

Aus dem Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie im
Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin,
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Markus Sperandio

**Die Rolle der *Hematopoietic Progenitor Kinase 1* (HPK1) in
neutrophilen Granulozyten**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Michael Winkelmann

aus Lindau (Bodensee)

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin: Prof. Dr. Barbara Walzog

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Karsten Spiekermann

Prof. Dr. Martin Hildebrandt

PD Dr. Norit Nägler

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 07.04.2022

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die akute Entzündungsreaktion	1
1.1.1	Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten	3
1.1.2	Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten	5
1.2	β_2-Integrine	6
1.2.1	Mitglieder der β_2 -Integrinfamilie	6
1.2.2	Aktivierung der Integrine (<i>Inside-out Signaling</i>)	7
1.2.3	Signaltransduktion in das Zellinnere (<i>Outside-in Signaling</i>).....	9
1.3	Die Hematopoietic Progenitor Kinase 1 (HPK1)	11
1.3.1	Die Struktur von HPK1	11
1.3.2	Interaktionspartner und Substrate von HPK1.....	12
1.3.3	HPK1-vermittelte Signalwege	15
1.3.3.1	Der JNK/SAPK-Signalweg	15
1.3.3.2	Der NF κ B-Signalweg.....	16
1.3.3.3	Signalwege bei Apoptose und Differenzierung	17
1.3.3.4	TCR- und BCR-vermittelte Signalwege.....	17
1.3.4	Die Rolle von HPK1 für die Leukozytenrekrutierung	18
1.3.5	HPK1 im klinischen Kontext	20
1.4	Zielsetzung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Chemikalien	22
2.1.2	Puffer und Lösungen	23
2.1.3	Antikörper	25
2.1.4	Versuchstiere	26
2.1.5	Zelllinien	27
2.1.6	Geräte	27
2.1.7	Software	29
2.2	Methoden	30
2.2.1	Isolation von murinen neutrophilen Granulozyten.....	30
2.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	30

2.2.3	<i>High Fidelity</i> Polymerase-Kettenreaktion (HiFi-PCR)	32
2.2.4	DNA-Isolation	33
2.2.5	DNA-Analyse	33
2.2.6	DNA-Gelelektrophorese	34
2.2.7	DNA-Gelextraktion	35
2.2.8	Klonierung	35
2.2.9	Transformation chemisch kompetenter Bakterien.....	37
2.2.10	Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	37
2.2.11	Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien	38
2.2.12	Zellkultur.....	38
2.2.13	Proteinextraktion	39
2.2.14	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	40
2.2.15	Western Blot.....	40
2.2.16	Transfektion von HEK-293T-Zellen	42
2.2.17	Transduktion von HL-60 Zellen	43
2.2.18	Durchflusszytometrische Analyse	44
2.2.19	Verstärkung der Adhäsion unter Flussbedingungen	45
2.2.20	Immunfluoreszenz.....	47
2.2.21	Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie	48
2.2.22	Co-Immunpräzipitation mit dHL-60 Zellen.....	48
2.2.23	Massenspektrometrie	49
2.3	Statistische Auswertung	50
3	Ergebnisse.....	51
3.1	Genotypisierung der HPK1-defizienten Versuchstiere.....	51
3.2	Die Funktion von HPK1 für das <i>Inside-out Signaling</i> unter Flussbedingungen	52
3.3	Herstellung und Charakterisierung einer HL-60 HPK1-Knockdown Zelllinie.....	54
3.3.1	Generierung der HL-60 Zelllinien und Proteinquantifizierung	54
3.3.2	Regulation der β_2 -Integrinexpression und Affinitätsregulation	56
3.4	Das HPK1-Interaktom	58
3.4.1	Klonierung des lentiviralen HPK1-EGFP-Expressionsvektors	58
3.4.2	Herstellung und Charakterisierung der HL-60 HPK-EGFP Zelllinie .	62

3.4.3	Co-Immunpräzipitation	64
3.4.4	Das HPK1-Interaktom	66
3.4.5	Funktionelle Unterteilung des HPK1-Interaktoms	68
4	Diskussion	73
4.1	Die genotypische Charakterisierung der HPK1-defizienten Versuchstiere	73
4.2	Die Bedeutung von HPK1 für das <i>Inside-out Signaling</i>	73
4.3	shRNA-transduzierte HL-60 Zellen als humanes Zellsystem.....	76
4.4	Herstellung der HPK1-EGFP HL-60 Zelllinie	77
4.5	Co-Immunpräzipitation	78
4.6	Das HPK1-Interaktom	79
4.6.1	Signalproteine des HPK1-Interaktoms	79
4.6.2	Zytoskelett-assoziierte Proteine	84
4.6.3	Transmembranproteine	86
4.6.4	Adapterproteine.....	87
4.6.5	Schlussfolgerung.....	88
4.7	Ausblick	89
5	Zusammenfassung	91
6	Abkürzungsverzeichnis.....	94
7	Literaturverzeichnis	98
8	Abbildungsverzeichnis.....	122
9	Tabellenverzeichnis	122
10	Danksagung	123
11	Anhang.....	124
11.1	Curriculum Vitae	124
11.2	Eidesstattliche Versicherung	126

1 Einleitung

Seit ihrer Entdeckung am Ende des 19. Jahrhunderts gelten polymorphkernige neutrophile Granulozyten als Bestandteil des angeborenen Immunsystems und Vermittler einer ersten unspezifischen Immunantwort [1]. Jedoch hat sich dieses Bild eines einfachen Fußsoldaten des Immunsystems in den letzten Jahren deutlich gewandelt. Neben ihrer ursprünglich identifizierten Aufgabe, der Vermittlung der akuten Entzündungsreaktion ausgelöst durch Mikroorganismen oder eine sterile Verletzung [2-4], kann ihnen inzwischen unter anderem auch eine Rolle bei Autoimmunerkrankungen [5-7], Atherosklerose [8], Myokardinfarkten [9], Schlaganfällen [10], bei einem Ischämie-Reperfusionsschaden [11], der Thrombose [12], in Vaskulitiden der kleinen Gefäße [13] und sogar bei der Metastasierung von Tumoren [14-16] zugeschrieben werden.

Somit ist die Identifizierung der molekularen Mechanismen, die der Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten im Kontext pathophysiologischer Vorgänge zugrunde liegen entscheidend, um die pathophysiologischen Prozesse besser zu verstehen und effektive therapeutische Mittel zu deren Bekämpfung zu entwickeln [17, 18].

1.1 Die akute Entzündungsreaktion

Die akute Entzündungsreaktion ist die Antwort des Organismus auf Infektionen oder Gewebsverletzungen und erfordert den koordinierten Transport von Blutbestandteilen wie Plasma und Leukozyten zum Ort der Infektion oder Verletzung [19]. Klinisch äußert sich die akute Entzündung durch die Kardinalsymptome *Rubor* (Rötung), *Calor* (Erwärmung), *Tumor* (Schwellung), *Dolor* (Schmerz) und *Functio Laesa* (Funktionseinschränkung) [20]. Die ersten Zellen, die dabei in das Gewebe auswandern, um die Erreger zu bekämpfen oder Zelltrümmer zu phagozytieren, sind die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten. Sie werden nach ihrer Bildung im Knochenmark ausgeschwemmt und können beim Patrouillieren des Gefäßsystems durch ihre Oberflächenrezeptoren Signale auf aktivierten Endothelien in postkapillaren Venolen im Bereich entzündlicher Gewebe erkennen und an solchen Stellen das Gefäßsystem verlassen. Die Extravasation der neutrophilen Granulozyten unterliegt

streng regulierten Prozessen, die kaskadenförmig ablaufen (siehe Kapitel 1.1.1) und auf molekularer Ebene durch Adhäsionsmoleküle der Integrin- und Selektinfamilie kontrolliert werden [2-4, 17, 18]. Hierbei nehmen in neutrophilen Granulozyten insbesondere die β_2 -Integrine, welche als heterodimere Rezeptoren bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit vorliegen, eine entscheidende Funktion ein (siehe Kapitel 1.2). Nach Extravasation können neutrophile Granulozyten die von infektiösen Mikroorganismen generierten *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMPs) oder durch Gewebeverletzungen entstandenen *Damage-Associated Molecular Patterns* [DAMPs] erkennen [19]. Durch das Aufspüren dieser Muster können die neutrophilen Granulozyten gezielt in die geschädigten Bereiche im Gewebe migrieren. Neben der akuten Entzündungsreaktion spielen neutrophile Granulozyten eine Rolle bei Reparatur- und Heilungsprozessen des Gewebes. Zudem bilden sie Signalstoffe, die weitere Immunzellen anlocken und tragen durch Modulierung der Funktion von B- und T-Lymphozyten zur Regulation des adaptiven Immunsystems bei [21-24].

Die komplexe Regulation von Adhäsionsmolekülen der Integrin- und Selektinfamilie sowie intrazelluläre Signalwege spielen bei der Rekrutierung und Aktivierung neutrophiler Granulozyten im Kontext der akuten Entzündungsreaktion eine große Rolle. Dies wird vor allem bei Patienten deutlich, bei denen eine Fehlregulation dieser Systeme vorliegt. Als Beispiel sei das *Leukocyte Adhesion Deficiency* (LAD) Syndrom genannt, das in vier verschiedene Typen (I-IV) unterteilt werden kann [25-29]. Patienten mit LAD Typ I leiden unter rezidivierenden Bakterien- und Pilzinfektionen aufgrund eines genetischen Defektes in der Expression der β -Untereinheit (CD18) der β_2 -Integrine mit eingeschränkter Adhäsion und verminderter Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten [25, 26]. Obwohl Patienten mit LAD Typ II ein sehr ähnliches klinisches Bild aufweisen, liegt der Defekt hier innerhalb eines Fucosetransporters, der die Funktion der Selektine und damit das Rollen der neutrophilen Granulozyten auf dem Endothel beeinflusst [27, 30, 31]. Des Weiteren spielen Moleküle, die an den Signalwegen der Integrine beteiligt sind, eine wichtige Rolle in der Leukozytenmigration, wie in Patienten mit LAD Typ III bestätigt werden konnte. Diese zeigen eine schwere Blutungsneigung und wiederkehrende Infektionen trotz intakten Rollens und einer normalen Integrinexpression. Jedoch liegt in diesem Fall eine Mutation im Integrinregulator *Kindlin-3* vor, der die volle Aktivierung der β_2 -Integrine

verhindert [28]. Kürzlich wurden zwei Patienten mit einer Mutation im Gen der GTPase Rac2 beschrieben, die ebenfalls anfällig für bakterielle Infektionen waren und unter Neutrophilie litten. Für diese Erkrankung wird die Bezeichnung LAD Typ IV vorgeschlagen [29, 32].

1.1.1 Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten

Die erfolgreiche Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsort erfordert spezifische molekulare Mechanismen, die die einzelnen Schritte der Rekrutierungskaskade (Abb. 1) genauestens regulieren. Dabei unterliegt dieser Prozess einem komplexen Zusammenspiel zwischen Adhäsions- und Signalmolekülen, sowohl der neutrophilen Granulozyten als auch des Endothels [2, 3, 17].

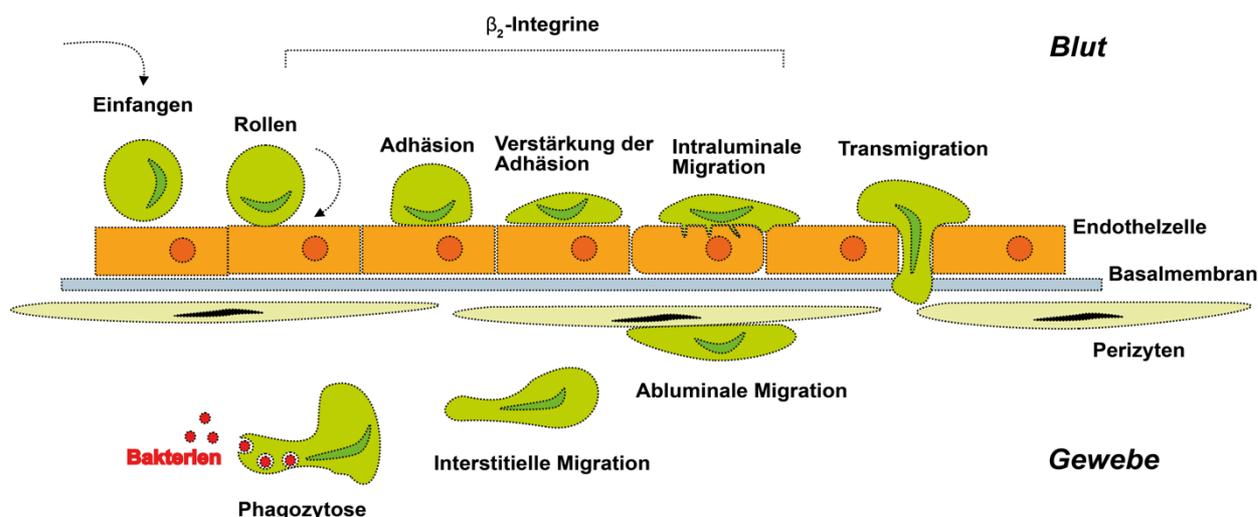


Abbildung 1: Rekrutierungskaskade der neutrophilen Granulozyten. Modifiziert nach Schymeinsky et al., *Trends in Cell Biology* 2011 [33]. Nach dem Selektin-vermittelten Einfangen und Rollen der Leukozyten auf den Endothelzellen folgen die β_2 -Integrin-abhängigen Schritte: Adhäsion, Verstärkung der Adhäsion, intraluminale Migration, Transmigration und abluminale Migration. Gefolgt werden diese von der interstitiellen Migration sowie der Phagozytose pathogener Erreger.

Die im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten werden von der Gefäßwand eingefangen (*Capturing*) und beginnen entlang dieser zu rollen (*Rolling*). Dieser Prozess wird hauptsächlich durch Interaktionen der endothelialen Selektine (P- und E-Selektin) und der Liganden auf den neutrophilen Granulozyten (*P-Selectin Glycopro-*

tein Ligand-1, PSGL-1) vermittelt [34, 35]. Nachfolgend werden durch proinflammatorische Mediatoren auf dem Endothel Signalprozesse in Gang gesetzt, die die β_2 -Integrine auf den neutrophilen Granulozyten von ihrer inaktiven Form in einen Zustand mit intermediärer Affinität bringen [36]. Das hierdurch vermittelte langsame Rollen (*Slow Rolling*) durch Selektine [37] und Integrine [38, 39] auf dem endothelialen *Intercellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) [40, 41] sowie die weitere Exposition von Chemokinen führen zu einer vollen Aktivierung der β_2 -Integrine in einen hochaffinen Zustand (siehe Kapitel 1.2.2.), der die feste Adhäsion ermöglicht [42, 43].

Nach erfolgter Adhäsion sind die β_2 -Integrine dazu befähigt, weitere Signale in die Zelle weiterzuleiten (*Outside-in Signaling*; siehe Kapitel 1.2.3) und somit Postadhäsions-Effekte zu vermitteln. Hierzu zählt die Verstärkung der Adhäsion (*Adhesion Strengthening*) [44, 45], die zu einer Aufrechterhaltung der Adhäsion unter hohen Schubspannungen beiträgt. Diese wird von dem Prozess der zytoskelettalen Reorganisation begleitet, der unter Ausbildung eines Lamellipodiums am führenden Ende der neutrophilen Granulozyten zur Abflachung der Zellen (*Spreading*) führt [46-48]. In diesem Zustand migrieren die neutrophilen Granulozyten im Gefäßlumen (*Intraluminal Crawling*), um eine passende Stelle zur Extravasation zu finden [49]. Letztendlich transmigrieren die neutrophilen Granulozyten durch die Endothelschicht. Dies geschieht entweder über die präferierte parazelluläre Route oder auch über den seltener genutzten transzellulären Weg. [50, 51]. Nach Durchtritt der Basalmembran der postkapillären Venolen erfolgt die abluminale Migration auf den Perizyten (*Abluminal Crawling*), welche ebenfalls durch die β_2 -Integrine vermittelt wird [52, 53]. An diesen Schritt schließt die gerichtete interstitielle Migration im Bindegewebe zum Erreger oder Ort der Inflammation an, die unabhängig von den Integrinen stattfindet [54-56]. Dort kann eine Bekämpfung der Erreger durch die Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten stattfinden (siehe Kapitel 1.1.2). Neuere Studien zeigen, dass neutrophile Granulozyten dazu in der Lage sind, durch den Prozess der reversen Transmigration wieder in das Gefäßsystem einzutreten und auf diese Art möglicherweise eine systemische Inflammation auszulösen [55, 57-59].

1.1.2 Abwehrmechanismen der neutrophilen Granulozyten

Nach der Auswanderung aus dem Blut stehen den neutrophilen Granulozyten vielfältige Abwehrmechanismen zur Verfügung, um körperfremde Erreger und Zellbestandteile zu eliminieren. Zu diesen zählen die Erkennung dieser Strukturen mit anschließender Phagozytose [60-63] und letztendlich der Abtötung durch eine Kombination von zytotoxischen Mechanismen. Diese beinhalten die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [64, 65], die Freisetzung antimikrobieller Peptide [66, 67] und Bildung sogenannter *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) [68-70].

Die Phagozytose der opsonierten Mikroben erfordert unter anderem den Fcγ-Rezeptor (FcRγ) und die β₂-Integrine. Nach Bindung wird der Rezeptor-Liganden-Komplex von der Zellmembran umschlossen und das Phagosom gebildet [60, 61]. Im weiteren Verlauf reift dieses durch Verschmelzung mit Granula, die hydrolytische Enzyme und NADPH-Oxidasen besitzen [62].

Parallel hierzu findet ein vermehrter Sauerstoffverbrauch, der sogenannte *Respiratory Burst* statt, bedingt durch die ROS-Produktion durch die Aktivierung der NADPH-Oxidase [64]. Diese sorgt für einen transmembranären Elektronentransport und Übertragung von Elektronen auf molekularen Sauerstoff. Aus O₂ entsteht hierbei O₂⁻. Die Superoxiddismutase bildet aus O₂⁻ Wasserstoffperoxid (H₂O₂) [71]. Die Myeloperoxidase (MPO) katalysiert die Bildung der hypochlorigen Säure (HOCl) aus H₂O₂. Diese Derivate spielen eine kritische Rolle bei der Eliminierung von Bakterien und Pilzen [65].

Neutrophile Granulozyten speichern ihre Proteasen und antimikrobiellen Peptide in Granula, die entweder bei der Phagozytose mit dem Phagosom oder mit der Zellmembran verschmelzen, um den Inhalt in den extrazellulären Raum abzugeben [66, 67]. Eine erste Gruppe bilden die primären (azurophilen) Granula, die die MPO, antibakterielle Peptide (z.B. Defensine), β-Glucuronidase, Lysozym und Serinproteasen (z.B. Elastase, Cathepsin G, Proteinase 3) enthalten. Sekundäre (spezifische) Granula beinhalten Lactoferrin und Matrixmetalloproteinasen (z.B. MMP8/Kollagenase). Die tertiären Granula tragen die MMP9/Gelatinase. Die letzteren beiden sind zudem Träger von Bestandteilen des NADPH-Oxidase-Komplexes. Neben diesen „klassischen“ Granula existieren sekretorische Vesikel, die hauptsächlich Oberflächenrezeptoren beherbergen [72].

Mit der Entdeckung der NETs wurde eine neue Form des Zelltods (NETosis) beschrieben, bei dem die neutrophilen Granulozyten dekondensiertes Chromatin zusammen mit antibakteriellen Peptiden und Enzymen wie der neutrophilen Elastase oder der MPO in den extrazellulären Raum freisetzen [68]. Die antimikrobielle Wirkung wird durch ein Einfangen der Erreger im Chromatinnetz und durch die Exposition hochkonzentrierter antibakterieller Peptide und Enzyme erreicht [69]. Jedoch existiert auch eine Schattenseite der NETs, die zu verstärkter Inflammation, Sepsis und Autoimmunerkrankungen führt [70].

1.2 β_2 -Integrine

1.2.1 Mitglieder der β_2 -Integrinfamilie

β_2 -Integrine sind eine Gruppe von heterodimeren transmembranären Rezeptoren, bestehend aus einer α - (CD11) und einer β -Untereinheit (CD18). Sie fungieren als aktivierungsabhängige Adhäsionsmoleküle auf der Oberfläche von Immunzellen und vermitteln die Bindung an immobilisierte Liganden auf der Endotheloberfläche oder der extrazellulären Matrix [73-75]. Die Interaktionen der Integrine mit ihren Liganden spielen eine wichtige Rolle bei einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Situationen wie der Entzündungsreaktion [76, 77], Immunantwort [78, 79], Thrombose und Hämostase [80, 81], Tumormetastasierung [82, 83] und weiteren Prozessen. Insgesamt sind 18 unterschiedliche α - und 8 β -Untereinheiten bekannt, die sich zu 24 verschiedenen Integrinen ($\alpha\beta$) zusammenschließen [78, 84]. Davon lassen sich vier Mitglieder der Familie der β_2 -Integrine zuordnen. Diese sind das *Leukocyte Function-associated Antigen 1* (LFA-1, CD11a/CD18, $\alpha_L\beta_2$), das *Macrophage-1 Antigen* (Mac-1, CD11b/CD18, $\alpha_M\beta_2$), p150/95 (CD11c/CD18 $\alpha_X\beta_2$) und das $\alpha_D\beta_2$ -Integrin (CD11d/CD18). Die wichtigste Rolle für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten spielen LFA-1 und Mac-1 [2, 85].

Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit besitzen große Ektodomänen, eine einzelne Transmembrandomäne (TMD) und einen kurzen zytoplasmatischen Anteil [78, 86, 87]. Letzterer ist dazu in der Lage, direkt mit Adaptermolekülen zu interagieren und verschiedene funktionelle Effekte zu vermitteln [88, 89]. β_2 -Integrine sind die wichtigsten Moleküle bei der Rekrutierung von Leukozyten und im Speziellen von neutrophilen Granulozyten zum Entzündungsort [3, 90, 91]. Sie sind involviert beim

langsamen Rollen [92-94], fördern die Adhäsion [42, 95, 96], unterstützen das Abflachen und die Migration der Zellen [97, 98], vermitteln homo- und heterotypische Zell-Zellinteraktionen [79, 99] und wie bereits erwähnt die Phagozytose [76, 100].

1.2.2 Aktivierung der Integrine (*Inside-out Signaling*)

Die β_2 -Integrine regulieren ihr Bindungsverhalten durch das Ändern der Konformation ihrer Ektodomäne [101]. Hierdurch kann die Affinität zu Liganden um den Faktor 10000 erhöht werden [102]. β_2 -Integrine haben mindestens drei verschiedene Konformationszustände mit unterschiedlicher Bindungsaffinität zu ihren Liganden [78, 85, 103, 104]. Die im Blut zirkulierenden inaktiven neutrophilen Granulozyten verfügen über β_2 -Integrine in der gebeugten Form mit geschlossenem Kopfteil der Ektodomäne und niedriger Ligandenaffinität (Abb. 2 A). Weitere Aktivierung führt zu einem Übergang in die gestreckte Form mit geschlossenem Kopfteil und intermediärer Affinität (Abb. 2 B). Die dritte Form stellt die gestreckte, offene Konformation mit hoher Affinität dar (Abb. 2 C). Das Erreichen dieses Zustandes erlaubt die weitere Signaltransduktion in das Zellinnere (*Outside-in Signaling*). Neuere Forschungsergebnisse berichten von einem vierten Zustand, bei dem sich zwar der Kopfteil der Ektodomäne öffnet, aber die Beugung der Ektodomänen erhalten bleibt [105].

Für die Erklärung der Prozesse, die eine Aktivierung der β_2 -Integrine vom Zustand niedriger Affinität bis zur hochaffinen Form ermöglichen, gibt es hauptsächlich zwei verschiedene Modelle. Das erste, das sogenannte „Schnappmesser“ (*Switchblade*)-Modell postuliert, dass für das Auseinanderweichen der transmembranären Domänen der α - und β -Untereinheit zuerst die Streckung der Integrine in der Knieregion durch vorherige Umstrukturierung im Bereich der *Metal Ion-Dependent Adhesion Site* (MIDAS) erforderlich ist [78, 101, 106, 107]. Im alternativen „Türriegel“ (*Deadbolt*)-Modell halten Interaktionen des Kopfteils mit dem restlichen Integrin dieses im geschlossenen, gebeugtem Zustand. Die Extension ist erst durch ein „Öffnen“ des „Türriegels“, also der Dissoziation der Untereinheiten möglich und eine vierte offene, gebeugte Konformation daher denkbar [85, 105, 108].

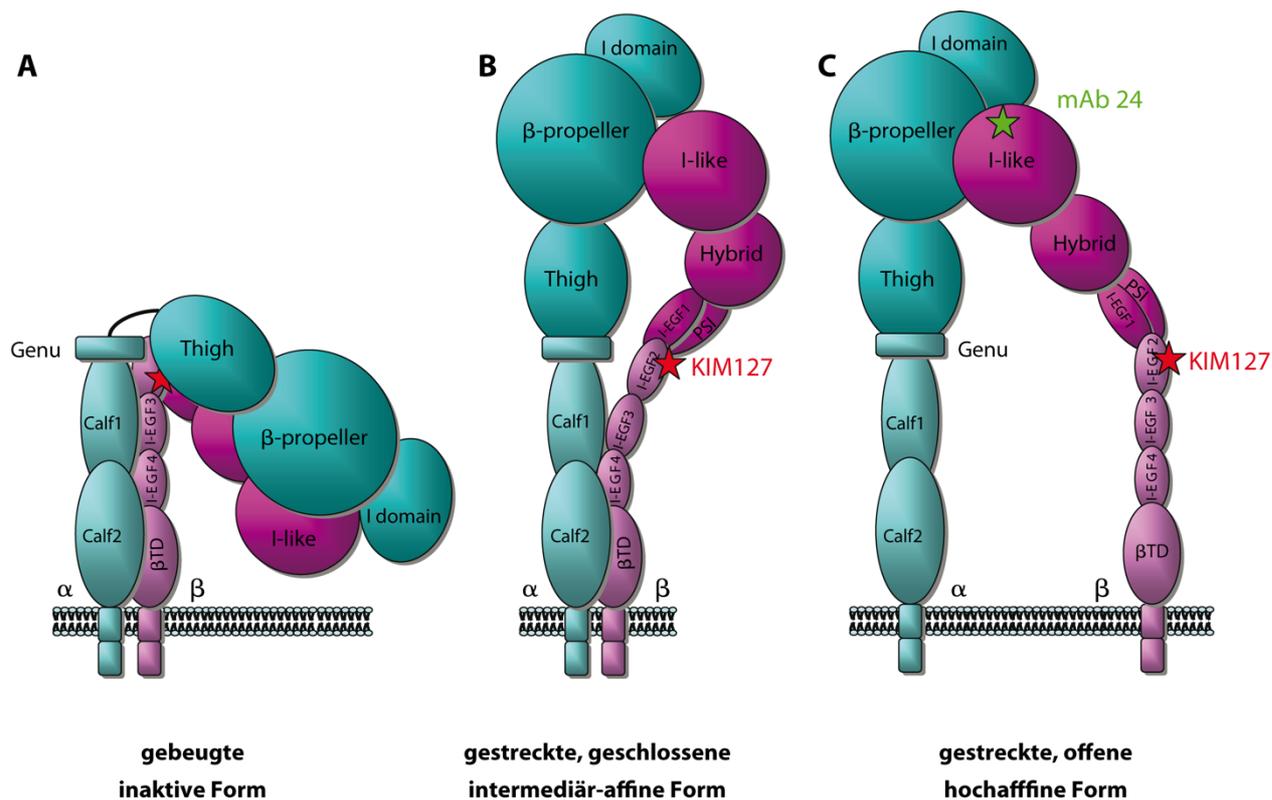


Abbildung 2: Aktivierung der β_2 -Integrine (Inside-out Signaling). Modifiziert nach Evans et al., *Journal of Cell Science* 2009 [103]. Gezeigt werden die verschiedenen Affinitätszustände der β_2 -Integrine. Diese sind heterodimere Rezeptoren und bestehen aus einer α - (CD11) und einer β -Untereinheit (CD18). Auf nicht aktivierten, im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten liegen sie in der gebeugten inaktiven Form vor (A). Durch Interaktion mit P- und E-Selektin auf der Oberfläche des Endothels erreichen sie eine gestreckte, geschlossene Form mit intermediärer Affinität (B). Durch weitere Signalprozesse, zum Beispiel der Aktivierung durch Chemokine gelangen sie in die gestreckte, offene Form mit hoher Affinität (C). Die verschiedenen Affinitätszustände lassen sich durch Reporterantikörper detektieren. Ab der intermediär-affinen Form werden sie durch den Antikörper KIM127 (roter Stern) und in der hochaffinen Form durch den Antikörper mAb24 (grüner Stern) erkannt.

Während des Rollens kommt es zu einer Interaktion von endothelalem E- und P-Selektin mit dem PSGL-1 der neutrophilen Granulozyten, welches sich hauptsächlich in den Spitzen der Mikrovilli befindet [109-111]. Die weiteren PSGL-1-vermittelten Signalprozesse führen zu einer Aktivierung der β_2 -Integrine in den gestreckten Zustand mit intermediärer Affinität und langsamen Rollen auf ICAM-1 [36, 112]. Insbesondere spielen hierbei die Phosphorylierung der *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs* (ITAM)-tragenden Seitenketten des *DNAX-activation Protein 12* (DAP12) durch Kinasen der *Src*-Familie (SFKs) und letztendlich die Rekrutierung der *Spleen Tyrosine Kinase* (Syk) eine entscheidende Rolle [36, 112]. Für die Überführung der β_2 -Integrine in die hochaffine Form mit gestreckten, offenem Zustand der

Ektodomänen (Abb. 2 C) und die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten sind weitere Chemokin-vermittelte Signalprozesse erforderlich [42, 43]. Die Rezeptoren der Chemokine sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) mit sieben Transmembrandomänen, die an das heterotrimere G-Protein mit einer einzelnen α -Untereinheit und dem gepaarten $\beta\gamma$ -Komplex gekoppelt sind [113]. Mehrere Chemokinrezeptoren werden in Leukozyten exprimiert und leiten die Adhäsion ein. Am besten untersucht ist der *C-X-C Chemokine Receptor Type 2* (CXCR2), der die Chemokin (C-X-C Motiv) Liganden (CXCL) 1-3 und 5-7 binden kann [85, 114]. Die genauen Signalwege zur Aktivierung der β_2 -Integrine sind jedoch nur teilweise bekannt und erfordern neben des GPCR-Signalweges *Src Homology 2-Domain Containing Leukocyte-Specific Phosphoprotein of 76 kDA* (SLP-76), *Adhesion and Degranulation Promoting Adaptor Protein* (ADAP), Phospholipase $C\gamma_2$ (PLC γ_2), PI3K γ , *Guanine Nucleotide Exchange Factors* (GEFs) und Rap1 [18, 36, 92, 94].

1.2.3 Signaltransduktion in das Zellinnere (*Outside-in Signaling*)

Nach erfolgter Aktivierung der Integrine (*Inside-out Signaling*) kann eine weitere Signaltransduktion in das Zellinnere erfolgen, welche Postadhäsion-Effekte wie die Verstärkung der Adhäsion (*Adhesion Strengthening*), die Abflachung der Zellen (*Spreading*) und die Migration der neutrophilen Granulozyten ermöglicht. Außerdem führen diese Signalwege zur Degranulierung und Aktivierung der NADPH-Oxidase mit anschließender ROS-Produktion wie in Kapitel 1.1.2 beschrieben.

Die Bindung der β_2 -Integrine in hochaffiner Form an ihre Liganden auf dem Endothel (z.B. ICAM-1) führt zu einer zweifachen Phosphorylierung der ITAM-tragenden Seitenketten von DAP12 und FcR γ (Abb. 3 A) durch die SFKs Fgr, Lyn und Hck, die zu einer Aktivierung und Translokation von Syk ins Lamellipodium führt [115]. Die Tyrosinkinase Syk spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Adhäsion der neutrophilen Granulozyten und weiteren Postadhäsions-Effekten *in vivo* [116]. Syk bindet mit ihren beiden *src-Homology 2* (SH2)-Domänen an die phosphorylierten Tyrosinreste der ITAMs. Von dort aus vermittelt Syk die weiteren Signalwege durch Interaktionen mit der *Phosphatidylinositol-3-Kinase δ* (PI3K δ) (bestehend aus den Untereinheiten p110 und p85), dem *Mammalian Actin-Binding Protein 1* (mAbp1) und dem GEF Vav1, dessen Aktivierung die Reorganisation des Zytoskeletts indu-

ziert [17]. Weiterhin werden PLC γ und SLP-76 aktiviert [117-121]. Die Aktivierung dieser Signalmoleküle als Teil des *Outside-in Signalings* spielt eine entscheidende Rolle für die Postadhäsions-Effekte in neutrophilen Granulozyten. Diese führen durch die Reorganisation des Zytoskeletts zu einer Verstärkung der Adhäsion (*Adhesion Strengthening*), der Ausbildung eines Lamellipodiums mit Zellabflachung (*Spreading*) und anschließender intraluminaler Migration, der Phagozytose, der Degranulation sowie der ROS-Produktion [122, 123].

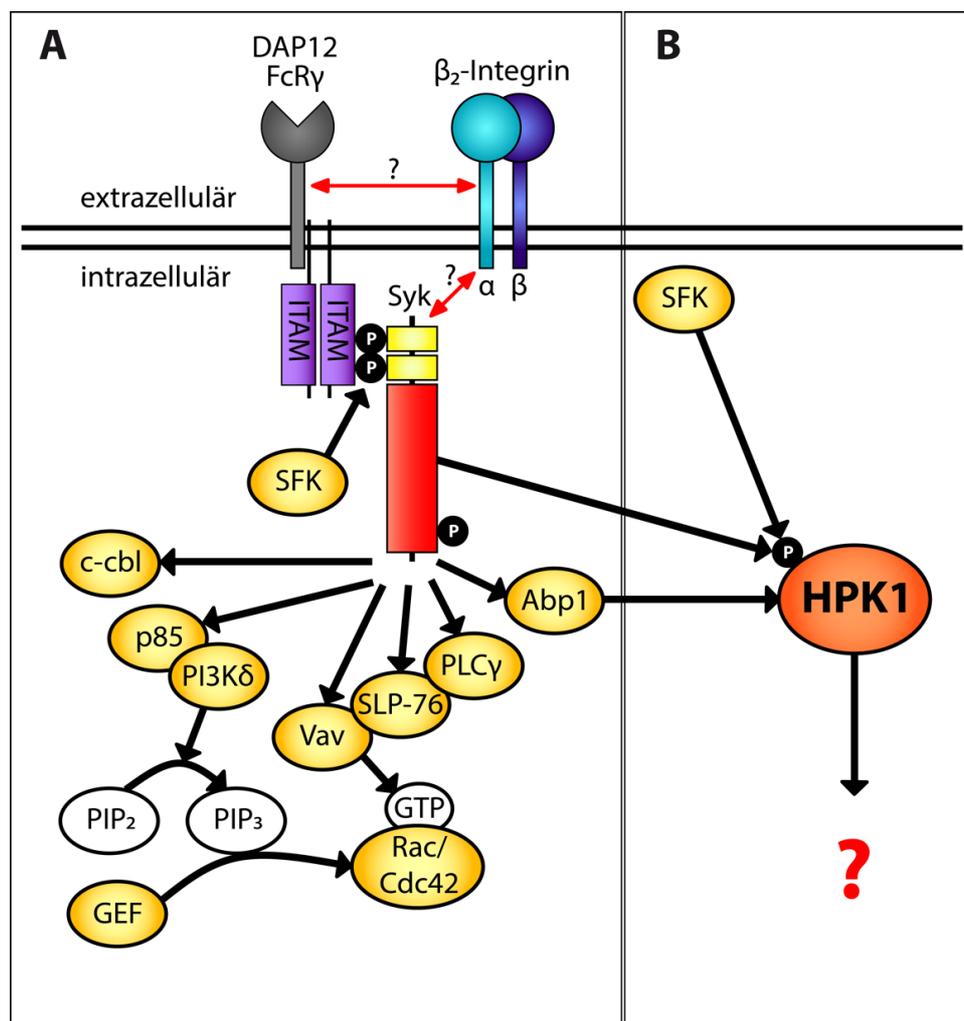


Abbildung 3: Signaltransduktion in das Zellinnere (*Outside-in Signaling*). Modifiziert nach Schymeinsky et al., *Thrombosis Haemostasis* 2007 [121]. (A) Nachdem die β_2 -Integrine ihre hochaffine Form erreicht haben, kann eine weitere Signaltransduktion in das Innere der Zelle erfolgen. Hierbei werden die ITAM-Reste von DAP12 und FcR γ durch die SFKs an Tyrosinresten phosphoryliert und Syk über deren beiden SH2-Domänen an diese phosphorylierten Motive gebunden. Syk interagiert nachfolgend mit den Molekülen c-cbl, p85, PI3K δ , Vav, SLP-76, PLC γ und mAbp1. (B) Letzteres ist ein Interaktionspartner von HPK1. HPK1 wird von den SFKs und Syk phosphoryliert. Die weiteren Interaktionspartner von HPK1 in neutrophilen Granulozyten sind weitgehend unbekannt.

Das Aktin-bindende mAbp1 spielt durch die Stabilisierung der hochaffinen Form der β_2 -Integrine ebenfalls eine Rolle in den Schritten nach der Adhäsion von neutrophilen Granulozyten. Die Defekte bei dessen Abwesenheit in neutrophilen Granulozyten kommen jedoch nur unter Flussbedingungen zum Vorschein und sind unter statischen Bedingungen nicht vorhanden [33, 124, 125]. Die *Hematopoietic Progenitor Kinase 1* (HPK1) (Abb. 3 B) kann konstitutiv mit mAbp1 in differenzierten Neutrophilen-ähnlichen dHL-60 Zellen präzipitiert werden und co-lokalisiert in aktivierten Zellen mit dem Aktin-bindenden Protein im Lamellipodium [126]. mAbp1 könnte hierbei wie im spezifischen Immunsystem HPK1 mit dem Zytoskelett verbinden [127]. Die weiteren Interaktionspartner und Signalproteine von HPK1 im angeborenen Immunsystem sind bisher jedoch unbekannt. In B- und T-Lymphozyten kann ein Zusammenhang zwischen HPK1 und Syk hergestellt werden, da Syk nach Rezeptorstimulation und vorheriger Aktivierung durch die SFKs zusammen mit diesen eine Phosphorylierung von HPK1 an dessen Tyrosinresten vornehmen und so weitere Interaktionen ermöglichen kann [128-132].

1.3 Die Hematopoietic Progenitor Kinase 1 (HPK1)

1.3.1 Die Struktur von HPK1

HPK1 oder auch *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase 1* (MAP4K1) gehört zur Familie der Ste20-ähnlichen Kinasen. Neben ihr lassen sich *Germinal Center Kinase* (GCK/MAP4K2), *Germinal Center Kinase-Like Kinase* (GLK/MAP4K3), *HPK/GCK-like Kinase* (HGK/MAP4K4), *Kinase Homologous to SPS/Ste20* (KHS/MAP4K5) und *Misshappen-Like Kinase* (MINK/MAP4K6) in diese Familie einordnen [133]. HPK1 ist eine 97 kDa Serin/Threonin-Kinase mit strukturellen Ähnlichkeiten zu der Ste20-Kinase der Hefe, der *p21Cdc42/Rac1-Activated Kinase* (PAK) [134] und der *Germinal Center Kinase* (GCK) [135]. Ursprünglich wurde sie als spezifischer Aktivator der *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK) beschrieben [134, 135]. Während der Embryogenese ist eine Expression von HPK1 in einer Vielzahl von Geweben zu beobachten, welche sich nach der Geburt auf die Lungen, Lymphknoten, den Thymus, die Leber, die Niere, das Gehirn und das Knochenmark beschränkt [135]. Bei adulten Organismen findet sich eine vorwiegende HPK1-Expression in Zellen des hämatopoetischen Systems [134, 135].

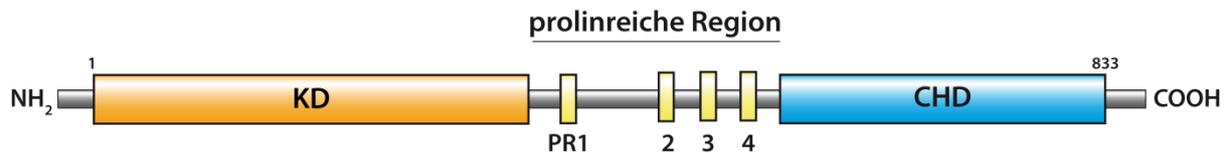


Abbildung 4: Struktur von HPK1. N-Terminus liegt die Kinasedomäne (KD) mit Ser-/Thr-Kinaseaktivität. Gefolgt wird diese von vier prolinreichen Regionen (PR), die als Interaktionsstellen für die SH3-Domänen verschiedener Adaptermoleküle dienen. Am C-Terminus liegt die *Citron Homology* Domäne (CHD), welche eine regulatorische Funktion hat.

An ihrem N-Terminus befindet sich eine Kinasedomäne, welche dazu in der Lage ist, Serin- und Threoninreste verschiedener Proteine zu phosphorylieren. Im sich daran anschließenden Teil befinden sich vier prolinreiche Domänen (PR), die *src-Homology 3* (SH3)-Domänen verschiedener Interaktionspartner binden können (Abb. 4) [134, 135]. Des Weiteren befindet sich zwischen der ersten und zweiten prolinreichen Domäne eine Schnittstelle für Caspasen. Während der Apoptose wird HPK1 an einer konservierten Caspaseschnittstelle (DDVD, Aminosäuren 382-385) von der Caspase 3 gespalten. Das N-terminale Spaltprodukt verfügt über eine intakte, verstärkte Kinaseaktivität, ist aber unfähig, Adapterproteine wie das *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2* (Grb2) und das *Adapter Molecule crk* (Crk) zu binden. Das C-terminale Produkt hingegen zeigt ein intaktes Bindungsverhalten, jedoch mit geringerer Effizienz als das komplette HPK1-Protein [136]. Am C-terminalen Ende befindet sich eine sogenannte *Citron Homology* Domäne (CHD), welche regulatorische Funktionen innerhalb des HPK1-Signalweges einnimmt [137-140]. Der Abbau von HPK1 erfolgt über eine Ubiquitinierung durch die Ligase *CUL7/Fbxw8*- mit anschließender Proteasom-vermittelter Degradierung [141, 142].

1.3.2 Interaktionspartner und Substrate von HPK1

Um ihre zahlreichen Funktionen innerhalb der regulatorischen Prozesse verschiedener Zellfunktionen wahrzunehmen, spielt die Bindung von HPK1 an Adapterproteine und Signalmoleküle sowie deren Phosphorylierung eine wichtige Rolle. Diese Interaktionen können entweder über eine der vier prolinreichen Domänen von HPK1 mit einer SH3-Domäne der Interaktionspartner oder über einen der 13 phosphorylierbaren Tyrosinreste (pTyr) in HPK1 mit einer SH2-Domäne des Bindungspartners statt-

finden. Für das adaptive Immunsystem sind viele dieser Interaktionspartner und Substrate bereits beschrieben (siehe Abb. 5) [143].

