrin-Konformation kommt es neben der Streckung der extrazellulären Domäne zusätzlich auch zur Dissoziation der beiden Transmembrandomänen und zur Öffnung des Kopfteils, was eine Aktivierung der MIDAS und somit eine Affinitätserhöhung bewirkt.³ Während der PMN-Rekrutierung erlauben diese drei klassischen Integrin-Konformationen je nach Affinitätsgrad Bindungen mit der

endothelial präsentierten *trans*-Konfiguration von ICAM-1 einzugehen. Es wurde kürzlich eine vierte Integrin-Konformation beschrieben, bei welcher trotz abgeknickter Konfiguration der extrazellulären Domäne eine aktivierte MIDAS vorliegt.² LFA-1 und Mac-1 binden in dieser Konformation ICAM-1 in *cis*-Stellung, welches auf den PMN selbst exprimiert wird. Hierdurch wird die Adhäsion von PMN gehemmt, so dass eine Autoinhibition eintritt. Signale, die zur Konformationsänderung von β_2 -Integrinen führen, werden unter dem Begriff *Inside-Out-Signaling* zusammengefasst. Neueren Erkenntnissen zufolge nehmen auch die auf β_2 -Integrine ausgeübten mechanischen Kräfte Einfluss auf deren Konformation.⁸⁵

3.4.2 Die Rolle von β_2 -Integrinen für die PMN-Rekrutierung

β_2 -Integrine sind an der PMN-Rekrutierung maßgeblich beteiligt (Abbildung 1). *In vivo* Experimente mit CD18-defizienten Mäusen ohne Expression von β_2 -Integrinen zeigten eine deutlich verminderte Rekrutierung von PMN in die entzündete Bauchhöhle.⁸⁰ Ein Funktionsverlust der β_2 -Integrine führt auch beim Menschen zu drastischen Rekrutierungsproblemen, wie am Beispiel der autosomal-rezessiv vererbten Erkrankung *Leukocyte Adhesion Deficiency-I* (LAD-I) erkannt wurde. Bei LAD-I kommt es aufgrund einer Mutation im CD18-Gen (ITGB2) zur verminderten Expression von β_2 -Integrinen (bis zu <1% der normalen Expression).⁸⁶ Das klinische Ausmaß der Erkrankung korreliert dabei direkt mit der β_2 -Integrin-Expression und ist gekennzeichnet durch rezidivierende lebensbedrohliche bakterielle Infektionen sowie Wundheilungsstörungen.⁸⁷ Die Erkrankung führt unbehandelt zu einer erhöhten Mortalität in der Kindheit. Während akuten Entzündungsreaktionen beobachtet man bei LAD-I Patienten eine dramatische Leukozytose, es kommt jedoch nicht zur Rekrutierung der PMN ins Gewebe. Untersuchungen haben gezeigt, dass CD18-Defizienz zu gestörter Adhäsion und verminderter Extravasation von PMN führt. Offenbar kann dieser Funktionsverlust nicht durch andere Integrine kompensiert werden.

Bei den einzelnen Rekrutierungsschritten kommen LFA-1 und Mac-1 teils unterschiedliche Bedeutung zu. Adhäsion und *Spreading* sind vor allem durch LFA-1 vermittelt.¹⁸ Mehreren Untersuchungen zufolge wird *Crawling* über Mac-1 vermittelt, wobei LFA-1 insbesondere für die perpendikuläre Richtungsgebung unter Fluss wichtig ist.^{73,75} Insgesamt scheint die Rekrutierung vor allem durch LFA-1 vermittelt zu sein, wie Studien zeigten, bei denen Mac-1-defiziente PMN *in vivo* keine verminderte Rekrutierung in entzündete Gewebe aufwiesen.^{83,88}

3.4.3 β_2 -Integrine als bidirektionale Signalmoleküle während der PMN-Rekrutierung

β_2 -Integrine fungieren auf PMN als bidirektionale Signalmoleküle, welche biochemische Signale in zwei Richtungen über die Zellmembran leiten können.⁷⁰ Je nach Richtung der Signalübertragung wird das *Inside-Out-Signaling* vom *Outside-In-Signaling* unterschieden. Es muss jedoch davon ausgegangen werden, dass sich die komplexen Abläufe bei *Inside-*

Out-Signaling und *Outside-In-Signaling* zeitlich überschneiden und sich insbesondere bei späten Rekrutierungsschritten sogar gegenseitig beeinflussen.⁷⁰ Zudem kommt den übertragenen mechanischen Kräften zwischen β_2 -Integrinen und dem Zytoskelett beziehungsweise ihren extrazellulären Liganden eine regulatorische Rolle bei der Integrin-Aktivierung zu.^{89,90} Das LFA-1-vermittelte *Signaling* ist bisher am eingehendsten untersucht worden.

Beim *Inside-Out-Signaling* (Abbildung 2) führen intrazelluläre Signalereignisse zur Konformationsänderung und Affinitätssteigerung von β_2 -Integrinen, welche hier als Effektoren am Ende der Signalkaskade stehen.⁷⁰ Das *Inside-Out-Signaling* findet vor allem während des Rollens statt und kann wiederum über zwei Rezeptorfamilien getriggert werden: (1) Zum einen kommt es durch die Interaktion von PSGL-1 mit E- oder P-Selektin zur Aktivierung eines Signalwegs, der unter anderem die Kinase *Spleen Tyrosine Kinase* (Syk), Phospholipase (PL) C_{v2} und die GTPase *Ras-Related Protein 1* (Rap1) involviert und zur Bindung von Talin-1 an die zyttoplasmatische Domäne von CD18 führt, was wiederum darin resultiert, dass LFA-1 die intermediär-affine Konformation mit gestreckter extrazellulärer Domäne und inaktiver MIDAS einnimmt und transient mit ICAM-1 interagieren kann, um langsames Rollen zu vermitteln.^{60,91-93}

