

Aus dem Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut der Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. Markus Sperandio

# Molekulare Mechanismen der Leukozytenrekrutierung im Rahmen der Entwicklung

## DISSERTATION

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

Vorgelegt von  
**Annamaria Ballweg**  
aus  
Arad, Rumänien

Jahr  
2022



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

Der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Markus Sperandio

**Mitberichterstatter:** Prof. Dr. Christoph Klein  
Prof. Dr. Uta Behrends

**Dekan:** Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Tag der mündlichen Prüfung:** 02.06.2022

## ZUSAMMENFASSUNG

Die neonatale Sepsis stellt bis heute die häufigste Todesursache bei Neugeborenen dar, wobei die Inzidenz mit sinkendem Gestationsalter steigt. Das hohe Risiko der Infektion scheint mit einem unreifen und funktionell eingeschränkten angeborenen Immunsystem zusammenzuhängen. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind jedoch bisher nicht bekannt. Anhand einer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Transkriptom-Analyse aus fetalen und adulten neutrophilen Granulozyten konnten 124 Gene identifiziert werden, die unterschiedlich reguliert sind. Eine Vielzahl davon ist Teil der NF- $\kappa$ B Signalkaskade. Die hochregulierten Gene der fetalen Neutrophilen betrafen vorrangig den non-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg, welchem unter anderem eine immunmodulatorische Funktion zugesprochen wird. Einige Gene des kanonischen Signalwegs waren im Vergleich zu adulten Neutrophilen herunterreguliert. Um diese Beobachtungen zu verifizieren, erfolgte die *in vivo* Untersuchung der fetalen Neutrophilen in Dottersackgefäßen unter Inflammationsbedingungen mit der Stimulation durch LPS. Hierbei zeigte sich, dass die Aktivierung des kanonischen Signalwegs von NF- $\kappa$ B über TLR4-Aktivierung erst spät in der Gestation zu einer zunehmenden Leukozytenrekrutierung und -aktivierung führt. Wir konnten A20 (*TNFAIP3*) unter den hochregulierten Genen des kanonischen Signalwegs von NF- $\kappa$ B identifizieren. A20 ist ein starker Inhibitor des kanonischen Signalwegs NF- $\kappa$ B und somit anti-inflammatorisch wirksam. Um dies zu verifizieren, haben wir A20 überexprimierende HoxB8-SCF Zellen generiert und diese zu neutrophilen Granulozyten differenziert. Deren Funktionalität wurde dann in einem Flusskammer-Experiment getestet. Es zeigte sich eine reduzierte Adhäsion. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei A20 Knock-out Mäusen ein Zustand der Hyperinflammation mit verstärkter Neutrophilenrekrutierung. Zusammenfassend konnte ich somit zeigen, dass A20 und der non-kanonische NF- $\kappa$ B Signalweg in neutrophilen Granulozyten als wichtige negative Regulatoren der Entzündungsreaktion dienen.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>I</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>II</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>V</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>VI</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINFÜHRUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 NEONATALE SEPSIS .....	1
1.2 REKRUTIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN.....	2
1.2.1 <i>Einfangen und Rollen</i> .....	3
1.2.2 <i>Aktivierung und Adhäsion</i> .....	4
1.2.3 <i>Crawling und Transmigration</i> .....	4
1.3 ONTOGENESE NEUTROPHILER GRANULOZYTEN.....	6
1.3.1 <i>Hämatopoiese</i> .....	6
1.3.2 <i>Funktionalität Neutrophiler Granulozyten in Abhängigkeit zum Gestationsalter</i> .....	8
1.3.2.1 <i>Unterschiede in der Expression von Oberflächenmolekülen</i> .....	8
1.3.2.2 <i>Bakterizide Granula und Degranulation</i> .....	9
1.3.2.3 <i>Phagozytose</i> .....	9
1.3.2.4 <i>Neutrophil Extracellular Traps (NETs)</i> .....	10
1.3.3 <i>Transkriptom-Analyse</i> .....	11
1.4 NF- $\kappa$ B .....	11
1.5 A20 (TNFAIP3) .....	16
<b>2 HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG .....</b>	<b>19</b>
<b>3 MATERIALIEN .....</b>	<b>20</b>
3.1 VERSUCHSTIERE.....	20
3.1.1 <i>Genotypisierung</i> .....	20
3.2 ZELLINIEN .....	21
3.3 PUFFER UND LÖSUNGEN .....	21
3.4 MEDIEN.....	22
3.5 SUBSTANZEN.....	23
3.5.1 <i>Antikörper</i> .....	25