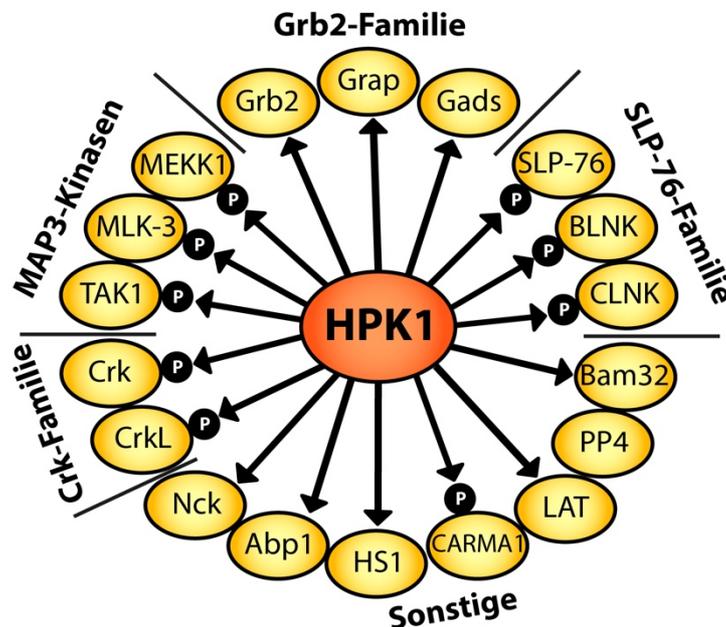


Abbildung 5: Interaktionspartner und Substrate von HPK1 im adaptiven Immunsystem. Dargestellt sind die bekannten Interaktionspartner von HPK1 im adaptiven Immunsystem. Sofern diese auch ein Substrat von HPK1 sind, wurde dies durch eine Phosphatgruppe (P) kenntlich gemacht.

HPK1 zeigt Autophosphorylierung [135] und spielt als MAP4-Kinase eine Rolle im MAPK-Signalweg. Es findet eine direkte Interaktion von HPK1 mit der MAP3-Kinase *MAPK/ERK Kinase Kinase 1* (MEKK1) und Phosphorylierung dieser statt [134]. Die *Mixed Lineage Kinase 3* (MLK-3) ist eine weitere MAP3-Kinase, die am Serinrest 281 (Ser281) von HPK1 phosphoryliert wird [144]. Zudem kann die *TGF- β -activated Kinase 1* (TAK1) als dritte beschriebene MAP3-Kinase von HPK1 phosphoryliert werden [145].

Als Verbindung zu den transmembranären Wachstumsrezeptoren bindet HPK1 das *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2* (Grb2) über dessen SH3-Domäne. Diese Interaktion kann zwar nicht durch Stimulation des *Epidermal Growth Factor Receptors* (EGFR) induziert werden, aber der HPK1-Grb2-Komplex wird nach Bindung zum autophosphorylierten EGFR rekrutiert [146, 147]. Mit dem *Grb2-Related Adap-*

ter Protein 2 (Grap2/Gads), welches spezifisch im lymphatischen Gewebe exprimiert wird, ist ein weiterer Vertreter der Grb2-Familie als Adapterprotein von HPK1 bekannt. Eine Co-Expression von Gads und HPK1 führt zu einer verstärkten Kinaseaktivität von HPK1 und JNK [148]. Die Interaktion findet zwischen der C-terminalen SH3-Domäne von Gads und der prolinreichen Region von HPK1 statt [149]. Ebenso zeigt das *Grb2-Related Adapter Protein* (Grap) als dritter Vertreter der Familie eine ähnliche Struktur und ein Bindungsverhalten wie Grb2. Durch Knockdown-Experimente konnte zudem gezeigt werden, dass die Funktionen von Grb2 und Grap überlappen [128, 130, 150].

Weiterhin bindet HPK1 an die SH3-Domäne der beiden Vertreter der Crk-Familie *Adapter Molecule crk* (Crk) und *Crk-Like Protein* (CrkL). Die Interaktion resultiert in einer Aktivierung von HPK1 mit folgender Aktivierung von JNK. Beide Moleküle werden an Serin- und Threoninresten von HPK1 phosphoryliert [130, 147, 150].

In B-Zellen konnte gezeigt werden, dass HPK1 nach einer B-Zellrezeptor (BCR)-Stimulation an Tyrosinresten, vor allem Tyr379, phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung ist hauptsächlich auf die Tyrosinkinase Syk und Lyn zurückzuführen. Sie führt zu einer Bindung von HPK1 an die SH2-Domäne des *B-Cell Linker Protein* (BLNK) [129]. Analog hierzu bindet das Tyr379-phosphorylierte HPK1 an SLP-76 in T-Zellen [131]. Der *Cytokine-Dependent Hematopoietic Cell Linker* (CLNK) bildet neben SLP-76 und BLNK das dritte Mitglied der SLP-76 Familie. Es wird nur in Zytokin-stimulierten hämatopoetischen Zellen exprimiert und zeigt ebenfalls eine Bindung zu HPK1, die nach Stimulation der Immunrezeptoren verstärkt werden kann. Außerdem besitzt CLNK die Fähigkeit, in SLP-76-defizienten Jurkat T-Zellen die Defekte in den Immunrezeptorsignalwegen teilweise zu kompensieren [151].

Eine wichtige Interaktion geht HPK1 mit mAbp1 (HIP-55) ein. Hierbei interagiert die zweite prolinreiche Domäne (PR2) von HPK1 mit der SH3-Domäne von mAbp1. Die konstitutive Interaktion der beiden kann sowohl mit rekombinanten Proteinen sowie in HEK-293T-Zellen gezeigt werden und führt bei einer Überexpression von mAbp1 zu einer verstärkten Kinaseaktivität von HPK1 und JNK [127, 152, 153]. In mAbp1-defizienten Jurkat T-Zellen dementsprechend ist die Aktivierung der beiden Kinasen deutlich herabgesetzt [153]. Dabei lokalisiert der mAbp1-HPK1 Komplex nach T-Zellrezeptor (TCR)-Stimulation im Bereich der Kontaktstelle zwischen T-Zellen und

antipräsentierenden Zellen (APCs) und führt zu einer Herunterregulierung des TCRs [153, 154]. Zudem kann HPK1 in dHL-60 Zellen konstitutiv mit mAbp1 präzipitiert werden und co-lokalisiert mit diesem im Bereich des Lamellipodiums [126].

Das *Non-Catalytic Region of Tyrosine Kinase Adaptor Protein* (Nck) besitzt eine SH2- und drei SH3-Domänen und kann direkt mit HPK1 interagieren können. Es vermittelt Ras- und JNK-Signalwege sowie die Aktinpolymerisierung und Reorganisation des Zytoskeletts [130, 146]. Ein positiver Regulator von HPK1, der diese direkt bindet, ist die *Serine/Threonine Protein Phosphatase 4* (PP4). Sie zeigt eine Phosphataseaktivität gegenüber HPK1 und führt so zu einer Aktivierung, einer erhöhten Halbwertszeit und verminderten Ubiquitin-vermittelten Degradierung von HPK1 [155]. Ein weiteres Adapterprotein von HPK1, das auch in der Aktivierung des NFκB-Signalwegs eine Rolle spielt, ist das *CARD-Containing MAGUK Protein 1* (CARMA1). Dieses wird bei der Interaktion mit HPK1 an den Serinresten 549, 551 und 552 (Ser549, Ser551 und Ser552) phosphoryliert [156]. Der *Linker for Activated T-cells* (LAT) wird nach TCR Stimulation von Syk/ZAP-70 phosphoryliert und vermittelt weitere Prozesse in Ca²⁺-Signalwegen und der Ras-MAPK Aktivierung. HPK1 kann mit dem phosphorylierten LAT interagieren, jedoch nur auf indirektem Weg über Grb2 oder Gads [130]. Des Weiteren interagiert HPK1 mit dem *Hematopoietic Cell-Specific Protein 1* (HS1), das nach Epo-Rezeptorstimulation aktiviert wird und eine Rolle im JNK/SAPK Signalweg spielt [157, 158]. Zudem kann in B-Zellen das *B-Cell Adaptor Molecule of 32 kDa* (Bam32) als dualer Adapter für Phosphotyrosine und 3-Phosphoinositide durch HPK1 gebunden werden [159].

1.3.3 HPK1-vermittelte Signalwege

1.3.3.1 Der JNK/SAPK-Signalweg

Wie ursprünglich beschrieben, spielt HPK1 eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung des JNK/SAPK-Signalwegs bei Stressantworten [134, 135]. Dieser Signalweg kann durch die inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF-α bei Zellverletzung durch Hitze, UV-Licht, ionisierende Strahlung, Chemotherapeutika und osmotische Schockzustände hervorgerufen werden [160-162]. In COS1-Zellen wird dieser Signalweg nach Transfektion mit mHPK1 cDNA spezifisch aktiviert. Die weiteren Sig-

nalwege werden hierbei über die MAP3-Kinasen TAK1 und MLK-3 sowie den MAP2-Kinasen *SAPK/ERK Kinase 1* (SEK1) und *MAP Kinase Kinase 7* (MKK7) vermittelt [145, 163-165]. Ebenso zeigt sich eine erhöhte JNK-Aktivität bei der Überexpression von HPK1 in humanen Jurkat T-Zellen [128]. Bei Überexpression einer HPK1-Mutante ohne Kinaseaktivität (HPK1-M46) bleibt die verstärkte Aktivität von MEKK1 und JNK aus [134, 166]. Die Expression der Kinase-defizienten SEK1, die von MEKK1 aktiviert wird, hat denselben Effekt [134]. Der Mechanismus der HPK1-Aktivierung kann in Jurkat T-Zellen gezeigt werden. In der Gegenwart von genotoxischen Substanzen, findet in diesen Zellen eine Translokation von c-Abl aus dem Zellkern in das Zytoplasma statt. Dieses ist in der Lage, HPK1 zu binden und dessen Kinaseaktivität und folglich die Aktivierung der JNK/SAPK zu steigern [167]. Primäre T-Zellen aus HPK1^{-/-}-Mäusen zeigen im Vergleich zu T-Zellen aus HPK1^{+/+}-Mäusen keinen Defekt in der JNK-Aktivierung nach TCR-Stimulation, was an der weiteren negativen Regulierung des TCR durch HPK1 liegen könnte [168]. Bei Spaltung durch die Caspase 3 zeigt der N-terminale Anteil weiterhin eine intakte Aktivierung der JNK [140]. Interessanterweise findet durch HPK1 keine Aktivierung von ERK oder der p38-MAPK statt [134, 135].

1.3.3.2 Der NFκB-Signalweg

Eine weitere Rolle spielt HPK1 im NFκB-Signalweg, welcher ebenfalls im Rahmen einer zellulären Stressantwort aktiviert wird. Hier werden sowohl die durch Zellstimulation aktivierte α-Untereinheit der *Inhibitor of Nuclear Factor-κB Kinase* (IKK-α) als auch die konstitutiv aktive IKK-β von HPK1 reguliert. Beide phosphorylieren die inhibitorischen κB-Proteine (IκB) und werden durch HPK1 über MEKK1 aktiviert [156, 164]. Die Aktivierung dieses Signalweges ist dabei unabhängig von dem der JNK/SAPK. Dies spiegelt sich in der Tatsache wider, dass in SEK1-defizienten Zellen die JNK/SAPK-Aktivierung vermindert ist, aber der NFκB-Signalweg unbeeinflusst bleibt. Des Weiteren spielt HPK1 ihre Rolle oberhalb der IKK-β, wie durch die Expression einer dominant negativen IKK-β gezeigt werden kann [169]. Der Knockdown von HPK1 durch siRNA führt zu einer deutlich reduzierten IKK- und NFκB-Aktivität nach TCR-Stimulation [138, 156]. Hierfür könnte die Interaktion und Phosphorylierung des Adapters CARMA1 an Ser551 durch HPK1 verantwortlich sein [156]. Weiterhin ist für eine Aktivierung der JNK/SAPK das alleinige Vorhandensein

der N-terminalen Kinasedomäne von HPK1 ausreichend, wohingegen die Aktivierung von NF κ B HPK1 in ihrer vollen Länge erfordert. Der durch die Caspase 3 abgespaltene C-Terminus zeigt sogar einen inhibierenden Effekt auf letzteren Signalweg [136, 169]. Die C-terminale Region könnte hier mit der intakten HPK1 um die Bindung von CARMA1 konkurrieren [156].

1.3.3.3 Signalwege bei Apoptose und Differenzierung

Neben den beschriebenen zellulären Stressantworten nimmt HPK1 auch eine Funktion in der Entscheidung des Schicksals der Zellen ein, insbesondere innerhalb der Apoptose und Differenzierung von Leukozyten. Eine Überexpression von HPK1 in CD4⁺-T-Zellen fördert die spontane und die TCR/CD3-vermittelte Apoptose [137]. Dies wird bewerkstelligt durch eine vermehrte Expression des Fas-Liganden (FasL) und einer verstärkten ROS-Produktion. In weiteren Schritten wird HPK1 durch die Caspase 3 proteolytisch gespalten. Der N-Terminus zeigt dabei weiterhin eine Kinaseaktivität, wohingegen der C-terminale Anteil eine inhibierende Wirkung auf das Zellüberleben mit dem NF κ B-Signalweg hat [137, 138]. Auch der aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD), welcher über den FasL vermittelt wird, ist nach TCR-Stimulation durch HPK1 verstärkt [138, 139]. Während der Differenzierung von Monozyten kommt es zu einer streng kontrollierten Spaltung von HPK1 durch die Caspase 3, welche nicht in der Apoptose endet, sondern zu einer Differenzierung der Monozyten führt [140]. HPK1 wird daher häufig eine Rolle als eine Art Schalter zugeschrieben, der je nach Caspaseaktivität zwischen Leben und Tod der Zellen entscheidet [138-140, 170].

1.3.3.4 TCR- und BCR-vermittelte Signalwege

Auch die Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) und des B-Zell-Rezeptors (BCR) sowie deren weitere Signalwege werden von HPK1 beeinflusst. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer verstärkten Aktivität von HPK1 [128, 130]. So wird nach TCR-Stimulation ein Signalkomplex um das Adapterprotein SLP-76 bestehend aus PLC γ 1, Gads, Vav, Nck, ITK, ADAP und HPK1 gebildet [143]. Während dieses Prozesses wird HPK1 an ihren Tyrosinresten phosphoryliert [130, 171]. Für diese Aktivierung sind die Kinasen Src und Syk/ZAP-70 sowie die Adapterproteine LAT,

SLP-76, BLNK, Grb2 und Grap erforderlich [128, 168, 171]. Das Tyrosinphosphorylierte HPK1 kann anschließend mit der SH2-Domäne des SLP-76 interagieren [130, 143]. Für die Relokalisierung von HPK1 an die Plasmamembran ist ebenfalls eine Tyrosinphosphorylierung von HPK1 durch Lck und eine Bindung an das Adapterprotein CLNK erforderlich. Zur vollen Aktivierung von HPK1 sind weitere Phosphorylierungen an den Stellen Thr165 und Ser171 durch die Proteinkinase D (PKD) nötig [132]. Weitere Interaktionen nach TCR-Stimulation mit Grb2, Nck, Crk und CrkL können in Jurkat T-Zellen gezeigt werden [130]. Nach Aktivierung von HPK1 phosphoryliert diese SLP-76 an Ser376. Dies führt zu einer weiteren Bindung der 14-3-3 Proteine an SLP-76 [168, 172]. Die Phosphorylierung von SLP-76, das Binden der 14-3-3 Proteine und weitere Threonin-Phosphorylierung von Gads durch HPK1 führt zur Auflösung der Signalmolekül-Mikrocluster durch Entkopplung von SLP-76-Gads vom Transmembranadapter LAT [173]. Eine Überexpression von HPK1 vermindert die TCR-vermittelte Aktivierung von AP-1 und ERK2, wohingegen die HPK1 *Kinase-Dead* Mutante (HPK1-KD) diese Antworten potenziert [128, 174]. HPK1 zeigt sich auch in weiteren Experimenten als negativer Regulator der TCR-vermittelten Signalwege und T-Zell-vermittelten Immunantworten [128, 168, 174].

Eine ähnliche Rolle als negativer Regulator findet sich auch im BCR-Signalweg. HPK1 vermindert dort die BCR-induzierte Zellaktivierung und Proliferation [175, 176]. In primären HPK1^{-/-}-B-Zellen ist die Aktivierung des Adapters BLNK, der PLCγ2, der Ca²⁺-Signalwege, Erk, p38, JNK und des IKK-Komplexes nach BCR-Stimulation im Vergleich zu HPK1^{+/+}-B-Zellen erhöht [176]. Nach BCR-Stimulation wird HPK1 an Tyr379 durch die Kinasen Syk und Lyn phosphoryliert [128, 129] und so eine Interaktion von HPK1 und BLNK induziert [129, 131]. Die negative Rolle wird weiter durch die HPK1-vermittelte Thr152-Phosphorylierung von BLNK verursacht. Dieses bindet dadurch an 14-3-3 Proteine, wird ubiquitiniert und im Proteasom degradiert [176].

1.3.4 Die Rolle von HPK1 für die Leukozytenrekrutierung

Neben ihrer Funktion in den bereits beschriebenen Signalwegen, nimmt HPK1 eine entscheidende Rolle in der Rekrutierung von Leukozyten ein. Wie in Kapitel 1.1.1 beschrieben stellen die β₂-Integrine ein zentrales Element der Leukozytenrekrutierung dar. In T-Zellen kann die Affinität der β₂-Integrine (*Inside-out Signaling*) durch

die Bindung des TCR an einen Liganden erhöht werden. Hierbei kommt es zu einer Bindung von ADAP an SLP-76 [177, 178]. ADAP bindet SKAP-55 und RIAM und transloziert an die Zellmembran um Rap1 zu rekrutieren. Das aktive Rap1 bindet RapL und führt zu einer Aktivierung des β_2 -Integrins LFA-1 [178-180]. HPK1 konkurriert mit ADAP um die Bindung zu SLP-76 und führt über eine verminderte Rap1-Aktivierung zu einer verminderten Aktivität von LFA-1. HPK1^{-/-}-T-Zellen zeigen eine verstärktes Bindungsverhalten zu ICAM-1 und ein vermehrtes *Spreading* im Vergleich zu HPK1^{+/+}-T-Zellen [178].

Die negative Rolle von HPK1 in der Integrinaktivierung und Zelladhäsion kann auch in B-Lymphozyten gezeigt werden. WEHI-231 B-Zellen, bei denen die HPK1-Expression durch *Small Hairpin RNA* (shRNA) verringert wird, haben eine erhöhte basale Rap1-Aktivierung und verstärkte Bindung zum β_2 -Integrinliganden ICAM-1. Dies geschieht unabhängig von der PI3K oder der PLC, jedoch bildet HPK1 einen Komplex mit dem SKAP55-Homolog (SKAP-HOM) [175], welches für die B-Zelladhäsion erforderlich ist [181]. Auch in B-Lymphozyten aus HPK1^{-/-}-Mäusen kann eine erhöhte Reaktivität der Zellen auf diverse Stimuli im Vergleich zu HPK1^{-/-}-B-Lymphozyten gezeigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wird HPK1 in Lymphozyten eine negative Rolle bei der Integrinaktivierung sowie der zellulären Aktivierung mit anschließender Adhäsion an Liganden zugeschrieben [175].

In murinen neutrophilen Granulozyten spielt HPK1 eine Rolle bei der LFA-1-vermittelten Adhäsion unter Flussbedingungen. Hierbei wird HPK1 für die CXCL1-vermittelte Aktivierung von LFA-1 in den hochaffinen Zustand benötigt. Bei Abwesenheit von HPK1 sind die β_2 -Integrin-vermittelten Schritte der Rekrutierungskaskade, darunter die Induktion der Adhäsion, die Abflachung der Zellen (*Spreading*), die Verstärkung der Adhäsion (*Adhesion Strengthening*) und die gerichtete Migration unter Fluss (*directed Mechanotactic Crawling*), beeinträchtigt. Dies kann sowohl in isolierten neutrophilen Granulozyten, als auch *in vivo* im Modell des entzündeten *M. cremaster* nachgewiesen werden [126]. Eine wichtige Interaktion zeigt sich hierbei zu mAbp1, dessen Abwesenheit ähnliche Defekte in den neutrophilen Granulozyten zeigt [33, 124]. Im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem zeigt sich HPK1 hier somit als positiver Regulator der β_2 -Integrine, der die Adhäsion der neutrophilen Granulozyten fördert [126].

1.3.5 HPK1 im klinischen Kontext

Die physiologische Relevanz von HPK1 kann durch die Generierung einer HPK1^{-/-}-Maus gezeigt werden. Die Abwesenheit von HPK1 hat keinen Einfluss auf T- und B-Zellentwicklung und die erzeugten Mäuse sind lebensfähig und fruchtbar [168, 174, 176, 182]. Die isolierten T-Zellen zeigen jedoch eine erhöhte Aktivierung und Proliferation nach TCR-Stimulation und eine vermehrte Produktion von IL-2, IFN- γ und IL-4. In B-Lymphozyten ist die Produktion von verschiedenen IgM- und IgG-Isoformen erhöht [168]. In Krankheitsmodellen sind HPK1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu HPK1^{+/+}-Kontrolltieren anfälliger für Autoimmunerkrankungen wie der experimentellen Autoimmunenkephalitis (EAE) [168]. Im humanen System zeigen CD4⁺-T-Zellen, die aus Patienten mit systemischen Lupus erythematoses (SLE) isoliert werden, eine deutlich erniedrigte Expression von HPK1 auf Protein- und mRNA-Niveau. Diese Zellen zeigen zudem eine erhöhte Proliferation und Reaktivität. Sobald man jedoch HPK1 in diesen Zellen überexprimiert, verringert sich die T-Zellreaktivität [183]. Eine verminderte HPK1-Expression kann auch in Patienten mit Psoriasisarthritis festgestellt werden [184].

Ein gezieltes Ausschalten beider HPK1-Allele in murinen CD4⁺-T-Zellen führt zu einer gesteigerten TH1-vermittelten Cytokinproduktion, einer vermehrten Proliferation der T-Zellen und einer Resistenz gegen die PGE₂-vermittelte Suppression, dessen Ausschüttung normalerweise im Tumorbett stattfindet. Mäuse, die einen adoptiven Transfer von HPK1^{-/-}-T-Zellen erhalten, werden resistent gegen weiteres Tumorstadium im Lungenkarzinom-Modell. Durch einen zusätzlichen Verlust von HPK1 in dendritischen Zellen können in diesen die Antigenpräsentation und das anti-Tumorpotential der T-Zellen weiter verstärkt werden [185].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Es konnte bereits gezeigt werden, dass HPK1 eine wichtige Rolle in den Signalwegen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems einnimmt. Hierbei kann sie insbesondere in neutrophilen Granulozyten die Zelladhäsion beeinflussen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die möglichen Mechanismen zu entschlüsseln, über die HPK1 die β_2 -Integrin-vermittelte Rekrutierung neutrophiler Granulozyten kontrolliert und die Interaktionspartner von HPK1 in neutrophilen Granulozyten zu identifizieren.

Zum einen sollte geklärt werden, ob HPK1 eine Rolle in der Aktivierung der β_2 -Integrine (*Inside-out Signaling*) oder der weiteren Signaltransduktion in das Zellinnere (*Outside-in Signaling*) spielt. Hierfür wurden die Genotypen der verwendeten HPK1^{+/+}- und HPK1^{-/-}-Versuchstiere mittels Polymerase-Kettenreaktion analysiert und neutrophile Granulozyten aus deren Knochenmark isoliert. Mit diesen sollten Flusskammer-Experimente zur Evaluation der Verstärkung der Adhäsion (*Adhesion Strengthening*) durchgeführt. Hierzu sollten die neutrophilen Granulozyten mit immobilisierten CXCL1 stimuliert werden, um eine physiologische Entzündungsreaktion zu simulieren und unter ansteigender Schubspannung mögliche Defekte in der Verstärkung der Adhäsion der HPK1^{-/-} neutrophilen Granulozyten zu analysieren. Anschließend sollte mit dem gleichen experimentellen Aufbau eine Stimulation mit Mn²⁺ durchgeführt werden, um das *Inside-out Signaling* zu umgehen und zu testen, ob das weitere *Outside-in Signaling* intakt war.

Um zu ermitteln, ob HPK1 für das Erreichen der intermediär-affinen oder der hochaffinen Form der β_2 -Integrine benötigt wird, sollten die Reporterantikörper KIM127 und mAb24 eingesetzt werden. Da diese Antikörper nur im humanen System funktionieren, sollte zunächst ein Modellsystem etabliert werden, in dem die Expression von HPK1 durch die Transduktion von shRNA-kodierenden Vektoren in einer humanen Leukämiezelllinie (HL-60) vermindert war.

Um weiterhin zu klären, über welche Interaktionspartner HPK1 ihre Effekte im angeborenen Immunsystem ausübt, sollte eine HPK1-EGFP-cDNA generiert und diese durch lentiviralen Gentransfer in einer HL-60 Zelllinie zur Expression gebracht werden. Nach der Charakterisierung dieser Zellen sollte eine Co-Immunpräzipitation mit differenzierten HL-60 (dHL-60) Zellen und GFP-NanoTraps® durchgeführt werden. Die präzipitierten Proteine sollten anschließend durch die Analyse in der Massenspektrometrie identifiziert werden.

Insgesamt sollte die vorliegende Arbeit zum genaueren Verständnis der Rolle von HPK1 in neutrophilen Granulozyten beitragen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylamid (30%), β -Mercaptoethanol, Bromphenolblau, Calciumchlorid, Diisopropylfluorophosphat (DFP), Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol (DTT), Essigsäure (96%), Ethanol (70% und 100%), Ethylendiaminessigsäure (EDTA), Glycin, Glycerin, HCl, Hefeextrakt, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES), Isopropanol, Magermilchpulver, Magnesiumchlorid, Mangan(II)-chlorid-tetrahydrat, Methanol (100%), Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumdesoxycholat, Natriumdodecylsulfat (SDS), Natriumfluorid (NaF), Natriumorthovanadat (NaO), Paraformaldehyd (PFA), Ponceau S-Lösung, Spectinomycin-Dihydrochlorid, Tetramethylethylenamin (TEMED), Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), Tris-Cl, Triton® X-100, Trypanblau und Trypton wurden von der Firma Applichem (Darmstadt, Deutschland) geliefert. *BD FACS Lysing Solution* wurde von BD Biosciences (Franklin Lakes, USA) bezogen. *Fetal Calf Serum* (FCS), *Hanks Buffered Salt Solution* (HBSS), Penicillin/Streptomycin (P/S), *Phosphate Buffered Saline* (PBS), RPMI-1640 Zellkulturmedium und Trypsin/EDTA (TE) stammten von der Biochrom AG (Berlin, Deutschland). Die GFP-Trap® Agarose (GFP-NanoTraps®) stammten von Chromotek (Martinsried, Deutschland). Agarose LE, sowie *GelRed* stammten von Genaxxon in Ulm. Die *Antarctic Phosphatase* mit Reaktionspuffer, der *Color Prestained Protein Standard Broad Range (P7712)*, die DNA-Leitern *100 bp DNA-Ladder*, *2-log DNA-Ladder* und *1 kbp DNA-Ladder*, Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP)-Mix, der *Gel Loading Dye Blue*, die Restriktionsenzyme mit Puffern (1.1, 2.1, CutSmart), T4-DNA-Ligase und die Taq-DNA-Polymerase wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt am Main, Deutschland) geliefert. *CloneAmp HiFi PCR Premix* und *MidiGreen* wurden von Nippon Genetics Europe (Darmstadt, Deutschland) erworben. Das *In-Fusion HD® Cloning Kit* wurde von Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, USA) bezogen. rmCXCL1 (KC), humanes CXCL8 (IL-8), rekombinantes murines und humanes ICAM-1 stammten von der Firma Peprotech (Hamburg, Deutschland). Ammoniumpersulfat (APS) und Coomassie R250 stammte von Serva (Heidelberg, Deutschland). Von Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) wurde bovines Serumalbumin (BSA), N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), Gluko-

se, 4-Nitrophenylphosphat-di(tris)-Salz (pNPP), murines Percoll[®], der *Protease Inhibitor Cocktail* (P8340), Puromycin-Dihydrochlorid und Tween 20 geliefert. *DNA Loading Dye*, AlexaFluor[®] 546 Phalloidin, *Lipofectamine[®] 2000*, *Opti-MEM[®] I Reduced Serum Medium*, *Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate*, *ProLong[™] Diamond Antifade Mountant* und die *Qubit Assay Kits: dsDNA (HS)*, *dsDNA (BR)* und *Protein* wurden bei Thermo Fisher (Waltham, USA) bestellt.

2.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer und Standardlösungen wurden mit ultrareinem destillierten Wasser angesetzt (Millipore, Darmstadt, Deutschland). Hitzestabile Lösungen wurden autoklaviert und alle übrigen Lösungen durch einen Filter mit der Porengröße von 0,2 µm steril filtriert.

Adhäsionsmedium I

0,25% BSA
0,1% Glukose
20,0 mM HEPES
1,2 mM CaCl₂
1,0 mM MgCl₂
in HBSS, pH 7,5

Adhäsionsmedium II

0,1% Glukose
20,0 mM HEPES
1,2 mM CaCl₂
1,0 mM MgCl₂
in 0,9% NaCl, pH 7,5

TAE-Puffer (50-fach)

242 g Tris
57,1 ml Essigsäure
100 ml EDTA (0,5 M)
auf 1,0 l H₂O
pH 8,0

Berton II Lysepuffer

25 mM Tris-Cl
150 mM NaCl
0,5 mM EDTA
1 mM DTT
1% TritonX-100
1% Na-Deoxycholat
pH 7,5

Laemmli-Puffer (2-fach)

125 mM Tris
4% SDS
20% Glycerol
0,01% Bromphenolblau
200 mM β-MercaptoEtOH

TBS (25-fach)

219 g NaCl
151,25 g Tris
auf 1,0 l H₂O

5% Sammelgel

5% Acrylamid
 125 mM Tris-Cl (pH 6,8)
 0,1% SDS
 0,1% APS
 0,1% TEMED
 in H₂O

8% Trenngel

8% Acrylamid
 375 mM Tris-Cl (pH 8,8)
 0,1% SDS
 0,1% APS
 0,1% TEMED
 in H₂O

**Lysogeny Broth
(LB)-Medium**

25 g Trypton
 12,5 g Hefe
 25 g NaCl
 auf 2,5 l H₂O
 pH 7,0

WB-Transferpuffer

25 mM Tris
 192 mM Glycin
 20% Methanol
 in H₂O
 pH 8,3

Coomassie-Lösung

0,125% Coomassie R 250
 50% Methanol
 10% Essigsäure
 39,875% H₂O

Entfärber

50% Methanol
 7,5% Essigsäure
 42,5% H₂O

SDS-Laufpuffer (10-fach)

30,2 g Tris-Base
 144 g Glycin
 10 g SDS
 auf 1,0 l H₂O

IP-Dilutionspuffer I

25 mM Tris-Cl
 150 mM NaCl
 0,5 mM EDTA
 1 mM DTT, pH 7,5

IP-Dilutionspuffer II

25 mM Tris-Cl
 150 mM NaCl
 0,5 mM EDTA
 pH 7,5

Western Blot**(WB)-Waschpuffer**

40 ml TBS (25-fach)
 0,1% Tween 20
 auf 1,0 l H₂O

Blockierungspuffer

5% Magermilch
 in WB-Waschpuffer

Stripping-Puffer

15 g Glycin
 1,0 g SDS
 10 ml Tween 20
 auf 1,0 l H₂O, pH 2,2

NEB 1.1

10 mM Bis-Tris-Propane-HCl
 10 mM MgCl₂
 100 µg/ml BSA
 pH 7

NEB 3.1

50 mM NaCl
 50 mM Tris-HCl
 10 mM MgCl₂
 100 µg/ml BSA
 pH 7,9

CutSmart Puffer

50 mM Kaliumacetat
 20 mM Trisacetat
 10 mM Magnesiumacetat
 100 µg/ml BSA
 pH 7,9

**Massenspektrometrie
(MS)-Ladepuffer**

2% ACN
0,3% TFA
in H₂O

**Massenspektrometrie
(MS)-Waschpuffer I**

1% TFA
in 2-Propanol

**Massenspektrometrie
(MS)-Waschpuffer II**

0,2% TFA
in H₂O

2.1.3 Antikörper

anti-Aktin I-19

Ziege, polyklonal, IgG
Cat # sc-1616
Santa Cruz Biotechnology

anti-β-Aktin C-4

Maus, monoklonal, IgG₁
Cat # sc-47778
Santa Cruz Biotechnology

anti-HPK1 N-19

Ziege, polyklonal, IgG
Cat # sc-6231
Santa Cruz Biotechnology

anti-HPK1 C-9

Maus, monoklonal, IgG_{2b}
Cat # sc-376169
Santa Cruz Biotechnology

anti-HIP-55 H-87

Kaninchen, polyklonal, IgG
Cat # sc-366772
Santa Cruz Biotechnology

anti-GFP FL

Kaninchen, polyklonal, IgG
Cat # sc-8334
Santa Cruz Biotechnology

anti-Human CD11a

Maus, monoklonal (Klon G43-25B),
IgG_{2a}, PE-konjugiert
Cat # 555380
BD Biosciences

anti-Human CD11b

Maus, monoklonal (Klon ICRF44), IgG₁,
PE-konjugiert
Cat # 555388
BD Biosciences

anti-Human CD18

Maus, monoklonal (Klon 6.7), IgG₁,
PE-konjugiert
Cat # 555924
BD Biosciences

anti-Human CD18 (KIM127)

Maus, monoklonal, IgG₁
CRL-2838
ATCC

anti-Human CD18 (mAb24)Maus, monoklonal, IgG₁

Cat # HM2183

Hycult Biotech

anti-Maus IgG Alexa Fluor 488

Ziege, polyklonal, IgG

Cat # A11017

Thermo Fisher Scientific

anti-Maus HRP

Ziege, polyklonal, IgG

HRP-konjugiert

Cat # sc-2005

Santa Cruz Biotechnology

anti-Kaninchen HRP

Ziege, polyklonal, IgG

HRP-konjugiert

Cat # sc-2004

Santa Cruz Biotechnology

anti-Ziege HRP

Kaninchen, polyklonal, IgG

HRP-konjugiert

Cat # 401515

Merck Milipore

anti-Human IgG₁

Maus, polyklonal (Klon MOPC-21), IgG

PE-konjugiert, Isotypenkontrolle

Cat # 555749

BD Biosciences

anti-Human IgG_{2a}

Maus, polyklonal (Klon G155-178),

IgG

PE-konjugiert, Isotypenkontrolle

Cat # 555574

BD Biosciences

anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor 647

Esel, polyklonal, IgG

Cat # A31573

Thermo Fisher Scientific

2.1.4 Versuchstiere

Die HPK1^{-/-}-Mäuse tragen eine PGK1-Neomycinselektionskassette in Exon 1 des HPK1-Gens mit vollständig unterbrochener Proteinexpression [182]. Die HPK1^{-/-}- und HPK1^{+/-}-Versuchstiere wurden in einem C57BL/6 Hintergrund gezüchtet. Alle Tierversuche in dieser Arbeit wurden von der Regierung in Oberbayern in München genehmigt.

2.1.5 Zelllinien

Die humane Promyelozyten-Leukämie Zelllinie HL-60 (ACC3) und die murine myelomonozytäre Leukämie Zelllinie WEHI-3B (ACC26) stammten von der Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen in Braunschweig (Deutschland). Die verwendeten HEK-293T-Zellen (CRL-11268) wurden von der American Type Culture Collection (Manassas, USA) bezogen. Die Bakterienstämme TOP10 wurden bei Invitrogen (Carlsbad, USA) und die *Stellar Competent Cells* von Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, USA) erworben.

2.1.6 Geräte

Analysenwaage

PT 610

Sartorius, Göttingen, Deutschland

Feinwaage

BP 61

Sartorius, Göttingen, Deutschland

Wärmeschrank

Hybridiser HB-1D

Techne, Jahnsdorf, Deutschland

Zellkultur-Inkubator

Heraeus Function Line

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Lichtmikroskop

Axiovert 200M

Zeiss, Oberkochen, Deutschland

Lichtmikroskop

Olympus-CKX41

Olympus, Tokio, Japan

Licht- und Fluoreszenzmikroskop

Leica DM IL LED

Leica, Solms, Deutschland

Konfokalmikroskop

Leica SP8X WLL

Leica, Solms, Deutschland

Fluorometer

Qubit 2.0

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Durchflusszytometer

BD FACS Canto II

BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Geldokumentationssystem

E-Box-VX2/20M

PEQLAB, Erlangen, Deutschland

CCD-Kamera

CoolSNAP HQ2

Photometrics, Tucson, USA

pH-Meter

MP220

Mettler-Toledo, Gießen, Deutschland

Zentrifuge

Centrifuge 5810R

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Thermocycler

UNO II

Biometra, Göttingen, Deutschland

SDS-PAGE Elektrophoresekammer*Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell*

Bio-Rad, Hercules, USA

Elektroblotter*Semi-Dry Elektroblotter PerfectBlue™*

PEQLAB, Erlangen, Deutschland

Thermoschüttler

Thermomixer compact

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Western Blot Dunkelkammer

Darkbox Type 4

Unit One, Birkerød, Dänemark

CCD-Kamera

Hamamatsu Orca

Hamamatsu, Hamamatsu, Japan

Zentrifuge

Centrifuge 5415R

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Zentrifuge

Labofuge 400R

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Thermocycler

TProfessional

Biometra, Göttingen, Deutschland

Spannungsquelle

peqPOWER 250

PEQLAB, Erlangen, Deutschland

Horizontalelektrophorese Apparatur

PerfectBlue™

PEQLAB, Erlangen, Deutschland

2.1.7 Software

Für das Anfertigen dieser Arbeit und Erstellen der Abbildungen wurden die *Microsoft Office* Programme *Word*, *Excel* und *Powerpoint 2010* (Microsoft, Redmond, USA), sowie der *Adobe Illustrator* und *Photoshop CS4* (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) verwendet. Zur weiteren Bildbearbeitung und Mikroskopie wurden *Metamorph* (Molecular Devices, Sunnyvale, USA), *ImageJ* (National Institute of Health, Bethesda, USA) mit den Plugins *Fiji* und *Biovoxxel*, *HoKaWo* (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) und die *Leica Application Suite* (Leica, Solms, Deutschland) verwendet. Bei der durchflusszytometrischen Analyse wurden die *FACSDiva* (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) und *FlowJo* Software (Tree Star, Ashland, USA) verwendet. Vektorkartenerstellung und Restriktionsanalysen erfolgten mit *pDRAW32* (Acaclone Software, Frederiksberg, Dänemark). Die Daten der DNA-Sequenzierung wurden mit dem *GATC-Viewer* (GATC Biotech, Konstanz, Deutschland) und *Clustal Omega* (Conway Institut, Dublin, Irland) ausgewertet. Die statistische Analyse der Daten erfolgte mit dem Programm *GraphPad PRISM 6* (GraphPad Software, La Jolla, USA).

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von murinen neutrophilen Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten wurden aus dem Knochenmark der HPK1^{+/+}- und HPK1^{-/-}-Mäuse gewonnen. Nach Ausbluten der Versuchstiere in tiefer Narkose wurden die langen Röhrenknochen Humerus, Femur und Tibia entnommen und vom restlichen Muskelgewebe befreit. Durch Entfernung der Epiphysen wurde das Knochenmark offengelegt. Dieses wurde durch das Aufsetzen einer 30 G Kanüle auf einer 20 ml Spritze mit kaltem PBS aus den Knochen gespült und aufgefangen. Die gesammelte Zellsuspension wurde filtriert und durch Zentrifugation pelletiert. Nach Resuspension in 1 ml PBS wurden diese auf einen diskontinuierlichen Percoll-Gradienten (72%, 64%, 52%) aufgetragen, um die unterschiedlichen Zellfraktionen durch Zentrifugation bei 1000 g für 30 min aufzutrennen. Die Phase zwischen den beiden unteren Percollschichten (72% und 64%) enthielt die murinen neutrophilen Granulozyten. Diese wurde entnommen und in PBS gewaschen.

Die Kultivierung der neutrophilen Granulozyten erfolgte über Nacht bei 37° C und 5% CO₂. Verwendet wurde das Zellkulturmedium RPMI-1640 mit einem Zusatz von FCS (10%) und Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml). Dieses wurde mit einem Verhältnis von 1:10 mit dem IL-3-haltigen Überstand der WEHI-3B-Zelllinie versetzt.

Die Zählung der Zellen erfolgte mit der Fast-Read 102[®] Zählkammer (Biosigma, Cona, Italien) nach einer Färbung mit einer 0,05%-igen Trypanblaulösung, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die Thermocycler Uno II und TProfessional der Firma Biometra (Göttingen, Deutschland) verwendet. Für die Genotypisierung der HPK1^{-/-}- und HPK1^{+/+}-Versuchstiere wurde ein Ansatz für die Wildtyp (WT)-PCR und ein weiterer für die Knockout (KO)-PCR mit den entsprechenden Primern (siehe Tab. 1) angesetzt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für eine Probe war hierbei wie folgt:

5 µl Polymerase-Reaktionspuffer (5x)
 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM)
 0,25 µl *Forward* (fwd)-Primer (10 mM)
 0,25 µl *Reverse* (rev)-Primer (10 mM)
 13,8 µl autoklaviertes Milipore H₂O
 0,20 µl Taq-Polymerase (1 U/µl)

Von jedem Reaktionsansatz wurden nach gründlichem Mischen 20 µl in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und 5 µl des DNA-Isolats hinzugegeben. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit H₂O an Stelle des DNA-Isolats und als Positivkontrolle bereits eindeutig genotypisierte DNA-Isolate von HPK1^{+/+}- und HPK1^{-/-}-Tieren verwendet. Die PCR erfolgte unter den Bedingungen wie in Tab. 1 dargestellt. Jedes PCR-Programm wurde zusätzlich durch einen Denaturierungsschritt für 5 Minuten bei 94° C eingeleitet und mit einem siebenminütigen Elongationsschritt bei 72 °C beendet. Nach Beendigung des PCR-Programmes erfolgte die Lagerung der Proben bei 4° C.

Amplifikat	PCR-Programm	Fragmentgröße	Primer 5' – 3' – Richtung (<i>fwd</i> : forward; <i>rev</i> : reverse)
HPK1 ⁺ -Gen (WT-Primer)	1 min 94° C 1 min 54° C 1 min 72° C 40 Zyklen	200 bp	<i>fwd</i> : TTCTGTCTCCTCCACCACAACC <i>rev</i> : CCATCTTCACCATCTTCAAAGCC
HPK1 ⁻ -Gen (KO-Primer)	1 min 94° C 1 min 54° C 1 min 72° C 40 Zyklen	470 bp	<i>fwd</i> : GGATGCCCCAATTAAGTGAAAG <i>rev</i> : CCGGTGGATGTGGAATGTGTG

Tabelle 1: Bedingungen der Genotypisierungs-PCR der Versuchstiere. Dargestellt sind die PCR-Ansätze für das HPK1⁺- und HPK1⁻-Gen mit den PCR-Programmen, den erwarteten Fragmentgrößen sowie der Sequenzen der verwendeten WT- und KO-Primer. Die PCR wurde mit einem Denaturierungsschritt bei 94° C für 5 Minuten gestartet und mit einem siebenminütigen Elongationsschritt bei 72° C beendet.