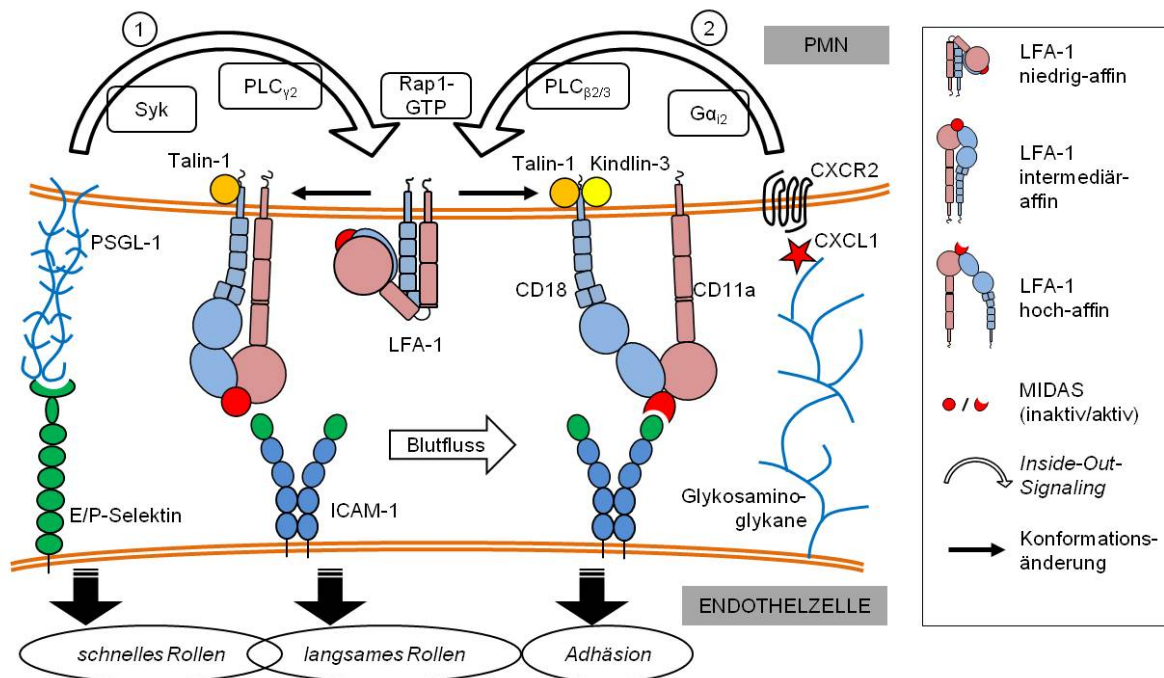


Abbildung 2: *Inside-Out-Signaling* über PSGL-1 (1) oder CXCR2 (2) führt zu Konformationsänderungen von LFA-1. Die Induktion von intermediär-affinem LFA-1 erlaubt transiente Bindungen zu endotheliale ICAM-1 und führt zu langsamem Rollen. Hoch-affines gestrecktes LFA-1 geht über die aktivierte MIDAS-Domäne stabile Bindungen zu ICAM-1 ein und vermittelt die PMN-Adhäsion (modifiziert nach Lefort et al., 2012).⁶⁰

(2) Zum anderen kommt es während des Rollens zur Aktivierung von GPCR wie CXCR2 durch endothelial präsentierte Chemokine wie CXCL1 und dadurch zur Aktivierung eines

Signalweges, welcher unter anderem über $G\alpha_{i2}$, $PLC_{\beta 2/3}$ und Rap1 zur Bindung von Talin-1 und Kindlin-3 an die zytoplasmatische Domäne von CD18 führt.^{60,91,94} Dies hat zur Folge, dass LFA-1 die hoch-affine Konformation mit gestreckter extrazellulärer Domäne und aktiver MIDAS einnimmt und über stabile Bindungen mit ICAM-1 die Adhäsion induziert werden kann. Eine vierte, kürzlich entdeckte LFA-1 Konformation mit abgeknickter extrazellulärer Domäne und aktiver MIDAS besitzt eine hohe Affinität zu ICAM-1 in *cis*-Stellung, welches auf PMN exprimiert wird und dessen Bindung eine Autoinhibition der PMN-Rekrutierung verursacht.² Diese Konformation wird ebenfalls durch Aktivierung von Chemokinrezeptoren induziert.²