3.6	KITS .....	26
3.7	AUSSTATTUNG .....	26
3.8	VERBRAUCHSMATERIALIEN .....	27
3.9	SOFTWARE .....	28
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>29</b>
4.1	AUFREINIGUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN .....	29
4.1.1	<i>Isolation humaner neutrophiler Granulozyten aus Nabelschnurblut</i> .....	29
4.1.2	<i>Isolation neutrophiler Granulozyten aus adulten Probanden</i> .....	30
4.2	ZELLKULTUR.....	30
4.2.1	<i>Zellkulturbedingungen</i> .....	30
4.2.2	<i>Zellzahlbestimmung</i> .....	31
4.2.3	<i>Produktion von Überständen</i> .....	31
4.2.4	<i>Kultur von Hoxb8-SCF Progenitor-Zellen</i> .....	31
4.3	REKRUTIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN IN VIVO .....	33
4.3.1	<i>Terminierte Verpaarung</i> .....	33
4.3.2	<i>Präparation des Dottersacks</i> .....	33
4.3.3	<i>LPS-induzierte Inflammation des Dottersacks</i> .....	34
4.3.4	<i>Intravitalmikroskopie des Dottersacks</i> .....	34
4.3.5	<i>Auswertung der Intravitalmikroskopie</i> .....	35
4.4	FLUSSKAMMEREXPERIMENTE (REKRUTIERUNG IN VITRO) .....	35
4.4.1	<i>Vorbereitung der Flusskammern</i> .....	35
4.4.2	<i>Vorbereitung der Zellen</i> .....	37
4.4.3	<i>Flusskammer- Mikroskopie</i> .....	37
4.4.4	<i>Auswertung der Flusskammerexperimente</i> .....	38
4.5	DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	38
4.5.1	<i>Differenzierung der Hoxb8-SCF Zellen</i> .....	38
4.5.2	<i>Oberflächenproteine auf differenzierten Hoxb8-SCF Zellen</i> .....	39
4.5.3	<i>Transduktionseffizienz von A20-GFP in Hoxb8-SCF Zellen</i> .....	39
4.5.4	<i>Reinheit der humanen neutrophilen Granulozyten</i> .....	39
4.6	RNA UND DNA .....	40
4.6.1	<i>RNA Isolation</i> .....	40
4.6.2	<i>Messung der RNA-Konzentration</i> .....	40
4.6.3	<i>Reverse Transkription</i> .....	41
4.6.4	<i>Polymerase-Kettenreaktion</i> .....	42
4.6.5	<i>Real-Time PCR</i> .....	42

4.6.6	<i>Retrovirale Transduktion von Hoxb8-SCF Zellen</i> .....	44
4.6.7	<i>Virusproduktion und Transduktion</i> .....	45
4.7	STATISTISCHE ANALYSE .....	47
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>48</b>
5.1	ADHÄSIONSUNTERSCHIEDE IN ABHÄNGIGKEIT VOM GESTATIONSALTER IN VIVO .....	48
5.2	VALIDIERUNG DER TRANSKRIPTOMANALYSE .....	50
5.2.1	<i>Reinheitsüberprüfung der neutrophilen Granulozyten</i> .....	51
5.2.2	<i>Expression der Zielgene in adulten und Neugeborenen neutrophilen Granulozyten</i> .....	52
5.2.3	<i>Zusammenfassende Beurteilung der Zielgene</i> .....	53
5.3	CHARAKTERISIERUNG HOXB8-SCF WILDTYP ZELLEN.....	53
5.3.1	<i>Mikroskopische Differenzierung muriner Hoxb8-SCF Zellen</i> .....	54
5.3.2	<i>Durchflusszytometrische Charakterisierung von Hoxb8-SCF Zellen</i> .....	55
5.3.3	<i>Oberflächen-Antigen Expression der Hoxb8-SCF Neutrophilen</i> .....	58
5.3.4	<i>Roll- und Adhäsionsverhalten von WT Hoxb8 Neutrophilen</i> .....	59
5.4	NACHWEIS DER TRANSDUKTION VON HOXB8-SCF A20 ÜBEREXPRIMIERTEN ZELLEN.....	61
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK</b> .....	<b>68</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b> .....	<b>78</b>
<b>10</b>	<b>APPENDIX</b> .....	<b>80</b>
10.1	EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG .....	80