2.2.3 High Fidelity Polymerase-Kettenreaktion (HiFi-PCR)

Zur Generierung des HPK1-EGFP-Expressionsvektors in einem lentiviralem Grundgerüst, mit zusätzlicher Puromycin-Resistenz, wurde die *High Fidelity* Polymerase-Kettenreaktion (HiFi-PCR) mit dem Kit der Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, USA) durchgeführt. Ziel hierbei war es, das linearisierte *Insert* (HPK1-EGFP) und den linearisierten lentiviralen Zielvektor mit Puromycin-Resistenz (pFu-P2A-Puro) zu erzeugen, die später für die homologe Rekombination in der *In-Fusion® HD* Klonierung verwendet wurden. Zu diesem Zweck wurden die *forward (fwd)*- und *reverse (rev)*-Primer bei der Firma Metabion (München, Deutschland) so synthetisiert, dass je 18-20 Basen am HPK1-EGFP Konstrukt banden, welches in linearer Form amplifiziert werden sollte. Je 15 weitere Basen hingen am 5'-Ende des *fwd*- und *rev*-Primers über. Diese waren zu den Endstücken des linearisierten pFu-P2A-Puro-Vektors identisch und konnten so für eine homologe Rekombination genutzt werden (siehe Tab. 2). Die Primer zur Linearisierung des pFu-P2A-Puro-Vektors wurden so gewählt, dass ein linearer Vektor entstand, an dessen 5'-Ende ebenfalls die 15 homologen Basenpaare lagen, gefolgt von einem 2A Peptid (P2A)-Linker und der Puromycinresistenz (siehe Tab. 2). Das 3'-Ende enthielt weitere 15 Basenpaare, die zu den Überhängen des HPK1-EGFP Konstrukts homolog waren. Die PCR-Reaktionsätze wurden hierfür wie folgt hergestellt:

12,5 µl *CloneAmp HiFi PCR Premix (2x)*
 100 ng Insert (pEGFP-N1+HPK1) oder 33 ng pFu-P2A-Puro
 1 µl *fwd*-Primer (5 µM)
 1 µl *rev*-Primer (5 µM)
 auf 25 µl autoklaviertes Milipore H₂O

Jeder Reaktionsansatz wurde anschließend in ein PCR-Reaktionsgefäß überführt und in einen PCR-Cycler gegeben. Für die beiden gewünschten Produkte wurde das jeweilige PCR-Programm wie in Tab. 2 dargestellt, eingestellt. Zudem wurde für beide PCR-Reaktionen ein Temperaturgradient (*) gewählt. Zusätzlich zu dem dargestellten Programm erfolgte bei beiden PCRs 30 Sekunden die Denaturierung der DNA bei 98° C und am Ende eine fünfminütige Extensionsphase bei 72° C. Die amplifizierten linearisierten Vektoren wurden bis zum Auftragen auf ein Agarosegel mit anschließender Gelextraktion für die *In-Fusion® HD* Klonierung bei -20° C geschützt gelagert.

Amplifikat	PCR-Programm	Primer 5' – 3' – Richtung (<i>fwd</i> : forward; <i>rev</i> : reverse)
HPK1-EGFP	10 sec 98° C 15 sec 58-64° C* 20 sec 72° C 35 Zyklen	<i>fwd</i> : CTCGAGCTCAAGCTTATGGACGTCGTGGACCCTGA <i>rev</i> : GGTGGCGCCGCTGCCCTTGTACAGCTCGTCCATGC
pFu-2A-Puro	10 sec 98° C 15 sec 63-66° C* 20 sec 72° C 35 Zyklen	<i>fwd</i> : GGCAGCGGCGCCACCAACTT <i>rev</i> : AAGCTTGAGCTCGAGCCCGGATC

Tabelle 2: PCR-Cycler Programme für die HiFi-PCR. Dargestellt sind die Zeitintervalle und Temperaturen der einzelnen PCR-Phasen. Hierbei wurde für die Proben ein Temperaturgradient (*) angewandt, um später das optimale PCR-Ergebnis zu bestimmen. Zudem sind *fwd*- und *rev*-Primer für die jeweiligen Produkte dargestellt.

2.2.4 DNA-Isolation

Zur Gewinnung des Analysenmaterials zur Genotypisierung der HPK1^{+/+}- und HPK1^{-/-}-Versuchstiere wurde die genomische DNA aus Gewebeproben der Mäuse gewonnen. Die DNA-Isolation wurde mit Hilfe des PEQLAB *peqGold Tissue DNA Mini Kits* (Erlangen, Deutschland) durchgeführt.

2.2.5 DNA-Analyse

Restriktionsverdau: Restriktionsanalysen wurden durchgeführt, um einen ersten Anhaltspunkt für die erfolgreiche Klonierung der einzelnen HPK1-EGFP-Konstrukt-Vektoren und das Ergebnis der *HiFi*-PCR zu erhalten. Die für den Restriktionsverdau verwendeten Enzyme und Puffer wurden von der Firma New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) bezogen. Die Puffer wurden entsprechend der optimalen Aktivität der Restriktionsenzyme gewählt. Für jede Restriktionsanalyse wurde pro Probe der folgende Reaktionsansatz und der Verdau bei einer für das Restriktionsenzym optimalen Temperatur auf einem Thermoschüttler für 60 Minuten inkubiert:

1 µl Restriktionsenzym
1 µg DNA
2 µl 10x NEB-Puffer (1.1, 3.1 oder CutSmart)
auf 20 µl H₂O

Die entstandenen Produkte wurden entweder auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt oder für die weiteren Klonierungsschritte durch Ligation verbunden.

DNA-Konzentrationsbestimmung: Zur Messung der DNA-Konzentration wurde das Qubit Fluorometer 2.0 mit dem Doppelstrang-DNA (dsDNA) *Broad Range (BR)* und *High Sensitivity (HS)* Kit der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet. Mit den beiden definierten mitgelieferten Standardproben wurde eine Standardkurve erstellt. Um die DNA-Konzentration der Proben zu bestimmen, wurde für jede Probe 1 µl des konzentrierten Qubit Assay-Reagenzes mit 199 µl des Verdünnungspuffers vermischt. Von dieser Mischung wurden 199 µl entnommen und in ein dünnwandiges 500 µl PCR-Röhrchen überführt. Zu dieser wurde 1 µl der gewünschten DNA-Probe pipettiert. Nach gründlichem Vermischen wurde das Reaktionsgefäß in das Qubit 2.0 Fluorometer gestellt und anhand der erstellten Standardkurve die DNA-Konzentration bestimmt.

Sequenzierung: Die Sequenzierung der DNA erfolgte bei der Firma GATC (Konstanz, Deutschland). Hierfür wurden die Proben über eine Mini- bzw. Maxipräparation aufgereinigt und durch Verdünnen mit ultrareinem H₂O auf eine Konzentration von 50-100 µg/ml gebracht.

2.2.6 DNA-Gelelektrophorese

Um die DNA-Fragmente der Genotypisierungs-PCR, der HiFi-PCR und der Restriktionsanalysen entsprechend ihrer Größe aufzutrennen, erfolgte eine Agarose-Gelelektrophorese mit horizontalen Elektrophoresekammern der Firma PEQLAB (Erlangen, Deutschland). Zu diesem Zweck wurden Agarosegele auf der Basis des TAE-Puffers in der Konzentration von 1-2% gegossen, mit einer DANN-interkalierenden Substanz (0,01% MidoriGreen) der Firma Nippon Genetics Europe (Düren, Deutschland) versetzt und mit 20-zahnigen Kämmen versehen. Nach dem

Aushärten der Gele, wurden die Proben mit einem 6-fachen Ladefarbstoff der Firma New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) 1:6 verdünnt und in die Taschen des Agarosegels geladen. Zur Analyse der Größe der DNA-Fragmente wurden DNA-Leitern verschiedener Größe (100 bp, 1 kbp, 2-log) derselben Firma geladen. Anschließend erfolgte die Elektrophorese in einem TAE-Pufferbad bei 120 V für bis zu 2 Stunden. Die Aufnahme des Gels erfolgte in einem Geldokumentationsgerät der Firma PEQLAB (Erlangen, Deutschland) unter Bestrahlung mit UV-Licht, um die DNA-interkalierende Substanz sichtbar zu machen. Über eine angeschlossene Kamera wurden Aufnahmen angefertigt und im TIFF-Format abgespeichert.

2.2.7 DNA-Gelextraktion

Die zu extrahierenden Plasmide oder linearen Vektoren wurden wie oben beschrieben auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde unter einer möglichst kurzen UV-Licht Exposition, um mögliche Mutationen der DNA zu vermeiden, eine Aufnahme im Geldokumentationsgerät angefertigt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit der gewünschten Größe durch ein Skalpell erneut unter kurzer UV-Licht Exposition ausgeschnitten. Die vom Gel losgelösten Stücke wurden darauffolgend in zuvor abgewogene 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die weitere Präparation der DNA erfolgte mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kits* der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Anschließend wurde die DNA-Konzentration der in Elutions-Puffer gelösten Proben gemessen und die Proben bei -20° C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.8 Klonierung

Vektordephosphorylierung: Um zu verhindern, dass die durch Restriktionsenzym geschnittenen Vektoren sich bei der Ligation wieder schließen ohne ein *Insert* aufzunehmen, wurde die 5'-Phosphatgruppe durch Vektordephosphorylierung entfernt. Pro 5 µg DNA wurde 1 µl des 10-fach *Antarctic Phosphatase Reaction* Puffers und 1 µl der *Antarctic Phosphatase* eingesetzt. Dieser Ansatz wurde vorsichtig vermischt und für 5'-Überhänge oder *Blunt-Ends* für 15 Minuten und bei 3'-Überhängen für 60 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte anschließend

bei 70° C für 5 Minuten. Die dephosphorylierten Produkte wurden der Ligation zugeführt.

Ligation: Die durch Restriktionsverdau behandelten Vektoren wurden nach Gelextraktion mit anschließender Aufreinigung und Vektordephosphorylierung durch die Ligation zu einem neuen Vektor verbunden. Hierbei wurden das durch NheI- und EcoRV-Verdau gewonnene HPK1-EGFP-Konstrukt und der mit NheI- und Eco53kI-Verdau geöffnete pEGFP-N1-Vektor mit einem molaren Insert-Vektor-Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Diese wurden neben der *T4 DNA Ligase* mit dem dazugehörigen *T4 DNA Ligase* Puffer und Nuklease freiem H₂O versetzt. Der Reaktionsansatz wurde in einem Thermoschüttler bei 16° C über Nacht inkubiert. Anschließend fand die Transformation in chemisch kompetente TOP10-Bakterien von Life Technologies (Carlsbad, USA) statt.

In-Fusion HD® Klonierung: Zur Generierung des lentiviralen FuVal-Vektors, welcher das HPK1-EGFP Konstrukt sowie eine Puromycinresistenz zur Selektionierung trägt, wurde eine Klonierung mit dem *In-Fusion HD® Cloning Kit* durchgeführt. Hierfür wurden wie im Kapitel *HiFi-PCR* beschrieben lineare DNA-Konstrukte generiert, aus dem Agarosegel extrahiert und aufgereinigt. Da das Insert (HPK1-EGFP) sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende einen 15 Basenpaarüberhang hatte, die den Basensequenzen an den freien Enden des linearen pFu-P2A-Puro-Vektors entsprachen, konnten diese durch homologe Rekombination vereint werden. Der Ansatz für diese Klonierungsreaktion bestand aus:

- 2 µl (60,0 ng) HPK1-EGFP (linearisiert, Insert)
- 3 µl (71,2 µl ng) pFu-P2A-Puro (linearisiert, Zielvektor)
- 2 µl *In-Fusion HD Enzyme Premix* (5-fach)
- 3 µl steril-filtriertes autoklaviertes destilliertes H₂O

Dieser Ansatz wurde für 25 Minuten bei 50° C inkubiert und bis zur Transformation in chemisch kompetente Stellar-Bakterien von Clontech Laboratories, Inc. (Mountain View, USA) auf Eis platziert.

2.2.9 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Für die Transformation von chemisch kompetenten TOP10- oder Stellar-Bakterien mit Plasmid-DNA wurden diese von -80°C auf Eis aufgetaut. Anschließend erfolgte nach vorsichtigem Durchmischen eine Überführung von $50\ \mu\text{l}$ der Bakteriensuspension in ein frisches autoklaviertes $1,5\ \text{ml}$ Reaktionsgefäß. Zu dieser Suspension wurde je $1\ \mu\text{l}$ des gewünschten Vektors pipettiert und der Ansatz für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 60 Sekunden in einem Thermoschüttler um die Aufnahme der DNA in die Zellen zu ermöglichen. Der Hitzeschock wurde nach dieser Zeit beendet und der Ansatz für 5 Minuten auf Eis gelagert. Die Suspension wurde mit $450\ \mu\text{l}$ *Lysogeny Broth* (LB)-Flüssigmedium oder SOC-Medium vermischt und der Ansatz für 60 Minuten bei 37°C in einen Thermoschüttler gestellt. Nach der Inkubation wurden ein $50\ \mu\text{l}$ und ein $200\ \mu\text{l}$ Ansatz auf je eine Agarplatte mit der dem Vektor entsprechenden Antibiotikumresistenz ausplattiert. Diese wurde über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37°C inkubiert, um ein Wachstum der transformierten Bakterien zu ermöglichen.

2.2.10 Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Zur Vorbereitung der Minipräparation von Plasmid-DNA wurde am Vortag eine erfolgreich transformierte Bakterienkolonie durch eine Impföse entnommen und in $5\ \text{ml}$ flüssiges LB-Medium gegeben, welches mit einem Antibiotikum entsprechend der Vektorresistenz versehen wurde. Dieser Ansatz wurde anschließend für 12-16 Stunden bei 37°C in einem Bakterieneschüttler inkubiert.

Zur Isolation und Aufreinigung der Plasmid-DNA aus den Bakterien wurde das *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* der Firma PEQLAB (Erlangen, Deutschland) verwendet. Die über Nacht entstandene Bakteriensuspension wurde durch Zentrifugation bei $10.000\ \text{g}$ für 60 Sekunden in ein $1,5\ \text{ml}$ Zentrifugenröhrchen überführt und pelletiert. Dieses Bakterienpellet wurde mit $250\ \mu\text{l}$ der mit RNase A versetzten *Solution I* resuspendiert. Durch das Hinzufügen der weiteren Lösungen wurden die Bakterien lysiert und die freien Plasmide gelöst. Diese Lösung wurde durch Zentrifugation auf die Silikamembran der *PerfectBind DNA Column* gebracht. Nach mehreren Waschschrinen wurde die Membran getrocknet und die Plasmide aus der Silika-

membran durch einen TE-Puffer in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen durch Zentrifugation eluiert.

2.2.11 Maxipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Wie bereits bei der Minipräparation beschrieben, wurde für die Aufreinigung der Plasmide durch die Maxipräparation eine Übernacht-Kultur von Bakterien angesetzt. Bei diesem Versuchsansatz wurden aufgrund des erhöhten Bedarfs an Ausgangs-Plasmiden 300 ml flüssiges LB-Medium mit dem der Vektorresistenz entsprechenden Antibiotikum in einem autoklavierten Erlenmeyerkolben gegeben und mit 1 ml der Übernachtkultur aus der Minipräparation vermischt. Der Ansatz wurde erneut im Bakterienschüttler bei 37° C für 12-16 Stunden über Nacht inkubiert.

Die weitere Behandlung erfolgte nach dem Protokoll des *NucleoBond® Xtra Maxi EF Kits* von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland). Nach erfolgter Inkubation wurde die komplette Bakteriensuspension entnommen, in Bakterienflaschen gefüllt und 15 Minuten bei 5000 g und 4° C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde mit dem RNase A-haltigen Resuspensions-Puffers (*Buffer RES*) resuspendiert und durch den Lyse-puffers (*Buffer LYS*) lysiert. Die *NucleoBond Xtra* Filter wurden durch den Äquilibrium-Puffer (*Buffer EQU*) eingestellt und anschließend das Bakterienlysat nach Vermischen mit dem Neutralisations-Puffer (*Buffer NEU*) auf den äquilibrierten Filter geladen. Nach dem Durchfluss der kompletten Flüssigkeit wurde der Filter mehreren Waschschritten unterzogen. Nach dem Trocknen des Filters erfolgte die Elution mit dem Elutions-Puffer (*Buffer ELU-EF*). Dieses Eluat wurde mit 10,5 ml Isopropanol versetzt. Das wurde Gemisch in eine 30 ml Spritze gefüllt und durch den *NucleoBond Finalizer* gepresst. Der *NucleoBond Finalizer* wurde anschließend mit 4 ml Endotoxin freiem Ethanol (70%) gewaschen und getrocknet. In einem letzten Schritt wurde die sich im *Finalizer* befindende Plasmid-DNA mit dem TE-Puffer in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert.

2.2.12 Zellkultur

Zur Kultivierung der HL-60 Zellen wurde das RPMI-1640 Medium mit einem Zusatz von FCS (10%) und Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml) versetzt. Für die Differenzie-

zung dieser Zelllinie zu Neutrophilen-ähnlichen Zellen (dHL-60) wurde das beschriebene Medium mit 1,3% Dimethylsulfoxid (DMSO) versehen und die Zellen wurden für 6 Tage bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Bei Zellen, die mit einem Lentivirus transduziert wurden, erfolgte ein Zusatz von Puromycin (1 µg/ml) in das RPMI-1640 Medium zur Selektionierung.

Die Kultivierung der adhärennten Zelllinien HEK-293T und WEHI-3B erfolgte ebenfalls in dem RPMI-1640 Medium mit Zusätzen von FCS (10%) und Penicillin/Streptomycin (100 µg/ml). Bei vollständiger Konfluenz dieser Zellen wurde diese mit Trypsin/EDTA (TE) für 2 Minuten bei 37° C vom Boden abgelöst und in einer 1:10 Verdünnung mit frischem Zellkulturmedium erneut ausgesät.

2.2.13 Proteinextraktion

Zellyse: Für die Zellyse und Extraktion der zytosolischen Proteine wurde dem Puffer Berton II am Versuchstag 1 mM DFP, 10 mM NaF, 250 µM Natriumorthovanadat und *Protease Inhibitor Cocktail* (1:800) von Sigma Aldrich (Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt.

Für die Anfertigung der Zellysate wurde pro 10⁶ Zellen je 30 µl des komplettierten Lysepuffers hinzugefügt und die Proben für 30 Minuten bei 4° C durchmischt. Nach dieser Inkubation erfolgte die mechanische Zellyse, indem die Lysate durch eine 20 G Kanüle gepresst wurden. Das verbleibende Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 16000 g pelletiert und der Überstand in ein frisches autoklaviertes 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach dem Messen der Proteinkonzentration wurde das Proteinlysate 1:1 mit dem zweifachen Laemmli-Puffer bei 95° C für 8 Minuten aufgekocht. Die weitere Lagerung der Proben erfolgte bei -20° C. Die Auftrennung der Lysate erfolgte per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und die weitere Analyse durch einen Western Blot.

Bestimmung der Proteinkonzentration: Die Analyse der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des Qubit 2.0 Fluorometers. Zur Vorbereitung wurde anhand von drei Proben mit definierter Proteinkonzentration (BSA) eine Standardkurve erstellt. Aus den Proteinlysaten wurde 1 µl für eine 1:10 Verdünnung mit destillierten H₂O entnommen. 1 µl dieser Lösung wurde mit 199 µl der Qubit Arbeitslösung (Protein-Reagenz +

Protein-Puffer, 1:200) vermischt und der Ansatz für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung im Qubit 2.0 Fluorometer.

2.2.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zu Auftrennung der Proteinextrakte nach Größe und Ladung wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Als Vorbereitung hierfür erfolgte das Gießen eines SDS-Polyacrylamidgels bestehend aus einem Trenngel (8%), auf das ein Sammelgel (5%) aufgebracht wurde. Zudem wurde in das Sammelgel ein Kamm eingebracht, damit 10 Ladetaschen für die Proteinlysate zur Verfügung standen. Zur Durchführung der SDS-PAGE wurde die *Bio-Rad Mini-Protean Tetra Cell* (Bio-Rad, Hercules, USA) als Reaktionskammer verwendet. Diese wurde mit dem einfachen SDS-Laufpuffer befüllt. Die Gele wurden anschließend in eine Halteapparatur mit Kathode und Anode eingespannt und der Zwischenraum ebenfalls mit dem SDS-Laufpuffer befüllt. Nach Entfernen der Kämmen wurden die aufgetauten Proteinextrakte in die Taschen gefüllt. Zur späteren Bestimmung der Proteingrößen wurde außerdem der gefärbte *Color Prestained Protein Standard Broad Range (P7712)* der Firma New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) in eine der Taschen eingebracht. Die Apparatur wurde mit einer externen Spannungsquelle verbunden und eine Spannung von 80 V angelegt. Diese wurde beibehalten, bis sich die Proteinlysate an der Sammel-Trenngel-Grenze gesammelt hatten. Für die restliche Elektrophorese wurde die Spannung auf 110 V erhöht und erfolgte für weitere 1,5 Stunden. Nach erfolgter SDS-PAGE wurden die Gele entnommen und zur weiteren Analyse einem Western Blot zugeführt.

2.2.15 Western Blot

Proteintransfer: Die Durchführung des Western Blots erfolgte mit dem *Semi-Dry Elektrobloetter PerfectBlue* der Firma PEQLAB (Erlangen, Deutschland). Nach Entnahme der Polyacrylamidgele aus der SDS-PAGE-Kammer wurde auf die Grundplatte (Anode) des Elektrobloetters ein Filterpapier (9,5 x 6,5 cm) gelegt. Dieses wurde im einfachen Western Blot Transferpuffer getränkt und auf dieses eine Nitrocellulose-Membran (9,0 x 6,0 cm) mittig platziert. Die Gele wurden vorsichtig auf diese Membran aufgebracht und als oberste Schicht ein weiteres in Transferpuffer ge-

tränktes Filterpapier (9,5 x 6,5 cm) gelegt. Die restliche Fläche wurde mit Parafilm M ausgelegt um einen Stromfluss abseits des zentralen Proteintransfers zu verhindern. Um einen gleichmäßigen Stromfluss innerhalb des Aufbaus sicherzustellen, wurden Luftblasen durch vorsichtiges Bestreichen des Filterpapiers entfernt. Anschließend erfolgte der Proteintransfer bei einer konstanten Stromstärke von 110 mA pro 45 cm² Fläche der Nitrocellulose-Membran über 2 Stunden.

Proteinfärbung: Nach abgeschlossenem Elektrotransfer der Proteine wurde mit der Nitrocellulose-Membran eine transiente Färbung der Proteine in einer Ponceau S-Lösung angefertigt, um den Erfolg des Proteintransfers zu kontrollieren. Nach Anfertigung einer Fotodokumentation erfolgte die Entfärbung der Membran mit 0,1% TBS-T. Mit dem Polyacrylamidgel wurde eine Coomassie-Färbung (R250) durchgeführt. Nach dem vollständigen Entfärben der Nitrocellulose-Membran wurde diese für 60 Minuten mit dem Blockierungspuffer behandelt, um Proteinbindungsstellen abzusättigen und unspezifische Bindungen der Antikörper herabzusetzen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper entweder für 2 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4° C im Blockierungspuffer. Nach drei Waschschritten mit 0,1% TBS-T wurde dem der Primärspezies entsprechende HRP-gekoppelte Sekundärantikörper hinzugegeben und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser wurde durch drei weitere Waschschrritte mit 0,1% TBS-T entfernt.

Proteindetektion: Die Proteindetektion erfolgte in einer Dunkelkammer *Darkbox Type 4* der Firma Unit One (Birkerød, Dänemark) mit angeschlossener CCD-Kamera der Firma Hamamatsu (Hamamatsu, Japan). Hierfür wurde die Nitrocellulose-Membran von der TBS-T-Lösung befreit und auf eine durchsichtige Folie gelegt. Um die Aktivität der Peroxidase zu starten und eine Chemolumineszenz zu erzeugen, wurde die *Pierce® ECL Western Blotting Substrate* Lösungen 1 und 2 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) im Verhältnis 1:1 gemischt. Die gemischte Lösung wurde anschließend auf die Membran gegeben und eine Aufsichtsaufnahme auf die Membran mit Weißlicht durchgeführt. Nach Schließen der Kammer wurden weitere Aufnahmen mit Expositionszeiten zwischen 30 Sekunden und 10 Minuten durchgeführt. Die in dieser Zeit entstandene Chemolumineszenz-Reaktion wurde von der Kamera detektiert und über das Programm HoKaWo (Hamamatsu, Japan) als Bild im TIFF-Format gespeichert.

Proteinquantifizierung: Zur Quantifizierung wurde eine Expositionszeit gewählt, bei dem sich die Grauwerte der detektierten Proteinbanden in einem linearen Bereich befanden, also keine Überbelichtung stattfand. Die Intensität der Banden wurde mit ImageJ analysiert und die Fläche unter der Kurve (*Area Under Curve*, AUC) berechnet. Die AUC-Werte des untersuchten Proteins wurden dann durch den AUC-Werten einer Aktinfärbung derselben Probe in Relation gesetzt. Aus den Mittelwerten von vier solcher Relationen wurde die Proteinexpression berechnet.

2.2.16 Transfektion von HEK-293T-Zellen

Die Transfektion der HEK-293T-Zellen mit dem HPK1-EGFP- und dem EGFP-Konstrukt wurde für die Lokalisationsstudien von HPK1-EGFP, EGFP und Aktin sowie zur Virusproduktion für die spätere lentivirale Transduktion der HL-60 Zellen durchgeführt. HEK-293T-Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert und das überständige RPMI-Medium entnommen. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte das Ablösen der adhärennten Zellen mit 1 ml einer Trypsin/EDTA (TE)-Lösung für 5 Minuten bei 37° C und 5% CO₂. Nach der abgelaufenen Inkubationszeit wurden zu der Zellsuspension 9 ml des RPMI-1640 Mediums mit FCS (10%) ohne antibiotische Zusätze (P/S) gegeben. In diesem wurden die Zellen in der *Fast-Read 102*[®] Zählkammer (Biosigma, Cona, Italien) nach einer Färbung mit einer 0,05%-igen Trypanblaulösung gezählt. Verschiedene Volumina entsprechend verschiedener Zellzahlen (5,0, 6,0 und 7,0 x 10⁵ Zellen) wurden in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt und zu einem Pellet zentrifugiert.

Lokalisationsstudie: Für die Analyse der Expression und Lokalisierung der von den HPK1-EGFP- und EGFP-Plasmide kodierten Proteine wurden sechs Deckgläschen mit 0,1% Gelatine in H₂O beschichtet und in die einzelnen Löcher einer 6-Loch-Platte verteilt. Die pelletierten Zellen wurden in 2 ml RPMI-1640 Medium resuspendiert und auf die einzelnen Deckgläschen verteilt und über Nacht bei 37° C sowie 5% CO₂ inkubiert, bis diese eine Konfluenz von 70-90% auf den Deckgläschen erreicht hatten. Das überständige Medium wurde abgenommen und durch 2 ml frisches RPMI-Medium ersetzt. Parallel hierzu wurden pro Ansatz 500 µl Optimem-Medium mit 8 µg des zu transfizierenden Vektors vermischt und weitere 500 µl Optimem-Medium mit 20 µl Lipofectamin 2000 versetzt. Diese wurden getrennt für 5 Minuten

bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte das vorsichtige Vermischen der beiden Ansätze durch Invertieren und eine weitere Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden 500 µl dieses Ansatzes zu jedem Deckgläschen langsam hinzugefügt und 6 Stunden bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Die Transfektion wurde gestoppt, indem das Optimem-Medium abgenommen und 3 ml frisches RPMI-1640 mit (10%) FCS ohne antibiotische Zusätze hinzugegeben wurde. Hierauf folgte eine Anfärbung der Proteine in der Immunfluoreszenz.

Vorbereitung für die Transduktion: Die Experimente zur Transfektion der HEK-293T-Zellen sowie die anschließende Transduktion der HL-60 Zellen mit viralen Bestandteilen fand in einer Zellkultur der Sicherheitsstufe S2 statt.

Für die Transfektion mit geplanter weiterer Transduktion in die HL-60 Zellen wurden die pelletierten Zellen in 2 ml RPMI mit FCS ohne antibiotische Zusätze resuspendiert und direkt in die 6-Loch-Platten gegeben. Nach der Inkubation über Nacht bei 37° C und 5% CO₂ wurde das Medium gewechselt. Analog zu dem oben beschriebenen Ansatz wurde pro Probe zum einen 250 µl Optimem-Medium mit 12 µl Lipofectamin 2000 gemischt und zum anderen 250 µl Optimem-Medium mit 2 µg des pVSV-G-Vektors, 3 µg des pCMV ΔR8.9-Vektors und 1 µg des gewünschten Plasmides (HPK1-shRNA-Vektor oder pFu-HPK1-EGFP-P2A-Puro). Diese wurden wie bereits beschrieben 5 Minuten separat und nach Vermischung weitere 20 Minuten im S2-Inkubator inkubiert. Nach sechs Stunden wurden die Überstände abgenommen und verworfen. Zu jedem Ansatz wurde 2 ml frisches RPMI-Medium mit FCS (10%) und P/S (100 µg/ml) gegeben, um den von den HEK-293T-Zellen produzierten Virus zu sammeln. Dieser Überstand wurde wie im Folgenden beschrieben für die stabile lentivirale Transduktion in HL-60 Zellen genutzt.

2.2.17 Transduktion von HL-60 Zellen

Zur stabilen Transduktion von HL-60 wurde ein siebentägiges Protokoll verfolgt. Am Tag 1 des Experimentes erfolgte das Ausplattieren von HEK-293T-Zellen in eine 6-Loch-Platte sowie die Transfektion an Tag 2 und die Abnahme des ersten virushaltigen Überstands (Tag 3).

An Tag 4, 24 Stunden nach der ersten Abnahme des Mediums, wurden je $2,0 \times 10^5$ HL-60 Zellen in sechs verschiedene Löcher einer 24-Loch-Platte pipettiert. Der virushaltige Überstand von den HEK-293T-Zellen wurde abgenommen und durch einen $0,45 \mu\text{m}$ Filter steril filtriert. Die HEK-293T-Zellen wurden mit frischem RPMI-Medium mit FCS (10%) und P/S ($100 \mu\text{g/ml}$) versorgt, damit eine weitere Virusproduktion erfolgen konnte. Zur lentiviralen Transduktion erfolgte das Hinzufügen verschiedener Konzentrationen (1:1, 1:2 und 1:5) des viralen Überstandes zu den HL-60 Zellen.

Nach erfolgter Hinzugabe des viralen Überstandes wurde direkt eine Spinokulation durchgeführt, um die Effizienz der Transduktion zu erhöhen. Hierfür wurde die 24-Loch-Platte bei 800 g für 35 Minuten zentrifugiert. Das dadurch entstandene Pellet suspendiert. Die weitere Inkubation erfolgte erneut bei 37°C und 5% CO_2 .

Nach weiteren 24 Stunden erfolgte an Tag 5 eine erneute Transduktion derselben HL-60 Zellen mit dem neu produzierten viralen Überstand der HEK-293T-Zellen. Die weitere Inkubationsdauer von 48 Stunden fand bei 37°C und 5 % CO_2 statt.

An Tag 7 wurden alle HL-60 Zellen aus den sechs verschiedenen Löchern der 24-Loch-Platten gesammelt und zu einem Pellet zentrifugiert. Dieses wurde in RPMI-1640 Medium mit FCS (10%), P/S ($100 \mu\text{g/ml}$) und Puromycin ($1 \mu\text{g/ml}$) zur Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen aufgenommen. Im Anschluss wurden, verteilt über 7 Tage, Waschvorgänge durchgeführt, um Virusbestandteile im Überstand zu entfernen. Die Kontrolle der pFu-HPK1-EGFP-P2A-Puro transduzierten Zellen erfolgte unter Fluoreszenzlicht und mittels durchflusszytometrischer Analyse im FITC-Kanal. Bei den mit dem shRNA tragenden Vektor transduzierten HL-60 Zellen wurde eine Subklonierung durchgeführt und die Proteinrestexpression mittels Western Blot festgestellt.

2.2.18 Durchflusszytometrische Analyse

Die Durchflusszytometrie wurde in dieser Arbeit zur Charakterisierung der β_2 -Integrinexpression und Affinitätsregulation der differenzierten HL-60 Zellen (dHL-60) verwendet. Außerdem wurde die Expression des HPK1-EGFP-Fusionsproteins in den transduzierten HL-60 Zellen überprüft. Hierfür wurden die

dHL-60 Zellen gezählt und anschließend zu einem Pellet zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit einer Konzentration von 10^6 Zellen pro ml in das Adhäsionsmedium I aufgenommen. Währenddessen wurden Röhrchen vorbereitet, indem diese mit 50 μ l der doppelten Stimuluskonzentration (IL-8 (200 ng/ml) oder fMLP (200 nM)) in Adhäsionsmedium I befüllt wurden. Zu diesem wurde je 5 μ l des gewünschten Antikörpers (anti-CD11a, anti-CD11b, anti-CD18, Istotypen IgG₁ oder IgG_{2a}, mAb24 oder KIM127) gegeben. Dazu wurden 50 μ l der Zellsuspension pipettiert und der Ansatz 20 Minuten bei 37° C inkubiert. Anschließend erfolgte eine zehninminütige Lagerung der Proben bei 4° C. Zur weiteren Färbung der apoptotischen Zellen erfolgte eine Färbung mit Annexin V für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Abschirmung von Licht. Zu den Ansätzen wurde daraufhin 1 ml der *BD FACS™ Lysing Solution* (Vorverdünnung 1:10 in H₂O) gegeben und die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach Waschen der Proben mit eiskaltem PBS erfolgte die Zentrifugation bei 800 g und 4° C für 10 Minuten. Dieser Schritt wurde wiederholt und der Überstand verworfen. Das entstandene Pellet wurde in 50 μ l eiskaltem PBS gelöst und die Analyse mittels Durchflusszytometer (*BD FACS Canto II*) durchgeführt. Die Analyse der β_2 -Integrinexpression erfolgte im PE-Kanal mit Anregungsmaximum bei 496 nm und Emissionsmaximum bei 578 nm. Die β_2 -Integrinaffinitätsregulation und die HL-60 HPK1-EGFP Zellen wurden im FITC-Kanal betrachtet. Hier lag das Anregungsmaximum bei 650 nm und das Emissionsmaximum bei 668 nm. Die Auswertung am Durchflusszytometer erfolgte mit der *FACSDiva™* Software und für die grafischen Darstellungen wurde das Programm *FlowJo™* verwendet.

2.2.19 Verstärkung der Adhäsion unter Flussbedingungen

Zur Analyse der Verstärkung der Adhäsion (*Adhesion Strengthening*) der murinen neutrophilen Granulozyten wurden IBIDI μ -Slides VI^{0,1} Flusskammern mit rmICAM-1 (12,5 μ g/ml) mit oder ohne rmCXCL1 (5 μ g/ml) in PBS über Nacht bei 4° C beschichtet. Das Adhäsionsmedium I wurde angesetzt und auf 37° C gebracht. Die den Mikroskopisch umschließende Thermokammer wurde ebenfalls auf 37° C gebracht und die Spritzenpumpe, wie in Tab. 3 dargestellt, programmiert.

Pro Kanal wurden $4,5 \times 10^5$ aus dem Knochenmark isolierte neutrophile Granulozyten verwendet. Diese wurde in Adhäsionsmedium I resuspendiert und in den zuvor

mit PBS gewaschenen Flusskammerkanal mit der ICAM-1- und CXCL1-Beschichtung gefüllt. An das System wurde über einen Silikonschlauch mit LUER-Adaptern eine mit Adhäsionsmedium I befüllte 1 ml Spritze angeschlossen. Der Flusskammer-Objektträger wurde in den Objektträgertisch des Mikroskops gespannt, die Thermokammer geschlossen und die 1 ml Spritze in das Pumpensystem gelegt. Über das Mikroskop wurde eine Stelle mit homogener Zellverteilung in der Mitte des Kanals gesucht und der Fokus eingestellt. Den Zellen wurde während einer 10-minütigen Inkubationszeit bei 37° C eine CXCL1-induzierte Adhäsion an ICAM-1 ermöglicht. Nach dieser Zeit wurde das Flussprogramm (Tab. 3) mit schrittweise ansteigenden Flussbedingungen gestartet.

Flussdauer	Schubspannung in dyne/cm ²	Flussgeschwindigkeit für 1 ml Spritze
60 sec	0,2	1,88 µl/min
90 sec	0,5	4,68 µl/min
90 sec	1,0	9,37 µl/min
90 sec	1,5	14,05 µl/min
90 sec	2,0	18,74 µl/min
90 sec	4,0	37,48 µl/min
90 sec	8,0	74,96 µl/min

Tabelle 3: Programmierung der Spritzenpumpe zur Testung der Verstärkung der Adhäsion. Gezeigt wird die Dauer jedes Schritts, die gewünschte Schubspannung und die programmierte Flussgeschwindigkeit bei Verwendung einer 1 ml Spritze.

Im ersten Schritt des Programms wurde 60 Sekunden eine Schubspannung von 0,2 dyne/cm² angelegt, um nicht adhärenente Zellen aus dem Kanal zu entfernen. Alle Zellen am Ende dieser Flussphase wurden als adhärenent betrachtet. Anschließend wurde die Schubspannung in einem Bereich zwischen 0,5 und 8,0 dyne/cm² schrittweise alle 90 Sekunden erhöht (Tab. 3). Während dieser Zeit wurde über die am Mikroskop angeschlossene Kamera alle 5 Sekunden eine Aufnahme erstellt. Diese wurden anschließend aneinandergelagt und als Zeitraffer-Video im TIFF-Format abgespeichert. Ausgewertet wurde die Zahl der adhärenenten Zellen zum Ende jeder Flussphase. Die

Zellzahl nach $0,2 \text{ dyne/cm}^2$ wurde als 100% definiert. Die Zellzahlen zu den späteren Zeitpunkten wurden als prozentuale Anteile zu dieser Ausgangszellzahl angegeben.

2.2.20 Immunfluoreszenz

HEK-293T-Zellen: Wie in Kapitel 2.2.16 beschrieben wurden Deckgläschen mit 0,1% Gelatine beschichtet und HEK-293T-Zellen ausgesät bis zu einer Konfluenz von 70-90% und anschließend entweder mit dem pEGFP-N1- oder mit dem pEGFP-N1 + HPK1-Vektor durch Lipofectamin 2000 transfiziert. Die Deckgläschen wurden einmalig mit PBS gewaschen und die Zellen für 10 Minuten mit PFA (4%) bei Raumtemperatur fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurde AlexaFluor 546-gekoppeltes Phalloidin (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) 1:500 in PBS für 30 Minuten im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Deckgläschen mit Mowiol auf einen Objektträger eingebettet.

dHL-60 Zellen: Zur Vorbereitung der Immunfluoreszenzanalyse wurden am Vortag Deckgläschen mit Ethanol (70%) und PBS gewaschen und mit $250 \mu\text{g/ml}$ humanem Fibrinogen (hFBG) über Nacht bei 4° C in einer 6-Loch-Platte beschichtet. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden pro Deckgläschen 4×10^5 dHL-60 Zellen, die EGFP oder HPK1-EGFP exprimierten, in Adhäsionsmedium I gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten erfolgte entweder eine Stimulation mit 100 nM fMLP oder keine Stimulation als Negativkontrolle für weitere 15 Minuten bei 37° C . Darauffolgend wurden die Zellen in einer 4%-igen PFA-Lösung in PBS für 15 Minuten bei Raumtemperatur fixiert und anschließend mit PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte mit 0,1% Triton X-100 + BSA (10%) in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen in PBS wurden die Proben für 90 Minuten mit BSA (10%) in PBS inkubiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit einem Kaninchen anti-HIP-55 Antikörper (H-87, Santa Cruz) mit einer Verdünnung von 1:100 in der Permeabilisierungslösung bei 4° C . Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit AlexaFluor 647-gekoppeltem Esel anti-Kaninchen IgG als Sekundärantikörper mit einer Verdünnung von 1:1000 für 2 Stunden bei Raumtemperatur sowie mit AlexaFluor-546 markiertem Phalloidin, um das Aktin-Zytoskelett anzufärben. Nach einem letzten Waschschriff mit PBS wurden die Deckgläschen auf Objektträger mit dem *ProLong™ Diamond Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, USA) eingebettet und 24 Stunden bei Raumtemperatur ausgehärtet. Die Proben wurden anschließend mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

2.2.21 Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie wurde an der *Core Facility Bioimaging* am Biomedizinischen Centrum (BMC) der LMU durchgeführt. Verwendet wurde das aufrechte Konfokalmikroskop Leica SP8X WLL ausgestattet mit einem 405 nm und einem WLL2 Laser (470-670 nm) sowie einem akustooptischem Strahlteiler (AOBS). Die Bilder wurden mit einem 63x/1.4 Objektiv mit einer Bildpixelgröße von 80 nm aufgenommen. Zur Detektion wurden sowohl Photomultiplier (PMTs) als auch Hybriddetektoren verwendet (HyDs).

2.2.22 Co-Immunpräzipitation mit dHL-60 Zellen

Für die Durchführung der Co-Immunpräzipitation wurden 6 Tage vor dem Experiment 2×10^8 Zellen pro Zelllinie (HL-60 EGFP und HL-60 HPK1-EGFP) differenziert. Zudem wurden am Vortag des Experimentes Petrischalen mit 250 $\mu\text{g/ml}$ humanem Fibrinogen (hFBG) bei 4° C beschichtet.

Nach dreimaligem Waschen der Petrischalen mit PBS wurden die Zellen gezählt und pro Platte $3,3 \times 10^7$ Zellsuspension gelöst in 24 ml Adhäsionsmedium II gegeben. Hierbei wurden auf sechs Petrischalen dHL-60 EGFP und auf sechs weiteren Petrischalen dHL-60 HPK1-EGFP Zellen ausgesät. Anschließend erfolgte eine Inkubation der Zellen bei 37° C für 15 Minuten. Jeweils drei Petrischalen jeder Zelllinie wurden mit Mn^{2+} (Endkonzentration 1 mM) stimuliert, wohingegen die andere Hälfte der Schalen als unstimulierte Proben lediglich mit Adhäsionsmedium II versetzt wurden. Die Stimulation erfolgte für weitere 15 Minuten bei 37° C. Anschließend wurde der Überstand der Zellen abgenommen und die drei jeweils identisch behandelten Zellsuspensionen zusammengeführt und zentrifugiert. Auf den Petrischalen adhärente Zellen wurden mit 500 μl des komplettierten Berton II Lysepuffers versehen und durch einen Zellkratzer in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen gesammelt. Derselbe Lysepuffer wurde anschließend verwendet um die herunter zentrifugierten Zellen mit densel-

ben Ausgangsbedingungen zu lysieren. Die Zellylyse und Messung der Proteinkonzentration erfolgte wie unter 2.2.13 beschrieben. Von jeder Probe wurden 50 μl als sogenannte Input-Kontrolle abgenommen und mit 50 μl des zweifachen Laemmli-Puffers für 8 Minuten bei 95°C aufgeköcht.