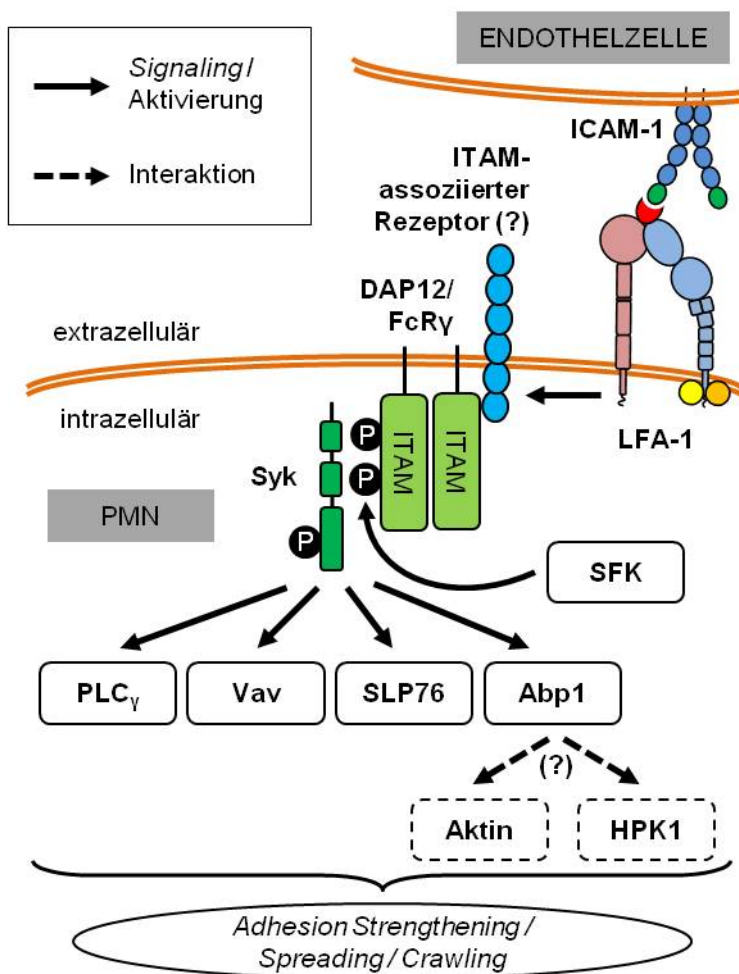


Abbildung 3: *Outside-In-Signaling* in PMN wird getriggert durch Ligandenbindung von hoch-affinem LFA-1 und führt zur Phosphorylierung von intrazellulären ITAM-Domänen an DAP12 / FcR γ durch SFK, was wiederum die Aktivierung von Syk ermöglicht. Die Kinase Syk hat verschiedene Substrate, von denen beispielhaft PLC γ , Vav, SLP76 und Abp1 abgebildet sind. Das Adaptorprotein Abp1 interagiert mit verschiedenen Proteinen, wie Aktin und HPK1, wobei diese Interaktionen in PMN noch nicht bestätigt wurden. Die komplexen Signalprozesse des *Outside-In-Signaling* sind notwendig für die im Anschluss an die Adhäsion stattfindenden Rekrutierungsschritte *Adhesion Strengthening*, *Spreading* und *Crawling* (modifiziert nach Schymeinsky et al., 2007).⁹⁵

Beim *Outside-In-Signaling* (Abbildung 3) induzieren aktivierte β_2 -Integrine als Rezeptoren eine Reihe intrazellulärer Signalkaskaden.⁷⁰ Getriggert wird dies durch Ligandenbindung und *Clustering* von β_2 -Integrinen, was zur Aktivierung mehrerer nicht-Rezeptor Tyrosin-Kinasen führt, den sogenannten *Src Family Kinases* (SFK).⁷⁰ Diese Kinasen phosphorylieren unter anderem membranständige Immunorezeptoren, nämlich Fc Rezeptor γ (FcR γ) und *DNAX Activation Protein Of 12 kDa* (DAP12) an den zytoplasmatischen *Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motifs* (ITAM)-Domänen.⁷⁰ Die phosphorylierten ITAM-Domänen

ermöglichen die Bindung und Aktivierung von Syk.⁷⁰ Aktiviertes Syk hat wiederum verschiedene Substrate im Rahmen des β_2 -Integrin-vermittelten *Signalings*, darunter zum Beispiel Abp1, *SH2 Domain-Containing Leukocyte Phosphoprotein Of 76kD* (SLP76), PLC γ oder Vav.^{71,96} Das *Outside-In-Signaling* ist für Rekrutierungsschritte, die eine Reorganisation des Zytoskeletts im Anschluss an die Adhäsion beinhalten, von großer Bedeutung.⁷⁰ Es konnte gezeigt werden, dass Syk für β_2 -Integrin-vermittelte Funktionen wie *Adhesion Strengthening*, *Spreading*, *Crawling*, Extravasation, Degranulation und Phagozytose notwendig ist.^{4,71,96-98} SFK hingegen sind insbesondere für die Ausbildung eines Entzündungsmilieus notwendig und bei der eigentlichen PMN-Rekrutierung entbehrlich.⁹⁹

3.5 Fragestellung

Mehr als 130 Jahre nach Paul Ehrlichs Erstbeschreibung von PMN hat unser Verständnis über diese Zellen stark zugenommen. Die Tatsache, dass PMN viele komplexe Funktionen im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion übernehmen und an der Entstehung bedeutender Erkrankungen beteiligt sind, rückte sie in den vergangenen 30 Jahren zunehmend in den Fokus internationaler Wissenschaft. Die Rekrutierung von PMN zum Entzündungsherd spielt eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der Entzündungsreaktion. Auf zellulärer Ebene ist dieser Rekrutierungsvorgang eingehend beschrieben worden, wobei die zugrunde liegenden molekularen Regulationsmechanismen bis heute noch nicht vollständig aufgeklärt sind.^{1,60,70} Es ist bekannt, dass die Rekrutierung von PMN von β_2 -Integrinen abhängig ist, welche neben adhäsiven Kräften auch bidirektionale biochemische Signale über die Zellmembran vermitteln.¹ Des Weiteren wurde gezeigt, dass die Kinase Syk eine zentrale Rolle beim β_2 -Integrin-vermittelten *Outside-In-Signaling* und bei der PMN-Rekrutierung spielt.⁴ Aktiviertes Syk hat mehrere Substrate, wobei die von Syk ausgehenden Signalwege zur Regulierung unterschiedlicher Zellfunktionen bis heute nur in Teilen aufgeklärt sind (Abbildung 3).⁵

Dem Syk-Substrat Abp1 wurde vor kurzem eine wichtige Rolle bei der PMN-Rekrutierung zugeschrieben.^{6,7} Abp1 (auch *HPK1-Interacting Protein Of 55 kDa* [Hip-55]; *Src Homology [SH]3 Domain-Containing Protein 7* [SH3P7]; *Debrin-Like Protein*) ist ein Aktin-bindendes Adaptorprotein.^{6,8,49} Vor kurzem wurde gezeigt, dass Abp1 in PMN wichtig für die Stabilisierung der hoch-affinen Konformation von LFA-1 Clustern unter Flussbedingungen ist und eine entscheidende Rolle bei der Adhäsion von PMN unter Flussbedingungen spielt.⁷ Über welche molekularen Interaktionspartner das Adaptorprotein Abp1 seine Effekte im Rahmen der PMN-Rekrutierung ausübt wurde bisher nicht untersucht.