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

### Abbildungsverzeichnis:

ABB. 1: KASKADE DER LEUKOZYTENREKRUTIERUNG.....	3
ABB. 2: SEQUENZIELLE ABFOLGE DER TRANSMIGRATION.....	6
ABB. 3: DIFFERENZIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN. ....	7
ABB. 4: NF- $\kappa$ B AKTIVATOREN UND ZIELGENE .....	12
ABB. 5: VEREINFACHTE DARSTELLUNG DES LPS-INDUZIERTEN KANONISCHEN NF- $\kappa$ B SIGNALWEGS .....	14
ABB. 6: PROTEIN-STRUKTUR VON A20 UND SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER SIGNAL-KASKADE NACH TNF-A STIMULATION IN EINER IMMUNZELLE .....	17
ABB. 7: SCHICHTUNG DES GRADIENTEN VOR UND NACH ZENTRIFUGATION SCHEMATISCH.....	29
ABB. 8: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG EINER FLUSSKAMMER. ....	37
ABB. 9: SCHEMATISCHE VEKTORKARTE VON PMSCV PIG (PURO IRES EGFP EMPTY VECTOR) .....	45
ABB. 10: ANSICHT EINER 12-WELL PLATTE MIT DEN ANGESETZTEN VERDÜNNUNGEN. ....	47
ABB. 11: PRÄPARATION DES DOTTERSACKS UND POSITIONIERUNG. ....	48
ABB. 12: ADHÄSION IN ABHÄNGIGKEIT VON GESTATIONSALTER UND EXPERIMENTALBEDINGUNG.....	50
ABB. 13: GATING-STRATEGIE ZUR REINHEITSÜBERPRÜFUNG DER AUFGEREINIGTEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN. ....	51
ABB. 14: DIFF-QUICK FÄRBUNGEN DARGESTELLT MIT EINEM ÖL-IMMERSIONS-OBJEKTIV IN 100X VERGRÖßERUNG .....	54
ABB. 15: VITALITÄT DER UNDIFFERENZIIERTEN ZELLEN .....	55
ABB. 16: GR-1 EXPRESSION IM LAUFE DER DIFFERENZIERUNG.....	56
ABB. 17: EXPRESSION VON LY6G WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG.....	56
ABB. 18: EXPRESSION VON C-KIT (CD117) WÄHREND DER DIFFERENZIERUNG .....	57
ABB. 19: OBERFLÄCHEN-ANTIGEN EXPRESSION ADHÄSIONS-RELEVANTER MOLEKÜLE AUF HOXB8-SCF NEUTROPHILEN UND WT NEUTROPHILEN AUS DEM PERIPHEREN BLUT UND KNOCHENMARK .....	59
ABB. 20: FLUSSKAMMERERGEBNISSE (ADHÄSION UND ROLLEN) DER HOXB8 WT ZELLEN .....	60
ABB. 21: NACHWEIS DER TRANSDUKTION ANHAND DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE .....	61

## TABELLENVERZEICHNIS

### Tabellenverzeichnis:

TAB. 1: PCR PROTOKOLL FÜR <i>LYZ2<sup>GFP</sup></i> .....	21
TAB. 2: PRIMER FÜR GENOTYPISIERUNG .....	21
TAB. 3: REKOMBINANTE PROTEINE.....	23
TAB. 4: WEITERE SUBSTANZEN .....	24
TAB. 5: PRIMÄRE ANTIKÖRPER .....	25
TAB. 6: BESTANDTEILE UND VOLUMINA PRO REAKTION DER REVERSE TRANSKRIPTASE .....	41
TAB. 7: SCHRITTE DER REVERSE TRANSKRIPTION.....	41
TAB. 8: BESTANDTEILE UND VOLUMINA PRO REAKTION DER REAL-TIME PCR .....	43
TAB. 9: SCHRITTE DER REAL-TIME PCR UND DAUER.....	43
TAB. 10: ÜBERSICHT INTRAVITRALMIKROSKOPISCHER EXPERIMENTE IM DOTTERSACK.....	49