Die GFP-NanoTraps[®] wurden durch dreimaliges Waschen mit dem Dilutionspuffer I kalibriert und je 100 μl mit den restlichen Zellylysaten der vier verschiedenen Proben vermischt und für 2 Stunden bei 4° C auf dem Drehrad inkubiert. Anschließend erfolgten drei weitere Waschvorgänge im Dilutionspuffer I. Im Falle der späteren Analyse im Western Blot wurden die Protein-gebundenen GFP-NanoTraps[®] mit je 100 μl zweifachen Laemmli-Puffer bei 95° C für 8 Minuten aufgeköcht. Für die Analyse in der Massenspektrometrie wurden die Zellen einmal mit dem Dilutionspuffer II und drei weitere Male mit einer 50 mM Tris-Cl-Lösung (pH 8,0) gewaschen, komplett von Flüssigkeit befreit und bis zur weiteren Analyse bei -20° C gelagert.

2.2.23 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse der Proben aus der Co-Immunpräzipitation erfolgte in einer Kooperation mit dem Zentrum für Proteinanalytik (ZfP) der LMU München.

Peptidverdau: In einem ersten Schritt wurden die an die GFP-NanoTraps[®] gebundenen Proteine verdaut. Nach Waschen mit NH_4HCO_3 (50 mM) wurde Trypsin (10 ng/ μl) gelöst in Urea (1 M) und NH_4HCO_3 (50 mM) zu den Proben pipettiert. Der Verdau erfolgte für 30 Minuten bei 25° C in einem Thermoschüttler. Die Ansätze wurde zentrifugiert und die Überstände in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 40 μl der NH_4HCO_3 -Lösung (50 mM) wurden die Überstände mit dem vorher entnommenen Peptidverdau vereint. Zu den Proben wurde anschließend je 1 mM DTT hinzugefügt und über Nacht bei 25° C unter Durchmischung in einem Thermoschüttler verdaut.

Probenvorbereitung: Am nächsten Tag erfolgte das Hinzufügen von 3 μl Iodacetamid (100 nM) und eine Inkubation bei 25° C für 30 Minuten im Dunkeln. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation nach Zugabe von 2 μl DTT (1 M) für 10 Minuten bei 25° C und darauffolgend wurden 6 μl Trifluoressigsäure (TFA) pro Probe pipettiert.

Zum Entsalzen der Proben wurden *StageTips* mit einer zweifachen Schicht von SDS-RPS (3M Empore PN 2241) verwendet. Diese wurden mit 50 μ l ACN, anschließend 50 μ l MetOH (30%) + TFA (0,2%) und zum Schluss 50 μ l TFA (0,2%) gewaschen. Nach den erfolgten Waschschrinen wurden die verdauten Peptidproben auf den Filter geladen und bei 300 g für 15 Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in einem frischen Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Die SDS-RPS *StageTips* wurden erst mit dem MS-Waschpuffer I und anschließend mit dem MS-Waschpuffer II gewaschen. Anschließend wurden die in dem SDS-RPS Filter gebundenen Peptide in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß eluiert. Hierfür wurde eine 80%-ige ACN-Lösung mit Zusatz von 1,25% NH_4OH verwendet. Die Proben wurden für 30 Minuten in der *SpeedyVac* bei 45° C zentrifugiert, dass kein Flüssigkeitsüberstand mehr zu erkennen war. In einem letzten Schritt wurden die Proben in je 17 μ l des MS-Ladepuffers aufgenommen und durch Behandlung im Ultraschallbad gelöst.

Analyse: Die gelösten Peptide wurden zur Analyse in das LTQ-Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) im ZfP eingesetzt. Nach Analyse von drei technischen Replikaten jeder Probe wurden die Daten mit der MaxQuant-Software analysiert [186], die Peptide ihren Ursprungproteinen zugeordnet und anschließend alle Proteine entfernt deren *Intensity-Based Absolute Quantification* (iBAQ)-Wert weniger als zweifach auf einer \log_2 -Skala im Vergleich zu ihrer Kontrolle erhöht waren. Der iBAQ entspricht der Summe aller in der Massenspektrometrie gemessenen Peptidintensitäten eines Proteins im Verhältnis zu der Anzahl der theoretisch möglichen Peptide eines Proteins und kann zur Quantifizierung verwendet werden [187]. Um weitere unspezifisch identifizierte Proteine zu eliminieren, wurde eine Analyse durch die *Crapome*-Software (crapome.org) durchgeführt [188]. Hierbei wurden Kandidaten als unspezifisch erachtet, die mindestens bei 50% der 411 Datensätze in der *Crapome*-Datenbank vorlagen.

2.3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde das Programm GraphPad PRISM 6 verwendet. Anwendung fanden der *Student's t-Test* und die *Analysis of Variance* (ANOVA). Signifikanzwerte (p) wurden wie folgt dargestellt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$.

3 Ergebnisse

3.1 Genotypisierung der HPK1-defizienten Versuchstiere

Um den Genotyp der Versuchstiere sicherzustellen, wurde dieser analysiert. Die DNA zur Genotypisierung wurde wie beschrieben aus den Gewebeproben der Mäuse isoliert und mit einem spezifischem Primerpaar zur Identifizierung von HPK1^{+/+}-Mäusen und mit einem weiteren Primerpaar zur Verifizierung des HPK1^{-/-}-Genotyps einer PCR zugeführt.

Bei den verwendeten HPK1^{-/-}-Mäusen war die Genexpression von HPK1 durch das Einfügen einer Neomycinselektionskassette in Exon 1 vollständig unterbrochen (Abb. 6 A) [182].

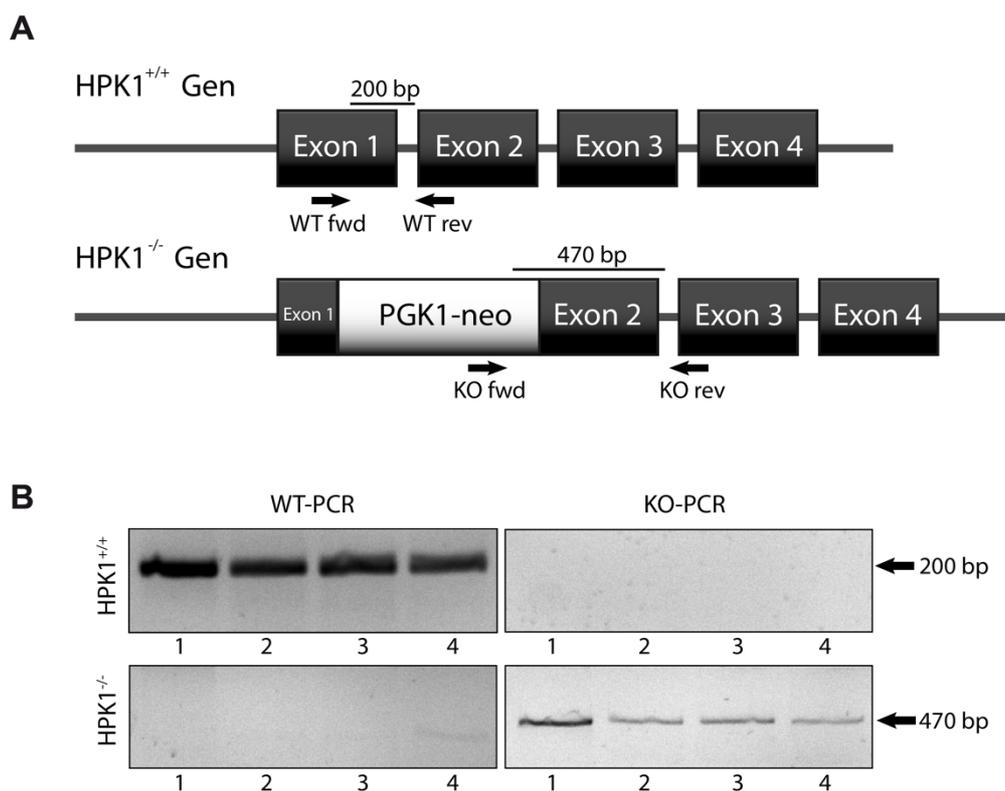


Abbildung 6: Genotypisierung der HPK1^{+/+}- und HPK1^{-/-}-Versuchstiere. (A) Dargestellt sind die ersten vier Exons des murinen HPK1-Gens von HPK1^{+/+}-Kontrollmäusen (oben) und HPK1^{-/-}-Mäusen (unten). Gezeigt werden zudem die für die Genotypisierung verwendeten *fwd*- und *rev*-Primer, deren Bindungsstellen sowie die erwarteten Größen der PCR-Produkte. (B) Abgebildet sind die durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennten PCR-Produkte der Genotypisierung von jeweils vier HPK1^{+/+}- und vier HPK1^{-/-}-Mäusen unter Verwendung der spezifischen Primer.

Der *fwd*-Primer für die WT-PCR (WT-*fwd*) band in Exon 1 des HPK1-Gens, die entsprechende Sequenz wurde im HPK1^{-/-} entfernt. Deshalb band dieser nur auf dem Wildtyp-Allel und ein PCR-Produkt war nur hier zu erwarten. Ebenso band der *fwd*-Primer für die KO-PCR (KO-*fwd*) spezifisch im Bereich der Neomycinselektionskassette (Abb. 6 A). Durch die unterschiedlichen Bindestellen der verwendeten Primer war bei Vorliegen eines HPK1^{+/+}-Allels ein PCR-Produkt mit der Größe von 200 Basenpaaren und bei Vorliegen des HPK1^{-/-}-Allels ein Produkt mit 470 Basenpaaren zu erwarten. Bei einer heterozygoten Maus wären beide Genabschnitte vorhanden und würden folglich in der PCR amplifiziert werden. Die Analyse der PCR-Produkte im Agarosegel zeigte, dass die verwendeten Wildtyp-Kontrolltiere einen homozygoten HPK1^{+/+}-Genotyp und die KO-Mäuse einen homozygoten HPK1^{-/-}-Genotyp aufwiesen (Abb. 6 B).

3.2 Die Funktion von HPK1 für das *Inside-out Signaling* unter Flussbedingungen

In einer früheren Studie konnte bereits gezeigt werden, dass HPK1 in murinen neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle in den β_2 -Integrin-vermittelten Schritten der Rekrutierungskaskade spielt [126]. Um zu untersuchen, ob dem beschriebenen Defekt in der Rekrutierung HPK1-defizienter neutrophiler Granulozyten eine Fehlfunktion in der Aktivierung der β_2 -Integrine (*Inside-out Signaling*) oder in der weiteren Signaltransduktion in das Zellinnere (*Outside-in Signaling*) zugrunde liegt, wurde ein *In-vitro*-Flusskammer-Experiment durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden neutrophile Granulozyten von HPK1^{-/-} und HPK1^{+/+}-Mäusen aus deren Knochenmark isoliert. Die isolierten neutrophilen Granulozyten wurden zum Start des ersten Versuchsaufbaus in eine mit rICAM-1 und CXCL1 beschichtete Flusskammer über einen Zeitraum von 10 Minuten zur Adhärenz gebracht. Anschließend wurde die Verstärkung der Adhäsion (*Adhesion Strengthening*) durch das Anlegen einer schrittweise ansteigenden Schubspannung (0,2-8,0 dyne/cm²) gemäß dem beschriebenen Protokoll analysiert. Hierbei zeigte sich bereits bei geringen Schubspannungen im physiologischen Bereich ein deutlicher Defekt der HPK1-defizienten neutrophilen Granulozyten, ihre Bindung zu ICAM-1 aufrechtzuerhalten (Abb. 7 A). Dieser konnte zu allen beobachteten Zeitpunkten bestätigt werden. Somit

konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von HPK1 in murinen neutrophilen Granulozyten zu einem Defekt in der Verstärkung der Adhäsion führt.

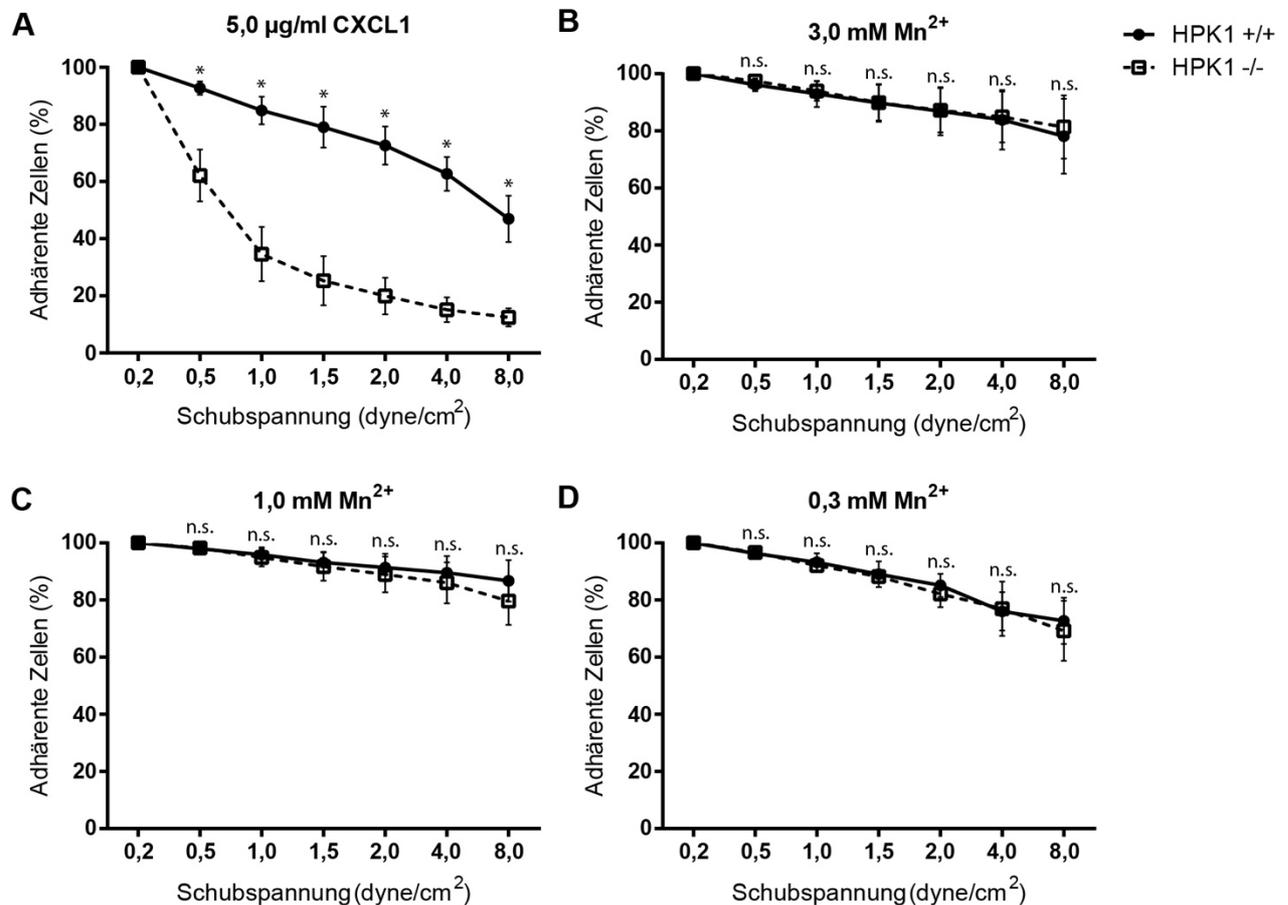


Abbildung 7: Verstärkung der Adhäsion (Adhesion Strengthening) von HPK1^{+/+} und HPK1^{-/-} murinen neutrophilen Granulozyten unter Fluss. *In-vitro*-Flusskammer-Experiment mit einer rmlCAM-1 (12,5 µg/ml)-beschichteten Ibidi µ-Slide VI^{0,1} Flusskammer und einer diskontinuierlich ansteigenden Schubspannung (0,2-8,0 dyne/cm²). Die Stimulation der isolierten neutrophilen Granulozyten erfolgte für 10 Minuten mit 5 µg/ml CXCL1 (A) oder mit verschiedenen Konzentrationen von Mn²⁺ (B-D). Gezeigt wird der prozentuale Anteil der adhärenen murinen neutrophilen Granulozyten bei der jeweiligen Schubspannung im Vergleich zu den adhärenen Zellen am Ausgangszeitpunkt (0,2 dyne/cm², 100%). n = 4; n.s. (nicht signifikant); *p-Wert < 0,05.

Da dieser Defekt sowohl auf eine Störung des *Inside-out* als auch des *Outside-in* Signalings beruhen könnte, wurde in einem nächsten Versuchsaufbau anstelle von CXCL1 eine Stimulation mit 3,0 mM Mn²⁺ durchgeführt (Abb. 7 B). Mn²⁺ stabilisiert die hochaffine Form der β₂-Integrine und umgeht damit das *Inside-out* Signaling [78]. Der zuvor beschriebene Defekt konnte unter allen getesteten Flussbedingungen

komplett aufgehoben werden. Dies galt sogar für Bereiche mit hoher Schubspannung von $8,0 \text{ dyne/cm}^2$. Um zu testen, ob dieser Effekt konzentrationsabhängig war, wurden weitere Experimente unter den gleichen Flussbedingungen mit einer Mn^{2+} -Konzentration von $1,0 \text{ mM}$ (Abb. 7 C) und $0,3 \text{ mM}$ (Abb. 7 D) durchgeführt. Auch unter diesen beiden Testbedingungen konnte der Defekt von $\text{HPK1}^{-/-}$ neutrophilen Granulozyten in der Verstärkung der Adhäsion vollständig aufgehoben werden.

Da nach dem Umgehen des *Inside-out Signalings* durch Mn^{2+} -Stimulation das *Adhesion Strengthening* zwischen den neutrophilen Granulozyten aus $\text{HPK1}^{+/+}$ - und $\text{HPK1}^{-/-}$ -Mäusen vergleichbar war, schien die weitere Signaltransduktion in das Zellinnere unbeeinträchtigt zu sein. Dies sprach dafür, dass HPK1 ihre Rolle spezifisch im *Inside-out Signaling* spielte.

3.3 Herstellung und Charakterisierung einer HL-60 HPK1-Knockdown Zelllinie

3.3.1 Generierung der HL-60 Zelllinien und Proteinquantifizierung

Um weiterhin zu klären, für welchen Schritt im *Inside-out Signaling* HPK1 eine Rolle spielte, sollten die monoklonalen Reporterantikörper KIM127, der die intermediär-affine Form und mAb24, der die hochaffine Form von β_2 -Integrinen erkennt, eingesetzt werden. Da diese beiden Antikörper jedoch nur im humanen System binden, musste zuerst eine menschliche Zelllinie generiert werden, bei der die Expression von HPK1 verringert war. Hierfür wurde die humane Leukämie-Zelllinie HL-60 verwendet. Um eine stabile Herunterregulierung von HPK1 zu gewährleisten, wurde eine spezifische *Small Hairpin* HPK1-RNA (shRNA) und eine *Scrambled* (SCR) Kontroll-shRNA verwendet, die keine Auswirkung auf die HPK1-Proteinexpression haben sollte. Diese wurden wie beschrieben über Transfektion mit den viralen Hüll- und Verpackungsplasmiden in HEK-293T-Zellen eingebracht und der virushaltige Überstand für einen lentiviralen Gentransfer in die HL-60 Zellen genutzt (Abb. 8 A). Anschließend an die Transduktion erfolgte eine Subklonierung, um monoklonale Zelllinien zu generieren und auszuschließen, dass man Mischpopulationen mit unterschiedlicher Restexpression von HPK1 unter Kultur nahm.

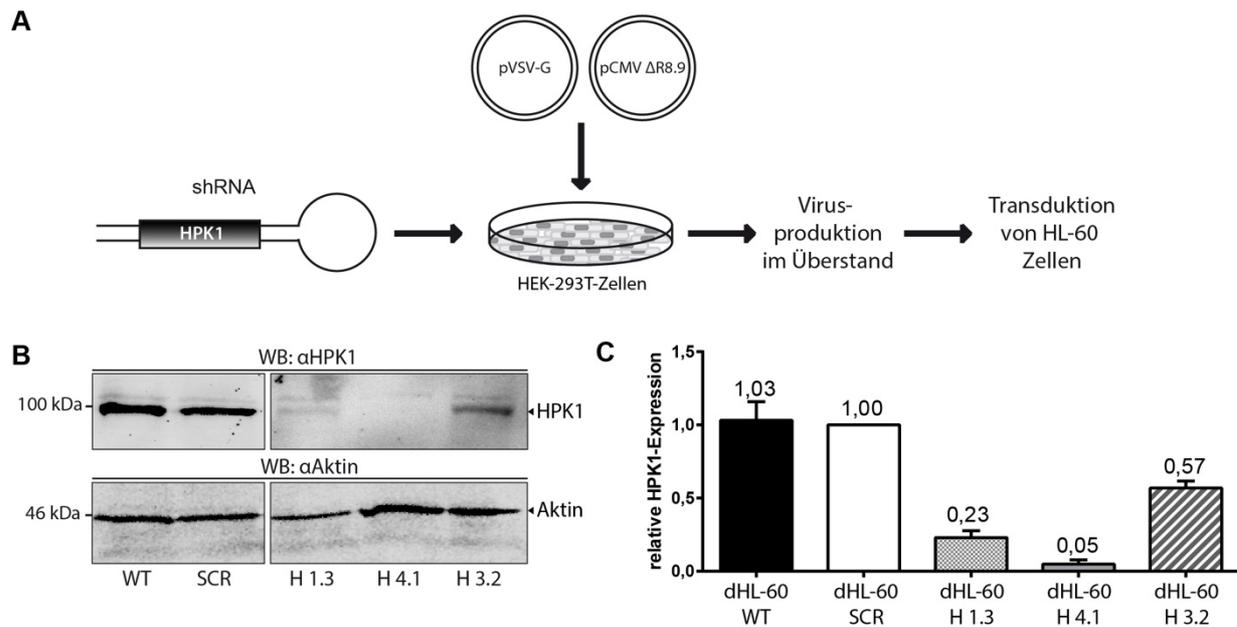


Abbildung 8: Herstellung der HL-60 HPK1-Knockdown Zelllinie. (A) HEK-293T-Zellen wurden mit HPK1-shRNA sowie SCR-shRNA kodierenden Vektoren und den viralen Plasmiden vVSV-G und pCMV Δ R8.9 transfiziert. Der von diesen Zellen produzierte virushaltige Überstand wurde anschließend zur Transduktion der HL-60 Wildtypzellen (WT) verwendet. (B) Detektion der HPK1-Proteinexpression von differenzierten transduzierten HL-60 (dHL-60) Zellen mittels Western Blot. Verwendet wurden Antikörper gegen HPK1 (N-19) und Aktin (I-19). Dargestellt sind Lysate aus dHL-60 Zellen WT, *Scrambled*-Kontrollzellen (SCR) sowie drei Subklonen transduziert mit unterschiedlichen HPK1-shRNA-Vektoren mit der Bezeichnung H 1.3, H 4.1 und H 3.2. (C) Relative HPK1-Expression ermittelt durch die Bildung eines Quotienten der AUC-Werte der HPK1- und Aktin-Proteinexpressionen. Gemittelt wurden die Werte aus 4 technischen Replikaten.

Um den Erfolg der Transduktion und die gewünschte Verminderung der HPK1-Proteinexpression zu kontrollieren, wurden die einzelnen Subklone der transduzierten HL-60 Zellen in der Zellkultur expandiert und für 6 Tage unter dem Einfluss von DMSO zu Neutrophilen-ähnlichen dHL-60 Zellen differenziert. Anschließend erfolgte eine Lyse der dHL-60 Zellen mit dem zytosolischen Lysepuffer Berton II. Nach Messen der Proteinkonzentrationen wurden die Proben mit Laemmli-Puffer aufgekocht und nach erfolgter Auftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion der Proteine wurde der anti-HPK1 Antikörper und zur Quantifizierung der anti-Aktin Antikörper verwendet. Hierbei zeigten die mit dem SCR-Vektor transduzierten dHL-60 Kontrollzellen (dHL-60 SCR) eine ähnliche HPK1-Proteinexpression wie die dHL-60 WT-Zellen (Abb. 8 B). Außerdem konnte eine erfolgreich verminderte HPK1-Proteinexpression bei drei mit HPK1-shRNA-Vektoren transduzierten Subklonen (H 1.3, H 3.2 und H 4.1) festgestellt werden. Um

diesen Effekt zu quantifizieren, wurde das Experiment drei weitere Male durchgeführt und ein Quotient aus den Mittelwerten der AUC-Werte der Intensitäten der HPK1- und Aktin-Banden der Western Blots gebildet (Abb. 8 C). Per Definition wurde die Proteinexpression in den dHL-60 SCR-Zellen als 100% angesehen. dHL-60 WT-Zellen zeigten eine ähnliche Expression an HPK1 wie die SCR-Kontrollzellen. Der dHL-60 Subklon H 3.2 zeigte eine verminderte Proteinexpression von HPK1 auf ein Level von 56,8%, der Subklon H 1.3 auf 23,0% und der Subklon H 4.1 auf 4,8%. Aufgrund der ausgeprägten Verminderung der HPK1-Proteinexpression wurden die (d)HL-60 H 4.1 Zellen für weitere Experimente verwendet.

3.3.2 Regulation der β_2 -Integrinexpression und Affinitätsregulation

Zuerst sollte geklärt werden, ob Unterschiede in der Expression der β_2 -Integrine zwischen den WT, SCR und H 4.1 HL-60 Zellen bestanden und ob sich diese durch Stimulation adäquat regulieren ließen. Hierfür wurden erneut WT, SCR und H 4.1 HL-60 Zellen ausdifferenziert. Die Untereinheiten CD11a, CD11b und CD18 der β_2 -Integrine LFA-1 und Mac-1 wurden zu diesem Zweck mit Fluoreszenzgekoppelten Antikörpern angefärbt und die Expression mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. Zudem wurde getestet, ob sich eine verstärkte Expression von CD11b und CD18 durch eine Stimulation mit IL-8 oder fMLP induzieren ließ. Die CD11a-Expression von dHL-60 WT und H 4.1 war vergleichbar und ließ sich wie erwartet nicht weiter durch Stimulation erhöhen (Abb. 9 A). In den dHL-60 SCR Zellen zeigte im Vergleich dazu eine geringfügig erhöhte Grundexpression, die auch durch Stimulation nicht beeinflusst werden konnte. Die dHL-60 WT und H 4.1 Zellen zeigten eine intakte Regulation von CD11b, die sich durch Stimulation mit fMLP deutlich erhöhen ließ. Dahingegen war die Expression und Regulation unter Stimulation in den dHL-60 SCR Zellen komplett abwesend. Demgegenüber ließen sich alle dHL-60 Zellen nicht mit IL-8 stimulieren. Die Expression von CD18 war in allen drei Zellarten vergleichbar, war jedoch nur in dHL-60 WT und H 4.1 Zellen durch Stimulation verstärkt zu detektieren. Um auszuschließen, dass die dHL-60 SCR Zellen aufgrund der Expansion eines defekten Zellklones eine solche Dysregulation zeigten, wurden die Experimente mit zwei weiteren dHL-60 SCR Subklonen wiederholt. Die-

se führten jedoch zu ähnlichen Ergebnissen (Daten nicht gezeigt), weshalb davon ausgegangen werden musste, dass alle mit SCR shRNA transduzierten dHL-60 SCR Zellen dysfunktional waren und nicht als Negativkontrolle verwendet werden konnten.

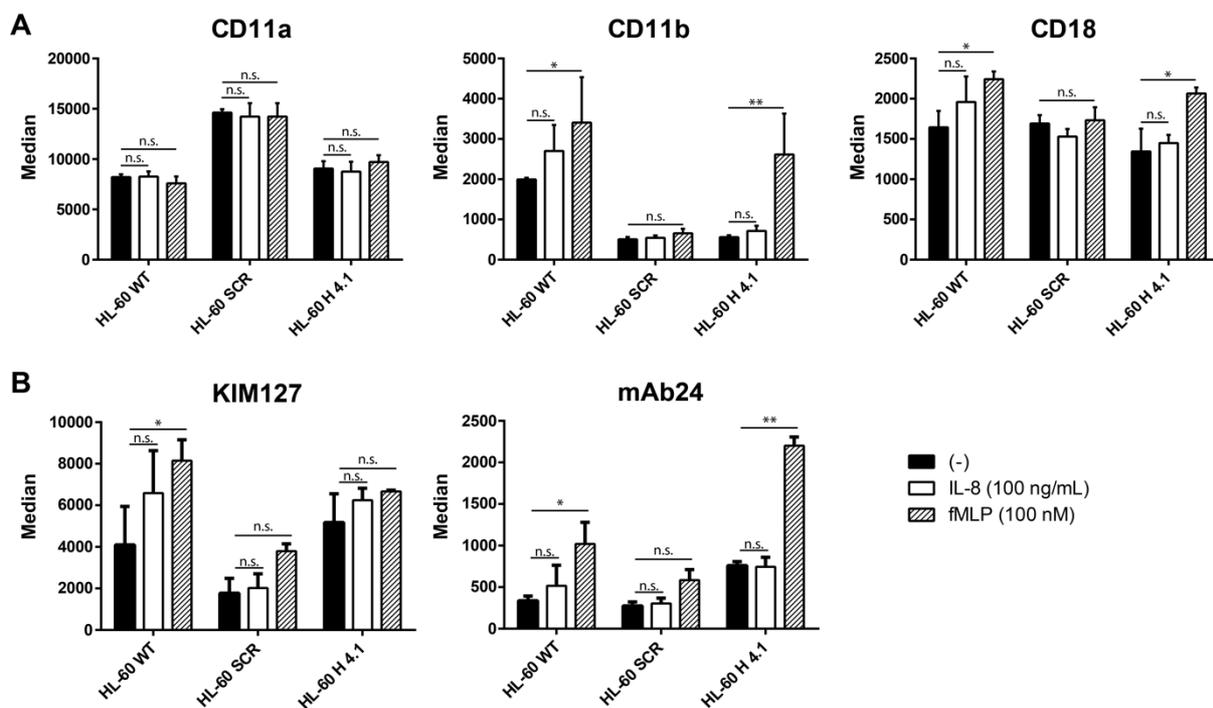


Abbildung 9: β_2 -Integrinexpression und Affinitätsregulation von shRNA-transduzierten dHL-60 Zellen. (A) Dargestellt ist die β_2 -Integrinexpression (CD11a, CD11b und CD18) von dHL-60 WT, SCR und H 4.1 Zellen. Gemessen wurden der Median der Fluoreszenzintensitäten in der Durchflusszytometrie und deren Regulation unter Stimulation mit entweder fMLP (100 nM) oder IL-8 (100 ng/ml). (B) Affinitätsregulation derselben Zellen mit denselben Stimuli. Detektion der intermediär- (KIM127) und hochaffinen Form (mAb24) der β_2 -Integrine durch Reporterantikörper und anschließender FACS-Analyse. n = 4; n.s. (nicht signifikant); *p-Wert < 0,05; **p-Wert < 0,01.

Um zu kontrollieren, ob die verminderte HPK1-Proteinexpression in den dHL-60 Zellen wie im murinen System einen Einfluss auf die β_2 -Integrinaffinitätsregulation hat, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Zur Evaluation, welcher Schritt des *Inside-out Signalings* bei Abwesenheit von HPK1 gestört ist, wurde eine Färbung der Zellen mit den Fluorochrom-gekoppelten Reporterantikörpern KIM127 und mAb24 angewandt. Erneut zeigten die dHL-60 WT und H 4.1 Zellen eine ähnliches Bindungsverhalten von KIM127, dieses ließ sich aber nur bei den dHL-60 WT-Zellen durch eine Stimulation mit fMLP erhöhen (Abb. 9 B). Auch die Bindung von mAb24

der beiden Zelllinien erfolgte in einem vergleichbaren Ausmaß und ließ sich bei beiden durch Stimulation mit fMLP erhöhen (Abb. 9 B). Hierbei reagierten die dHL-60 H 4.1 Zellen sogar mit einem deutlich verstärktem Bindungsverhalten. Die dHL-60 SCR Zellen zeigten für beide verwendeten Reporterantikörper eine deutlich abgeschwächte Bindung, die sich auch durch Stimulation nicht weiter erhöhen ließ. Gleiches galt wie bereits bei der Expression der β_2 -Integrine auch für die anderen beiden analysierten dHL-60 SCR Subklone (Daten nicht gezeigt). Somit erwiesen sich insbesondere die zur Kontrolle hergestellten dHL-60 SCR Zellen als dysfunktional und der experimentelle Ansatz lieferte daher keine verwertbaren Ergebnisse. Aufgrund dieser methodischen Schwäche wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt.

3.4 Das HPK1-Interaktom

3.4.1 Klonierung des lentiviralen HPK1-EGFP-Expressionsvektors

HPK1 hat als Kinase eine wichtige Funktion bei der Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen. Dabei spielt die Interaktion von HPK1 mit ihren Adapterproteinen und Effektormolekülen sowie deren Phosphorylierung eine entscheidende Rolle. Um aufzuschlüsseln, welche Proteine in neutrophilen Granulozyten hierfür eine Rolle spielen, sollte das HPK1-Interaktom mittels GFP-NanoTrap[®]-Technologie und anschließender Massenspektrometrie identifiziert werden.

Zuerst musste ein Vektor generiert werden, der für ein Fusionsprotein kodierte, bei dem das humane HPK1 an ein verstärkt grün-fluoreszierendes Protein gekoppelt (EGFP) war. Als Ausgangsvektoren wurden der Spectinomycin-resistente pENTR223.1-Vektor mit der Sequenz für die humane HPK1-cDNA und der Kanamycin-resistente pEGFP-N1-Vektor, der für das EGFP kodiert, verwendet (Abb. 10 A). Diese beiden Vektoren wurden nach Transformation in TOP10-Bakterien durch eine Minipräparation aufbereitet.

Um sicherzustellen, dass sich innerhalb der HPK1-cDNA keine Mutationen befanden, wurde zunächst ein Kontrollverdau des pENTR223.1-Vektors mit dem Restriktionsenzym XhoI durchgeführt (Abb. 10 A+B). Durch die drei vorhandenen Schnittstellen innerhalb dieses Vektors waren drei DNA-Fragmente mit den Größen von 981, 1526 und 2812 Basenpaaren zu erwarten. Insgesamt wurden hierfür DNA-Proben

aus fünf unterschiedlichen Minipräparationen analysiert (Abb. 10 B, links). Alle fünf Proben zeigten im unterschiedlichen Ausmaß die korrekte Bandenhöhe. Probe Nummer 1 wurde für die weiteren Versuche verwendet.

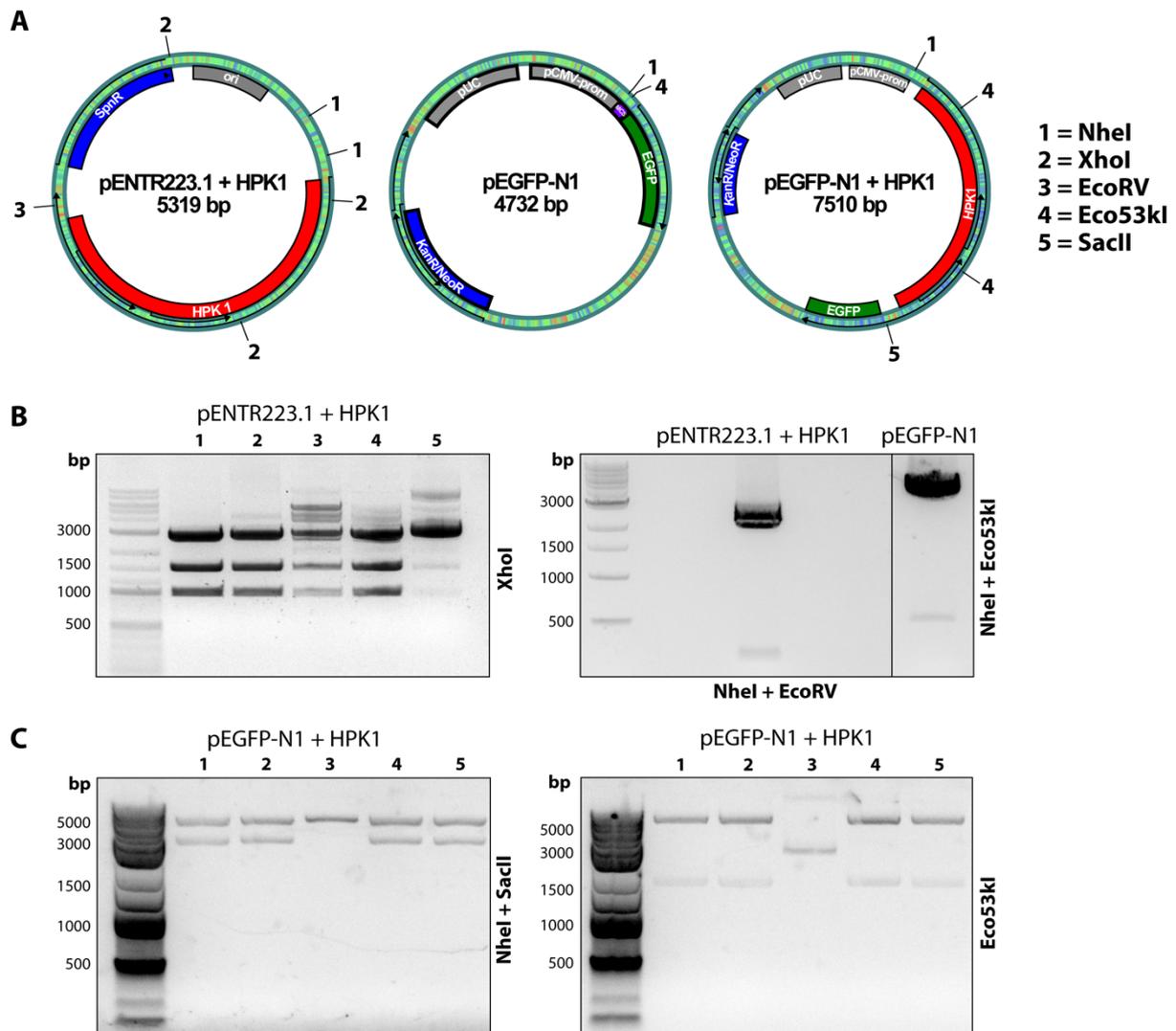


Abbildung 10: Klonierung des HPK1-EGFP-Expressionsvektors. (A) Dargestellt sind der HPK1-cDNA-tragende Vektor (pENTR223.1 + HPK1), der EGFP-tragende Vektor (pEGFP-N1) und der zu klonierende Zielvektor (pEGFP-N1 + HPK1). Annotiert sind HPK1 (rot), EGFP (grün) und die entsprechenden Antibiotikaresistenzen der Vektoren (blau). Die Zahlen symbolisieren die Schnittstellen der verwendeten Restriktionsenzyme. (B) Links dargestellt ist der Kontrollverdau des pENTR223.1 + HPK1-Vektors durch das Enzym XhoI. Rechts sind die durch Restriktionsenzyme geöffneten Vektoren pENTR223.1 + HPK1 und pEGFP-N1 vor der Gelextraktion mit anschließender Ligation zu sehen. Nummeriert sind fünf Ansätze aus unterschiedlichen Minipräparationen 1-5. (C) Gezeigt wird der Kontrollverdau des klonierten pEGFP-N1 + HPK1-Zielvektors durch zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme nach der erfolgten Ligation.

Nachdem die korrekte Sequenz der HPK1-cDNA in Probe Nummer 1 durch die Sequenzierung sichergestellt werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde der Zielvektor pEGFP-N1 + HPK1 generiert. Hierfür wurde der pEGFP-N1-Vektor durch die Restriktionsenzyme NheI und Eco53kI geöffnet und die für HPK1-kodierende Sequenz durch die Enzyme NheI und EcoRV aus dem pENTR223.1-Vektor geschnitten. Die verdauten Produkte wurden nach dem Laden mit einem DNA-Farbstoff elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und unter kurzer UV-Licht-Exposition analysiert (Abb. 10 B, rechts). Die HPK1-cDNA zeigte sich als Bande der Größe von 2806 Basenpaaren. Der geöffnete pEGFP-N1-Vektor zeigte sich auf der korrekten Höhe von 4732 Basenpaaren. Anschließend wurden die beiden gewünschten DNA-Produkte unter möglichst kurzer UV-Licht Exposition aus dem Agarosegel geschnitten und durch das Gelextraktionskit aufgereinigt. Die entstandenen Produkte wurden ligiert, um den Zielvektor pEGFP-N1 + HPK1 zu erhalten und dieser Ansatz erneut in TOP10-Bakterien transformiert. Nach Selektion durch Kanamycin erfolgte die Minipräparation. Der präparierte Zielvektor pEGFP-N1 + HPK1 wurde einem weiteren Kontrollverdau mit den Restriktionsenzymen NheI und SacII (Abb. 10 C, links) und Eco53kI (Abb. 10 C, rechts) zugeführt. Bis auf Probe Nummer 3 zeigten sich alle DNA-Fragmente auf den erwarteten Größen. Probe Nummer 1 wurde zum Abschluss von Punktmutationen zur Sequenzierung eingeschickt.

Um eine humane Zelllinie zu erhalten in der das HPK1-EGFP-Fusionsprotein exprimiert wird, sollte ein lentiviraler Gentransfer in HL-60 Zellen erfolgen. Zu diesem Zweck musste das bisher klonierte HPK1-EGFP-Konstrukt aus dem pEGFP-N1-Vektor in ein lentivirales Grundgerüst gebracht werden. Hierfür wurde ein FuVal-Vektor mit Puromycin-Resistenz gewählt, bei dem eine Puromycin-Resistenzkodierende Region über einen P2A-Linker von der für HPK1-EGFP kodierenden Region getrennt sein sollte, so dass diese sich zwar im selben Leseraster befanden, aber nach der Translation zwei separate Proteine entstanden (Abb. 11 A).

Es wurden sowohl für das HPK1-EGFP-Konstrukt, als auch für den pFu-P2A-Puro-Vektor *fwd*- und *rev*-Primer synthetisiert, die mit 18-20 Basenpaaren auf den Zielsequenzen binden. Des Weiteren enthielten die Primer für das HPK1-EGFP-Konstrukt einen 5'-Überhang von 15 Basenpaaren, bei denen jeweils die Basen vom *fwd*- und *rev*-Primer zum linearen Produkt des pFu-P2A-Puro-Vektors homolog waren. Mit diesen Primern wurden die beiden Vektoren einer *High-Fidelity (HiFi)*-PCR zuge-

führt, um beide Vektoren in linearisierter Form zu erhalten. Die entstandenen PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und unter UV-Licht analysiert (Abb. 11 B). Die Zahlen der Abbildung stehen für unterschiedliche Temperaturen eines Gradienten, der bei der *HiFi*-PCR gewählt wurde. Die erwartete Fragmentgröße des linearisierten HPK1-EGFP Konstrukts war 3402 Basenpaare und das des linearisierten pFu-P2A-Puro-Vektors 9909 Basenpaare groß. Die beiden linearisierten Vektoren wurden aus dem Agarosegel geschnitten, extrahiert und durch das *In-Fusion*-Klonierungskit zu dem gewünschten Zielvektor pFu-HPK1-EGFP-P2A-Puro vereint. Dieser Ansatz wurde nach Transformation in *Stella*-Bakterien durch eine Minipräparation aufgereinigt und zehn dieser Ansätze einem Kontrollverdau mit *EcoRI* unterzogen (Abb. 11 C). Nachdem der Restriktionsverdau mit *EcoRI* DNA-Fragmente auf entsprechenden Höhen lieferte, wurde Probe Nummer 5 zur Sequenzierung eingeschickt.