Zu den in der Literatur beschriebenen Interaktionspartnern von Abp1 gehört HPK1 (auch *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 1* [MAP4K1]), eine Serin-/Threonin-Kinase von 97 kDa aus der Familie der *Ste20-related Kinases*.¹⁰⁰ Die Interaktion von HPK1 mit Abp1 wurde nach Ko-Transfektion in 293T Zellen nachgewiesen, wobei die zweite

prolinreiche Domäne von HPK1 eine Bindung mit der SH3-Domäne von Abp1 einging.⁸ HPK1 enthält neben der N-terminalen Kinase-Domäne vier zentral gelegene prolinreiche Regionen, eine Spaltstelle für Caspasen sowie eine C-terminal gelegene regulatorische *Citron Homology Domain*.^{101,102} Während der Embryonalzeit lässt sich HPK1 bei Mäusen ubiquitär nachweisen, wohingegen sich die Expression von HPK1 bei adulten Mäusen weitgehend auf hämatopoetische Zellen beschränkt.¹⁰⁰ HPK1 ist an *Mitogen-Activated Protein Kinases* (MAPK)-Signalwegen sowie am *Nuclear Factor κ B* (NF κ B)-Signalweg beteiligt und spielt außerdem eine Rolle bei der Apoptoseeinleitung von T-Zellen.^{100,103,104} Zudem wurde kürzlich gezeigt, dass HPK1 ein negativer Regulator der β_2 -Integrin-vermittelten Adhäsion von B- und T-Zellen ist.^{9,10} Es lagen bisher weder Untersuchungen über die Interaktion von HPK1 mit Abp1 in PMN vor, noch über eine mögliche funktionelle Beteiligung von HPK1 an der PMN-Rekrutierung.

Die erste Publikation der vorliegenden Arbeit behandelt die Fragestellungen, (1) ob HPK1 mit Abp1 in PMN interagiert und ob eine Assoziation von HPK1 mit dem Zytoskelett besteht; (2) ob HPK1 eine Bedeutung für die Affinitätsregulation von LFA-1 in PMN hat; (3) ob HPK1 für die Rekrutierung von PMN eine funktionelle Rolle spielt. Zur Beantwortung des ersten Fragenkomplexes wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit Abp1-*Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) überexprimierenden *Neutrophil-Like Differentiated Human Promyelocytic Leukemia* (dHL-60) Zellen durchgeführt. Konfokalmikroskopisch wurde zudem die subzelluläre Lokalisation von HPK1 im Bezug zu Abp1-EGFP und Aktin in polarisierten dHL-60 Zellen analysiert. Zur Beantwortung des zweiten Fragenkomplexes wurde mittels Durchflusszytometrie anhand isolierter PMN aus HPK1^{+/+} und HPK1^{-/-} Mäusen die Oberflächenexpression von LFA-1 und Mac-1 untersucht. Des Weiteren wurde an isolierten HPK1^{+/+} und HPK1^{-/-} PMN die Induktion von hoch-affinem LFA-1 und Mac-1 nach Stimulierung durch CXCL1 indirekt am Ausmaß der Ligandenbindung durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Beantwortung des dritten Fragenkomplexes wurden funktionelle Flusskammerexperimente mit isolierten HPK1^{+/+} und HPK1^{-/-} PMN durchgeführt, um die Induktion der Adhäsion, das *Adhesion Strengthening*, das *Spreading* sowie das *Crawling* zu analysieren. Zudem wurde am Modell der akuten Entzündung im *M. cremaster* von HPK1^{+/+} und HPK1^{-/-} Mäusen intravitalmikroskopisch die Induktion der Adhäsion und das *Crawling* von PMN *in vivo* untersucht sowie histologisch die Leukozytenrekrutierung ins Gewebe analysiert.

In einer zweiten Publikation konnte durch den Autor mit Hilfe von Ko-Immünpräzipitation gezeigt werden, dass die Interaktion des Adaptorproteins Abp1 mit Aktin in dHL-60 Zellen durch β_2 -Integrin-vermittelte PMN-Aktivierung induziert werden kann. Zudem werden in der Publikation weitere Funktionen von Abp1 für die PMN-Rekrutierung untersucht und die subzelluläre Lokalisation von Abp1 nach β_2 -Integrin-induzierter PMN-Aktivierung analysiert.

Zusammenfassend besteht die übergeordnete Fragestellung des Forschungsvorhabens darin, die Rolle von HPK1 für die β_2 -Integrin-vermittelte Rekrutierung von PMN im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion zu charakterisieren. Ein genaueres Verständnis der molekularen Regulierung der PMN-Rekrutierung ist Grundlage zur Entwicklung selektiver Therapeutika für inflammatorische und onkologische Erkrankungen.

4 Beitrag des Autors

4.1 Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response

Jakob SM, Pick R, Brechtefeld D, Nussbaum C, Kiefer F, Sperandio M, Walzog B. The hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response. *Blood*. 2013 May 16;121(20):4184-94

Der Autor hat das Manuskript der oben genannten Veröffentlichung selbst verfasst, sowie den Großteil der Experimente geplant, durchgeführt und ausgewertet. Der Autor hat die Ko-Immunpräzipitations-Experimente (Abbildung 1A), die Flusskammer-Experimente (Abbildungen 1D, 4A-B, 5A-C), die durchflusszytometrischen Experimente (Abbildungen 2A-C), die intravitalmikroskopischen Experimente (Abbildungen 3A-B, 5D-G, 6A-C), sowie die histologischen Untersuchungen (Abbildungen 6D-E, S2) weitgehend selbst geplant, durchgeführt und ausgewertet.

4.2 The Mammalian Actin-Binding Protein 1 is Critical for Spreading and Intraluminal Crawling of Neutrophils under Flow Conditions

Hepper I, Schymeinsky J, Weckbach L, Jakob SM, Frommhold D, Sixt M, Laschinger M, Sperandio M, Walzog B. The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions. *J Immunol*. 2012 May 1;188(9):4590-601.

Der Autor hat die Ko-Immunpräzipitations-Experimente (Abbildungen 2C-D) der oben genannten Veröffentlichung selbst geplant, durchgeführt und ausgewertet.