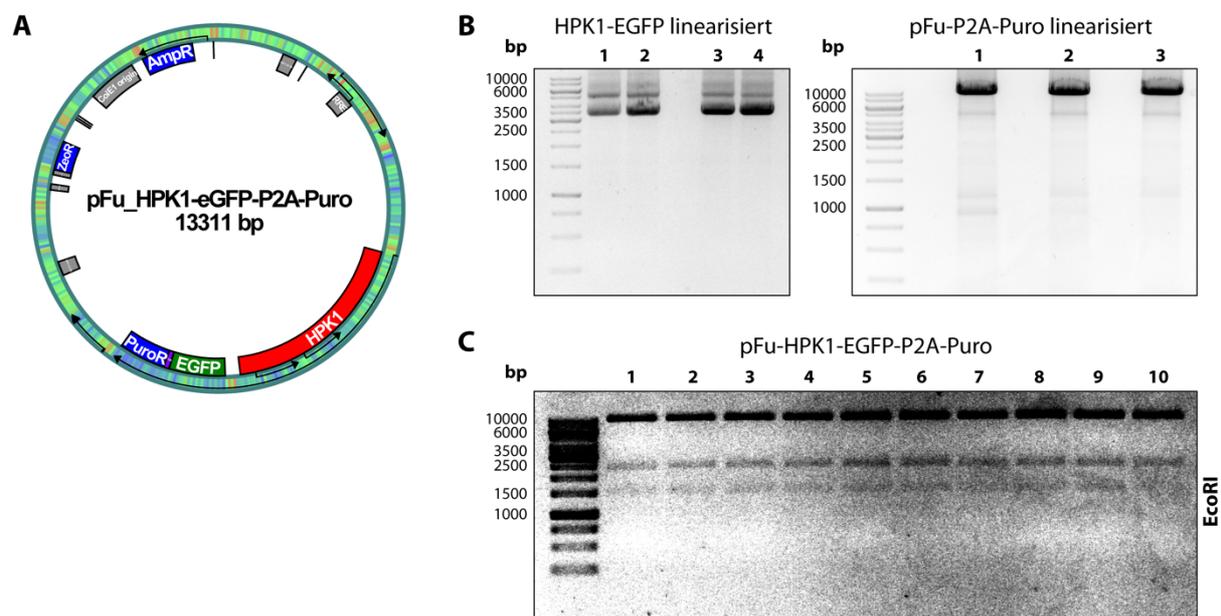


Abbildung 11: Herstellung des lentiviralen pFu-HPK1-EGFP-P2A-Puro-Vektors. (A) Gezeigt wird der lentivirale FuVal-Vektor mit HPK1 und einer zusätzlichen Puromycinresistenz, die durch einen P2A-Linker gekoppelt sind, der das Endprodukt der Klonierung darstellt. (B) Dargestellt sind die durch die *HiFi*-PCR generierten linearisierten Produkte HPK1-EGFP und pFu-P2A-Puro. Durch Zahlen markiert sind unterschiedliche Temperaturen bei der Durchführung der PCR 1-4 für das linearisierte HPK1-EGFP-Produkt sowie 1-3 für den linearisierten pFu-P2A-Puro-Vektor. (C) Kontrollverdau des durch *In-Fusion* Klonierung hergestellten pFu-HPK1-EGFP-P2A-Puro-Vektors durch das Restriktionsenzym *EcoRI*. Nummeriert mit den Zahlen 1-10 wurden zehn technische Replikationen der Minipräparation.

3.4.2 Herstellung und Charakterisierung der HL-60 HPK1-EGFP Zelllinie

Nach Bestätigung der korrekten Sequenz des klonierten Vektors wurde der lentivirale Gentransfer in die HL-60 Zellen vorgenommen (Abb. 12 A). Bevor dieser jedoch durchgeführt wurde, musste zuerst die korrekte intrazelluläre Lokalisation des HPK1-EGFP-Fusionsproteins überprüft werden. Zu diesem Zweck wurden HEK-293T-Zellen mit der Hilfe von Lipofectamin 2000 entweder mit dem pEGFP-N1-Vektor oder mit dem HPK1-EGFP tragenden Vektor transfiziert. Des Weiteren wurde das Aktin-Zytoskelett durch AlexaFluor-546 markiertes Phalloidin visualisiert und die Proben mit einem Konfokalmikroskop analysiert (Abb. 12 B). EGFP war gleichmäßig in allen Zellkompartimenten verteilt, wohingegen das HPK1-EGFP Fusionsprotein die erwartete Lokalisation im Zytoplasma zeigte und den Zellkern aussparte. Nach Bestätigung der adäquaten Lokalisation von HPK1-EGFP wurde der lentivirale Gentransfer in die HL-60 Zellen durchgeführt (HL-60 HPK1-EGFP). Als Kontrollzelllinie wurden zudem weitere HL-60 Zellen mit einem Vektor transduziert, der nur für EGFP kodierte (HL-60 EGFP). Erfolgreich transduzierte HL-60 Zellen wurden durch Hinzufügen von Puromycin in das Kulturmedium selektioniert und anschließend die fluoreszierenden Zellen mit der höchsten Intensität unter Zuhilfenahme der Durchflusszytometrie sortiert. Um zu bestätigen, dass es in den beiden transduzierten Zelllinien HL-60 EGFP und HL-60 HPK1-EGFP zu einer regelrechten Proteinexpression kam, wurden diese zusammen mit HL-60 WT-Zellen für 6 Tage unter dem Einfluss von DMSO zu Neutrophilen-ähnlichen dHL-60 Zellen differenziert. Im Western Blot zeigte sich, dass das endogene HPK1 mit einem Molekulargewicht von 97 kDa in allen Zelllinien exprimiert wurde (Abb. 12 C). Zudem befand sich in den dHL-60 HPK1-EGFP das entsprechende Fusionsprotein bei der errechneten Größe von 130 kDa. Dieselbe Membran wurde mit einem *Stripping*-Puffer behandelt, um bisherige Antikörperbindungen zu lösen und anschließend mit einem anti-GFP Antikörper (FL) behandelt. Dieser zeigte die Expression von EGFP mit einer Größe von 27 kDa in den dHL-60 EGFP Zellen und das HPK1-EGFP in der entsprechenden Zelllinie und auf der korrekten Höhe. Um zu kontrollieren, ob alle Lysate eine ähnliche Menge an Proteinen aufwiesen, wurde ein anti-Aktin Antikörper (I-19) verwendet. Hierbei zeigte sich eine nahezu identische Proteinmenge in allen drei Proben.

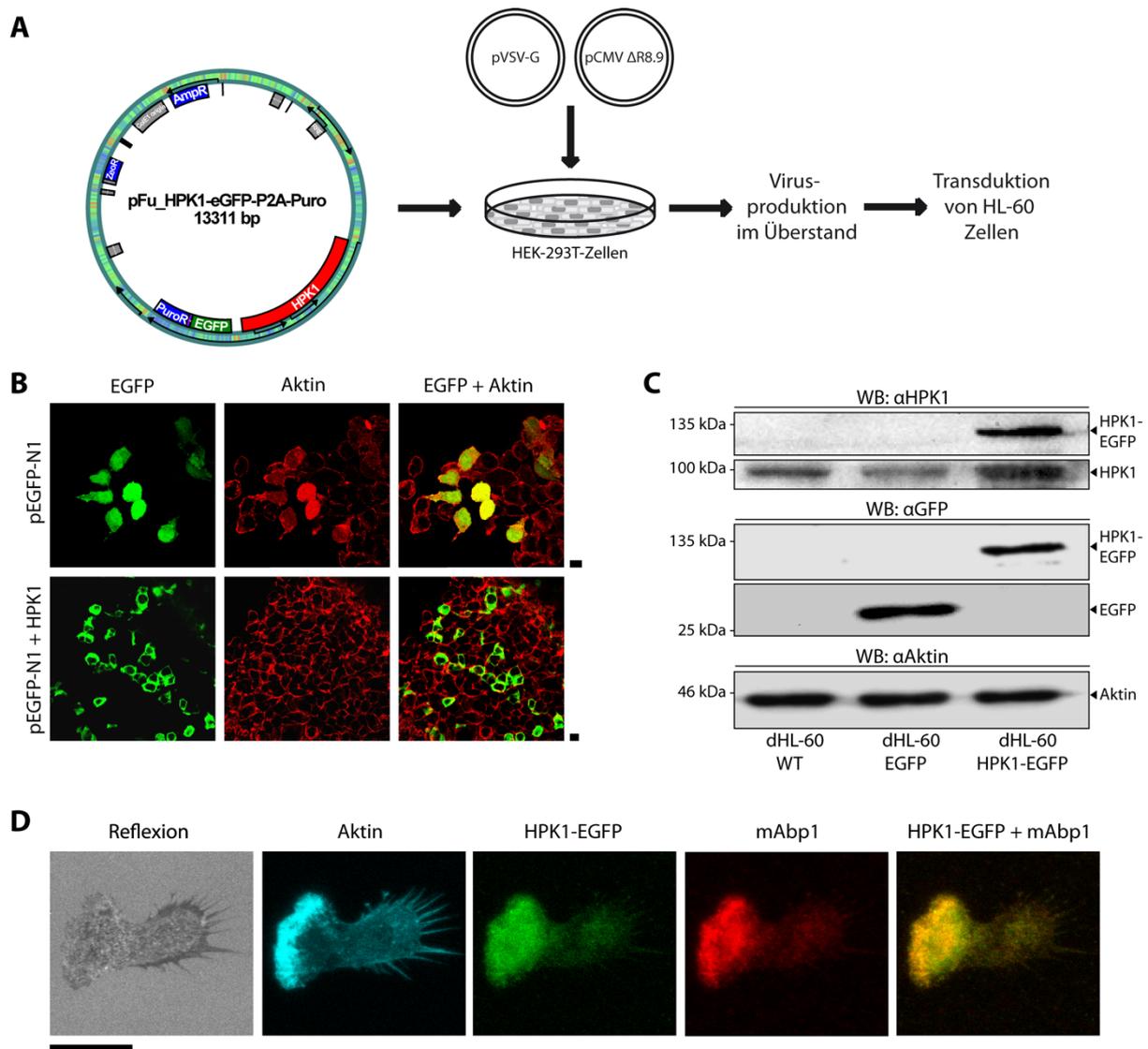


Abbildung 12: Generierung und Charakterisierung der HPK1-EGFP-exprimierenden HL-60 Zellen. *Modifiziert nach Bader et al., European Journal of Immunology 2022 [189].* (A) Schematische Darstellung der Transfektion des lentiviralen pFu-HPK1-EGFP-P2A-Puro-Vektors in die HEK-293T-Zellen mit anschließender Transduktion in HL-60 Zellen. (B) Konfokalmikroskopische Immunfluoreszenzaufnahmen von transient transfizierten HEK-293T-Zellen mit einem EGFP-Kontrollvektor (oben) oder dem HPK1-EGFP-Konstrukt (unten). Das Aktin-Zytoskelett wurde durch AlexaFluor-546 markiertes Phalloidin sichtbar gemacht. (C) Western Blot der lentiviral transduzierten HL-60 Zellen. Dargestellt sind dHL-60 WT, EGFP und HPK1-EGFP Zellen. Verwendet wurden ein Antikörper gegen HPK1 (oberes Feld), gegen GFP (Mitte) und gegen Aktin (unten). (D) Dargestellt ist eine konfokalmikroskopische Immunfluoreszenzaufnahme einer mit fMLP (100 nM) stimulierten dHL-60 HPK1-EGFP Zelle auf humanem Fibrinogen (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Neben dem exprimierten HPK1-EGFP wurde Aktin durch AlexaFluor-546 markiertes Phalloidin und mAbp1 durch einen Antikörper gefärbt. Links zu sehen ist die Reflexionsaufnahme im aufrechten Konfokalmikroskop. (B+D) Größenmarker (-) befinden sich neben bzw. unter den Bildern und entsprechen einer Länge von 10 μm . Abbildungen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Um weiterhin die korrekte Lokalisation des HPK1-EGFP-Konstrukts in den dHL-60 Zellen zu überprüfen, wurden diese auf ein mit humanem Fibrinogen (250 µg/ml) beschichtetes Deckgläschen durch Stimulation mit fMLP (100 nM) zur Adhärenz gebracht. Anschließend wurden diese fixiert und eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt. Neben dem exprimierten HPK1-EGFP wurde über einen polyklonalen Kaninchenantikörper das mAbp1 und das Aktin-Zytoskelett durch AlexaFluor-546 markiertes Phalloidin angefärbt. Bei Verwendung eines aufrechten Konfokalmikroskops wurde eine Reflexionsaufnahme angefertigt, um die Zellform und die Zelloberfläche darzustellen (Abb. 12 D). Des Weiteren wurden Aufnahmen in den entsprechenden Kanälen für die Färbungen von Aktin (cyan), mAbp1 (rot) und HPK1-EGFP (grün) angefertigt. An Stellen, an denen HPK1-EGFP und mAbp1 co-lokalisierten, wurde aufgrund der gewählten Farbkanäle ein gelber Bildpunkt sichtbar (Abb. 12 D, rechts). Wie bereits in der Literatur für das endogene HPK1 und mAbp1 beschrieben [126], ließ sich auch hier eine Co-Lokalisation von mAbp1 mit dem HPK1-EGFP Fusionsprotein im Lamellipodium nachweisen, wo eine weitere Co-Lokalisation der beiden Proteine mit Aktin zu beobachten war.

3.4.3 Co-Immunpräzipitation

Da die adäquate Proteinexpression in den HL-60 HPK1-EGFP Zellen und in den HL-60 EGFP Zellen sichergestellt werden konnte und auch die Lokalisation des Fusionsproteins dem des endogenen HPK1 entsprach, wurde im nächsten Schritt die geplante Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Ziel hierbei war, das HPK1-EGFP-Fusionsprotein durch ein spezifisches Präzipitations-Experiment mit den GFP-NanoTraps[®] zu präzipitieren (Abb. 13 A). Diese bestehen aus einem GFP-spezifischen Antikörperteil, welcher an ein Agarose-Kügelchen gekoppelt ist (Abb. 13 B).

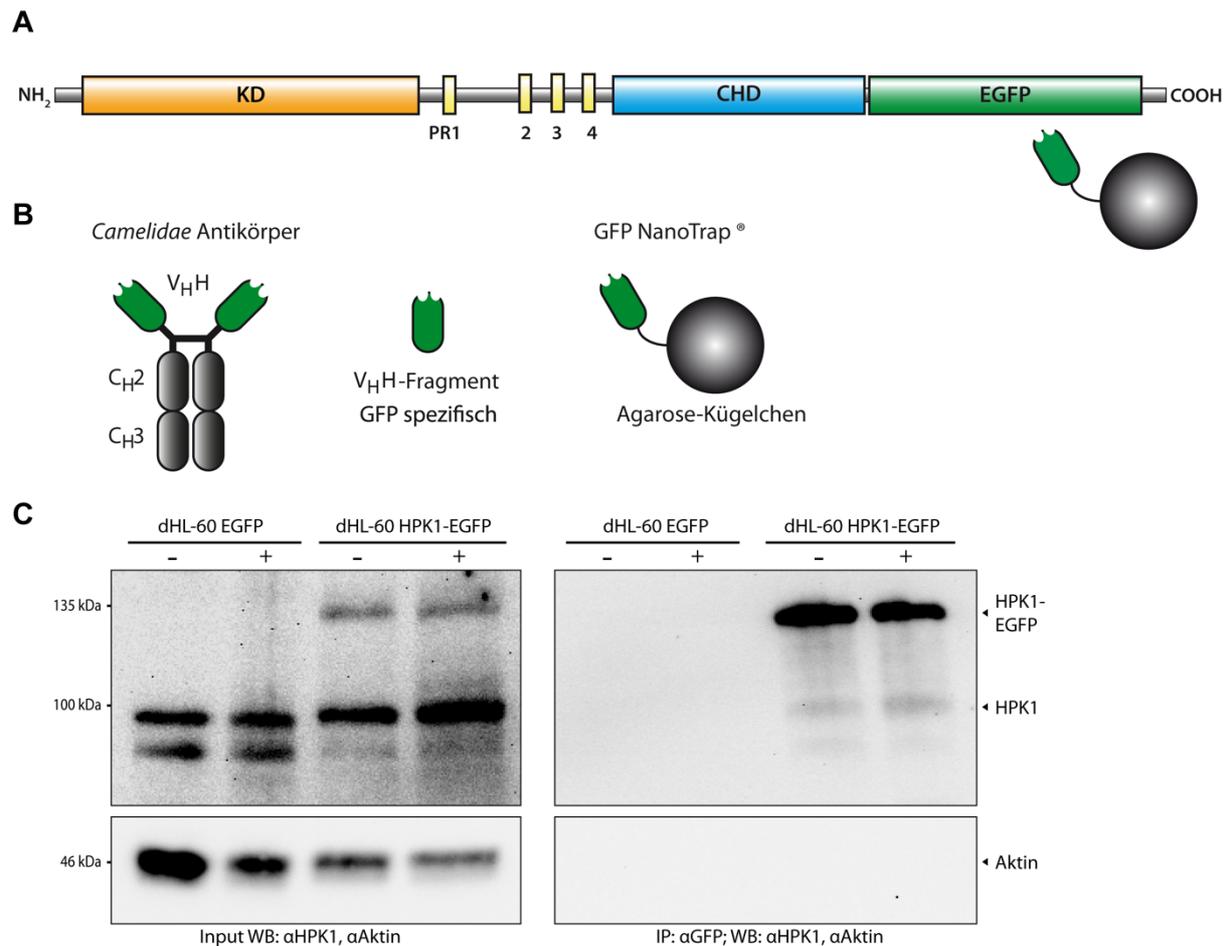


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Co-Immünpräzipitation mit GFP-NanoTraps®. Modifiziert nach Bader et al., *European Journal of Immunology* 2022 [189]. (A) Struktur des HPK1-EGFP-Fusionsproteins mit N-terminaler Kinasedomäne (KD), den prolinreichen Domänen (PR), der Citron Homology Domäne (CHD) und des C-Terminal gekoppelten grün fluoreszierenden Proteins (EGFP), an das eine Bindung der GFP-NanoTraps® erfolgen kann. (B) Aufbau der GFP-NanoTraps®. Der GFP-spezifische Anteil eines in *Camelidae* produziertem Antikörpers ist an ein Agarose-Kügelchen gekoppelt, welches für die Präzipitation genutzt werden kann. (C) Links zu sehen ist der Western Blot der *Input*-Kontrollen vor der Co-Immünpräzipitation von dHL-60 EGFP Zellen und HPK1-EGFP Zellen mit einem anti-HPK1 Antikörper und einem anti-Aktin Antikörper. Es wurden sowohl unstimulierte Zellen (-) als auch mit 1 mM Mn^{2+} -stimulierte Proben (+) analysiert. Rechts dargestellt ist der Western Blot nach stattgefundenener Co-Immünpräzipitation mit denselben Antikörpern.

Verglichen wurden unstimulierte und Mn^{2+} -stimulierte dHL-60 EGFP Zellen und dHL-60 HPK1-EGFP Zellen. Alle Gruppen wurden auf humanen Fibrinogen (250 $\mu\text{g/ml}$) ausgesät und die Stimulation mit Mn^{2+} (1 mM) in Adhäsionsmedium durchgeführt. Die adhärennten Zellen wurden durch den zytosolischen Lysepuffer Berton II von den Petrischalen gelöst. Jeweils 50 μl der Zelllysate wurden als Input-

Kontrollen entnommen, deren Proteinkonzentration gemessen und mit Laemmli-Puffer aufgeköcht. Mit dem restlichen Zelllysate wurde die Co-Immunpräzipitation durchgeführt. Nachdem diese abgeschlossen war und nach den erfolgten Waschschritten wurden die präzipitierten Proteine ebenfalls durch den Laemmli-Puffer von den GFP-NanoTraps[®] unter Hitze gelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

Sowohl die Input-Kontrollen als auch die von den GFP-NanoTraps[®] gelösten Proteinproben wurden durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mithilfe eines anschließenden Western Blots analysiert. Zuerst wurde die Membran mit einem Antikörper gegen HPK1 inkubiert. In den Input-Kontrollen zeigten alle vier Proben das endogene HPK1 bei einer Größe von 97 kDa (Abb. 13 C, links). Die dHL-60 HPK1-EGFP Zellen exprimierten darüber hinaus wie erwartet das HPK1-EGFP-Fusionsprotein mit einer Größe von 130 kDa. In den beiden EGFP-Proben war keine Form von HPK1 zu finden. Dies spricht für die hohe Spezifität des Versuchs. In den HPK1-EGFP Proben konnte das Fusionsprotein deutlich dargestellt werden. Darüber hinaus war das endogene HPK1 detektierbar (Abb. 13 C, rechts).

3.4.4 Das HPK1-Interaktom

Nachdem sichergestellt werden konnte, dass das HPK1-EGFP-Fusionsprotein erfolgreich durch die Co-Immunpräzipitation angereichert wurde und keine unspezifischen Bindungen in den Kontrollen nachweisbar waren, wurden im nächsten Schritt die präzipitierten Proteine mittels Massenspektrometrie analysiert.

Für diese massenspektrometrische Analyse wurde das Protokoll wie in der Co-Immunpräzipitation durchgeführt, lediglich für den letzten Waschschriff wurde ein Dilutionspuffer ohne DTT verwendet und die GFP-NanoTraps[®] wurden nicht mit dem Laemmli-Puffer aufgeköcht, sondern vollständig von Puffer befreit und drei weitere Male mit 50 mM Tris-Cl (pH 8) gewaschen und bis zu weiteren Analyse bei -20° C gelagert. Unmittelbar vor der Massenspektrometrie wurden die Proben von den GFP-Nanotraps[®] verdaut, aufgereinigt und im Massenspektrometrie-Ladepuffer eluiert.

Die Auftrennung der Proben über Flüssigchromatographie (LC) und die weitere Analyse in der Massenspektrometrie (MS) erfolgte in Kooperation mit dem Zentrum für

Proteinanalytik (ZfP) der LMU. Die Ergebnisse von drei technischen Replikaten von jeder der vier Proben (dHL-60: EGFP unstimuliert, EGFP stimuliert, HPK1-EGFP unstimuliert und HPK1-EGFP stimuliert) dieses Experimentes wurden durch die Analysesoftware MaxQuant [186] ausgewertet. Dort wurden die Peptide quantifiziert und den einzelnen Sequenzen der Ausgangsproteine zugeordnet. Diese Sequenzen wurden anhand einer Analyse der *UniProt*-Datenbank identifiziert und Gennamen, sowie Proteinnamen zugeordnet. Verglichen wurden die Proben aus den dHL-60 HPK1-EGFP Zellen mit den dHL-60 EGFP Kontrollzellen. Dabei wurden jeweils die beiden unstimulierten und die beiden stimulierten Proben einander gegenübergestellt. Als relevant wurden alle identifizierten Proteine angesehen, die mit einer mehr als doppelten Erhöhung des iBAQ-Quotienten auf einer \log_2 -Skala gemessen werden konnten. Unspezifische Interaktionspartner wurden durch das Durchführen einer Analyse mit der *Crapome*-Software (crapome.org) entfernt. Alle verbleibenden Mitglieder des HPK1-Interaktoms wurden anschließend in drei große Untergruppen unterteilt (Abb. 14). Die erste Gruppe bildeten Proteine, die nur in den unstimulierten dHL-60 HPK1-EGFP Proben vermehrt im Vergleich zu den dHL-60 EGFP Kontrollzellen detektiert werden konnten. Diese wurden wie auch in den weiteren Darstellungen in weiß dargestellt (Abb. 14, links). Proteine, die in den Mn^{2+} -stimulierten Proben im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle verstärkt exprimiert wurden, tragen einen dunkelblauen Hintergrund (Abb. 14, rechts). Die Proben die sowohl in unstimulierten als auch in stimulierten Proben vermehrt in dHL-60 HPK1-EGFP Proben im Vergleich zur Negativkontrolle zu finden waren, wurden hellblau hinterlegt (Abb. 14, Mitte). Insgesamt konnten 115 Proteine identifiziert werden. Hierbei waren 58 Proteine nur in den unstimulierten Proben, 18 Proteine waren sowohl in den unstimulierten als auch in den Mn^{2+} -stimulierten Proben und 39 Proteine nur in den stimulierten Proben zu detektieren.

unstimuliert			Mn ²⁺ -stimuliert		
ABCB10	ELAVL1	RTN3	ABCE1	ALDH18A1	GMIP
ACAT1	FAM120A	S100A6	APOO	ANXA2	HIGD1A
ANXA1	FTL	SCAMP4	BST1	AP3S1	HIGD2A
ANXA7	GNG5	SEMG1	CNPY3	APIP	KCNAB2
ATP2B4	GRB2	SEMG2	COPZ1	ARF6	LASP1
ARHGEF6	GRN	SRI	DEFA3	ARFIP1	LEMD2
BAG2	HRH4	SRSF3	HINT1	ARHGDI1	LGALS3
BAK1	ISOC2	STX4	HSPB1	ATP5J2	LMBRD1
BOLA2	JUP	SUB1	HSPE1	ATP6V0D2	METTTL7A
BPI	LBR	SYK	ITGA5	CHTOP	NDUFA4
C16orf96	MOB1A	TKT	MAN2B1	CPPED1	NDUFC2
CBX3	NUP54	TMX1	MAP4K1	CTSZ	PFKP
CLTA	OCIAD2	TMEM205	NME2P1	CYB5R3	PSME3
CLTB	PDK3	TXNDC12	NUCB2	DBT	RANBP1
CTSC	PECAM1	TYROBP	PLAUR	DEGS1	RPL32
DLST	PGD	VKORC1	RGS11	DHX38	SLC35E1
DNPEP	PKP1		SHMT2	ECHS1	TAGLN2
DSC1	PLGRKT		SRRM2	EPB41L3	THUMPD1
DSG1	POF1B			ERO1L	YWHAH
DYNLRB1	PTPN11			GPX1	
EIF2S2	RAC1				
58			18		39

Abbildung 14: Kandidaten des HPK1-Interaktoms. Modifiziert nach Bader et al., *European Journal of Immunology* 2022 [189]. Zu sehen sind die Gennamen der Proteine, die durch dreimaliges Durchführen der Massenspektrometrie der Co-Immunpräzipitation Proben verstärkt in dHL-60 HPK1-EGFP im Vergleich zu den dHL-60 EGFP Ausgangszellen detektiert werden konnten. Zu diesen wurde nach Analyse mit der MaxQuant-Software alle Proben mit einer mehr als doppelten Erhöhung des iBAQ-Quotienten auf einer log₂-Skala im Vergleich zur EGFP-Kontrolle gezählt. Zudem wurde zur Reduktion unspezifischer Interaktionspartner eine *Crapome*-Analyse durchgeführt. Proteine, die nur bei unstimulierten Ausgangszellen vermehrt gefunden werden konnten, wurden weiß hinterlegt, Proteine aus stimulierten Zellen in dunkelblau und solche die sich in beiden Proben in erhöhter Konzentration befanden in hellblau dargestellt.

3.4.5 Funktionelle Unterteilung des HPK1-Interaktoms

Um die Vielzahl der identifizierten Mitglieder des HPK1-Interaktoms zu ordnen, wurden diese in kleinere Untergruppen entsprechend ihrer biologischen Funktion unterteilt. Der Fokus lag hierbei bei auf Funktionen, die für die Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten eine Rolle spielen. Deshalb wurden Signalproteine, Zytoskelett-assoziierte Proteine, Transmembranproteine und Adapterproteine als die vier großen Hauptgruppen gewählt (Abb. 15). Die farbliche Kodierung mit weiß (Protein

nur in unstimulierten Proben), hellblau (Protein in unstimulierten und stimulierten Proben) und dunkelblau (Protein nur in stimulierten Proben) wurde beibehalten. Alle Proteine, die nicht in eine dieser Gruppen einzuordnen waren, wurden unter der Kategorie „Sonstige“ zusammengefasst. Zu den Vertretern der vier Hauptkategorien wurde eine Literaturrecherche durchgeführt (Tab. 4) auf die in der Diskussion näher eingegangen wird.

Insgesamt waren von den 115 identifizierten Proteinen des HPK1-Interaktoms 23 den Signalproteinen, fünf den Zytoskelett-assoziierten Proteinen, acht den Transmembranproteinen und fünf den Adapterproteinen zuzuordnen. Hierbei wurden in den unstimulierten Proben 11 Signalproteine, ein Zytoskelett-assoziiertes Protein, sieben Transmembranproteine und ein Adapterprotein detektiert. In den stimulierten Proben ließen sich sieben Signalproteine, drei Zytoskelett-assoziierte Proteine, kein Transmembranprotein und drei Adapterproteine nachweisen. Darüber hinaus konnten fünf Signalproteine, ein Zytoskelett-assoziiertes Protein, ein Transmembranprotein und ein Adapterprotein identifiziert werden, welche sowohl in den unstimulierten als auch in den stimulierten Proben nachweisbar waren. Des Weiteren gab es insgesamt 74 Proteine, die sich keiner dieser Kategorien zuordnen ließen und der Kategorie „Sonstige“ zugeteilt wurden.

Signalproteine			Zytoskelett-assozierte Proteine	Transmembranproteine		Adapterproteine
ANXA1	GNG5	S100A6	DYNLRB1	ATP2B4	TMEM205	GRB2
ANXA7	MOB1A	SRI		HRH4	TYROBP	
ARHGEF6	PTPN11	SYK		PECAM1		
FAM120A	RAC1			SCAMP4	STX4	
BST1	MAP4K1	RGS11	HSPB1	ITGA5		NUCB2
HINT1	NME2P1					
ANXA2	ARHGDI1	LGALS3	EPB41L3			AP3S1
APIP	CPPED1		LASP1			ARFIP1
ARF6	GMIP		TAGLN2			YWHAH

Sonstige					
ABCB10	CBX3	DNPEP	JUP	PKP1	SRSF3
ACAT1	CLTA	EIF2S2	LBR	PLGRKT	SUB1
BAG2	CLTB	ELAVL1	NUP54	POF1B	TKT
BAK1	CTSC	FTL	OCIAD2	RTN3	TMX1
BOLA2	DLST	GRN	PDK3	SEMG1	TXNDC12
BPI	DSC1	ISOC2	PGD	SEMG2	VKORC1
C16orf96	DSG1				
ABCE1	CNPY3	DEFA3	MAN2B1	SHMT2	
APOO	COPZ1	HSPE1	PLAUR	SRRM2	
ALDH18A1	CYB5R3	ERO1L	LEMD2	PFKP	THUMPD1
ATP5J2	DBT	GPX1	LMBRD1	PSME3	
ATP6V0D2	DEGS1	HIGD1A	METTL7A	RANBP	
CHTOP	DHX38	HIGD2A	NDUFA4	RPL32	
CTS2	ECHS1	KCNAB2	NDUFC2	SLC25E1	

Abbildung 15: Funktionelle Einteilung des HPK1-Interaktoms. Die Kandidaten des HPK1-Interaktoms wurden in Untergruppen entsprechend ihrer funktionellen Zugehörigkeit eingeteilt. Unterschieden wurden Signalproteine, Zytoskelett-assoziierte Proteine, Transmembranproteine und Adapterproteine. Alle weiteren Proteine, die nicht in eine dieser Kategorien zugeteilt werden konnten, wurden unter Sonstige eingeordnet. Die farbliche Kodierung für unstimuliert (weiß), stimuliert (dunkelblau) und in beiden Proben vorhanden (hellblau) wurde beibehalten.

Genname	Proteinname	Funktion	Literatur
ANXA1	<i>Annexin A1</i>	Signalprotein	[240]
ANXA2	<i>Annexin A2</i>	Signalprotein	[241]
ANXA7	<i>Annexin A7; Synexin</i>	Signalprotein	[242]
AP3S1	<i>Adapter Related Protein Complex 3 Sigma 2 Subunit</i>	Adapterprotein	[274]
APIP	<i>APAF1 Interacting Protein</i>	Signalprotein	[243]
ARF6	<i>ADP Ribosylation Factor 6; Cytohesin-1</i>	Signalprotein	[238]
ARFIP1	<i>ADP Ribosylation Factor Interacting Protein; Arfaptin-1</i>	Adapterprotein	[275]
ARHGDI1	<i>Rho GDP Dissociation Inhibitor Alpha</i>	Signalprotein	[218]
ARHGEF6	<i>Rac/Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor 6</i>	Signalprotein	[224]
ATP2B4	<i>Plasma Membrane Calcium-transporting ATPase 4</i>	Transmembranprotein	[267]
BST1	<i>ADP Ribosyl Cyclase/Cyclic ADP Ribose Hydrolase 2; CD157</i>	Signalprotein	[239]
CPPED1	<i>Serine/Threonine-Protein Phosphatase CPPED1</i>	Signalprotein	[244]
DYNLRB1	<i>Dynein Light Chain Roadblock-Type 1</i>	Zytoskelett-assoziiertes Protein	[253]
EPB41L3	<i>Band 4.1-like Protein 3; DAL-1</i>	Zytoskelett-assoziiertes Protein	[254]
FAM120A	<i>Constitutive Coactivator of PPAR-gamma-like Protein 1; Oxidative stress-associated Src activator</i>	Signalprotein	[215-218]
GMIP	<i>GEM-interacting Protein</i>	Signalprotein	[225]
GNG5	<i>G-Protein Subunit Gamma 5</i>	Signalprotein	[248]
GRB2	<i>Growth Factor Receptor-bound Protein 2</i>	Adapterprotein	[146-150]
HINT1	<i>Histidine Triad Nucleotide-binding Protein 1</i>	Signalprotein	[247]
HRH4	<i>Histamine H4 Receptor</i>	Transmembranprotein	[268]
HSPB1	<i>Heat Shock Protein Beta-1; HSP27</i>	Zytoskelett-assoziiertes Protein	[255, 256]
ITGA5	<i>Integrin Alpha-5</i>	Transmembranprotein	[269]
LASP1	<i>LIM and SH3 Domain Protein 1</i>	Zytoskelett-assoziiertes Protein	[257]
LGALS3	<i>Galectin-3</i>	Signalprotein	[250]

MAP4K1	<i>Hematopoietic Progenitor Kinase 1</i>	Signalprotein	[126]
MOB1A	<i>MOB Kinase Activator 1A</i>	Signalprotein	[251]
NME2P1	<i>Putative Nucleoside Diphosphatase Kinase</i>	Signalprotein	[245]
NUCB2	<i>Nucleobindin-2</i>	Adapterprotein	[276]
PECAM1	<i>Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>	Transmembranprotein	[270]
PTPN11	<i>Tyrosine-Protein Phosphatase non-Receptor Type 11, SHP-2</i>	Signalprotein	[226]
RAC1	<i>Ras-related C3 Botulinum Toxin Substrate 1</i>	Signalprotein	[227]
RGS11	<i>Regulator of G-Protein Signaling 11</i>	Signalprotein	[249]
S100A6	<i>Protein S100A6</i>	Signalprotein	[246]
SCAMP4	<i>Secretory Carrier-associated Membrane Protein 4</i>	Transmembranprotein	[271]
SRI	<i>Sorcin</i>	Signalprotein	[252]
STX4	<i>Syntaxin-4</i>	Transmembranprotein	[272]
SYK	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>	Signalprotein	[199-210]
TAGLN2	<i>Transgelin-2</i>	Zytoskelett-assoziiertes Protein	[258-264]
TMEM205	<i>Transmembrane Protein 205</i>	Transmembranprotein	[273]
TYROBP	<i>DNAX-Activation Protein 12 (DAP12)</i>	Transmembranprotein	[265, 266]
YWHAH	<i>14-3-3 Protein Eta</i>	Adapterprotein	[277]

Tabelle 4: Kandidaten des HPK1-Interaktoms. Aufgelistet sind alle Kandidaten der vier Hauptkategorien (Signalproteine, Zytoskelett-assoziierte Proteine, Transmembranproteine und Adapterproteine) in alphabetischer Reihenfolge. Angegeben sind die Gennamen, Proteinennamen, die Funktion und die dazugehörige Literaturstelle.

4 Diskussion

4.1 Die genotypische Charakterisierung der HPK1-defizienten Versuchstiere

Zur Charakterisierung der verwendeten HPK1^{+/+}- und HPK1^{-/-}-Versuchstiere wurden diese vor der Isolierung der neutrophilen Granulozyten aus deren Knochenmark durch eine PCR genotypisiert. Bei den HPK1^{-/-}-Mäusen ist ein Teil von Exon 1 sowie das angrenzende Intron durch eine Neomycinselektionskassette ersetzt [174]. Durch die Verwendung von je zwei spezifischen Primern mit einem Paar für die Identifizierung des WT-Allels und einem weiteren Paar zur Detektion des HPK1^{-/-}-Allels war eine eindeutige Zuordnung der Mäuse zu den Genotypen homozygoter WT, homozygoter KO und heterozygote Tiere möglich. Alle für die Versuche verwendeten Mäuse zeigten entweder einen eindeutigen WT- oder KO-Genotyp bezüglich des HPK1-Gens. Der vollständige Verlust der Proteinexpression derselben HPK1^{-/-}-Mauslinie konnte in einer Vorarbeit in einem Western Blot nachgewiesen werden [126]. Somit waren die methodischen Grundlagen für weitere Experimente zur funktionellen Analyse der Funktion von HPK1 in den murinen neutrophilen Granulozyten vorhanden.

4.2 Die Bedeutung von HPK1 für das *Inside-out Signaling*

Erste Hinweise für die Funktion von HPK1 bei der Aktivierung der β_2 -Integrine (*Inside-out Signaling*) konnten bereits im erworbenen Immunsystem gewonnen werden. So konnte in T-Lymphozyten nachgewiesen werden, dass HPK1 als negativer Regulator des β_2 -Integrins LFA-1 agiert [178]. Die mechanistische Grundlage hierfür bildet das Konkurrieren von HPK1 mit ADAP um die Bindungsstelle am phosphorylierten SLP-76 [178]. Diese Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Integrinaktivierung [177]. ADAP und SLP-76 bilden dabei einen ternären Komplex mit dem *Src Kinase-associated Phosphorprotein of 55 kDa* (SKAP55), der zur Aktivierung der kleinen GTPase Rap1 führt [179, 180]. In T-Zellen mit intaktem HPK1 wurde die Rap1-Aktivierung und die folgende Bindung an RapL deutlich inhibiert. Dadurch unterblieb auch die Aktivierung von LFA-1 und die T-Zellen zeigten eine verminderte Bindung an den Integrinliganden ICAM-1. Dieser inhibierende Prozess war bei den HPK1-defizienten Zellen jedoch abwesend und diese zeigten eine erhöhte Rap1-Aktivität und ein verstärktes Bindungsverhalten zu ICAM-1 [178]. Ein ähnlicher regulatori-

scher Prozess konnte in B-Lymphozyten nachgewiesen werden, bei denen ebenfalls einer verstärkte Aktivierung von Rap1 in HPK1-defizienten WEHI-231 Zellen stattfand [175].

Da die Wirkung von HPK1 stark von ihren Interaktionspartnern abhängt, ist deren Wirkung in verschiedenen Zellarten unterschiedlich. So konnte in murinen neutrophilen Granulozyten, die aus dem Knochenmark von HPK1-defizienten Mäusen isoliert wurden, erste Hinweise darauf geliefert werden, dass HPK1 in neutrophilen Granulozyten ein positiver Regulator des β_2 -Integrins LFA-1 ist [126]. HPK1 war dort für die CXCL1-induzierte Aktivierung von LFA-1 notwendig. Bei Abwesenheit von HPK1 waren die β_2 -Integrin-abhängigen Schritte der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten eingeschränkt. Ein besonders wichtiger Hinweis zur Bedeutung der Rolle von HPK1 im *Inside-out Signaling* konnte hierbei durch ein Durchflusszytometrie-Experiment gewonnen werden, dass das Bindungsverhalten der neutrophilen Granulozyten zu ICAM-1 analysierte. Hierbei wurde ICAM-1 nur gebunden, wenn die β_2 -Integrine voll aktiviert waren, also ihre hochaffine Form mit gestreckter, offener Konformität erreicht hatten. Verglichen wurden hierbei aus dem Knochenmark isolierte murine neutrophile Granulozyten von HPK1^{+/+}- und HPK1^{-/-}-Mäusen, die entweder unstimuliert gelassen wurden oder mit CXCL1 oder Mn²⁺ stimuliert wurden [126]. Letzteres stabilisiert die hochaffine Form der β_2 -Integrine und umgeht somit das *Inside-out Signaling* [78]. Um sicherzustellen, dass das ICAM-1 nur durch LFA-1 gebunden wurde und nicht durch Mac-1, wurde letzteres durch einen Antikörper blockiert. In unstimulierten Proben zeigte sich kein Unterschied zwischen den HPK1^{+/+} und HPK1^{-/-} neutrophilen Granulozyten. Bei den mit CXCL1-stimulierten Zellen zeigte sich bei den HPK1^{-/-}-Proben ein signifikant niedrigeres Bindungsverhalten im Vergleich zu den HPK1^{+/+} neutrophilen Granulozyten. Bei einer Stimulation mit Mn²⁺ konnte dieser Defekt aufgehoben werden und beide Proben wiesen ein ähnliches Bindungsverhalten zu ICAM-1 auf [126]. Dies deutete bereits darauf hin, dass HPK1 eine Funktion innerhalb der β_2 -Integrinaktivierung (*Inside-out Signaling*) hat.

Um diese Befunde weiter zu untermauern und bei physiologischen Bedingungen unter Fluss zu bestätigen, wurde in dieser Arbeit ein *In-vitro*-Flusskammer-Experiment durchgeführt. Zudem sollte geklärt werden, ob HPK1 noch einen zusätzlichen Defekt bei der weiteren Signaltransduktion in das Zellinnere (*Outside-in Signaling*) hat. Hierfür wurden ähnliche Bedingungen zu dem oben beschriebenen Ver-

sich geschaffen, indem Flusskammern mit ICAM-1 und CXCL1 beschichtet wurden. In diese wurden aus dem Knochenmark isolierte neutrophile Granulozyten aus HPK1^{+/+}- und HPK1^{-/-}-Mäusen gegeben und eine schrittweise ansteigende Schubspannung wie in Kapitel 2.2.19 und 3.2 beschrieben angelegt. Das Resultat war vergleichbar mit dem bereits beschriebenen Defekt in der Verstärkung der Adhäsion [126]. Da hier ein Postadhäsion-Effekt evaluiert wurde, der sowohl ein intaktes *Inside-out* als auch ein regelrechtes *Outside-in Signaling* erfordert, könnte der Defekt bei Abwesenheit von HPK 1 nur einen dieser beiden oder die Kombination beider Signalwege betreffen. Um den genauen Mechanismus aufzudecken, wurden die Flusskammern in einem zweiten Versuchsaufbau mit ICAM-1 beschichtet und wie in der Durchflusszytometrie die β_2 -Integrinaktivierung durch die Stimulation mit Mn^{2+} induziert. Bei Stimulation mit verschiedenen Mn^{2+} -Konzentrationen zeigte sich zu allen getesteten Zeitpunkten eine vergleichbare Anzahl an adhärenenten HPK1^{+/+} und HPK1^{-/-} neutrophilen Granulozyten. Hieraus lässt sich schließen, dass die Signaltransduktion in das Zellinnere (*Outside-in Signaling*) intakt war. Somit nimmt HPK1 ihre Rolle spezifisch im *Inside-out Signaling* ein.

Da die β_2 -Integrinaktivierung als Wirkungsort der HPK1-vermittelten Effekte auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten festgestellt werden konnte, sollte in einem nächsten Schritt der Mechanismus hinter dieser Wirkung genauer aufgeschlüsselt werden. β_2 -Integrine können in mindestens drei verschiedenen Affinitätszuständen vorliegen. Um die Frage zu klären, für welchen Aktivierungsschritt HPK1 eine Rolle spielte, also ob sie für das Erreichen des intermediär-affinen oder des hochaffinen Zustands notwendig war, wurde die Durchflusszytometrie nach vorheriger Anfärbung der Proben durch die Reporterantikörper KIM127 und mAb24 durchgeführt. Diese erkennen wie beschrieben entweder nur die hochaffine Form der β_2 -Integrine (mAb24) oder die intermediär- und hochaffine Form (KIM127) [190, 191]. Die hier vorliegenden Experimente zeigten, dass die dHL-60 WT Zellen eine intakte Affinitätsregulation der β_2 -Integrine aufwiesen mit regelrechtem Bindungsverhalten der Reporterantikörper im unstimulierten Zustand und deutlicher Steigerung dieser Bindung bei Stimulation mit fMLP. Die dHL-60 SCR Zellen, die als Kontrolle dienen sollten, zeigten dagegen ein sehr niedriges Bindungsverhalten unter unstimulierten Bedingungen, welches sich auch nicht weiter durch Stimulation erhöhen ließ.

Der dHL-60 Zellklon H 4.1 mit einer HPK1-Restexpression von 4,8% zeigte bei ähnlicher Integrinexpression ein nahezu identisches Bindungsverhalten von KIM127 und mAb24 im unstimulierten Zustand wie die dHL-60 WT Zellen. Unter Stimulation mit fMLP ließ sich jedoch keine vermehrte Bindung von KIM127 induzieren. Dies sprach dafür, dass die Zellen keinen Defekt beim Erreichen der intermediär-affinen Form der β_2 -Integrine aufwiesen. Überraschenderweise zeigten die dHL-60 H 4.1 Zellen jedoch eine deutlich vermehrte Bindung von mAb24 unter fMLP-Stimulation, die deutlich über das Niveau der dHL-60 WT Zellen hinausging. Dies zeigte, dass das Erreichen des hochaffinen Affinitätszustandes nicht beeinträchtigt war.

Eine Erklärung könnte sein, dass die restliche Expression von HPK1 ausreicht, um die Signalwege, die bei der Integrinaktivierung erforderlich sind, aufrechtzuerhalten. Eine zweite Möglichkeit wäre, dass bei Abwesenheit von HPK1 nur noch die vierte beschriebene Form der Integrin-Affinitätszustände erreicht werden kann [105]. Bei dieser handelt es sich um eine offene Form, bei der die α - und β -Untereinheit dissoziiert vorliegen, aber der Kopfteil der Ektodomäne weiter in gebeugter Form verharret. Für diese Annahme spricht, dass diese vierte Form der β_2 -Integrine lediglich durch den Reporterantikörper mAb24, aber nicht durch KIM127, erkannt werden kann, wie im vorliegenden Fall. Daher könnte HPK1 ihre Rolle spezifisch bei Signalprozessen einnehmen, die für die Extension des Kopfteils der β_2 -Integrine verantwortlich sind. Gegen dieses Argument spricht jedoch, dass dieser Integrin-Affinitätszustand nicht funktionell ist und keine Bindung am Liganden ICAM-1 erfolgen kann. In weiteren Experimente (Daten nicht gezeigt) zeigte sich jedoch, dass diese Interaktion intakt war und auch keine weiteren Unterschiede in den β_2 -Integrin-vermittelten Rekrutierungsschritten zwischen den dHL-60 WT und H 4.1 vorlagen. Da die zur Kontrolle generierten dHL-60 SCR Zellen jedoch dysfunktional waren, waren die Experimente insgesamt wenig aussagekräftig und dieser methodische Ansatz wurde nicht weiter verfolgt.

4.3 shRNA-transduzierte HL-60 Zellen als humanes Zellsystem

Wie bereits beschrieben, wurde in dieser Arbeit die Leukämiezelllinie HL-60 als humanes Zellsystem verwendet, um die HPK1-Proteinexpression durch lentiviralen Gentransfer mit einem für shRNA-kodierenden Vektor zu reduzieren. Wie beschrie-

ben zeigten die dHL-60 SCR Zellen eine deutliche Dysfunktionalität. Hierbei kam es zu keiner adäquaten Expression und Regulation der Untereinheiten der β_2 -Integrine. Zudem konnten alle drei getesteten Subklone der dHL-60 SCR Zellen in Flusskammer-Experimenten unter Stimulation mit fMLP, im Gegensatz zu den dHL-60 WT Zellen, nicht zur Adhärenz auf ICAM-1 gebracht werden (Daten nicht gezeigt).

Gründe hierfür könnten sein, dass die verwendete SCR shRNA gegen eine mRNA innerhalb der Zelle kodiert war oder eine solche unspezifisch band und so eine Proteinexpression verhinderte [192]. Dadurch könnte ein Regulator für die Integrine oder der Zelladhäsion betroffen gewesen sein und somit die beschriebenen Defekte erklären.

Eine weitere Erklärung für diese Dysregulation wäre, dass durch den viralen Gentransfer und das Produkt der doppelsträngigen (sh)RNA (dsRNA) Abwehrmechanismen des unspezifischen Immunsystems aktiviert wurden [193, 194]. Dabei kann entweder das virale Genom selbst oder auch später produzierte dsRNA die Zellen aktivieren und zu einer erhöhten Interferonproduktion führen. Durch weitere Mechanismen wird die dsRNA-activated Protein Kinase (PKR) aktiviert, die den eIF2 α Komplex phosphoryliert [194, 195]. Dieser bindet anschließend an eIF2B und inhibiert die Translation an den Ribosomen. Zudem werden RNAsen aktiviert, die neben Degradierung der shRNA auch zum unspezifischen Abbau von mRNA führen können und auf diesem Weg ebenfalls eine Proteinexpression verhindern [194, 196]. Zudem konnte gezeigt werden, dass diese Signalwege durch eine direkte Bindung der dsRNA an den *Toll-like* Rezeptor 3 (TLR3) vermittelt werden [193, 194, 197].

Aufgrund der Fehlregulation in der Expression und der Affinitätsregulation der β_2 -Integrine und der Unfähigkeit der dHL-60 SCR Zellen adhärenz zu werden, wurde das Modellsystem der shRNA transduzierten HL-60 Zellen, unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen, als nicht aussagekräftig betrachtet und wie bereits erwähnt verlassen.

4.4 Herstellung der HPK1-EGFP HL-60 Zelllinie

Für die Durchführung der Co-Immunpräzipitation mit der GFP-NanoTrap®-Technologie [198] zur Aufschlüsselung des HPK1-Interaktoms musste zuerst eine

Zelllinie generiert werden, die HPK1-EGFP exprimierte. Zu diesem Zweck wurden die beschriebenen Klonierungsschritte durchgeführt, um das Gen für grün fluoreszierende Protein (EGFP) an die HPK1-cDNA zu koppeln und in ein lentivirales Grundgerüst einzubringen. Nach erfolgtem Kontrollverdau und Sequenzierungen konnte davon ausgegangen werden, dass alle Sequenzen korrekt waren und keine Mutation während der einzelnen Schritte stattgefunden hatte. Auch die weitere Evaluation der Proteinexpression der transduzierten Zellen im Western Blot zeigte wie erwartet die Expression des endogenen HPK1 bzw. HPK1-EGFP in den entsprechenden Zelllinien. Die weitere Analyse der subzellulären Lokalisation des HPK1-EGFP Konstrukts in dHL-60 Zellen zeigte ein zytoplasmatisches Verteilungsmuster und eine Co-Lokalisation mit mAbp1 und Aktin, welche sich unter Stimulation der Zellen in das Lamellipodium der Zelle verlagerte [126]. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die methodische Grundlage zur Verwendung dieser Zelllinie für weitere Experimente gegeben war.

4.5 Co-Immunpräzipitation

Die dHL-60 HPK1-EGFP Zellen und die dHL-60 EGFP Kontrollzelllinie wurden lysiert und für die Co-Immunpräzipitation verwendet. Um den Erfolg und die Spezifität des Experimentes zu gewährleisten, wurde vor der Analyse durch die Massenspektrometrie ein Western Blot der genannten Proben angefertigt. Zum einen wurde die Proteinexpression in den Lysaten untersucht, bevor diese der Präzipitation zugeführt wurden (Input-Kontrolle). In dieser zeigten wie erwartet alle Zelllinien eine intakte Expression des endogenen HPK1. Zudem zeigten unstimulierte und stimulierte dHL-60 HPK1-EGFP Zellen eine Expression des Fusionsproteins mit korrekter Größe. Zum anderen wurde ein Western Blot mit den Proben nach der Präzipitation durchgeführt. In den dHL-60 EGFP Zellen konnten bei Verwendung eines HPK1-Antikörpers keine Proteine detektiert werden. Dies spricht für die Spezifität des Versuches. In den dHL-60 HPK1-EGFP Proben konnte das Fusionsprotein deutlich dargestellt. Dies zeigte, dass die Präzipitation erfolgreich war. Nach dreimaliger Reproduktion der Ergebnisse konnten die Proben für die weitere Analyse in der Massenspektrometrie vorbereitet werden.

4.6 Das HPK1-Interaktom

4.6.1 Signalproteine des HPK1-Interaktoms

Nach Analyse der präzipitierten Proteine in der Massenspektrometrie konnten verschiedene vielversprechende Kandidaten des HPK1-Interaktoms identifiziert werden. Interessante Vertreter sind vor allem die Signalproteine, da auch HPK1 als Serin-/Threoninkinase unter diese Kategorie fällt. Ein sehr vielversprechender Kandidat ist hierbei die Tyrosinkinase Syk, deren Funktion auf die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten konnte bereits mehrfach gezeigt werden konnte [116, 118-121, 199].

Syk ist eine Tyrosinkinase, die N-terminal aus zwei SH2-Domänen besteht, die durch eine Interdomäne A getrennt werden. Abgetrennt durch eine weitere Interdomäne B folgt eine C-terminale Kinasedomäne [200]. Syk wurde ursprünglich in Schweinen beschrieben als 72 kDa Protein, das hauptsächlich in der Milz und im Thymus exprimiert wird [201]. Syk werden Funktionen in der Lymphozytenentwicklung und der Signaltransduktion nach Immunrezeptor- und β_2 -Integrinstimulation zugeschrieben [202-205]. Außerdem wird Syk für die Mastzelldegranulation und die Zytokinfreisetzung benötigt [206]. Syk-defiziente Mäuse sterben perinatal wahrscheinlich aufgrund von Fehlbildungen im Gefäß- und Lymphsystem [203, 204, 207, 208]. In Syk-defizienten neutrophilen Granulozyten ist die durch fMLP und TNF- α induzierte Adhäsion auf immobilisiertem Fibrinogen eingeschränkt [202]. dHL-60 Zellen, die eine dominant negative Mutante von Syk exprimieren und Syk-defiziente neutrophile Granulozyten bilden mehrere instabile Lamellipodia aus [119, 121]. Nach Aktivierung der β_2 -Integrine werden die ITAM-Seitenketten von DAP12 und FcR γ durch die SFKs phosphoryliert. Es folgt die Rekrutierung von Syk und es kommt zu einer weiteren Bindung zu deren Interaktionspartnern PLC- γ , Vav, SLP-76, Cbl, PI3K und mAbp1 [121, 200, 205, 209-211]. Vav-1, welches hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird, ist ein *Guanine-Nucleotide Exchange Factor* (GEF) für GTPasen der Rho/Rac Familie und insbesondere, Rac1, Rac2 und RhoG [212, 213]. Für die Anreicherung von Syk am Lamellipodium ist deren Aktivität sowie die Bindungsstelle zu Vav erforderlich. Diese Anreicherung ist auch erforderlich für eine intakte β_2 -Integrin-abhängige Migration [119].

Im spezifischem Immunsystem ist Syk zusammen mit den SFKs an der Phosphorylierung von HPK1 an Tyr379 beteiligt und reguliert damit die weitere Bindung an das

Adapterprotein SLP-76 bzw. BLNK. Durch diese Interaktion wird im adaptiven Immunsystem die negative regulatorische Funktion auf die T-Zell- bzw. B-Zellrezeptoren und das β_2 -Integrin LFA-1 vermittelt [128-131].

In der hier vorliegenden Analyse konnte Syk nur in unstimulierten Zellen mit HPK1 zusammen präzipitiert werden. Interessanterweise befinden sich in den unstimulierten Proben das Transmembranprotein DAP12, dessen ITAM-Seitenketten nach Phosphorylierung durch die SFKs die Bindungsstelle für Syk darstellt. Außerdem konnte mit FAM120A auch ein positiver Regulator der SFKs präzipitiert werden. Möglicherweise wird HPK1 im unspezifischen Immunsystem in inaktivierten Zellen von Syk zusammen mit den SFKs an Tyr379 phosphoryliert, so wie es im adaptiven Immunsystem der Fall ist und somit ebenfalls die Interaktion mit SLP-76 induziert. Der HPK1-SLP-76 Komplex könnte dabei eine ähnlich hemmende Wirkung auf LFA-1 haben wie im erworbenen Immunsystem. Bei Stimulation der Immunrezeptoren oder der β_2 -Integrine könnten durch die dadurch aktivierten Signalwege und die verstärkte Syk-Rekrutierung zu anderen Bindungspartnern die Phosphorylierung von HPK1 durch Syk verhindert oder deutlich reduziert werden. Die nicht phosphorylierte HPK1 könnte SLP-76 nicht mehr binden und somit wäre SLP-76 für weitere Bindungen frei. Hierdurch könnte dessen Bindung zu ADAP stattfinden, die positiv regulatorisch auf die Integrinaktivierung wirkt und normalerweise durch die konkurrierende Bindung von HPK1 eingeschränkt wird. Dadurch könnte es den Zellen erleichtert werden, ihre Integrine zu aktivieren. Dies stände im Einklang mit dem Befund, dass HPK1 im angeborenen Immunsystem als positiver Regulator der β_2 -Integrine und vor allem LFA-1 agiert. Die initiale Phosphorylierung von HPK1 könnte durch den positiven SFK-Regulator FAM120A initiiert und weitere Effekte nach Syk-Phosphorylierung durch kleine GTPase Rac1 vermittelt werden. Diese beiden Proteine wurden ebenfalls in den unstimulierten Proben identifiziert. Ein interessanter Mechanismus, der als negative Rückkopplung die Lokalisation von HPK in der Nähe von Transmembranproteinen wie DAP12 im unstimulierten Zustand aufheben könnte, ist die Aktivierung des *Rho GDP-Dissociation Inhibitor 1* (RHOGDI1; ARHGDI1). Dieser inhibiert die Wirkung von Rac1 durch Verhinderung des GDP-Austausches. Ein solcher negativer Feedbackmechanismus der RHOGDIs auf die Rac-vermittelten Signalwege wurde bereits diskutiert [214, 215]. RHOGDI1 konnte interessanterweise spezifisch in den stimulierten Proben mit HPK1 präzipitiert werden.

Das Protein FAM120A (auch *Homo sapiens Chromosome Open Reading Frame 10* (C9orf10) oder *Oxidative Stress-associated Src activator* (Ossa)) wurde als ein neuer Aktivator der SFKs identifiziert [216]. Dabei ist FAM120A sowohl mit der SH2- als auch mit der SH3-Domäne der SFKs assoziiert und unterstützt dabei die Entfaltung der inaktiven Form der SFKs. Im Zuge dieser Interaktion wird FAM120A an Tyrosinresten phosphoryliert und ist an der weiteren Rekrutierung der PI3K beteiligt. Zudem aktiviert es den PI3K-AKT Komplex und vermittelt dadurch einen Schutzmechanismus gegen oxidativen Stress. Die Aktivierung der *Serine/Threonine-Protein Kinase Akt* (AKT) wird durch Ausschaltung der FAM120A Expression durch siRNA unterbunden. Gleiches gilt für die SFKs und die zelluläre Antwort mit ROS-Produktion [216, 217]. Zudem kann die antiapoptotische Wirkung nach Ausschaltung von FAM120A aufgehoben werden. Außerdem kann dieser gesamte Mechanismus und im Speziellen die Aktivierung der SFKs durch Behandlung mit PP2, welches einen Inhibitor der SFKs darstellt, unterbunden werden. Eine Überexpression von FAM120A resultiert in einer verstärkten Aktivierung der SFKs [216]. So konnte auch gezeigt werden, dass die Expression von FAM120A beim szirrhösen Magenkarzinom deutlich erhöht ist und so eine mögliche Erklärung für das schlechte Ansprechen auf Therapien dieser Form des Magenkrebses liefert [216, 218, 219]. Eine Suppression von FAM120A verringert in mehreren Modellen das Tumorwachstum. Dieses Resultat ist besonders interessant, da auch HPK1-defiziente Mäuse ein vermindertes Tumorwachstum zeigen, vermittelt durch eine Resistenz gegen Prostaglandin E₂ (PGE₂) [182, 185, 220]. Interessanterweise spielt FAM120A auch eine Rolle in den Signalwegen, die durch die photodynamische Therapie (PDT) ausgelöst werden. Diese führen zu einer zellulären Stressantwort, die neben den SFKs auch MAP-Kinasen und die JNK involvieren [217, 221, 222]. Dieser Mechanismus ist bezüglich der Funktion von HPK1 als MAP4-Kinase interessant, da genau diese Signalwege durch HPK1 aktiviert werden [134, 135]. Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass FAM120A nach Ligation des Interleukin-13 Rezeptor $\alpha 2$ (IL13 $\alpha 2$) aktiviert wird und die *Focal Adhesion Kinase* (FAK), SFKs und die PI3K aktiviert [219]. IL-13 ist vor allem an der Pathogenese von allergischen Erkrankungen, Tumoren und Autoimmunerkrankungen beteiligt. Dabei wird dort Zelladhäsion, Migration und Invasion der Tumorzellen vermittelt [219, 223, 224]. Die Unterbrechung der FAM120A-Expression in den Tumorzelllinien KM12SM und SW620 inhibiert die basale Zellmigration und wirkt sich negativ auf die Tumorzelladhäsion aus. Außerdem zeigen diese

Zellen eine erhöhte Anfälligkeit für Apoptose [219]. Weitere Co-Immunpräzipitationsstudien in KM12SM Zellen zeigen, dass zusammen mit FAM120A das β_1 -Integrin, die SFKs, Talin und weitere Vertreter der Integrinsignalwege präzipitiert werden können. Zudem konnten Rac1 und ARHGDI1 präzipitiert werden, die auch in der hier vorliegenden Arbeit gefunden wurden [219].

FAM120A ist ein interessanter Kandidat des HPK1-Interaktoms, da es eine Rolle bei der Apoptoseregulation spielt, das Tumorstadium auch unter den schwierigen Bedingungen in der Tumorumgebung ermöglicht und es auch eine Funktion bei der Zellmigration und Adhäsion einnimmt [216-219]. HPK1 hat wie beschrieben ebenfalls einen Einfluss auf die Apoptose, vermittelt die Resistenz gegen das PGE₂-vermittelte Tumorstadium und spielt eine Rolle bei der Zellmigration. Deshalb könnten durch die beiden Moleküle ähnliche Signalwege aktiviert werden oder das Zusammenspiel der beiden Moleküle an diesen entscheidend beteiligt sein.

Einige Mitglieder des HPK1-Interaktoms spielen eine Rolle bei der Regulation von Rho-GTPasen Familienmitgliedern. Der *Rho GTPase Dissociation Inhibitor Alpha* (ARHGDI1) zeigt hierbei einen negativen [215] und der *Rac/Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor 6* (ARHGEF6) einen positiven Einfluss auf diese Regulation [225]. Das *GEM-interacting Protein* (GMIP) zeigt eine spezifische GTPase-Aktivität für RhoA, nicht jedoch Rac oder Cdc42 [226]. Die *Tyrosine Protein Phosphatase non-Receptor type 11* (PTPN11) kontrolliert zusammen mit RhoA die ROCKII-Aktivierung [227]. Mit Rac1 konnte auch ein Vertreter der GTPasen selbst in der Co-Immunpräzipitation identifiziert entdeckt werden [228].

ARHGDI1, auch bekannt als RHOGDI1, konnte bei stimulierten Proben mit HPK1 präzipitiert werden. Dieses Protein wird ubiquitär exprimiert und interagiert mit den GTPasen RHOA, RHOC, Rac1, Rac2 und Cdc42 [215, 229, 230]. Sie verhindern die Dissoziation des GDP und dadurch die Bindung zu GTP, das für eine erneute Aktivierung der GTPasen erforderlich wäre [231]. Zudem wird diskutiert, ob die Familie der RHOGDIs eine Funktion im Transport der GTPasen zwischen dem Zytosol und Zellmembran einnehmen und so deren Aktivität regulieren kann [232-234]. Damit könnte RHOGDI1 den oben diskutierten negativen Feedbackmechanismus auf die Rac1-Regulierung vermitteln und die HPK1-Lokalisation von Transmembranproteinen im inaktivierten Zustand zu anderen Interaktionspartnern nach Stimulation be-

wirken [214, 215]. Im humanen System ist Rac-2 die prädominante Isoform. Rac-1-defiziente neutrophile Granulozyten zeigen im Vergleich zu den Rac-2-defizienten neutrophilen Granulozyten keinen Migrationsdefekt [235-237]. Beide Isoformen liegen dabei innerhalb des Syk-Signalweges [235]. Die Aktivität der Rac-GTPasen wird in humanen neutrophilen Granulozyten zeitlich genau reguliert und nimmt nach β_2 -Integrin-vermittelten Adhäsion ab [238].

Anderen Mitgliedern des HPK1-Interaktoms wurde bereits eine Rolle der Regulation der Zelladhäsion zugeschrieben. So reguliert der *ADP Ribosylation Factor 6* (ARF6) die Adhäsion und transendotheliale Migration von humanen neutrophilen Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen und T-Lymphozyten [239]. Die *ADP Ribosyl Cyclase/Cyclic ADP Ribose Hydrolase 2* (BST1) ist durch einen GPI-Anker an die Zellmembran gebunden und beeinflusst die Adhäsion und fMLP-induzierte Chemotaxis [240].

Als weitere Vertreter der Signalproteine im HPK1-Interaktom konnten drei Mitglieder der Annexin-Familie gefunden werden. Annexin A1 (ANXA1) führt in neutrophilen Granulozyten zu einer verminderten Gewebeinfiltration und aktiviert die Apoptose [241], Annexin A2 (ANXA2) inhibiert ebenfalls die Inflammation durch eine negative Regulation der ROS- und IL-17A-Produktion [242]. Annexin A7 (ANXA7) spielt vor allem eine Rolle bei der Exozytose in Folge erhöhter Ca^{2+} -Konzentrationen [243].

Weitere Vertreter der Signalproteine des HPK1-Interaktoms spielen eine Rolle in Kinase-Signalwegen, wie das *APAF1 Interacting Protein* (APIP), welches AKT und ERK1/2 aktivieren kann [244]. Auch die *Serine/Threonine-Protein Phosphatase CPPED1* spielt durch die Dephosphorylierung an Ser473 von AKT eine Rolle [245]. Die *Putative Nucleoside Diphosphate Kinase* (NME2P1) aktiviert ebenfalls den AKT-Signalweg und den weiter folgenden NF κ B-Signalweg [246]. Auch das in vielen Tumor- und Leukämiezelllinien erhöhte S100A6 aktiviert neben dem ERK1/2- und p38 MAPK-Signalweg eine Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse [247]. Das *Histidine Triad Nucleotide-binding Protein 1* (HINT1) bindet an die Proteinkinase C und inhibiert deren Tätigkeit [248].

Auch Bestandteile der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) und deren weitere Signalwege konnten detektiert werden. So konnte mit der *G-Protein Subunit Gamma 5* (GNG5) direkt ein Teil der G-Proteine selbst identifiziert werden [249]. Zu-

dem wurde der *Regulator of G Protein Signaling 11* (RGS11) gefunden, der als *GTPase-activating Protein* (GAP) für $G\alpha$ -Proteine dient und an $G\beta$ -Untereinheiten bindet und so das GPCR-vermittelte Signaling kontrolliert [250].

Galectin-3 (LGALS3) wird eine Rolle bei der zellulären Stressantwort und Differenzierung, im Speziellen der Ausdifferenzierung von HL-60 Zellen durch DMSO zugeschrieben [251]. Auch der *MOB Kinase Activator 1A* (MOB1A) wirkt als Tumorsuppressoren hemmend auf den Zellzyklus und somit die Proliferation und fördert die Apoptose [252]. Das Ca^{2+} -bindende Protein *Sorcina* (SRI), welches in vielen Tumoren sowie Leukämien erhöht exprimiert wird, unterbindet die Apoptose und führt zu einer Resistenz gegenüber einigen Chemotherapeutika [253].

Insgesamt konnten in der vorliegenden Arbeit erstmals Interaktionspartner von HPK1 im angeborenen Immunsystem identifiziert werden. Hierbei ließen sich viele Signalproteine identifizieren, denen bereits eine wichtige Funktion in der Leukozytenrekrutierung sowie in den Signalwegen der Immunrezeptoren zugeschrieben werden konnte. Zudem konnten weitere Moleküle detektiert werden, die Rollen in ähnlichen regulatorischen Zellprozessen wie HPK1 einnehmen, beispielsweise in der Apoptose oder beim Tumorwachstum. Des Weiteren konnten erste Anhaltspunkte gewonnen werden, wie es zu den unterschiedlichen Funktionen von HPK1 im angeborenen im Vergleich zum erworbenen Immunsystem kommen könnte.

4.6.2 Zytoskelett-assoziierte Proteine

Da HPK1 ihre Funktionen über eine Interaktion mit dem Zytoskelett ausübt und dabei mit Bestandteilen desselbigen co-lokalisiert, sind in einer zweiten wichtigen Kategorie die Zytoskelett-assoziierten Proteine zusammengefasst worden. Als Bestandteil von *Dynein* bindet die *Light Chain Roadblock Type 1* (DYNLRB1) an Mikrotubuli und agiert dabei als Motorprotein, das am Transport unterschiedlicher biologischer Lasten beteiligt ist [254]. Das *Band 4.1-like Protein 3* (EPB41L3) ist ein Protein der 4.1 Familie, das die Zellmembran mit dem Zytoskelett verbindet. Es besitzt neben einer FERM-Domäne eine Spectrin- und Aktin-bindende Domäne (SABD) [255]. Das *Heat Shock Protein 27* (HSPB1) bindet und reorganisiert das Aktin-Zytoskelett. Zudem wird ihm eine Rolle bei der Chemotaxis und Exozytose von neutrophilen Granulozyten zugeschrieben. Es bildet dabei einen Komplex mit AKT und der p38 MAPK, von

der es phosphoryliert wird [256, 257]. Das *LIM and SH3 Domain Protein 1* (LASP1) besitzt neben den beiden im Namen erwähnten Domänen, die Proteininteraktionen dienen, 2 *Nebulin Repeats* (NR), die es direkt an das Aktin-Zytoskelett koppeln [258].

Transgelin-2 (TAGLN2) ist ein Aktin-bindendes Protein, das hauptsächlich in T-Zellen exprimiert wird und das Zytoskelett der immunologischen Synapse stabilisiert. Dadurch wird unter anderem die Aktivierung des β_2 -Integrins LFA-1 aufrechterhalten [259, 260]. Es besteht aus einer N-terminalen *Calponin Homology* (CH) Domäne und einen C-terminalen *Calponin-like Module* (CLIK) [261, 262]. Neben *Transgelin-2* existieren die Isoformen *Transgelin-1*, die hauptsächlich in glatten Muskelzellen exprimiert wird [263] und *Transgelin-3*, das hauptsächlich im Gehirn vorkommt [264]. *Transgelin-2* stabilisiert das kortikale F-Aktin, indem es die Aktindepolymerisierung blockiert und mit Cofilin um die Aktinbindung konkurriert [259, 260]. Hierdurch können Komponenten der Zellaktivierung an der immunologischen Synapse gehalten und eine anhaltende Aktivierung von LFA-1 ermöglicht werden [259, 260]. Hier ist *Transgelin-2* an der Integrin-vermittelten Adhäsion an ICAM-1 in T-Zellen beteiligt [259, 260]. Ein ähnlicher Effekt konnte auch in B-Lymphozyten gezeigt werden [265].

Insgesamt konnten einige Vertreter der Zytoskelett-assoziierten Proteine im HPK1-Interaktom identifiziert werden, die mögliche direkte Bindungspartner von HPK1 darstellen und eine Koppelung von HPK1 an das Zytoskelett ermöglichen. Auffällig war insbesondere eine vermehrte Detektion der Zytoskelett-assoziierten Proteine in stimulierten im Vergleich zu den unstimulierten Proben. Durch die Interaktion von HPK1 mit *Transgelin-2* nach Stimulation der Zellen könnte analog zum adaptiven Immunsystem durch eine Stabilisierung des Aktin-Zytoskeletts im Bereich der Zellmembran LFA-1 in dessen hochaffinen Form stabilisiert werden. Über diesen Mechanismus könnte HPK1 ihre stabilisierende Wirkung auf die hochaffine Form der β_2 -Integrine vermitteln.

4.6.3 Transmembranproteine

Eine dritte interessante Kategorie des HPK1-Interaktoms bilden die Transmembranproteine. Die Funktion von HPK1 bei der Regulation des β_2 -Integrins LFA-1 sowie des BCR und TCR wird, wie oben beschrieben, über eine Interaktion mit den ITAM-tragenden Seitenketten von Transmembranproteinen wie DAP12 und FcR γ vermittelt.

Dabei konnte DAP12 (TYROBP) selbst als Mitglied des HPK1-Interaktoms in der vorliegenden Arbeit identifiziert werden. DAP12 ist ein ITAM-tragendes Protein, welches als Interaktor von CD18 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der β_2 -Integrine auf neutrophilen Granulozyten einnimmt. Die ITAM-Motive von DAP12 können von den SFKs phosphoryliert werden und eine weitere Rekrutierung von Syk erfolgen [266, 267].

Die *Plasma Membrane Calcium-transporting ATPase 4* (ATPB2) ist ein ubiquitär exprimierter Transporter, der an der Ca²⁺-Homöostase beteiligt ist [268]. Der *Histamine H4 Receptor* (HRH4) ist als negativer Regulator der Degranulation von humanen neutrophilen Granulozyten beschrieben [269]. Das *Integrin Alpha 5* (ITGA5) wird als Bestandteil des β_1 -Integrins in geringem Maße in neutrophilen Granulozyten exprimiert und dient vor allem der Bindung zu Fibronectin [270]. Das *Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1* (PECAM1) wird auch in neutrophilen Granulozyten exprimiert und co-lokalisiert dort am Lamellipodium mit F-Aktin. Interessanterweise zeigen PECAM1^{-/-} neutrophile Granulozyten einen Defekt in der Lokalisation und Aktivität der SHP-2 [271]. Die Rolle des *Secretory Carrier-Associated Membrane Protein 4* (SCAMP4) besteht hauptsächlich im Recycling von Bestandteilen der Zelloberfläche [272]. *Syntaxin-4* (STX4) ist Teil des SNARE-Komplexes und spielt neben der Endozytose auch eine Rolle in der Formation des Lamellipodiums [273]. Die Rolle des *Transmembrane Protein 205* (TMEM205) ist weitgehend ungeklärt, jedoch ist eine Rolle bei der Entwicklung von einer Cisplatinresistenz bei Tumorzellen beschrieben [274].

Unter den Transmembranproteinen des HPK1-Interaktoms konnten Proteine wie DAP12 detektiert werden, denen bereits eine wichtige Rolle in den Signalwegen der β_2 -Integrinaktivierung auf neutrophilen Granulozyten zugeschrieben werden konnte. Zum anderen konnten bisher wenig erforschte Proteine wie TMEM205 identifiziert

werden, deren Bedeutung für die Leukozytenrekrutierung bislang unklar ist und somit mögliche vielversprechende Kandidaten für weitere Analysen zur Aufschlüsselung der Signalwege von HPK1 in neutrophilen Granulozyten darstellen.

4.6.4 Adapterproteine

Eine vierte bedeutende Kategorie des HPK1-Interaktoms sind die Adapterproteine, da die Funktion von HPK1 maßgeblich von dessen Interaktionspartnern abhängt. *Adapter Related Protein Complex 3 Sigma 2 Subunit* (AP3S1) ist ein ubiquitär exprimierter Adapterkomplex der am Transport von membranständigen Proteinen beteiligt ist [275]. *Arfaptin-1* (ARFIP1) bindet unter anderem Arf6 und wirkt so inhibierend auf die Phospholipase D [276]. Das *Growth Factor Receptor-Bound Protein 2* (GRB2) ist ein bekanntes Adapterprotein von HPK1 und kann dabei Tyrosinkinasen mit diesem und Ras-GTPasen verbinden [146]. *Nucleobindin-2* (NUCB2) ist ein Ca^{2+} -bindendes Protein, das in dessen Homöostase und am GPCR-Signaling beteiligt ist [277]. Das *14-3-3 Protein Eta* (YHAH) ist ein negativer Regulator der AKT-aktivierenden PDK1 [278].

Ein bekannter Interaktionspartner, der im adaptiven Immunsystem konstitutiv mit HPK1 interagiert, konnte mit dem Adapterprotein Grb2 ebenfalls gefunden werden. Als Verbindung zu den transmembranären Wachstumsrezeptoren bindet HPK1 das Grb2 über dessen SH3-Domäne. Bei dessen Abwesenheit ist zudem die Kinaseaktivität von HPK1 eingeschränkt [143, 146, 147].

Als weiteres bekanntes Adapterprotein von HPK1 konnte mAbp1 jedoch nicht präzipitiert werden [126, 127]. Dies könnte an den relativ kurzen und zum Teil nur sehr schwach ausgeprägten Protein-Protein-Interaktionen von Kinasen wie HPK1 mit ihren Substraten liegen. Somit waren die bei der Co-Immunpräzipitation auf die Proben ausgeübten Kräfte möglicherweise zu groß, als dass diese Interaktion aufrechterhalten werden konnte, da der hier verwendete Versuchsaufbau hauptsächlich zur Identifikation von mittleren bis starken Protein-Protein Interaktionen genutzt werden kann [279-281].

4.6.5 Schlussfolgerung

Die Identifizierung der Proteine, die mit HPK1 präzipitiert werden konnten, liefern einen ersten Einblick in das HPK1-Interaktom im angeborenen Immunsystem und geben einen Anhaltspunkt für mögliche Signalwege, über die HPK1 ihre Funktion in den β_2 -Integrin-vermittelten Mechanismen ausübt. Hierbei konnten neben gut erforschten Vertretern dieser Prozesse wie die Tyrosinkinase Syk auch Proteine wie zum Beispiel FAM120A, deren Funktionen noch weitgehend unverstanden sind oder Transgelin-2, dessen Rolle im Immunsystem erst vor kurzem beschrieben wurde, identifiziert werden.

Hinweise auf eine mögliche Lokalisationsverlagerung von HPK1 innerhalb der Zellen nach deren Aktivierung lassen sich auch gewinnen, wenn man die Aufteilung der identifizierten Proteine auf die Unterkategorien des HPK1-Interaktoms analysiert. Im unstimulierten Zustand lassen sich neben der Hauptgruppe der Signalproteine vorwiegend Transmembranproteine finden. Nach Stimulation lässt sich nur noch ein einziges Transmembranprotein detektieren und der Anteil der Adapterproteine und Zytoskelett-assoziierten Proteine nimmt stark zu. Unter Stimulation könnte somit wie bereits diskutiert die hemmende Phosphorylierung von HPK1 durch Syk wegfallen und HPK1 von der Membran dislozieren. Diese Prozesse könnten auch durch den bereits diskutierten negativen Feedbackmechanismus der RHOGDIs unterstützt werden. Anschließend könnte HPK1 weitere Signalfunktionen bei der Reorganisation des Zytoskeletts ausüben und so die hochaffine Form der β_2 -Integrine zusätzlich stabilisieren.

Um diese potentiellen Mechanismen zu bestätigen, sind weitere Studien erforderlich. Zur Verifizierung der direkten Interaktion von HPK1 mit Mitgliedern des HPK1-Interaktoms sollten Experimente mit rekombinanten Proteinen durchgeführt werden. Zudem sind weitere Experimente erforderlich, um eine Co-Lokalisation der Vertreter des HPK1-Interaktoms mit HPK1 zu bestätigen. Um die Signalwege von HPK1 besser aufzuklären und zu verstehen, sollten Substrate von HPK1 über die Ermittlung des HPK1-Phosphoproteins identifiziert werden. Eine genaue Charakterisierung der bisher noch wenig erforschten Interaktionspartner könnte das Verständnis der genauen molekularen Mechanismen des HPK1-Signalweges fördern.

4.7 Ausblick

Neutrophile Granulozyten spielen eine entscheidende Rolle bei der akuten Entzündungsreaktion. Neben ihrer Aufgabe als Vermittler in der initialen angeborenen Immunantwort werden ihnen weitere Funktionen vor allem in der Pathogenese von chronischen entzündlichen Erkrankungen unter anderem des kardiovaskulären Systems und von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben. Für viele dieser Erkrankungen gibt es derzeit nur eine unzureichende oder keine adäquate medikamentöse Therapie. Ein wünschenswertes Ziel wäre die Entwicklung eines Medikamentes, das die Entwicklung der chronisch entzündlichen Erkrankungen verhindert, aber zugleich die Immunabwehr gegen pathogene Keime nicht beeinträchtigt. Zudem ist es von der Seite des Patienten erstrebenswert, dass eine solche Therapie arm an Nebenwirkung ist. Ein vielversprechender Kandidat zur medikamentösen Therapie wäre daher HPK1, da es in adulten Organismen fast ausschließlich in den Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird. Eine spezifische Hemmung würde sich somit auf dieses System beschränken und auch die Wirkung bzw. Nebenwirkung auf die restlichen Körperzellen entfielen aufgrund der nicht vorhandenen Expression. Auch im Bereich der Onkologie wird bereits nach einem potenten Hemmstoff von HPK1 geforscht, da man sich auch hier aufgrund ihrer spezifischen Expression eine anti-Tumorthherapie mit geringen Nebenwirkungen verspricht [185].

Um einen Wirkstoff zu finden, der das Fortschreiten inflammatorischer Prozesse adäquat unterbindet, ist es jedoch erforderlich, die molekularen Mechanismen innerhalb der Leukozyten besser zu erforschen. In den letzten Jahren konnten in diesem Bereich große Fortschritte erzielt werden. So konnte gezeigt werden, dass das Aktin-bindende Protein mAbp1 bei der Stabilisierung der hochaffinen Konformation der β_2 -Integrine, die für eine regelrechte Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Gefäßsystem benötigt wird, entscheidend beteiligt ist. Interessanterweise findet man diesen Effekt nur unter Flussbedingungen und nicht bei statischen Bedingungen [33, 124, 125]. Ähnliche Effekte konnten für HPK1 beschrieben werden, das in HL-60 Zellen konstitutiv mit mAbp1 präzipitiert werden konnte und in diesen Neutrophilen-ähnlichen Zellen mit diesem co-lokalisiert [126]. Auch im adaptiven Immunsystem findet diese Interaktion statt und vermittelt somit die Kopplung von HPK1 über mAbp1 an das Aktin-Zytoskelett [127].

Um spezifisch in diesen Mechanismus durch eine potentielle Medikation einzugreifen, ist es daher notwendig zu wissen, ob bereits die Modulation einer einzelnen Domäne von HPK1 die gewünschten Effekte einer abgeschwächten Immunantwort bewirken und die anderen regulatorischen Mechanismen innerhalb der Zelle unberührt lassen. Um diese Frage zu klären, bietet es sich an, die einzelnen Domänen von HPK1 zu mutieren und die Mutanten in einer Zelllinie zur Expression zu bringen, in der die Expression der endogenen HPK1 beispielsweise durch die CRISPR/Cas-Technologie [282] ausgeschaltet wurde. Dabei bietet sich neben der N-terminalen Kinasedomäne entweder eine der vier prolinreichen Motive an, die die Protein-Protein-Interaktionen mit den SH3-Domänen der Bindungspartner vermitteln oder die C-terminale *Citron Homology Domain*, die eine regulatorische Funktion einnimmt, an. Außerdem bestünde die Möglichkeit, nur das N- oder das C-terminale Spaltprodukt von HPK1 nach Prozessierung durch Caspasen zur Expression zu bringen. Für diese beiden Produkte wurden im adaptiven Immunsystem bereits unterschiedliche Wirkweisen in dem selben Mechanismus wie dem NF κ B-Signalweg gezeigt.

Darüber hinaus wäre es interessant, die Funktion von HPK1 bei verschiedenen Krankheitsmodellen zu analysieren, um so einen besseren Einblick in die Relevanz von HPK1 bei unterschiedlichen inflammatorischen Situationen zu gewinnen. Von besonderem Interesse wären hierbei Erkrankungen, die durch die neutrophilen Granulozyten gesteuert werden wie die chronische Gastritis nach Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* [283].

Des Weiteren wäre es interessant, die Signalwege auf molekularer Ebene genauer zu verstehen. Neben der in dieser Arbeit durchgeführten Co-Immunpräzipitation und Aufschlüsselung des HPK1-Interaktoms über Massenspektrometrie ist es von großem Interesse, die weiteren Phosphorylierungen, die durch HPK1 verursacht werden, aufzuklären. Das HPK1-Phosphoproteom könnte über eine massenspektrometrische Analyse identifiziert werden, um so einen genaueren Einblick in die Signalwege zu erhalten. Hierbei könnten neutrophile Granulozyten aus dem Knochenmark von HPK1^{+/-}- und HPK1^{-/-}-Mäusen isoliert werden und Unterschiede im Phosphorylierungsprofil nach Aufreinigung und chromatographischer Auftrennung über Massenspektrometrie aufgeklärt werden.

5 Zusammenfassung

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten spielen eine entscheidende Rolle in der akuten Entzündungsreaktion und vermitteln dabei die erste Abwehr gegen körperfremde Erreger und sterile Verletzungen. Sie sind beteiligt an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, Atherosklerose, Myokardinfarkten, Schlaganfällen, Ischämie-Reperfusionsschäden, Thrombosen, Vaskulitiden der kleinen Gefäße und sogar bei der Metastasierung von Tumoren. Um diese Funktionen auszuüben, müssen sie aus dem Gefäßsystem in das Gewebe auszuwandern. Dabei folgen die neutrophilen Granulozyten einer Rekrutierungskaskade, deren Schritte auf zellulärer Ebene gut beschrieben sind. Die molekularen Mechanismen hinter den einzelnen Schritten sind Gegenstand der aktuellen Forschung und werden zunehmend besser verstanden. Die Extravasation der neutrophilen Granulozyten zum Zielort erfordert eine Aktivierung der β_2 -Integrine (*Inside-out Signaling*) und eine weitere Signaltransduktion durch diese in das Zellinnere (*Outside-in Signaling*). Unlängst konnte gezeigt werden, dass das Aktin-bindende Protein mAbp1 bei diesen Signalwegen vor allem unter Flussbedingungen eine entscheidende Rolle spielt [33, 124, 125]. In weiteren Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Kinase HPK1 konstitutiv mit mAbp1 in dHL-60 Zellen präzipitiert werden konnte und in dieser Neutrophilen-ähnlichen Zelllinie unter Stimulation im Lamellipodium mit mAbp1 co-lokalisierte [126]. Weiterhin war HPK1 für die CXCL1-induzierte Aktivierung des β_2 -Integrins LFA-1 in neutrophilen Granulozyten erforderlich und bei dessen Abwesenheit waren die β_2 -Integrin-abhängigen Schritte der Rekrutierungskaskade eingeschränkt [126].