5 Veröffentlichungen

5.1 Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response

Jakob SM, Pick R, Brechtefeld D, Nussbaum C, Kiefer F, Sperandio M, Walzog B. *The hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response*. Blood. 2013 May 16;121(20):4184-94

Angenommen zur Publikation am 20.02.2013

Online publiziert am 04.03.2013

<https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-451385>

5.2 The Mammalian Actin-Binding Protein 1 is Critical for Spreading and Intraluminal Crawling of Neutrophils under Flow Conditions

Hepper I, Schymeinsky J, Weckbach L, Jakob SM, Frommhold D, Sixt M, Laschinger M, Sperandio M, Walzog B. *The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions*. J Immunol. 2012 May 1;188(9):4590-601.

Angenommen zur Publikation am 06.03.2012

Online publiziert am 01.05.2012

<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100878>

6 Literaturverzeichnis

1. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(9):678-689.
2. Fan Z, McArdle S, Marki A, Mikulski Z, Gutierrez E, Engelhardt B, Deutsch U, Ginsberg M, Groisman A, Ley K. Neutrophil recruitment limited by high-affinity bent beta2 integrin binding ligand in cis. *Nat Commun.* 2016;7:12658.
3. Evans R, Patzak I, Svensson L, De Filippo K, Jones K, McDowall A, Hogg N. Integrins in immunity. *J Cell Sci.* 2009;122(Pt 2):215-225.
4. Mocsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity.* 2002;16(4):547-558.
5. Mocsai A, Ruland J, Tybulewicz VL. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(6):387-402.
6. Larbolette O, Wollscheid B, Schweikert J, Nielsen PJ, Wienands J. SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors. *Mol Cell Biol.* 1999;19(2):1539-1546.
7. 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. A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo. *Blood.* 2009;114(19):4209-4220.
8. Ensenat D, Yao Z, Wang XS, Kori R, Zhou G, Lee SC, Tan TH. A novel src homology 3 domain-containing adaptor protein, HIP-55, that interacts with hematopoietic progenitor kinase 1. *J Biol Chem.* 1999;274(48):33945-33950.
9. Konigsberger S, Peckl-Schmid D, Zaborsky N, Patzak I, Kiefer F, Achatz G. HPK1 associates with SKAP-HOM to negatively regulate Rap1-mediated B-lymphocyte adhesion. *PLoS One.* 2010;5(9).
10. Patzak IM, Konigsberger S, Suzuki A, Mak TW, Kiefer F. HPK1 competes with ADAP for SLP-76 binding and via Rap1 negatively affects T-cell adhesion. *Eur J Immunol.* 2010;40(11):3220-3225.
11. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Robbins SL. Robbins basic pathology (ed 9th). Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders; 2013.
12. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-435.
13. Nathan C. Points of control in inflammation. *Nature.* 2002;420(6917):846-852.
14. Pittman K, Kubes P. Damage-associated molecular patterns control neutrophil recruitment. *J Innate Immun.* 2013;5(4):315-323.
15. Rather LJ. Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus. *Bull N Y Acad Med.* 1971;47(3):303-322.
16. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(10):803-815.
17. Ehrlich P. Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten. *Z Klin Med.* 1880;1:553-560.
18. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(3):159-175.
19. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med.* 2011;17(11):1381-1390.
20. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity.* 2010;33(5):657-670.
21. Athens JW. Blood: leukocytes. *Annu Rev Physiol.* 1963;25:195-212.
22. Dancey JT, Deubelbeiss KA, Harker LA, Finch CA. Neutrophil kinetics in man. *J Clin Invest.* 1976;58(3):705-715.
23. Summers C, Rankin SM, Condliffe AM, Singh N, Peters AM, Chilvers ER. Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 2010;31(8):318-324.

24. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(3):173-182.
25. Wong CH, Heit B, Kubes P. Molecular regulators of leucocyte chemotaxis during inflammation. *Cardiovasc Res.* 2010;86(2):183-191.
26. Foxman EF, Campbell JJ, Butcher EC. Multistep navigation and the combinatorial control of leukocyte chemotaxis. *J Cell Biol.* 1997;139(5):1349-1360.
27. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol.* 2012;30:459-489.
28. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):238-250.
29. Yipp BG, Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013;122(16):2784-2794.
30. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535.
31. Geering B, Simon HU. Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils. *Cell Death Differ.* 2011;18(9):1457-1469.
32. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest.* 1989;83(3):865-875.
33. Tofts PS, Chevassut T, Cutajar M, Dowell NG, Peters AM. Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2011;117(22):6050-6052; author reply 6053-6054.
34. Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood.* 2010;116(4):625-627.
35. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol.* 2011;12(11):1035-1044.
36. Li KW, Turner SM, Emson CL, Hellerstein MK, Dale DC. Deuterium and neutrophil kinetics. *Blood.* 2011;117(22):6052-6053; author reply 6053-6054.
37. Colotta F, Re F, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood.* 1992;80(8):2012-2020.
38. Kim MH, Granick JL, Kwok C, Walker NJ, Borjesson DL, Curry FR, Miller LS, Simon SI. Neutrophil survival and c-kit(+)-progenitor proliferation in *Staphylococcus aureus*-infected skin wounds promote resolution. *Blood.* 2011;117(12):3343-3352.
39. Lee A, Whyte MK, Haslett C. Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J Leukoc Biol.* 1993;54(4):283-288.
40. Cartwright GE, Athens JW, Wintrobe MM. The Kinetics of Granulopoiesis in Normal Man. *Blood.* 1964;24:780-803.
41. Furze RC, Rankin SM. The role of the bone marrow in neutrophil clearance under homeostatic conditions in the mouse. *FASEB J.* 2008;22(9):3111-3119.
42. Hong C, Kidani Y, N AG, Phung T, Ito A, Rong X, Ericson K, Mikkola H, Beaven SW, Miller LS, Shao WH, Cohen PL, Castrillo A, Tontonoz P, Bensinger SJ. Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *J Clin Invest.* 2012;122(1):337-347.
43. Shi J, Gilbert GE, Kokubo Y, Ohashi T. Role of the liver in regulating numbers of circulating neutrophils. *Blood.* 2001;98(4):1226-1230.
44. Mocsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013;210(7):1283-1299.
45. von Bruhl ML, Stark K, Steinhart A, Chandraratne S, Konrad I, Lorenz M, Khandoga A, Tirniceriu A, Coletti R, Kollnberger M, Byrne RA, Laitinen I, Walch A, Brill A, Pfeiler S, Manukyan D, Braun S, Lange P, Riegger J, Ware J, Eckart A, Haidari S, Rudelius M, Schulz C, Echtler K, Brinkmann V, Schwaiger M, Preissner KT, Wagner DD, Mackman N, Engelmann B, Massberg S. Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J Exp Med.* 2012;209(4):819-835.
46. Doring Y, Soehnlein O, Weber C. Neutrophil Extracellular Traps in Atherosclerosis and Atherothrombosis. *Circ Res.* 2017;120(4):736-743.

47. Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B, Gowing S, Chow S, Giannias B, Bourdeau F, Kubes P, Ferri L. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J Clin Invest.* 2013.
48. Stark K, Eckart A, Haidari S, Tirniceriu A, Lorenz M, von Bruhl ML, Gartner F, Khandoga AG, Legate KR, Pless R, Hepper I, Lauber K, Walzog B, Massberg S. Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs. *Nat Immunol.* 2013;14(1):41-51.
49. Schymeinsky J, Sperandio M, Walzog B. The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology. *Trends Cell Biol.* 2011;21(4):247-255.
50. Pruenster M, Mudde L, Bombosi P, Dimitrova S, Zsak M, Middleton J, Richmond A, Graham GJ, Segerer S, Nibbs RJ, Rot A. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. *Nat Immunol.* 2009;10(1):101-108.
51. Middleton J, Neil S, Wintle J, Clark-Lewis I, Moore H, Lam C, Auer M, Hub E, Rot A. Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell.* 1997;91(3):385-395.
52. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood.* 1996;88(9):3259-3287.
53. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol.* 2013;17(4):1185-1197.
54. Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, Olson TS, Xia L, McEver RP, Ley K. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med.* 2003;197(10):1355-1363.
55. Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med.* 2001;194(2):205-218.
56. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood.* 2002;99(1):336-341.
57. Kuwano Y, Spelten O, Zhang H, Ley K, Zarbock A. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood.* 2010;116(4):617-624.
58. Salas A, Shimaoka M, Kogan AN, Harwood C, von Andrian UH, Springer TA. Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction. *Immunity.* 2004;20(4):393-406.
59. Chesnutt BC, Smith DF, Raffler NA, Smith ML, White EJ, Ley K. Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. *Microcirculation.* 2006;13(2):99-109.
60. Lefort CT, Ley K. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol.* 2012;3:157.
61. Johnson Z, Proudfoot AE, Handel TM. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(6):625-636.
62. Ley K. Arrest chemokines. *Front Immunol.* 2014;5:150.
63. Kim M, Carman CV, Springer TA. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science.* 2003;301(5640):1720-1725.
64. Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *J Immunol.* 2013;190(9):4451-4457.
65. Giagulli C, Ottoboni L, Cavegion E, Rossi B, Lowell C, Constantin G, Laudanna C, Berton G. The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating beta 2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for beta 2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion. *J Immunol.* 2006;177(1):604-611.
66. Hogg N, Patzak I, Willenbrock F. The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(6):416-426.
67. Lowell CA, Berton G. Integrin signal transduction in myeloid leukocytes. *J Leukoc Biol.* 1999;65(3):313-320.
68. DeMali KA, Wennerberg K, Burridge K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15(5):572-582.

69. Kim M, Carman CV, Yang W, Salas A, Springer TA. The primacy of affinity over clustering in regulation of adhesiveness of the integrin α L β 2. *J Cell Biol.* 2004;167(6):1241-1253.
70. Abram CL, Lowell CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:339-362.
71. Frommhold D, Mannigel I, Schymeinsky J, Mocsai A, Poeschl J, Walzog B, Sperandio M. Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo. *BMC Immunol.* 2007;8:31.
72. Schymeinsky J, Then C, Walzog B. The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. *J Cell Physiol.* 2005;204(2):614-622.
73. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med.* 2006;203(12):2569-2575.
74. Phillipson M, Heit B, Parsons SA, Petri B, Mullaly SC, Colarusso P, Gower RM, Neely G, Simon SI, Kubes P. Vav1 is essential for mechanotactic crawling and migration of neutrophils out of the inflamed microvasculature. *J Immunol.* 2009;182(11):6870-6878.
75. Dixit N, Yamayoshi I, Nazarian A, Simon SI. Migrational guidance of neutrophils is mechanotransduced via high-affinity LFA-1 and calcium flux. *J Immunol.* 2011;187(1):472-481.
76. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, Colom B, Caille D, Diapouli FM, Nash GB, Chavakis T, Albelda SM, Rainger GE, Meda P, Imhof BA, Nourshargh S. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol.* 2011;12(8):761-769.
77. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11(5):366-378.
78. Lammermann T, Bader BL, Monkley SJ, Worbs T, Wedlich-Soldner R, Hirsch K, Keller M, Forster R, Critchley DR, Fassler R, Sixt M. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature.* 2008;453(7191):51-55.
79. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110(6):673-687.
80. Walzog B, Scharffetter-Kochanek K, Gaehtgens P. Impairment of neutrophil emigration in CD18-null mice. *Am J Physiol.* 1999;276(5 Pt 1):G1125-1130.
81. Mocsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, Lowell CA. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol.* 2006;7(12):1326-1333.
82. Tan SM. The leucocyte beta2 (CD18) integrins: the structure, functional regulation and signalling properties. *Biosci Rep.* 2012;32(3):241-269.
83. Ding ZM, Babensee JE, Simon SI, Lu H, Perrard JL, Bullard DC, Dai XY, Bromley SK, Dustin ML, Entman ML, Smith CW, Ballantyne CM. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol.* 1999;163(9):5029-5038.
84. Moser M, Legate KR, Zent R, Fassler R. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science.* 2009;324(5929):895-899.
85. Zhu J, Luo BH, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA. Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces. *Mol Cell.* 2008;32(6):849-861.
86. Schmidt S, Moser M, Sperandio M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol Immunol.* 2013;55(1):49-58.
87. Anderson DC, Springer TA. Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1, and p150,95 glycoproteins. *Annu Rev Med.* 1987;38:175-194.
88. Lu H, Smith CW, Perrard J, Bullard D, Tang L, Shappell SB, Entman ML, Beaudet AL, Ballantyne CM. LFA-1 is sufficient in mediating neutrophil emigration in Mac-1-deficient mice. *J Clin Invest.* 1997;99(6):1340-1350.
89. Springer TA, Dustin ML. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Curr Opin Cell Biol.* 2012;24(1):107-115.
90. Nordenfelt P, Moore TI, Mehta SB, Kalappurakkal JM, Swaminathan V, Koga N, Lambert TJ, Baker D, Waters JC, Oldenbourg R, Tani T, Mayor S, Waterman CM, Springer TA. Direction of actin flow dictates integrin LFA-1 orientation during leukocyte migration. *Nat Commun.* 2017;8(1):2047.