In dieser Arbeit wurden die Mechanismen durch die HPK1 ihre Funktion auf die Integrinaktivierung und damit auf die Funktion der neutrophilen Granulozyten ausübt, genauer untersucht. Ein erstes Ziel war es aufzuschlüsseln, ob die Defekte in der Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten bei Abwesenheit von HPK1 auf eine Störung im *Inside-out* oder im *Outside-in Signaling* zurückzuführen sind. So konnte in einem ersten Flusskammer-Experiment mit murinen neutrophilen Granulozyten, die zuvor aus dem Knochenmark isoliert wurden, der bekannte Defekt in der Verstärkung der Adhäsion der HPK1^{-/-} neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den HPK1^{+/+}-Kontrollzellen auf dem β_2 -Integrinliganden ICAM-1 unter CXCL1 Stimulation bestätigt werden. Dieser Defekt ließ sich durch eine Stimulation mit Mn²⁺ komplett aufheben. Dieses Ion umgeht das *Inside-out Signaling*, indem es die β_2 -Integrine in

ihrer hochaffinen Form stabilisiert. Da für eine regelrechte Verstärkung der Adhäsion sowohl eine intakte Integrinaktivierung als auch die weitere Signaltransduktion in das Zellinnere nötig ist, kann davon ausgegangen werden, dass durch Umgehen des *Inside-out Signalings* durch Mn^{2+} -Stimulation man in den Experimenten lediglich das *Outside-in Signaling* evaluiert. Da nach dieser Stimulation in den HPK1-defizienten neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle keine Unterschiede mehr zu beobachten waren, schien diese weitere Signaltransduktion auch bei Abwesenheit von HPK1 intakt zu sein. Somit konnte gezeigt werden, dass HPK1 ihre Rolle spezifisch im *Inside-out Signaling* spielt.

Da die β_2 -Integrinaktivierung aus mehreren Schritten besteht, sollte anschließend geklärt werden, in welchem Aktivierungsschritt HPK1 eine Rolle spielt und ob bei deren Abwesenheit die intermediär und hochaffine Form der β_2 -Integrine erreicht werden kann. Zu diesem Zweck wurde die HPK1-Proteinexpression in HL-60 Zellen durch lentiviralen Gentransfer eines shRNA-kodierenden Vektors verringert. Hierbei wurden neben den ursprünglichen HL-60 Wildtypzellen, die SCR HL-60 Kontrollzellen und die HL-60 Zellen mit verringerter HPK1-Proteinexpression (Klon H 4.1) erzeugt. Nach Ausdifferenzierung dieser Zelllinien wurden in der Durchflusszytometrie die β_2 -Integrinexpression der dHL-60 WT, SCR und H 4.1 Zellen durch Analyse der Oberflächenantigene CD11a, CD11b und CD18 getestet. Anschließend wurden durch Reporterantikörper, die die intermediär- (KIM127) und hochaffine Form (mAb24) der β_2 -Integrine erkennen, erneut eine FACS-Analyse ohne und mit Stimulation durch IL-8 und fMLP durchgeführt. Die generierten dHL-60 SCR Zelllinien zeigten eine Dysregulation in Expression und Affinitätsregulation der β_2 -Integrine. Die dHL-60 H 4.1 Zellen mit einer HPK1 Protein-Restexpression von 4,8% zeigten ein intaktes Bindungsverhalten von mAb24 unter Stimulation mit fMLP. Aufgrund der Fehlregulation in der Expression und der Affinitätsregulation der β_2 -Integrine der dHL-60 SCR Kontrollzellen wurde das Modellsystem der shRNA transduzierten HL-60 Zellen unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen als nicht aussagekräftig betrachtet und daher verlassen.

Im letzten Teil der Arbeit sollten mögliche Interaktionspartner von HPK1 auf der Proteinebene identifiziert werden, um die molekularen Mechanismen der β_2 -Integrinaktivierung weiter aufzuklären. Dazu wurde ein HPK1-EGFP-Konstrukt basierend auf der HPK1-cDNA kloniert und in den lentiviralen FuVal-Vektor eingebracht.

Mit diesem erfolgte eine Transduktion in HL-60 Zellen. Anschließend erfolgte die Kontrolle der korrekten Lokalisation des Fusionsproteins über konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie und die Überprüfung der adäquaten Proteinexpression im Western Blot. Erfolgreich transduzierte Zellen wurden lysiert und eine Co-Immunpräzipitation mit GFP-NanoTraps[®] durchgeführt. Diese Proben wurden nach der Aufreinigung chromatographisch aufgetrennt und in der Massenspektrometrie analysiert. Abschließend erfolgte eine Literaturrecherche über die identifizierten Kandidaten des HPK1-Interaktoms. Hierbei wurden insgesamt 115 Proteine identifiziert, die unter anderem Signalproteinen, Zytoskelett-assoziierten Proteinen, Transmembranproteinen und Adapterproteinen zugeordnet werden konnten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass HPK1 eine entscheidende Rolle in der β_2 -Integrinaktivierung (*Inside-out Signaling*) spielt, wohingegen die weitere Signaltransduktion in das Zellinnere (*Outside-in Signaling*) unbeeinträchtigt bleibt. Außerdem konnte erstmals das Interaktom von HPK1 in neutrophilen Granulozyten dargestellt werden und so Hinweise auf mögliche Signalmoleküle geliefert werden, über die HPK1 ihre Funktion in diesen Zellen ausübt.

6 Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ADAP	<i>Adhesion and Degranulation Promoting Adaptor Protein</i>
AKT	<i>Serine/Threonine-Protein Kinase Akt</i>
ANXA1-7	<i>Annexin A1-7</i>
AP3S1	<i>Adapter Related Protein Complex 3 Sigma 2 Subunit</i>
APIP	<i>APAF1 Interacting Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARF6	<i>ADP Ribosylation Factor 6; Cytohesin-1</i>
ARFIP1	<i>ADP Ribosylation Factor Interacting Protein; Arfaptin-1</i>
ARHGDI1	<i>Rho GDP Dissociation Inhibitor Alpha</i>
ARHGEF6	<i>Rac/Cdc42 Guanine Nucleotide Exchange Factor 6</i>
ARP2/3	<i>Actin Related Protein 2/3</i>
ATP2B4	<i>Plasma Membrane Calcium-Transporting ATPase 4</i>
Bam32	<i>B-Cell Adaptor Molecule of 32 kDa</i>
BCR	B-Zell-Rezeptor
BLNK	<i>B-Cell Linker Protein</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BST1	<i>ADP Ribosyl Cyclase/Cyclic ADP Ribose Hydrolase 2; CD157</i>
CARMA1	<i>CARD-containing MAGUK Protein 1</i>
CCD	<i>Charged-Coupled Device</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD18	β -Untereinheit der β_2 -Integrine
Cdc42	<i>Cell Division Control Protein 42</i>
CHD	<i>Citron Homology Domain</i>
CLNK	<i>Cytokine-Dependent Hematopoietic Cell Linker</i>
CPPED1	<i>Serine/Threonine-Protein Phosphatase CPPED1</i>
Crk	<i>Adapter Molecule crk</i>
CrkL	<i>Crk-Like Protein</i>
CXCL(1)	<i>Chemokine (C-X-C motif) (Ligand 1)</i>
CXCR(2)	<i>C-X-C Chemokine Receptor (Type 2)</i>
DAG	Diacylglycerol
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DAP12	<i>DNAX-activation Protein 12</i>
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
DYNLRB1	<i>Dynein Light Chain Roadblock-Type 1</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EPB41L3	<i>Band 4.1-like Protein 3; DAL-1</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAM120A	<i>Constitutive Coactivator of PPAR-Gamma-Like Protein 1; Oxidative Stress-Associated Src Activator</i>
FcR γ	γ -Kette des Fc-Rezeptors
FCS	Fetales Kälberserum
fMLP	<i>N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin</i>
Gads	<i>Grb2-Related Adaptor Downstream of Shc</i>
GCK	<i>Germinal Center Kinase</i>
GEF	<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>
GMIP	<i>GEM-Interacting Protein</i>
GNG5	<i>G-Protein Subunit Gamma 5</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
Grap	<i>Grb2-related Adapter Protein</i>
Grb2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
HBSS	<i>Hanks Buffered Salt Solution</i>
HEPES	<i>2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure</i>
HINT1	<i>Histidine Triad Nucleotide-binding Protein 1</i>
(d)HL-60	<i>(differentiated) Human Promyelocytic Leukemia Cells</i>
HPK1	<i>Hematopoietic Progenitor Kinase 1</i>
HPK1-KD	<i>Hematopoietic Progenitor Kinase 1 Kinase-Dead Mutant</i>
HRH4	<i>Histamine H4 Receptor</i>
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
HS1	<i>Hematopoietic Cell-Specific Protein 1</i>
HSPB1	<i>Heat Shock Protein Beta-1; HSP27</i>
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IKK- α/β	<i>Inhibitory κB-Protein Kinase α/β</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP ₃	<i>Inositol (1,4,5)-Triphosphat</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosine-Based Action Motif</i>
ITGA5	<i>Integrin Alpha-5</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KD	Kinasedomäne
KO	Knockout
LAD	<i>Leukocyte Adhesion Deficiency</i>
LASP1	<i>LIM and SH3 Domain Protein 1</i>
LAT	<i>Linker for Activated T-cells</i>
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-Associated Antigen 1</i>

LGALS3	<i>Galectin-3</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M., Mm.	Muskel, Muskeln
mAbp1	<i>Mammalian Actin-Binding Protein 1</i>
Mac-1	<i>Macrophage-1 Antigen</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MAP4K	<i>Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase Kinase</i>
MEKK1	<i>MAPK/ERK Kinase Kinase 1</i>
MIDAS	<i>Metal Ion-Dependent Adhesion Site</i>
MLK-3	<i>Mixed Lineage Kinase 3</i>
MOB1A	<i>MOB Kinase Activator 1A</i>
MPO	Myeloperoxidase
mTNF α	muriner Tumornekrosefaktor- α
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaF	Natriumfluorid
NaO	Natriumorthovanadat
Nck	<i>Non-Catalytic Region of Tyrosine Kinase Adaptor Protein</i>
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NF κ B	<i>Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B-Cells</i>
NME2P1	<i>Putative Nucleoside Diphosphatase Kinase</i>
NUCB2	<i>Nucleobindin-2</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECAM1	<i>Platelet and Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatydilinositol (4,5)-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PP4	<i>Serine/Threonine Protein Phosphatase 4</i>
PR	prolinreiche Domäne
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand-1</i>
PTPN11	<i>Tyrosine-Protein Phosphatase Non-Receptor Type 11, SHP-2</i>
Rac1/2	<i>Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1/2</i>
Rap1	<i>Ras-Related Protein 1</i>
RGS11	<i>Regulator of G-Protein Signaling 11</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S100A6	<i>Protein S100A6</i>
SAPK	<i>Stress-activated Protein Kinase</i>

SCAMP4	<i>Secretory Carrier-Associated Membrane Protein 4</i>
SCR	<i>Scrambled</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
SFK	Src Family Kinases
SH2	<i>Src Homolgy 2</i>
SH3	<i>Src Homolgy 3</i>
shRNA	<i>Small Hairpin RNA</i>
SLP-76	<i>SH2 Domain-Containing Leukocyte Proteine of 76 kDa</i>
SOC	<i>Super Optimal Broth</i>
Src	<i>Sarcoma</i>
SRI	<i>Sorcin</i>
STX4	<i>Syntaxin-4</i>
Syk	<i>Spleen Tyrosine Kinase</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAGLN2	<i>Transgelin-2</i>
TAK1	<i>TGF-β-activated Kinase 1</i>
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Thr	Threonin
TMD	Transmembrandomäne
TMEM205	<i>Transmembrane Protein 205</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tyr	Tyrosin
TYROBP	<i>DNAX-Activation Protein 12 (DAP12)</i>
Vav	Protoonkogen vav
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
YWHAH	<i>14-3-3 Protein Eta</i>
ZfP	Zentrum für Proteinanalytik

7 Literaturverzeichnis

1. Kay, A.B., *Paul Ehrlich and the Early History of Granulocytes*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(4).
2. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
3. Kolaczkowska, E. and Kubes, P., *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
4. Nourshargh, S. and Alon, R., *Leukocyte migration into inflamed tissues*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 694-707.
5. Mocsai, A., *Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond*. J Exp Med, 2013. **210**(7): p. 1283-99.
6. Nemeth, T. and Mocsai, A., *The role of neutrophils in autoimmune diseases*. Immunol Lett, 2012. **143**(1): p. 9-19.
7. Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., and Jaillon, S., *Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(8): p. 519-31.
8. Doring, Y., Drechsler, M., Soehnlein, O., and Weber, C., *Neutrophils in atherosclerosis: from mice to man*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(2): p. 288-95.
9. Carbone, F., Nencioni, A., Mach, F., Vuilleumier, N., and Montecucco, F., *Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction*. Thromb Haemost, 2013. **110**(3): p. 501-14.
10. Jickling, G.C., Liu, D., Ander, B.P., Stamova, B., Zhan, X., and Sharp, F.R., *Targeting neutrophils in ischemic stroke: translational insights from experimental studies*. J Cereb Blood Flow Metab, 2015. **35**(6): p. 888-901.
11. Schofield, Z.V., Woodruff, T.M., Halai, R., Wu, M.C., and Cooper, M.A., *Neutrophils--a key component of ischemia-reperfusion injury*. Shock, 2013. **40**(6): p. 463-70.
12. Geddings, J.E. and Mackman, N., *New players in haemostasis and thrombosis*. Thromb Haemost, 2014. **111**(4): p. 570-4.
13. Jennette, J.C. and Falk, R.J., *Pathogenesis of antineutrophil cytoplasmic autoantibody-mediated disease*. Nat Rev Rheumatol, 2014. **10**(8): p. 463-73.
14. Wculek, S.K. and Malanchi, I., *Neutrophils support lung colonization of metastasis-initiating breast cancer cells*. Nature, 2015. **528**(7582): p. 413-7.
15. Coffelt, S.B., Kersten, K., Doornebal, C.W., Weiden, J., Vrijland, K., Hau, C.S., Verstegen, N.J., Ciampricotti, M., Hawinkels, L.J., Jonkers, J., and de

- Visser, K.E., *IL-17-producing gammadelta T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis*. *Nature*, 2015. **522**(7556): p. 345-8.
16. El Rayes, T., Catena, R., Lee, S., Stawowczyk, M., Joshi, N., Fischbach, C., Powell, C.A., Dannenberg, A.J., Altorki, N.K., Gao, D., and Mittal, V., *Lung inflammation promotes metastasis through neutrophil protease-mediated degradation of Tsp-1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(52): p. 16000-5.
 17. Mocsai, A., Walzog, B., and Lowell, C.A., *Intracellular signalling during neutrophil recruitment*. *Cardiovasc Res*, 2015. **107**(3): p. 373-85.
 18. Begandt, D., Thome, S., Sperandio, M., and Walzog, B., *How neutrophils resist shear stress at blood vessel walls: molecular mechanisms, subcellular structures, and cell-cell interactions*. *J Leukoc Biol*, 2017.
 19. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. *Nature*, 2008. **454**(7203): p. 428-35.
 20. Nathan, C., *Points of control in inflammation*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 846-52.
 21. Serhan, C.N. and Savill, J., *Resolution of inflammation: the beginning programs the end*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(12): p. 1191-7.
 22. Nathan, C., *Neutrophils and immunity: challenges and opportunities*. *Nat Rev Immunol*, 2006. **6**(3): p. 173-82.
 23. Pillay, J., Kamp, V.M., van Hoffen, E., Visser, T., Tak, T., Lammers, J.W., Ulfman, L.H., Leenen, L.P., Pickkers, P., and Koenderman, L., *A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1*. *J Clin Invest*, 2012. **122**(1): p. 327-36.
 24. Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., Magri, G., Knowles, D.M., Tam, W., Chiu, A., Bussel, J.B., Serrano, S., Lorente, J.A., Bellosillo, B., Lloreta, J., Juanpere, N., Alameda, F., Baro, T., de Heredia, C.D., Toran, N., Catala, A., Torreadell, M., Fortuny, C., Cusi, V., Carreras, C., Diaz, G.A., Blander, J.M., Farber, C.M., Silvestri, G., Cunningham-Rundles, C., Calvillo, M., Dufour, C., Notarangelo, L.D., Lougaris, V., Plebani, A., Casanova, J.L., Ganal, S.C., Diefenbach, A., Arostegui, J.I., Juan, M., Yague, J., Mahlaoui, N., Donadieu, J., Chen, K., and Cerutti, A., *B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen*. *Nat Immunol*, 2011. **13**(2): p. 170-80.
 25. Anderson, D.C., Schmalsteig, F.C., Finegold, M.J., Hughes, B.J., Rothlein, R., Miller, L.J., Kohl, S., Tosi, M.F., Jacobs, R.L., Waldrop, T.C., and et al., *The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features*. *J Infect Dis*, 1985. **152**(4): p. 668-89.
 26. Bowen, T.J., Ochs, H.D., Altman, L.C., Price, T.H., Van Epps, D.E., Brautigan, D.L., Rosin, R.E., Perkins, W.D., Babior, B.M., Klebanoff, S.J., and

- Wedgwood, R.J., *Severe recurrent bacterial infections associated with defective adherence and chemotaxis in two patients with neutrophils deficient in a cell-associated glycoprotein*. J Pediatr, 1982. **101**(6): p. 932-40.
27. Phillips, M.L., Schwartz, B.R., Etzioni, A., Bayer, R., Ochs, H.D., Paulson, J.C., and Harlan, J.M., *Neutrophil adhesion in leukocyte adhesion deficiency syndrome type 2*. J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2898-906.
 28. Svensson, L., Howarth, K., McDowall, A., Patzak, I., Evans, R., Ussar, S., Moser, M., Metin, A., Fried, M., Tomlinson, I., and Hogg, N., *Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation*. Nat Med, 2009. **15**(3): p. 306-12.
 29. Pai, S.Y., Kim, C., and Williams, D.A., *Rac GTPases in human diseases*. Dis Markers, 2010. **29**(3-4): p. 177-87.
 30. Luhn, K., Wild, M.K., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R., and Vestweber, D., *The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter*. Nat Genet, 2001. **28**(1): p. 69-72.
 31. Yakubenia, S., Frommhold, D., Scholch, D., Hellbusch, C.C., Korner, C., Petri, B., Jones, C., Ipe, U., Bixel, M.G., Krempien, R., Sperandio, M., and Wild, M.K., *Leukocyte trafficking in a mouse model for leukocyte adhesion deficiency II/congenital disorder of glycosylation IIc*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1472-81.
 32. Ambruso, D.R., Knall, C., Abell, A.N., Panepinto, J., Kurkchubasche, A., Thurman, G., Gonzalez-Aller, C., Hiester, A., deBoer, M., Harbeck, R.J., Oyer, R., Johnson, G.L., and Roos, D., *Human neutrophil immunodeficiency syndrome is associated with an inhibitory Rac2 mutation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(9): p. 4654-9.
 33. Schymeinsky, J., Sperandio, M., and Walzog, B., *The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology*. Trends Cell Biol, 2011. **21**(4): p. 247-55.
 34. Kansas, G.S., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3259-87.
 35. McEver, R.P. and Cummings, R.D., *Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment*. J Clin Invest, 1997. **100**(11 Suppl): p. S97-103.
 36. Zarbock, A., Abram, C.L., Hundt, M., Altman, A., Lowell, C.A., and Ley, K., *PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling*. J Exp Med, 2008. **205**(10): p. 2339-47.
 37. Kunkel, E.J. and Ley, K., *Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo*. Circ Res, 1996. **79**(6): p. 1196-204.

38. Sigal, A., Bleijs, D.A., Grabovsky, V., van Vliet, S.J., Dwir, O., Figdor, C.G., van Kooyk, Y., and Alon, R., *The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 442-52.
39. Salas, A., Shimaoka, M., Kogan, A.N., Harwood, C., von Andrian, U.H., and Springer, T.A., *Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 393-406.
40. Chesnutt, B.C., Smith, D.F., Raffler, N.A., Smith, M.L., White, E.J., and Ley, K., *Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin*. Microcirculation, 2006. **13**(2): p. 99-109.
41. Kadono, T., Venturi, G.M., Steeber, D.A., and Tedder, T.F., *Leukocyte rolling velocities and migration are optimized by cooperative L-selectin and intercellular adhesion molecule-1 functions*. J Immunol, 2002. **169**(8): p. 4542-50.
42. Alon, R. and Feigelson, S.W., *Chemokine-triggered leukocyte arrest: force-regulated bi-directional integrin activation in quantal adhesive contacts*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(5): p. 670-6.
43. Lum, A.F., Green, C.E., Lee, G.R., Staunton, D.E., and Simon, S.I., *Dynamic regulation of LFA-1 activation and neutrophil arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20660-70.
44. Herter, J. and Zarbock, A., *Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment*. J Immunol, 2013. **190**(9): p. 4451-7.
45. Zarbock, A. and Ley, K., *New insights into leukocyte recruitment by intravital microscopy*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **334**: p. 129-52.
46. Xu, J., Wang, F., Van Keymeulen, A., Herzmark, P., Straight, A., Kelly, K., Takuwa, Y., Sugimoto, N., Mitchison, T., and Bourne, H.R., *Divergent signals and cytoskeletal assemblies regulate self-organizing polarity in neutrophils*. Cell, 2003. **114**(2): p. 201-14.
47. Giagulli, C., Ottoboni, L., Cavegion, E., Rossi, B., Lowell, C., Constantin, G., Laudanna, C., and 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): p. 604-11.
48. Wilson, K., Lewalle, A., Fritzsche, M., Thorogate, R., Duke, T., and Charras, G., *Mechanisms of leading edge protrusion in interstitial migration*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 2896.
49. Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., and 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): p. 2569-75.
50. Gorina, R., Lyck, R., Vestweber, D., and Engelhardt, B., *beta2 integrin-mediated crawling on endothelial ICAM-1 and ICAM-2 is a prerequisite for transcellular neutrophil diapedesis across the inflamed blood-brain barrier.* J Immunol, 2014. **192**(1): p. 324-37.
 51. Phillipson, M., Kaur, J., Colarusso, P., Ballantyne, C.M., and Kubes, P., *Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration.* PLoS One, 2008. **3**(2): p. e1649.
 52. Stark, K., Eckart, A., Haidari, S., Tirniceriu, A., Lorenz, M., von Bruhl, M.L., Gartner, F., Khandoga, A.G., Legate, K.R., Pless, R., Hepper, I., Lauber, K., Walzog, B., and 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): p. 41-51.
 53. Proebstl, D., Voisin, M.B., Woodfin, A., Whiteford, J., D'Acquisto, F., Jones, G.E., Rowe, D., and Nourshargh, S., *Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo.* J Exp Med, 2012. **209**(6): p. 1219-34.
 54. Friedl, P., Entschladen, F., Conrad, C., Niggemann, B., and Zanker, K.S., *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.* Eur J Immunol, 1998. **28**(8): p. 2331-43.
 55. Nourshargh, S., Hordijk, P.L., and Sixt, M., *Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 366-78.
 56. Lammermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Critchley, D.R., Fassler, R., and Sixt, M., *Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing.* Nature, 2008. **453**(7191): p. 51-5.
 57. Mathias, J.R., Perrin, B.J., Liu, T.X., Kanki, J., Look, A.T., and Huttenlocher, A., *Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish.* J Leukoc Biol, 2006. **80**(6): p. 1281-8.
 58. Woodfin, A., Voisin, M.B., Beyrau, M., Colom, B., Caille, D., Diapouli, F.M., Nash, G.B., Chavakis, T., Albelda, S.M., Rainger, G.E., Meda, P., Imhof, B.A., and Nourshargh, S., *The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo.* Nat Immunol, 2011. **12**(8): p. 761-9.
 59. Buckley, C.D., Ross, E.A., McGettrick, H.M., Osborne, C.E., Haworth, O., Schmutz, C., Stone, P.C., Salmon, M., Matharu, N.M., Vohra, R.K., Nash,

- G.B., and Rainger, G.E., *Identification of a phenotypically and functionally distinct population of long-lived neutrophils in a model of reverse endothelial migration*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(2): p. 303-11.
60. Allen, L.A. and Aderem, A., *Mechanisms of phagocytosis*. Curr Opin Immunol, 1996. **8**(1): p. 36-40.
61. Nordenfelt, P. and Tapper, H., *Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils*. J Leukoc Biol, 2011. **90**(2): p. 271-84.
62. Vieira, O.V., Botelho, R.J., and Grinstein, S., *Phagosome maturation: aging gracefully*. Biochem J, 2002. **366**(Pt 3): p. 689-704.
63. Tapper, H., Furuya, W., and Grinstein, S., *Localized exocytosis of primary (lysosomal) granules during phagocytosis: role of Ca²⁺-dependent tyrosine phosphorylation and microtubules*. J Immunol, 2002. **168**(10): p. 5287-96.
64. Sheppard, F.R., Kelher, M.R., Moore, E.E., McLaughlin, N.J., Banerjee, A., and Silliman, C.C., *Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation*. J Leukoc Biol, 2005. **78**(5): p. 1025-42.
65. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(3): p. 181-9.
66. Faurschou, M. and Borregaard, N., *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
67. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. Immunity, 2010. **33**(5): p. 657-70.
68. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
69. Papayannopoulos, V. and Zychlinsky, A., *NETs: a new strategy for using old weapons*. Trends Immunol, 2009. **30**(11): p. 513-21.
70. Kaplan, M.J. and Radic, M., *Neutrophil extracellular traps: double-edged swords of innate immunity*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2689-95.
71. Segal, A.W., *How neutrophils kill microbes*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 197-223.
72. Mayadas, T.N., Cullere, X., and Lowell, C.A., *The multifaceted functions of neutrophils*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 181-218.
73. Hynes, R.O., Lively, J.C., McCarty, J.H., Taverna, D., Francis, S.E., Hodivala-Dilke, K., and Xiao, Q., *The diverse roles of integrins and their ligands in angiogenesis*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2002. **67**: p. 143-53.
74. Ruoslahti, E., *Integrins*. J Clin Invest, 1991. **87**(1): p. 1-5.

75. Schwartz, M.A., *Transmembrane signalling by integrins*. Trends Cell Biol, 1992. **2**(10): p. 304-8.
76. El Kebir, D. and Filep, J.G., *Modulation of Neutrophil Apoptosis and the Resolution of Inflammation through beta2 Integrins*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 60.
77. Zarbock, A., Kempf, T., Wollert, K.C., and Vestweber, D., *Leukocyte integrin activation and deactivation: novel mechanisms of balancing inflammation*. J Mol Med (Berl), 2012. **90**(4): p. 353-9.
78. Luo, B.H., Carman, C.V., and Springer, T.A., *Structural basis of integrin regulation and signaling*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 619-47.
79. Springer, T.A. and Dustin, M.L., *Integrin inside-out signaling and the immunological synapse*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(1): p. 107-15.
80. Cheresh, D.A., *Integrins in thrombosis, wound healing and cancer*. Biochem Soc Trans, 1991. **19**(4): p. 835-8.
81. Shattil, S.J. and Newman, P.J., *Integrins: dynamic scaffolds for adhesion and signaling in platelets*. Blood, 2004. **104**(6): p. 1606-15.
82. Foubert, P. and Varner, J.A., *Integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis*. Methods Mol Biol, 2012. **757**: p. 471-86.
83. Desgrosellier, J.S. and Cheresh, D.A., *Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(1): p. 9-22.
84. Byron, A., Humphries, J.D., Askari, J.A., Craig, S.E., Mould, A.P., and Humphries, M.J., *Anti-integrin monoclonal antibodies*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 22): p. 4009-11.
85. Fan, Z. and Ley, K., *Leukocyte arrest: Biomechanics and molecular mechanisms of beta2 integrin activation*. Biorheology, 2015. **52**(5-6): p. 353-77.
86. Campbell, I.D. and Humphries, M.J., *Integrin structure, activation, and interactions*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(3).
87. Arnaout, M.A., Goodman, S.L., and Xiong, J.P., *Structure and mechanics of integrin-based cell adhesion*. Curr Opin Cell Biol, 2007. **19**(5): p. 495-507.
88. Morse, E.M., Brahme, N.N., and Calderwood, D.A., *Integrin cytoplasmic tail interactions*. Biochemistry, 2014. **53**(5): p. 810-20.
89. Legate, K.R. and Fassler, R., *Mechanisms that regulate adaptor binding to beta-integrin cytoplasmic tails*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 187-98.

90. Gahmberg, C.G., Valmu, L., Fagerholm, S., Kotovuori, P., Ihanus, E., Tian, L., and Pessa-Morikawa, T., *Leukocyte integrins and inflammation*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(6): p. 549-55.
91. Phillipson, M. and Kubes, P., *The neutrophil in vascular inflammation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1381-90.
92. Kuwano, Y., Spelten, O., Zhang, H., Ley, K., and 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): p. 617-24.
93. Lefort, C.T., Rossaint, J., Moser, M., Petrich, B.G., Zarbock, A., Monkley, S.J., Critchley, D.R., Ginsberg, M.H., Fassler, R., and Ley, K., *Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation*. Blood, 2012. **119**(18): p. 4275-82.
94. Herter, J.M., Rossaint, J., Block, H., Welch, H., and Zarbock, A., *Integrin activation by P-Rex1 is required for selectin-mediated slow leukocyte rolling and intravascular crawling*. Blood, 2013. **121**(12): p. 2301-10.
95. Ley, K., *Arrest chemokines*. Microcirculation, 2003. **10**(3-4): p. 289-95.
96. D'Ambrosio, D., Albanesi, C., Lang, R., Girolomoni, G., Sinigaglia, F., and Laudanna, C., *Quantitative differences in chemokine receptor engagement generate diversity in integrin-dependent lymphocyte adhesion*. J Immunol, 2002. **169**(5): p. 2303-12.
97. Green, C.E., Schaff, U.Y., Sarantos, M.R., Lum, A.F., Staunton, D.E., and Simon, S.I., *Dynamic shifts in LFA-1 affinity regulate neutrophil rolling, arrest, and transmigration on inflamed endothelium*. Blood, 2006. **107**(5): p. 2101-11.
98. Constantin, G. and Laudanna, C., *A deadly migration*. Immunity, 2010. **32**(2): p. 147-9.
99. Dustin, M.L. and Shaw, A.S., *Costimulation: building an immunological synapse*. Science, 1999. **283**(5402): p. 649-50.
100. Schnitzler, N., Haase, G., Podbielski, A., Luttkien, R., and Schweizer, K.G., *A co-stimulatory signal through ICAM-beta2 integrin-binding potentiates neutrophil phagocytosis*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 231-5.
101. Nishida, N., Xie, C., Shimaoka, M., Cheng, Y., Walz, T., and Springer, T.A., *Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations*. Immunity, 2006. **25**(4): p. 583-94.
102. Shimaoka, M., Xiao, T., Liu, J.H., Yang, Y., Dong, Y., Jun, C.D., McCormack, A., Zhang, R., Joachimiak, A., Takagi, J., Wang, J.H., and Springer, T.A., *Structures of the alpha L I domain and its complex with ICAM-1 reveal a shape-shifting pathway for integrin regulation*. Cell, 2003. **112**(1): p. 99-111.
103. Evans, R., Patzak, I., Svensson, L., De Filippo, K., Jones, K., McDowall, A., and Hogg, N., *Integrins in immunity*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 2): p. 215-25.

104. Abram, C.L. and Lowell, C.A., *The ins and outs of leukocyte integrin signaling*. *Annu Rev Immunol*, 2009. **27**: p. 339-62.
105. Fan, Z., McArdle, S., Marki, A., Mikulski, Z., Gutierrez, E., Engelhardt, B., Deutsch, U., Ginsberg, M., Groisman, A., and Ley, K., *Neutrophil recruitment limited by high-affinity bent beta2 integrin binding ligand in cis*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 12658.
106. Zhu, J., Luo, B.H., Xiao, T., Zhang, C., Nishida, N., and Springer, T.A., *Structure of a complete integrin ectodomain in a physiologic resting state and activation and deactivation by applied forces*. *Mol Cell*, 2008. **32**(6): p. 849-61.
107. Ye, F., Kim, C., and Ginsberg, M.H., *Molecular mechanism of inside-out integrin regulation*. *J Thromb Haemost*, 2011. **9 Suppl 1**: p. 20-5.
108. Zhu, J., Boylan, B., Luo, B.H., Newman, P.J., and Springer, T.A., *Tests of the extension and deadbolt models of integrin activation*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(16): p. 11914-20.
109. Zarbock, A., Ley, K., McEver, R.P., and Hidalgo, A., *Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow*. *Blood*, 2011. **118**(26): p. 6743-51.
110. Norman, K.E., Moore, K.L., McEver, R.P., and Ley, K., *Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1*. *Blood*, 1995. **86**(12): p. 4417-21.
111. Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., Li, F., Johnson, D.A., Lichenstein, H.S., Cummings, R.D., Bainton, D.F., and McEver, R.P., *P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin*. *J Cell Biol*, 1995. **128**(4): p. 661-71.
112. Zarbock, A., Lowell, C.A., and 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): p. 773-83.
113. Qin, K., Dong, C., Wu, G., and Lambert, N.A., *Inactive-state preassembly of G(q)-coupled receptors and G(q) heterotrimers*. *Nat Chem Biol*, 2011. **7**(10): p. 740-7.
114. Ley, K., *Arrest chemokines*. *Front Immunol*, 2014. **5**: p. 150.
115. Mocsai, A., Abram, C.L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L.L., and Lowell, C.A., *Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*. *Nat Immunol*, 2006. **7**(12): p. 1326-33.
116. Frommhold, D., Mannigel, I., Schymeinsky, J., Mocsai, A., Poeschl, J., Walzog, B., and Sperandio, M., *Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo*. *BMC Immunol*, 2007. **8**: p. 31.

117. Newbrough, S.A., Mocsai, A., Clemens, R.A., Wu, J.N., Silverman, M.A., Singer, A.L., Lowell, C.A., and Koretzky, G.A., *SLP-76 regulates Fcγ receptor and integrin signaling in neutrophils*. *Immunity*, 2003. **19**(5): p. 761-9.
118. Schymeinsky, J., Then, C., and Walzog, B., *The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes*. *J Cell Physiol*, 2005. **204**(2): p. 614-22.
119. Schymeinsky, J., Sindrilariu, A., Frommhold, D., Sperandio, M., Gerstl, R., Then, C., Mocsai, A., Scharffetter-Kochanek, K., and 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): p. 3919-27.
120. Schymeinsky, J., Then, C., Sindrilariu, A., Gerstl, R., Jakus, Z., Tybulewicz, V.L., Scharffetter-Kochanek, K., and Walzog, B., *Syk-mediated translocation of PI3Kdelta to the leading edge controls lamellipodium formation and migration of leukocytes*. *PLoS One*, 2007. **2**(11): p. e1132.
121. Schymeinsky, J., Mocsai, A., and Walzog, B., *Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications*. *Thromb Haemost*, 2007. **98**(2): p. 262-73.
122. Mocsai, A., Ruland, J., and Tybulewicz, V.L., *The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions*. *Nat Rev Immunol*, 2010. **10**(6): p. 387-402.
123. Zarbock, A. and Ley, K., *Protein tyrosine kinases in neutrophil activation and recruitment*. *Arch Biochem Biophys*, 2011. **510**(2): p. 112-9.
124. Hepper, I., Schymeinsky, J., Weckbach, L.T., Jakob, S.M., Frommhold, D., Sixt, M., Laschinger, M., Sperandio, M., and Walzog, B., *The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions*. *J Immunol*, 2012. **188**(9): p. 4590-601.
125. 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., and Walzog, B., *A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo*. *Blood*, 2009. **114**(19): p. 4209-20.
126. Jakob, S.M., Pick, R., Brechtefeld, D., Nussbaum, C., Kiefer, F., Sperandio, M., and Walzog, B., *Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response*. *Blood*, 2013. **121**(20): p. 4184-94.
127. Ensenat, D., Yao, Z., Wang, X.S., Kori, R., Zhou, G., Lee, S.C., and Tan, T.H., *A novel src homology 3 domain-containing adaptor protein, HIP-55, that interacts with hematopoietic progenitor kinase 1*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(48): p. 33945-50.

128. Liou, J., Kiefer, F., Dang, A., Hashimoto, A., Cobb, M.H., Kurosaki, T., and Weiss, A., *HPK1 is activated by lymphocyte antigen receptors and negatively regulates AP-1*. *Immunity*, 2000. **12**(4): p. 399-408.
129. Tsuji, S., Okamoto, M., Yamada, K., Okamoto, N., Goitsuka, R., Arnold, R., Kiefer, F., and Kitamura, D., *B cell adaptor containing src homology 2 domain (BASH) links B cell receptor signaling to the activation of hematopoietic progenitor kinase 1*. *J Exp Med*, 2001. **194**(4): p. 529-39.
130. Ling, P., Meyer, C.F., Redmond, L.P., Shui, J.W., Davis, B., Rich, R.R., Hu, M.C., Wange, R.L., and Tan, T.H., *Involvement of hematopoietic progenitor kinase 1 in T cell receptor signaling*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(22): p. 18908-14.
131. Sauer, K., Liou, J., Singh, S.B., Yablonski, D., Weiss, A., and Perlmutter, R.M., *Hematopoietic progenitor kinase 1 associates physically and functionally with the adaptor proteins B cell linker protein and SLP-76 in lymphocytes*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(48): p. 45207-16.
132. Arnold, R., Patzak, I.M., Neuhaus, B., Vancauwenbergh, S., Veillette, A., Van Lint, J., and Kiefer, F., *Activation of hematopoietic progenitor kinase 1 involves relocation, autophosphorylation, and transphosphorylation by protein kinase D1*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(6): p. 2364-83.
133. Chuang, H.C., Wang, X., and Tan, T.H., *MAP4K Family Kinases in Immunity and Inflammation*. *Adv Immunol*, 2016. **129**: p. 277-314.
134. Hu, M.C., Qiu, W.R., Wang, X., Meyer, C.F., and Tan, T.H., *Human HPK1, a novel human hematopoietic progenitor kinase that activates the JNK/SAPK kinase cascade*. *Genes Dev*, 1996. **10**(18): p. 2251-64.
135. Kiefer, F., Tibbles, L.A., Anafi, M., Janssen, A., Zanke, B.W., Lassam, N., Pawson, T., Woodgett, J.R., and Iscove, N.N., *HPK1, a hematopoietic protein kinase activating the SAPK/JNK pathway*. *EMBO J*, 1996. **15**(24): p. 7013-25.
136. Chen, Y.R., Meyer, C.F., Ahmed, B., Yao, Z., and Tan, T.H., *Caspase-mediated cleavage and functional changes of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1)*. *Oncogene*, 1999. **18**(51): p. 7370-7.
137. Schulze-Luehrmann, J., Santner-Nanan, B., Jha, M.K., Schimpl, A., Avots, A., and Serfling, E., *Hematopoietic progenitor kinase 1 supports apoptosis of T lymphocytes*. *Blood*, 2002. **100**(3): p. 954-60.
138. Brenner, D., Golks, A., Kiefer, F., Krammer, P.H., and Arnold, R., *Activation or suppression of NFkappaB by HPK1 determines sensitivity to activation-induced cell death*. *EMBO J*, 2005. **24**(24): p. 4279-90.
139. Brenner, D., Golks, A., Becker, M., Muller, W., Frey, C.R., Novak, R., Melamed, D., Kiefer, F., Krammer, P.H., and Arnold, R., *Caspase-cleaved HPK1 induces CD95L-independent activation-induced cell death in T and B lymphocytes*. *Blood*, 2007. **110**(12): p. 3968-77.

140. Arnold, R., Frey, C.R., Muller, W., Brenner, D., Krammer, P.H., and Kiefer, F., *Sustained JNK signaling by proteolytically processed HPK1 mediates IL-3 independent survival during monocytic differentiation*. *Cell Death Differ*, 2007. **14**(3): p. 568-75.
141. Wang, H., Song, X., Logsdon, C., Zhou, G., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Hamilton, S.R., Tan, T.H., and Wang, H., *Proteasome-mediated degradation and functions of hematopoietic progenitor kinase 1 in pancreatic cancer*. *Cancer Res*, 2009. **69**(3): p. 1063-70.
142. Wang, H., Chen, Y., Lin, P., Li, L., Zhou, G., Liu, G., Logsdon, C., Jin, J., Abbruzzese, J.L., Tan, T.H., and Wang, H., *The CUL7/F-box and WD repeat domain containing 8 (CUL7/Fbxw8) ubiquitin ligase promotes degradation of hematopoietic progenitor kinase 1*. *J Biol Chem*, 2014. **289**(7): p. 4009-17.
143. Boomer, J.S. and Tan, T.H., *Functional interactions of HPK1 with adaptor proteins*. *J Cell Biochem*, 2005. **95**(1): p. 34-44.
144. Leung, I.W. and Lassam, N., *The kinase activation loop is the key to mixed lineage kinase-3 activation via both autophosphorylation and hematopoietic progenitor kinase 1 phosphorylation*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(3): p. 1961-7.
145. Wang, W., Zhou, G., Hu, M.C., Yao, Z., and Tan, T.H., *Activation of the hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1)-dependent, stress-activated c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by transforming growth factor beta (TGF-beta)-activated kinase (TAK1), a kinase mediator of TGF beta signal transduction*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(36): p. 22771-5.
146. Anafi, M., Kiefer, F., Gish, G.D., Mbamalu, G., Iscove, N.N., and Pawson, T., *SH2/SH3 adaptor proteins can link tyrosine kinases to a Ste20-related protein kinase, HPK1*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(44): p. 27804-11.
147. Oehrl, W., Kardinal, C., Ruf, S., Adermann, K., Groffen, J., Feng, G.S., Blenis, J., Tan, T.H., and Feller, S.M., *The germinal center kinase (GCK)-related protein kinases HPK1 and KHS are candidates for highly selective signal transducers of Crk family adapter proteins*. *Oncogene*, 1998. **17**(15): p. 1893-901.
148. Ma, W., Xia, C., Ling, P., Qiu, M., Luo, Y., Tan, T.H., and Liu, M., *Leukocyte-specific adaptor protein Grap2 interacts with hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) to activate JNK signaling pathway in T lymphocytes*. *Oncogene*, 2001. **20**(14): p. 1703-14.
149. Lewitzky, M., Harkiolaki, M., Domart, M.C., Jones, E.Y., and Feller, S.M., *Mona/Gads SH3C binding to hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) combines an atypical SH3 binding motif, R/KXXK, with a classical PXXP motif embedded in a polyproline type II (PPII) helix*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(27): p. 28724-32.
150. Ling, P., Yao, Z., Meyer, C.F., Wang, X.S., Oehrl, W., Feller, S.M., and Tan, T.H., *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): p. 1359-68.
151. Yu, J., Riou, C., Davidson, D., Minhas, R., Robson, J.D., Julius, M., Arnold, R., Kiefer, F., and Veillette, A., *Synergistic regulation of immunoreceptor signaling by SLP-76-related adaptor Clnk and serine/threonine protein kinase HPK-1.* Mol Cell Biol, 2001. **21**(18): p. 6102-12.
 152. Han, J., Kori, R., Shui, J.W., Chen, Y.R., Yao, Z., and Tan, T.H., *The SH3 domain-containing adaptor HIP-55 mediates c-Jun N-terminal kinase activation in T cell receptor signaling.* J Biol Chem, 2003. **278**(52): p. 52195-202.
 153. Han, J., Shui, J.W., Zhang, X., Zheng, B., Han, S., and Tan, T.H., *HIP-55 is important for T-cell proliferation, cytokine production, and immune responses.* Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 6869-78.
 154. Le Bras, S., Foucault, I., Foussat, A., Brignone, C., Acuto, O., and Deckert, M., *Recruitment of the actin-binding protein HIP-55 to the immunological synapse regulates T cell receptor signaling and endocytosis.* J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 15550-60.
 155. Zhou, G., Boomer, J.S., and Tan, T.H., *Protein phosphatase 4 is a positive regulator of hematopoietic progenitor kinase 1.* J Biol Chem, 2004. **279**(47): p. 49551-61.
 156. Brenner, D., Brechmann, M., Rohling, S., Tapernoux, M., Mock, T., Winter, D., Lehmann, W.D., Kiefer, F., Thome, M., Krammer, P.H., and Arnold, R., *Phosphorylation of CARMA1 by HPK1 is critical for NF-kappaB activation in T cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(34): p. 14508-13.
 157. Nagata, Y., Kiefer, F., Watanabe, T., and Todokoro, K., *Activation of hematopoietic progenitor kinase-1 by erythropoietin.* Blood, 1999. **93**(10): p. 3347-54.
 158. Siligardi, G., Ruzza, P., Hussain, R., Cesaro, L., Brunati, A.M., Pinna, L.A., and Donella-Deana, A., *The SH3 domain of HS1 protein recognizes lysine-rich polyproline motifs.* Amino Acids, 2012. **42**(4): p. 1361-70.
 159. Han, A., Saijo, K., Mecklenbrauker, I., Tarakhovskiy, A., and Nussenzweig, M.C., *Bam32 links the B cell receptor to ERK and JNK and mediates B cell proliferation but not survival.* Immunity, 2003. **19**(4): p. 621-32.
 160. Bird, T.A., Kyriakis, J.M., Tyshler, L., Gayle, M., Milne, A., and Virca, G.D., *Interleukin-1 activates p54 mitogen-activated protein (MAP) kinase/stress-activated protein kinase by a pathway that is independent of p21ras, Raf-1, and MAP kinase kinase.* J Biol Chem, 1994. **269**(50): p. 31836-44.
 161. Kyriakis, J.M., Banerjee, P., Nikolakaki, E., Dai, T., Rubie, E.A., Ahmad, M.F., Avruch, J., and Woodgett, J.R., *The stress-activated protein kinase subfamily of c-Jun kinases.* Nature, 1994. **369**(6476): p. 156-60.