91. Lefort CT, Rossaint J, Moser M, Petrich BG, Zarbock A, Monkley SJ, Critchley DR, Ginsberg MH, Fassler R, Ley K. Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood*. 2012.
92. Stadtmann A, Brinkhaus L, Mueller H, Rossaint J, Bolomini-Vittori M, Bergmeier W, Van Aken H, Wagner DD, Laudanna C, Ley K, Zarbock A. Rap1a activation by CalDAG-GEFI and p38 MAPK is involved in E-selectin-dependent slow leukocyte rolling. *Eur J Immunol*. 2011;41(7):2074-2085.
93. Zarbock A, Lowell CA, Ley K. Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity*. 2007;26(6):773-783.
94. Zarbock A, Deem TL, Burcin TL, Ley K. Galpha2 is required for chemokine-induced neutrophil arrest. *Blood*. 2007;110(10):3773-3779.
95. Schymeinsky J, Mocsai A, Walzog B. Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost*. 2007;98(2):262-273.
96. Schymeinsky J, Sindrilaru A, Frommhold D, Sperandio M, Gerstl R, Then C, Mocsai A, Scharffetter-Kochanek K, Walzog B. 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*. 2006;108(12):3919-3927.
97. Schymeinsky J, Then C, Sindrilaru A, Gerstl R, Jakus Z, Tybulewicz VL, Scharffetter-Kochanek K, Walzog B. Syk-mediated translocation of PI3Kdelta to the leading edge controls lamellipodium formation and migration of leukocytes. *PLoS One*. 2007;2(11):e1132.
98. Shi Y, Tohyama Y, Kadono T, He J, Miah SM, Hazama R, Tanaka C, Tohyama K, Yamamura H. Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. *Blood*. 2006;107(11):4554-4562.
99. Kovacs M, Nemeth T, Jakus Z, Sitaru C, Simon E, Futosi K, Botz B, Helyes Z, Lowell CA, Mocsai A. The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *J Exp Med*. 2014;211(10):1993-2011.
100. Kiefer F, Tibbles LA, Anafi M, Janssen A, Zanke BW, Lassam N, Pawson T, Woodgett JR, Iscove NN. HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway. *EMBO J*. 1996;15(24):7013-7025.
101. Ling P, Yao Z, Meyer CF, Wang XS, Oehrl W, Feller SM, Tan TH. Interaction of hematopoietic progenitor kinase 1 with adapter proteins Crk and CrkL leads to synergistic activation of c-Jun N-terminal kinase. *Mol Cell Biol*. 1999;19(2):1359-1368.
102. Boomer JS, Tan TH. Functional interactions of HPK1 with adaptor proteins. *J Cell Biochem*. 2005;95(1):34-44.
103. Arnold R, Liou J, Drexler HC, Weiss A, Kiefer F. Caspase-mediated cleavage of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) converts an activator of NFkappaB into an inhibitor of NFkappaB. *J Biol Chem*. 2001;276(18):14675-14684.
104. Brenner D, Golks A, Becker M, Muller W, Frey CR, Novak R, Melamed D, Kiefer F, Krammer PH, Arnold R. Caspase-cleaved HPK1 induces CD95L-independent activation-induced cell death in T and B lymphocytes. *Blood*. 2007;110(12):3968-3977.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abp1	<i>Mammalian Actin-Binding Protein 1</i>
CD	<i>Cluster Of Differentiation</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C Motif) Ligand</i>
CXCR	<i>CXC Chemokine Receptor</i>
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
DAP12	<i>DNAX Activation Protein Of 12 kDa</i>
dHL-60	<i>Neutrophil-Like Differentiated Human Promyelocytic Leukemia Cells</i>
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
FcR γ	<i>Fc Receptor γ</i>
fMLP	<i>N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine</i>
GPCR	<i>G Protein-Coupled Receptor</i>
Hip-55	<i>HPK1-Interacting Protein Of 55 kDa</i>
HPK1	<i>Hematopoietic Progenitor Kinase 1</i>
iC3b	<i>Inactivated Complement Component 3b</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IL	<i>Interleukin</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motifs</i>
JAM-1	<i>Junctional Adhesion Molecule-1</i>
LAD-1	<i>Leukocyte Adhesion Deficiency-1</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen 1</i>
M.	<i>Musculus</i>
Mac-1	<i>Macrophage Receptor 1</i>
MAP4K1	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 1</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>
MIDAS	<i>Metal-Ion-Dependent Adhesion Site</i>
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>
PLC	<i>Phospholipase C</i>
PMN	<i>Polymorphonuclear Neutrophils</i>
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i>
Rap1	<i>Ras-Related Protein 1</i>
SFK	<i>Src Family Kinases</i>
SH3P7	<i>Src Homology [SH]3 Domain-Containing Protein 7</i>
SLP76	<i>SH2 Domain-Containing Leukocyte Phosphoprotein Of 76kD</i>
Syk	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>
TNF- α	<i>Tumor-Necrosis Factor-α</i>
VCAM	<i>Vascular Cell-Adhesion Molecule</i>
VLA-4	<i>Very Late Antigen-4</i>