162. Woodgett, J.R., Avruch, J., and Kyriakis, J., *The stress activated protein kinase pathway*. *Cancer Surv*, 1996. **27**: p. 127-38.
163. Zhou, G., Lee, S.C., Yao, Z., and Tan, T.H., *Hematopoietic progenitor kinase 1 is a component of transforming growth factor beta-induced c-Jun N-terminal kinase signaling cascade*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(19): p. 13133-8.
164. Hu, M.C., Wang, Y., Qiu, W.R., Mikhail, A., Meyer, C.F., and Tan, T.H., *Hematopoietic progenitor kinase-1 (HPK1) stress response signaling pathway activates IkkappaB kinases (IKK-alpha/beta) and IKK-beta is a developmentally regulated protein kinase*. *Oncogene*, 1999. **18**(40): p. 5514-24.
165. Li, T., Han, D., Chen, J., Yu, X.J., and Zhang, G.Y., *Neuroprotection against ischemic brain injury by knockdown of hematopoietic progenitor kinase 1 expression*. *Neuroreport*, 2008. **19**(6): p. 647-51.
166. Chen, Y.R. and Tan, T.H., *The c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptotic signaling (review)*. *Int J Oncol*, 2000. **16**(4): p. 651-62.
167. Ito, Y., Pandey, P., Sathyanarayana, P., Ling, P., Rana, A., Weichselbaum, R., Tan, T.H., Kufe, D., and Kharbanda, S., *Interaction of hematopoietic progenitor kinase 1 and c-Abl tyrosine kinase in response to genotoxic stress*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(21): p. 18130-8.
168. Shui, J.W., Boomer, J.S., Han, J., Xu, J., Dement, G.A., Zhou, G., and Tan, T.H., *Hematopoietic progenitor kinase 1 negatively regulates T cell receptor signaling and T cell-mediated immune responses*. *Nat Immunol*, 2007. **8**(1): p. 84-91.
169. Arnold, R., Liou, J., Drexler, H.C., Weiss, A., and 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): p. 14675-84.
170. Krammer, P.H., Arnold, R., and Lavrik, I.N., *Life and death in peripheral T cells*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(7): p. 532-42.
171. Liu, S.K., Smith, C.A., Arnold, R., Kiefer, F., and McGlade, C.J., *The adaptor protein Gads (Grb2-related adaptor downstream of Shc) is implicated in coupling hemopoietic progenitor kinase-1 to the activated TCR*. *J Immunol*, 2000. **165**(3): p. 1417-26.
172. Di Bartolo, V., Montagne, B., Salek, M., Jungwirth, B., Carrette, F., Fournane, J., Sol-Foulon, N., Michel, F., Schwartz, O., Lehmann, W.D., and Acuto, O., *A novel pathway down-modulating T cell activation involves HPK-1-dependent recruitment of 14-3-3 proteins on SLP-76*. *J Exp Med*, 2007. **204**(3): p. 681-91.
173. Lasserre, R., Cuche, C., Blecher-Gonen, R., Libman, E., Biquand, E., Danckaert, A., Yablonski, D., Alcover, A., and Di Bartolo, V., *Release of serine/threonine-phosphorylated adaptors from signaling microclusters down-regulates T cell activation*. *J Cell Biol*, 2011. **195**(5): p. 839-53.

174. Alzabin, S., Bhardwaj, N., Kiefer, F., Sawasdikosol, S., and Burakoff, S., *Hematopoietic progenitor kinase 1 is a negative regulator of dendritic cell activation*. J Immunol, 2009. **182**(10): p. 6187-94.
175. Konigsberger, S., Peckl-Schmid, D., Zaborsky, N., Patzak, I., Kiefer, F., and Achatz, G., *HPK1 associates with SKAP-HOM to negatively regulate Rap1-mediated B-lymphocyte adhesion*. PLoS One, 2010. **5**(9).
176. Wang, X., Li, J.P., Kuo, H.K., Chiu, L.L., Dement, G.A., Lan, J.L., Chen, D.Y., Yang, C.Y., Hu, H., and Tan, T.H., *Down-regulation of B cell receptor signaling by hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1)-mediated phosphorylation and ubiquitination of activated B cell linker protein (BLNK)*. J Biol Chem, 2012. **287**(14): p. 11037-48.
177. Wang, H., McCann, F.E., Gordan, J.D., Wu, X., Raab, M., Malik, T.H., Davis, D.M., and Rudd, C.E., *ADAP-SLP-76 binding differentially regulates supramolecular activation cluster (SMAC) formation relative to T cell-APC conjugation*. J Exp Med, 2004. **200**(8): p. 1063-74.
178. Patzak, I.M., Konigsberger, S., Suzuki, A., Mak, T.W., and Kiefer, F., *HPK1 competes with ADAP for SLP-76 binding and via Rap1 negatively affects T-cell adhesion*. Eur J Immunol, 2010. **40**(11): p. 3220-5.
179. Kliche, S., Breitling, D., Togni, M., Pusch, R., Heuer, K., Wang, X., Freund, C., Kasirer-Friede, A., Menasche, G., Koretzky, G.A., and Schraven, B., *The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(19): p. 7130-44.
180. Baker, R.G., Hsu, C.J., Lee, D., Jordan, M.S., Maltzman, J.S., Hammer, D.A., Baumgart, T., and Koretzky, G.A., *The adapter protein SLP-76 mediates "outside-in" integrin signaling and function in T cells*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(20): p. 5578-89.
181. Togni, M., Swanson, K.D., Reimann, S., Kliche, S., Pearce, A.C., Simeoni, L., Reinhold, D., Wienands, J., Neel, B.G., Schraven, B., and Gerber, A., *Regulation of in vitro and in vivo immune functions by the cytosolic adaptor protein SKAP-HOM*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(18): p. 8052-63.
182. Alzabin, S., Pyarajan, S., Yee, H., Kiefer, F., Suzuki, A., Burakoff, S., and Sawasdikosol, S., *Hematopoietic progenitor kinase 1 is a critical component of prostaglandin E2-mediated suppression of the anti-tumor immune response*. Cancer Immunol Immunother, 2010. **59**(3): p. 419-29.
183. Zhang, Q., Long, H., Liao, J., Zhao, M., Liang, G., Wu, X., Zhang, P., Ding, S., Luo, S., and Lu, Q., *Inhibited expression of hematopoietic progenitor kinase 1 associated with loss of jumonji domain containing 3 promoter binding contributes to autoimmunity in systemic lupus erythematosus*. J Autoimmun, 2011. **37**(3): p. 180-9.

184. Batliwalla, F.M., Li, W., Ritchlin, C.T., Xiao, X., Brenner, M., Laragione, T., Shao, T., Durham, R., Kemshtetti, S., Schwarz, E., Coe, R., Kern, M., Baechler, E.C., Behrens, T.W., Gregersen, P.K., and Gulko, P.S., *Microarray analyses of peripheral blood cells identifies unique gene expression signature in psoriatic arthritis*. Mol Med, 2005. **11**(1-12): p. 21-9.
185. Sawasdikosol, S., Zha, R., Yang, B., and Burakoff, S., *HPK1 as a novel target for cancer immunotherapy*. Immunol Res, 2012. **54**(1-3): p. 262-5.
186. Cox, J. and Mann, M., *MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(12): p. 1367-72.
187. Krey, J.F., Wilmarth, P.A., Shin, J.B., Klimek, J., Sherman, N.E., Jeffery, E.D., Choi, D., David, L.L., and Barr-Gillespie, P.G., *Accurate label-free protein quantitation with high- and low-resolution mass spectrometers*. J Proteome Res, 2014. **13**(2): p. 1034-1044.
188. Mellacheruvu, D., Wright, Z., Couzens, A.L., Lambert, J.P., St-Denis, N.A., Li, T., Miteva, Y.V., Hauri, S., Sardiou, M.E., Low, T.Y., Halim, V.A., Bagshaw, R.D., Hubner, N.C., Al-Hakim, A., Bouchard, A., Faubert, D., Fermin, D., Dunham, W.H., Goudreault, M., Lin, Z.Y., Badillo, B.G., Pawson, T., Durocher, D., Coulombe, B., Aebersold, R., Superti-Furga, G., Colinge, J., Heck, A.J., Choi, H., Gstaiger, M., Mohammed, S., Cristea, I.M., Bennett, K.L., Washburn, M.P., Raught, B., Ewing, R.M., Gingras, A.C., and Nesvizhskii, A.I., *The CRAPome: a contaminant repository for affinity purification-mass spectrometry data*. Nat Methods, 2013. **10**(8): p. 730-6.
189. Bader, A., Winkelmann, M., Forne, I., Walzog, B., and Maier-Begandt, D., *Decoding the signaling profile of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) in innate immunity: A proteomic approach*. Eur J Immunol, 2022.
190. Robinson, M.K., Andrew, D., Rosen, H., Brown, D., Ortlepp, S., Stephens, P., and Butcher, E.C., *Antibody against the Leu-CAM beta-chain (CD18) promotes both LFA-1- and CR3-dependent adhesion events*. J Immunol, 1992. **148**(4): p. 1080-5.
191. Dransfield, I. and Hogg, N., *Regulated expression of Mg²⁺ binding epitope on leukocyte integrin alpha subunits*. EMBO J, 1989. **8**(12): p. 3759-65.
192. Manjunath, N., Wu, H., Subramanya, S., and Shankar, P., *Lentiviral delivery of short hairpin RNAs*. Adv Drug Deliv Rev, 2009. **61**(9): p. 732-45.
193. Karpala, A.J., Doran, T.J., and Bean, A.G., *Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies*. Immunol Cell Biol, 2005. **83**(3): p. 211-6.
194. Gantier, M.P. and Williams, B.R., *The response of mammalian cells to double-stranded RNA*. Cytokine Growth Factor Rev, 2007. **18**(5-6): p. 363-71.
195. Williams, B.R., *Signal integration via PKR*. Sci STKE, 2001. **2001**(89): p. re2.

196. Hartmann, R., Justesen, J., Sarkar, S.N., Sen, G.C., and Yee, V.C., *Crystal structure of the 2'-specific and double-stranded RNA-activated interferon-induced antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase*. Mol Cell, 2003. **12**(5): p. 1173-85.
197. Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J., and Weissman, D., *Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3*. J Immunol, 2004. **172**(11): p. 6545-9.
198. Rothbauer, U., Zolghadr, K., Muyldermans, S., Schepers, A., Cardoso, M.C., and Leonhardt, H., *A versatile nanotrap for biochemical and functional studies with fluorescent fusion proteins*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(2): p. 282-9.
199. Willeke, T., Schymeinsky, J., Prange, P., Zahler, S., and Walzog, B., *A role for Syk-kinase in the control of the binding cycle of the beta2 integrins (CD11/CD18) in human polymorphonuclear neutrophils*. J Leukoc Biol, 2003. **74**(2): p. 260-9.
200. Sada, K., Takano, T., Yanagi, S., and Yamamura, H., *Structure and function of Syk protein-tyrosine kinase*. J Biochem, 2001. **130**(2): p. 177-86.
201. Zioncheck, T.F., Harrison, M.L., Isaacson, C.C., and Geahlen, R.L., *Generation of an active protein-tyrosine kinase from lymphocytes by proteolysis*. J Biol Chem, 1988. **263**(35): p. 19195-202.
202. Mocsai, A., Zhou, M., Meng, F., Tybulewicz, V.L., and Lowell, C.A., *Syk is required for integrin signaling in neutrophils*. Immunity, 2002. **16**(4): p. 547-58.
203. Cheng, A.M., Rowley, B., Pao, W., Hayday, A., Bolen, J.B., and Pawson, T., *Syk tyrosine kinase required for mouse viability and B-cell development*. Nature, 1995. **378**(6554): p. 303-6.
204. Turner, M., Mee, P.J., Costello, P.S., Williams, O., Price, A.A., Duddy, L.P., Furlong, M.T., Geahlen, R.L., and Tybulewicz, V.L., *Perinatal lethality and blocked B-cell development in mice lacking the tyrosine kinase Syk*. Nature, 1995. **378**(6554): p. 298-302.
205. Turner, M., Schweighoffer, E., Colucci, F., Di Santo, J.P., and Tybulewicz, V.L., *Tyrosine kinase SYK: essential functions for immunoreceptor signalling*. Immunol Today, 2000. **21**(3): p. 148-54.
206. Gilfillan, A.M. and Tkaczyk, C., *Integrated signalling pathways for mast-cell activation*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(3): p. 218-30.
207. Abtahian, F., Guerriero, A., Sebzda, E., Lu, M.M., Zhou, R., Mocsai, A., Myers, E.E., Huang, B., Jackson, D.G., Ferrari, V.A., Tybulewicz, V., Lowell, C.A., Lepore, J.J., Koretzky, G.A., and Kahn, M.L., *Regulation of blood and lymphatic vascular separation by signaling proteins SLP-76 and Syk*. Science, 2003. **299**(5604): p. 247-51.

208. Sebzda, E., Hibbard, C., Sweeney, S., Abtahian, F., Bezman, N., Clemens, G., Maltzman, J.S., Cheng, L., Liu, F., Turner, M., Tybulewicz, V., Koretzky, G.A., and Kahn, M.L., *Syk and Slp-76 mutant mice reveal a cell-autonomous hematopoietic cell contribution to vascular development*. *Dev Cell*, 2006. **11**(3): p. 349-61.
209. Berton, G., Mocsai, A., and Lowell, C.A., *Src and Syk kinases: key regulators of phagocytic cell activation*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(4): p. 208-14.
210. Larbolette, O., Wollscheid, B., Schweikert, J., Nielsen, P.J., and Wienands, J., *SH3P7 is a cytoskeleton adapter protein and is coupled to signal transduction from lymphocyte antigen receptors*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(2): p. 1539-46.
211. Moon, K.D., Post, C.B., Durden, D.L., Zhou, Q., De, P., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L., *Molecular basis for a direct interaction between the Syk protein-tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(2): p. 1543-51.
212. Turner, M. and Billadeau, D.D., *VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(7): p. 476-86.
213. Hornstein, I., Alcover, A., and Katzav, S., *Vav proteins, masters of the world of cytoskeleton organization*. *Cell Signal*, 2004. **16**(1): p. 1-11.
214. Ding, J., Huang, S., Wu, S., Zhao, Y., Liang, L., Yan, M., Ge, C., Yao, J., Chen, T., Wan, D., Wang, H., Gu, J., Yao, M., Li, J., Tu, H., and He, X., *Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI α* . *Nat Cell Biol*, 2010. **12**(4): p. 390-9.
215. Garcia-Mata, R., Boulter, E., and Burridge, K., *The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011. **12**(8): p. 493-504.
216. Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Hoshino, Y., Yanagihara, K., and Sakai, R., *A novel RNA-binding protein, Ossa/C9orf10, regulates activity of Src kinases to protect cells from oxidative stress-induced apoptosis*. *Mol Cell Biol*, 2009. **29**(2): p. 402-13.
217. Wozniak, M., Hotowy, K., Czapinska, E., Dus-Szachniewicz, K., Szczuka, I., Gamian, E., Gamian, A., Terlecki, G., and Ziolkowski, P., *Early induction of stress-associated Src activator/Homo sapiens chromosome 9 open reading frame 10 protein following photodynamic therapy*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2014. **11**(1): p. 27-33.
218. Yagi, R., Tanaka, M., Sasaki, K., Kamata, R., Nakanishi, Y., Kanai, Y., and Sakai, R., *ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion*. *Oncogene*, 2011. **30**(12): p. 1413-21.

219. Bartolome, R.A., Garcia-Palmero, I., Torres, S., Lopez-Lucendo, M., Balyasnikova, I.V., and Casal, J.I., *IL13 Receptor alpha2 Signaling Requires a Scaffold Protein, FAM120A, to Activate the FAK and PI3K Pathways in Colon Cancer Metastasis*. *Cancer Res*, 2015. **75**(12): p. 2434-44.
220. Sawasdikosol, S., Pyarajan, S., Alzabin, S., Matejovic, G., and Burakoff, S.J., *Prostaglandin E2 activates HPK1 kinase activity via a PKA-dependent pathway*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(48): p. 34693-9.
221. Xue, L.Y., He, J., and Oleinick, N.L., *Rapid tyrosine phosphorylation of HS1 in the response of mouse lymphoma L5178Y-R cells to photodynamic treatment sensitized by the phthalocyanine Pc 4*. *Photochem Photobiol*, 1997. **66**(1): p. 105-13.
222. Chu, E.S. and Yow, C.M., *Modulation of telomerase and signal transduction proteins by hexyl-ALA-photodynamic therapy (PDT) in human doxorubicin resistant cancer cell models*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, 2012. **9**(3): p. 243-55.
223. Wills-Karp, M. and Finkelman, F.D., *Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways*. *Sci Signal*, 2008. **1**(51): p. pe55.
224. Barderas, R., Bartolome, R.A., Fernandez-Acenero, M.J., Torres, S., and Casal, J.I., *High expression of IL-13 receptor alpha2 in colorectal cancer is associated with invasion, liver metastasis, and poor prognosis*. *Cancer Res*, 2012. **72**(11): p. 2780-90.
225. Zhou, W., Li, X., and Premont, R.T., *Expanding functions of GIT Arf GTPase-activating proteins, PIX Rho guanine nucleotide exchange factors and GIT-PIX complexes*. *J Cell Sci*, 2016. **129**(10): p. 1963-74.
226. Aresta, S., de Tand-Heim, M.F., Beranger, F., and de Gunzburg, J., *A novel Rho GTPase-activating-protein interacts with Gem, a member of the Ras superfamily of GTPases*. *Biochem J*, 2002. **367**(Pt 1): p. 57-65.
227. Lee, H.H. and Chang, Z.F., *Regulation of RhoA-dependent ROCKII activation by Shp2*. *J Cell Biol*, 2008. **181**(6): p. 999-1012.
228. Matos, P., Skaug, J., Marques, B., Beck, S., Verissimo, F., Gespach, C., Boavida, M.G., Scherer, S.W., and Jordan, P., *Small GTPase Rac1: structure, localization, and expression of the human gene*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **277**(3): p. 741-51.
229. Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A., and Takai, Y., *Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins*. *Oncogene*, 1990. **5**(9): p. 1321-8.
230. Leonard, D., Hart, M.J., Platko, J.V., Eva, A., Henzel, W., Evans, T., and Cerione, R.A., *The identification and characterization of a GDP-dissociation inhibitor (GDI) for the CDC42Hs protein*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(32): p. 22860-8.

231. Ueda, T., Kikuchi, A., Ohga, N., Yamamoto, J., and Takai, Y., *Purification and characterization from bovine brain cytosol of a novel regulatory protein inhibiting the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein.* J Biol Chem, 1990. **265**(16): p. 9373-80.
232. Gandhi, P.N., Gibson, R.M., Tong, X., Miyoshi, J., Takai, Y., Konieczkowski, M., Sedor, J.R., and Wilson-Delfosse, A.L., *An activating mutant of Rac1 that fails to interact with Rho GDP-dissociation inhibitor stimulates membrane ruffling in mammalian cells.* Biochem J, 2004. **378**(Pt 2): p. 409-19.
233. Boulter, E., Garcia-Mata, R., Guilluy, C., Dubash, A., Rossi, G., Brennwald, P.J., and Burridge, K., *Regulation of Rho GTPase crosstalk, degradation and activity by RhoGDI1.* Nat Cell Biol, 2010. **12**(5): p. 477-83.
234. Chianale, F., Rainero, E., Cianflone, C., Bettio, V., Pighini, A., Porporato, P.E., Filigheddu, N., Serini, G., Sinigaglia, F., Baldanzi, G., and Graziani, A., *Diacylglycerol kinase alpha mediates HGF-induced Rac activation and membrane ruffling by regulating atypical PKC and RhoGDI.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(9): p. 4182-7.
235. Pradip, D., Peng, X., and Durden, D.L., *Rac2 specificity in macrophage integrin signaling: potential role for Syk kinase.* J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41661-9.
236. Sun, C.X., Downey, G.P., Zhu, F., Koh, A.L., Thang, H., and Glogauer, M., *Rac1 is the small GTPase responsible for regulating the neutrophil chemotaxis compass.* Blood, 2004. **104**(12): p. 3758-65.
237. Barber, M.A. and Welch, H.C., *PI3K and RAC signalling in leukocyte and cancer cell migration.* Bull Cancer, 2006. **93**(5): p. E44-52.
238. Dib, K., Melander, F., Axelsson, L., Dagher, M.C., Aspenstrom, P., and Andersson, T., *Down-regulation of Rac activity during beta 2 integrin-mediated adhesion of human neutrophils.* J Biol Chem, 2003. **278**(26): p. 24181-8.
239. El azreq, M.A. and Bourgoin, S.G., *Cytohesin-1 regulates human blood neutrophil adhesion to endothelial cells through beta2 integrin activation.* Mol Immunol, 2011. **48**(12-13): p. 1408-16.
240. Funaro, A., Ortolan, E., Ferranti, B., Gargiulo, L., Notaro, R., Luzzatto, L., and Malavasi, F., *CD157 is an important mediator of neutrophil adhesion and migration.* Blood, 2004. **104**(13): p. 4269-78.
241. Sugimoto, M.A., Vago, J.P., Teixeira, M.M., and Sousa, L.P., *Annexin A1 and the Resolution of Inflammation: Modulation of Neutrophil Recruitment, Apoptosis, and Clearance.* J Immunol Res, 2016. **2016**: p. 8239258.
242. He, S., Li, X., Li, R., Fang, L., Sun, L., Wang, Y., and Wu, M., *Annexin A2 Modulates ROS and Impacts Inflammatory Response via IL-17 Signaling in Polymicrobial Sepsis Mice.* PLoS Pathog, 2016. **12**(7): p. e1005743.

243. Pollard, H.B., Rojas, E., and Burns, A.L., *Synexin (annexin VII) and membrane fusion during the process of exocytotic secretion*. Prog Brain Res, 1992. **92**: p. 247-55.
244. Cho, D.H., Lee, H.J., Kim, H.J., Hong, S.H., Pyo, J.O., Cho, C., and Jung, Y.K., *Suppression of hypoxic cell death by APIP-induced sustained activation of AKT and ERK1/2*. Oncogene, 2007. **26**(19): p. 2809-14.
245. Zhuo, D.X., Zhang, X.W., Jin, B., Zhang, Z., Xie, B.S., Wu, C.L., Gong, K., and Mao, Z.B., *CSTP1, a novel protein phosphatase, blocks cell cycle, promotes cell apoptosis, and suppresses tumor growth of bladder cancer by directly dephosphorylating Akt at Ser473 site*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e65679.
246. Kim, Y.J., Lee, J.H., Lee, Y., Jia, J., Paek, S.H., Kim, H.B., Jin, S., and Ha, U.H., *Nucleoside diphosphate kinase and flagellin from Pseudomonas aeruginosa induce interleukin 1 expression via the Akt/NF-kappaB signaling pathways*. Infect Immun, 2014. **82**(8): p. 3252-60.
247. Donato, R., Sorci, G., and Giambanco, I., *S100A6 protein: functional roles*. Cell Mol Life Sci, 2017.
248. Klein, M.G., Yao, Y., Slosberg, E.D., Lima, C.D., Doki, Y., and Weinstein, I.B., *Characterization of PKCI and comparative studies with FHIT, related members of the HIT protein family*. Exp Cell Res, 1998. **244**(1): p. 26-32.
249. Hurowitz, E.H., Melnyk, J.M., Chen, Y.J., Kouros-Mehr, H., Simon, M.I., and Shizuya, H., *Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes*. DNA Res, 2000. **7**(2): p. 111-20.
250. Snow, B.E., Krumins, A.M., Brothers, G.M., Lee, S.F., Wall, M.A., Chung, S., Mangion, J., Arya, S., Gilman, A.G., and Siderovski, D.P., *A G protein gamma subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding to Gbeta5 subunits*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13307-12.
251. Vinnai, J.R., Cumming, R.C., Thompson, G.J., and Timoshenko, A.V., *The association between oxidative stress-induced galectins and differentiation of human promyelocytic HL-60 cells*. Exp Cell Res, 2017. **355**(2): p. 113-123.
252. Hergovich, A., *MOB control: reviewing a conserved family of kinase regulators*. Cell Signal, 2011. **23**(9): p. 1433-40.
253. Ilari, A., Fiorillo, A., Poser, E., Lalioti, V.S., Sundell, G.N., Ivarsson, Y., Genovese, I., and Colotti, G., *Structural basis of Sorcin-mediated calcium-dependent signal transduction*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 16828.
254. Susalka, S.J., Nikulina, K., Salata, M.W., Vaughan, P.S., King, S.M., Vaughan, K.T., and Pfister, K.K., *The roadblock light chain binds a novel region of the cytoplasmic Dynein intermediate chain*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 32939-46.

255. Wang, Z., Zhang, J., Ye, M., Zhu, M., Zhang, B., Roy, M., Liu, J., and An, X., *Tumor suppressor role of protein 4.1B/DAL-1*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(24): p. 4815-30.
256. Jog, N.R., Jala, V.R., Ward, R.A., Rane, M.J., Haribabu, B., and McLeish, K.R., *Heat shock protein 27 regulates neutrophil chemotaxis and exocytosis through two independent mechanisms*. *J Immunol*, 2007. **178**(4): p. 2421-8.
257. Wu, R., Kausar, H., Johnson, P., Montoya-Durango, D.E., Merchant, M., and Rane, M.J., *Hsp27 regulates Akt activation and polymorphonuclear leukocyte apoptosis by scaffolding MK2 to Akt signal complex*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(30): p. 21598-608.
258. Raman, D., Sai, J., Neel, N.F., Chew, C.S., and Richmond, A., *LIM and SH3 protein-1 modulates CXCR2-mediated cell migration*. *PLoS One*, 2010. **5**(4): p. e10050.
259. Na, B.R., Kim, H.R., Piragyte, I., Oh, H.M., Kwon, M.S., Akber, U., Lee, H.S., Park, D.S., Song, W.K., Park, Z.Y., Im, S.H., Rho, M.C., Hyun, Y.M., Kim, M., and Jun, C.D., *TAGLN2 regulates T cell activation by stabilizing the actin cytoskeleton at the immunological synapse*. *J Cell Biol*, 2015. **209**(1): p. 143-62.
260. Na, B.R. and Jun, C.D., *TAGLN2-mediated actin stabilization at the immunological synapse: implication for cytotoxic T cell control of target cells*. *BMB Rep*, 2015. **48**(7): p. 369-70.
261. Li, M., Li, S., Lou, Z., Liao, X., Zhao, X., Meng, Z., Bartlam, M., and Rao, Z., *Crystal structure of human transgelin*. *J Struct Biol*, 2008. **162**(2): p. 229-36.
262. Assinder, S.J., Stanton, J.A., and Prasad, P.D., *Transgelin: an actin-binding protein and tumour suppressor*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009. **41**(3): p. 482-6.
263. Camoretti-Mercado, B., Forsythe, S.M., LeBeau, M.M., Espinosa, R., 3rd, Vieira, J.E., Halayko, A.J., Willadsen, S., Kurtz, B., Ober, C., Evans, G.A., Thweatt, R., Shapiro, S., Niu, Q., Qin, Y., Padrid, P.A., and Solway, J., *Expression and cytogenetic localization of the human SM22 gene (TAGLN)*. *Genomics*, 1998. **49**(3): p. 452-7.
264. Depaz, I., Ito, M., Matsumoto, I., Niwa, S., Kroon, P., and Wilce, P.A., *Expression of hNP22 is altered in the frontal cortex and hippocampus of the alcoholic human brain*. *Alcohol Clin Exp Res*, 2003. **27**(9): p. 1481-8.
265. Na, B.R., Kwon, M.S., Chae, M.W., Kim, H.R., Kim, C.H., Jun, C.D., and Park, Z.Y., *Transgelin-2 in B-Cells Controls T-Cell Activation by Stabilizing T Cell - B Cell Conjugates*. *PLoS One*, 2016. **11**(5): p. e0156429.
266. Futosi, K., Fodor, S., and Mocsai, A., *Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways*. *Int Immunopharmacol*, 2013. **17**(3): p. 638-50.

267. Lanier, L.L., *DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 150-60.
268. Giacomello, M., De Mario, A., Scarlatti, C., Primerano, S., and Carafoli, E., *Plasma membrane calcium ATPases and related disorders*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(3): p. 753-62.
269. Dib, K., Perecko, T., Jenei, V., McFarlane, C., Comer, D., Brown, V., Katebe, M., Scheithauer, T., Thurmond, R.L., Chazot, P.L., and Ennis, M., *The histamine H4 receptor is a potent inhibitor of adhesion-dependent degranulation in human neutrophils*. J Leukoc Biol, 2014. **96**(3): p. 411-8.
270. Bohnsack, J.F. and Zhou, X.N., *Divalent cation substitution reveals CD18- and very late antigen-dependent pathways that mediate human neutrophil adherence to fibronectin*. J Immunol, 1992. **149**(4): p. 1340-7.
271. Wu, Y., Stabach, P., Michaud, M., and Madri, J.A., *Neutrophils lacking platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 exhibit loss of directionality and motility in CXCR2-mediated chemotaxis*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3484-91.
272. Castle, A. and Castle, D., *Ubiquitously expressed secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) 1-4 mark different pathways and exhibit limited constitutive trafficking to and from the cell surface*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 16): p. 3769-80.
273. Veale, K.J., Offenhauser, C., and Murray, R.Z., *The role of the recycling endosome in regulating lamellipodia formation and macrophage migration*. Commun Integr Biol, 2011. **4**(1): p. 44-7.
274. Shen, D.W., Ma, J., Okabe, M., Zhang, G., Xia, D., and Gottesman, M.M., *Elevated expression of TMEM205, a hypothetical membrane protein, is associated with cisplatin resistance*. J Cell Physiol, 2010. **225**(3): p. 822-8.
275. Dell'Angelica, E.C., *AP-3-dependent trafficking and disease: the first decade*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(4): p. 552-9.
276. Man, Z., Kondo, Y., Koga, H., Umino, H., Nakayama, K., and Shin, H.W., *Arfaptins are localized to the trans-Golgi by interaction with Arl1, but not Arfs*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 11569-78.
277. Gonzalez, R., Mohan, H., and Unniappan, S., *Nucleobindins: bioactive precursor proteins encoding putative endocrine factors?* Gen Comp Endocrinol, 2012. **176**(3): p. 341-6.
278. Sato, S., Fujita, N., and Tsuruo, T., *Regulation of kinase activity of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 by binding to 14-3-3*. J Biol Chem, 2002. **277**(42): p. 39360-7.
279. Acuner Ozbabacan, S.E., Engin, H.B., Gursoy, A., and Keskin, O., *Transient protein-protein interactions*. Protein Eng Des Sel, 2011. **24**(9): p. 635-48.

280. Chichili, V.P.R., Kumar, V., and Sivaraman, J., *A method to trap transient and weak interacting protein complexes for structural studies*. *Intrinsically Disord Proteins*, 2013. **1**(1): p. e25464.
281. Huang, B.X. and Kim, H.Y., *Effective identification of Akt interacting proteins by two-step chemical crosslinking, co-immunoprecipitation and mass spectrometry*. *PLoS One*, 2013. **8**(4): p. e61430.
282. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science*, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
283. Garhart, C.A., Redline, R.W., Nedrud, J.G., and Czinn, S.J., *Clearance of Helicobacter pylori Infection and Resolution of Postimmunization Gastritis in a Kinetic Study of Prophylactically Immunized Mice*. *Infect Immun*, 2002. **70**(7): p. 3529-38.

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Rekrutierungskaskade der neutrophilen Granulozyten	3
Abbildung 2	Aktivierung der β_2 -Integrine (<i>Inside-out Signaling</i>).....	8
Abbildung 3	Signaltransduktion in das Zellinnere (<i>Outside-in Signaling</i>).....	10
Abbildung 4	Struktur von HPK1	12
Abbildung 5	Interaktionspartner und Substrate von HPK1 im adaptiven Immunsystem	13
Abbildung 6	Genotypisierung der HPK1 ^{+/+} - und HPK1 ^{-/-} -Versuchstiere	51
Abbildung 7	Verstärkung der Adhäsion (<i>Adhesion Strengthening</i>) von HPK1 ^{+/+} und HPK1 ^{-/-} murinen neutrophilen Granulozyten unter Fluss	53
Abbildung 8	Herstellung der HL-60 HPK1-Knockdown Zelllinie.....	55
Abbildung 9	β_2 -Integrinexpression und Affinitätsregulation von shRNA- transduzierten dHL-60 Zellen	57
Abbildung 10	Klonierung des HPK1-EGFP-Expressionsvektors	59
Abbildung 11	Herstellung des lentiviralen pFu-HPK1-EGFP-P2A-Puro- Vektors	61
Abbildung 12	Generierung und Charakterisierung der HPK1-EGFP- exprimierenden HL-60 Zellen	63
Abbildung 13	Schematische Darstellung der Co-Immunpräzipitation mit GFP-NanoTraps®	65
Abbildung 14	Kandidaten des HPK1-Interaktoms	68
Abbildung 15	Funktionelle Einteilung des HPK1-Interaktoms	70

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Bedingungen der Genotypisierungs-PCR der Versuchstiere	31
Tabelle 2	PCR-Cycler Programme für die HiFi-PCR	33
Tabelle 3	Programmierung der Spritzenpumpe zur Testung der Verstärkung der Adhäsion.....	46
Tabelle 4	Kandidaten des HPK1-Interaktoms	71

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Barbara Walzog für die Möglichkeit zur Durchführung dieser interessanten Arbeit, für ihre tatkräftige Unterstützung und Betreuung, die kontinuierliche wissenschaftliche und berufliche Förderung meiner Laufbahn sowie die wertvollen professionellen und persönlichen Ratschläge.

Herrn Professor Dr. Ulrich Pohl als ehemaligen Institutsleiter des Walter-Brendel-Zentrums für experimentelle Medizin und dem aktuellen Institutsleiter Herrn Professor Dr. med. Markus Sperandio danke ich für die Möglichkeit der Durchführung einer experimentellen Doktorarbeit.

Herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Barbara Walzog für ihre Unterstützung und gute Zusammenarbeit bedanken, insbesondere bei Frau Dr. Melanie Salvermoser, Herrn Dr. Robert Pick und Herrn Dr. Sascha Jakob. Ausdrücklich danken möchte ich Frau Jennifer Truong, Frau Tanja Vlaovic und Herrn Severin Gylstorff für ihre hervorragende technische Unterstützung.

Herrn Professor Dr. Friedemann Kiefer danke ich für die Bereitstellung der HPK1-defizienten Versuchstiere. Herrn Dr. Ignasi Forné und den Mitarbeitern des Zentrums für Proteinanalytik der LMU (ZfP) möchte ich für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Massenspektrometrie danken.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Professor Dr. Markus Sperandio und Herrn PD Dr. Markus Moser für ihre kompetenten Ratschläge als *Thesis Advisory Committee* im Rahmen der *Integrated Research Training Group* (IRTG) des Sonderforschungsbereichs 914 (SFB 914) „*Trafficking of Immune Cells in Inflammation, Development and Disease*“. Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit im Rahmen des SFB 914. Zudem danke ich für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg „*Leukocyte Trafficking*“ des Sonderforschungsbereichs 914 (IRTG 914) und Herrn Professor Dr. Dr. Jürgen Heesemann für die Möglichkeit zur Teilnahme am Promotionsstudiengang „Molekulare und Systembiologische Medizin“.

Schließlich möchte ich meinen Eltern aus tiefstem Herzen danken, die mich während meines Medizinstudiums und der Doktorarbeit stets unterstützt haben.

11 Anhang

11.1 Curriculum Vitae

Michael Winkelmann
*26.10.1989 in Lindau (Bodensee)

Werdegang

- 09/2000 – 06/2009 **Erwerb der allgemeinen Hochschulreife**
Bodensee Gymnasium, Lindau (Bodensee)
Abschlussnote: sehr gut (1,1)
- 10/2009 – 07/2016 **Studium der Humanmedizin**
Ludwig-Maximilians-Universität München
Gesamtnote: sehr gut (1,5)
- 05/2015 – 04/2016 **Praktisches Jahr**
Radiologie am Nepean Hospital, Sydney (Australien)
und am Groote Schuur Hospital, Kapstadt (Südafrika)
Innere Medizin am Klinikum der Universität München
(LMU), München (Deutschland)
Chirurgie am Shanghai East Hospital, Shanghai (China)
- 07/2016 **Approbation als Arzt**
- 07/2016 – 08/2017 **wissenschaftlicher Mitarbeiter des SFB 914**
Biomedizinisches Centrum, München (Deutschland)
AG Prof. Dr. Barbara Walzog
- seit 09/2017 **Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Radiologie**
Klinikum der Universität München (LMU), München
(Deutschland)
Direktor: Prof. Dr. Jens Ricke

Promotion

- 2013 – 2022 Promotion am Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und
Pathophysiologie, Walter-Brendel-Zentrum, Biomedizini-
sches Centrum, LMU München (AG Prof. Walzog)
- 03/2013 – 09/2014 Teilnahme am Promotionsstudiengang „Molekulare und
Systembiologische Medizin“ im Rahmen des Förderpro-
gramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) der LMU
München
- 04/2013 – 06/2017 Mitglied des Graduiertenkollegs des SFB 914: „*Trafficking
of Immune Cells in Inflammation, Development and Dis-
ease*“ (*Integrated Research Training Group* des SFB 914,
IRTG914)

Publikationen

Karschnia P, Rejeski K, **Winkelmann M**, Schöberl F, Bücklein VL, Blumenberg V, Schmidt, C, Blobner J, von Bergwelt-Baildon M, Tonn JC, Kunz WG, Subklewe M, von Baumgarten L. Toxicities and response rates of secondary CNS lymphoma after adoptive immunotherapy with CD19-directed CAR T-cells. *Neurology*. 2022 Mar 29. doi: 10.1212/WNL.0000000000200608. Epub ahead of print. PMID: 35351785.

Bader A*, **Winkelmann M***, Forné I, Walzog B, Maier-Begandt D. Decoding the signaling profile of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) in innate immunity: A proteomic approach. *Eur J Immunol*. 2022 Jan 31. doi: 10.1002/eji.202149283. Epub ahead of print. PMID: 35099066. *authors contributed equally

Dos Santos DMC, Rejeski K, **Winkelmann M**, Liu L, Trinkner P, Günther S, Bücklein VL, Blumenberg V, Schmidt C, Kunz WG, Von Bergwelt-Baildon M, Theurich S, Subklewe M. Increased visceral fat distribution and body composition impact cytokine release syndrome onset and severity after CD19 CAR-T in advanced B-cell malignancies. *Haematologica*. 2022 Feb 17. doi: 10.3324/haematol.2021.280189. Epub ahead of print. PMID: 35172565.

Winkelmann M, Rejeski K, Subklewe M, Ricke J, Unterrainer M, Rudelius M, Kunz WG. Sarcoid-like reaction in non Hodgkin lymphoma – a diagnostic challenge for Deauville scoring on 18F-FDG PET/CT imaging. *Diagnostics*. 2021 May 31;11(6):1009. doi: 10.3390/diagnostics11061009.

Winkelmann M, Rejeski K, Unterrainer M, Schmidt C, Ruzicka M, Ricke J, Rudelius M, Subklewe M, Kunz WG. Transformation of diffuse large B cell lymphoma into dendritic sarcoma under CAR T cell therapy detected on 18F-FDG PET/CT. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2021 May;48(5):1692-1693. doi: 10.1007/s00259-020-05000-9. Epub 2020 Aug 19. PMID: 32814980; PMCID: PMC8113144.

Unterrainer M, Ruzicka M, Fabritius MP, Mittlmeier LM, **Winkelmann M**, Rübenthaler J, Brendel M, Subklewe M, von Bergwelt-Baildon M, Ricke J, Kunz WG, Cyran CC. PET/CT imaging for tumour response assessment to immunotherapy: current status and future directions. *Eur Radiol Exp*. 2020 Nov 17;4(1):63. doi: 10.1186/s41747-020-00190-1. PMID: 33200246; PMCID: PMC7669926.

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 β 2 integrins (CD11/CD18). *Blood*. 2014 Mar 20;123(12):1887-96. doi: 10.1182/blood-2013-06-510875. Epub 2014 Jan 23. PMID: 24458438.

11.2 Eidesstattliche Versicherung

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

Die Rolle der *Hematopoietic Progenitor Kinase 1 (HPK1)* in neutrophilen Granulozyten

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 08.05.22

Ort, Datum

Michael Winkelmann