8 Danksagung

Ich möchte mich vor allem herzlich bei Frau **Prof. Dr. Barbara Walzog** bedanken, unter deren professioneller Supervision ich diese Forschungsarbeit durchgeführt habe. Die exzellente Betreuung war Grundlage für die Entstehung dieser Arbeit. Frau Prof. Walzog stand mir in all den Jahren uneingeschränkt und unmittelbar als Ansprechpartnerin zur Verfügung, gab Motivationshilfen und half durch kritische und konstruktive Diskussion die Qualität der vorliegenden Arbeit zu fördern. Dankbar anerkennen möchte ich ihre immer freundliche, uneingeschränkte und geduldige Bereitschaft mir ihr großes Wissen über die Rekrutierung von PMN weiterzugeben. Ich hatte die Freiheit selbst Ideen einzubringen, wurde unterstützt eigene Methoden zu etablieren und konnte über das breite wissenschaftliche Netzwerk von Frau Prof. Walzog interessante Kooperationen mit mehreren Arbeitsgruppen eingehen. Sie gab mir die Möglichkeit, die Ergebnisse auf nationalen und internationalen Kongressen zu präsentieren und wandte viel Zeit auf mich darauf vorzubereiten. Durch ihre außerordentliche akademische Kompetenz ermöglichte mir Frau Prof. Walzog eine grundlegende wissenschaftliche Ausbildung.

Herrn **Prof. Dr. Markus Sperandio** möchte ich vielmals danken für die Möglichkeit zur Durchführung der intravitalmikroskopischen Experimente. Als absoluter Experte auf dem Gebiet der Intravitalmikroskopie am Cremaster-Modell der Maus vermittelte mir Herr Prof. Sperandio die notwendigen theoretischen Grundlagen und stellte mir die technischen Geräte sowie die Räumlichkeiten zur Verfügung. Bei Problemen oder Fragen bezüglich der Experimente stand seine Tür stets offen und ich konnte auch darüber hinaus auf seine große wissenschaftliche Expertise zurück greifen. Für methodische Anleitung bei der Intravitalmikroskopie möchte ich zudem Frau **PD Dr. Claudia Nussbaum** und Frau **Susanne Bierschenk** ganz herzlich danken.

Herrn **Prof. Dr. Ulrich Pohl** möchte ich herzlich danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, die Arbeit an dem von ihm geleiteten Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie durchzuführen.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Walzog, insbesondere **Dr. Robert Pick, Ingrid Hepper, Dr. Ludwig Weckbach, Doris Brechtefeld, Dr. Thomas Stocker, Katy Niedung, Jenny Truong** und **Angelika Höhe**. Die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, wertvolle konzeptionelle und methodische Anregungen sowie stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Herrn **Prof. Dr. Friedemann Kiefer** möchte ich für die Bereitstellung der HPK1^{-/-} Mäuse sowie für anregende wissenschaftliche Gespräche danken.

Ein herzlicher Dank gilt ebenfalls Herrn **Prof. Dr. Heesemann**, dem Leiter des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe), für die Förderung im Rahmen des Promotionsstudienganges Molekulare Medizin der Medizinischen Fakultät der LMU.

Nicht zuletzt möchte ich **meiner Familie** für die uneingeschränkte liebevolle Unterstützung während meines Studiums von ganzem Herzen danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Viele ermutigende Worte, Geduld sowie Anteilnahme an Erfolg und Misserfolg durch Freunde und Familie waren für mich eine große Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

9 Wissenschaftliche Beiträge

9.1 Publikationsliste

Garving C, Jakob S, Bauer I, Nadjar R, Brunner UH: Impingement syndrome of the shoulder. *Dtsch Arztebl Int* 2017; 114: 765-76.

Weckbach LT, Gola A, Winkelmann M, Jakob SM, Groesser L, Borgolte J, Pogoda F, Pick R, Pruenster M, Müller-Höcker J, Deindl E, Sperandio M, Walzog B. The cytokine midkine supports neutrophil trafficking during acute inflammation by promoting adhesion via $\beta 2$ integrins (CD11/CD18). *Blood* 2014;123:1887-96.

Jakob SM, Pick R, Brechtefeld D, Nussbaum C, Kiefer F, Sperandio M, Walzog B. The hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response. *Blood*. 2013 May 16;121(20):4184-94

Hepper I, Schymeinsky J, Weckbach L, Jakob SM, Frommhold D, Sixt M, Laschinger M, Sperandio M, Walzog B. The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions. *J Immunol*. 2012 May 1;188(9):4590-601.

Németh T, Futosi K, Hably C, Brouns MR, Jakob SM, Kovács M, Kertész Z, Walzog B, Settleman J, Mócsai A. Neutrophil functions and autoimmune arthritis in the absence of p190RhoGAP: generation and analysis of a novel null mutation in mice. *J Immunol*. 2010 Sep 1;185(5):3064-75.

9.2 Kongressbeiträge

- 04/2013 47th Annual Scientific Meeting of ESCI (European Society for Clinical Investigation), Portugal
Vortrag: "HPK1 is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response"
- 01/2012 9th GCOE (Global Center of Excellence) International Symposium on "Cell Migration in Biology and Medicine", Fukuoka, Japan
Vortrag: "HPK1 is critical for neutrophil adhesion, adhesion strengthening and crawling under flow conditions during acute inflammation"
- 10/2011 Joint Meeting of ESM (European Society for Microcirculation) and GfMVB (Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie), München
Vortrag: "HPK1 is required for neutrophil recruitment during the acute inflammatory response"
- 04/2011 45th Annual Scientific Meeting of ESCI, Griechenland
Posterpräsentation: "A role of mAbp1 for post-arrest spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions"
- 07/2010 32th Annual Meeting of GfMVB, Berlin
Vortrag: "The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1) is critically involved in Mac-1 (CD11b/CD18)-mediated crawling of neutrophils under flow conditions"

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Sascha Jakob, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Die Rolle von *Hematopoietic Progenitor Kinase 1* (HPK1) für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

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

München, den 31.01.2020

Sascha Jakob