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

### **7**

7-AAD · 7-Amino-Actinomycin D

---

### **A**

A20 · *TNFAIP3*

ABIIN1 · A20-binding protein 1

AGM · Aorto-Gonado-Mesonephron

ANOVA · Analysis of variance

---

### **B**

BPI · Bakterien permeabilisierendes Protein

BSA · Bovine serum albumin

---

### **C**

CaCl<sub>2</sub> · Calciumchlorid

CAM-2 · Intercellular-adhesion-molecule-2

CD99L2 · CD99 antigen-like protein 2

cDNA · Komplementäre Ribonukleinsäure

cIAP · Cellular inhibitor of apoptosis protein

Ct · Threshold cycle

---

### **D**

DAMPs · Damage-associated molecular patterns

DMSO · Dimethylsulfoxid

DNA · Desoxyribonukleinsäure

---

### **E**

*E. Coli* · *Escherichia coli*

E8.5 · Embryonaltag 8.5

EDTA · Ethylendiamintetraacetat

EGFP · Enhanced green fluorescent protein

ESAM-1 · Endothelial-cell-selective adhesion-molecule 1

ESL-1 · E-Selektin Ligand

---

### **F**

FACS · Fluorescence-activated cell sorting

FCS · Fetal calf serum

FOV · Field of view

---

### **G**

GAPDH · Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GM-CSF · Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

---

### **H**

HBSS · Hanks' balanced salt solution

Hepes · 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HKG · House keeping gene

---

### **I**

ICAM-1 · Intercellular-adhesion-molecule-1

IL-1 $\beta$  · Interleukin-1 $\beta$

IRAK1 · Interleukin-1 receptor-associated kinase 1

IRAK4 · Interleukin-1 receptor-associated kinase 4

IRF3 · Interferon regulation-factor 3

IkB · Nuclear factor of kappa light polypeptide gene  
enhancer in B-cells inhibitor

---

## **K**

KC · CXCL-1

KCl · Kaliumchlorid

---

## **L**

LAD · Leukozytenadhäsionsdefizienz

LBRC · Lateral border recycling compartment

LFA-1 · Leukocyte function associated antigen

LPS · Lipopolysaccharid

LUBAC · Ubiquitin-chain-assembly-complex

---

## **M**

MAC-1 · Macrophage-antigen-1

MD-2 · Myeloid differentiation factor 2

MgCl<sub>2</sub> · Magnesiumchlorid

MyD88 · Myeloid differentiation primary response gene 88

---

## **N**

NaCl · Natriumchlorid

NaHCO<sub>2</sub> · Natriumformiat

NaHCO<sub>3</sub> · Natriumhydrogencarbonat

NEMO · NF-κB essential modulator

NETs · Neutrophil extracellular traps

NF-κB · Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of  
activated B-cells

NH<sub>4</sub>Cl · Ammoniumchlorid

NLRP3 · NLR family pyrin domain containing 3

---

## **O**

OTU · Ovarian-tumor-domain

---

## **P**

PAMPs · Pathogen-associate molecular patterns

PCR · Polymerase-Kettenreaktion

PECAM-1 · Platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule

pMSCV · Murine stem cell virus

PSGL-1 · P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1

PVR · Poliovirus receptor

---

## **Q**

qRT-PCR · Quantitative real-time PCR

---

## **R**

Rap-1 · Ras-related protein 1

RelA · p65

RHD · Rel Domäne

RIP1 · Receptor-interacting serine/threonine-protein  
kinase 1

RNA · Ribonukleinsäure

ROS · Reactive oxygen species

---

## **S**

SCF · Stem cell factor

SEM · Standard error of mean

SSW · Schwangerschaftswochen

---

## **T**

TAK1 · Transforming growth factor-beta-activated kinase-1

TAX1BP1 · TAX1 binding protein

TBK1 · TANK-binding kinase

TIR · Toll-interleukin 1 receptor  
TIRAP · Toll/ interleukin 1 domain containing adaptor  
protein  
TLR 4 · Toll-Like-receptor 4  
TNF · Tumor-necrosis-factor  
TNFAIP3 · Tumor necrosis- $\alpha$  induced protein 3  
TNFR-1 · Tumor-necrosis-factor 1  
TNF- $\alpha$  · Tumor-necrosis-factor- $\alpha$   
TRAF6 · TNF- $\alpha$  receptor associated factor 6  
TRAM · TRIF-related adapter molecule

---

**U**

Ubc13 · Ubiquitin-conjugating enzyme 13

---

**V**

VCAM-1 · Vascular-cell-adhesion molecule-1  
VE-Cadherin · Vascular endothelial cadherin

---

**W**

WT · Wildtyp

---

**Z**

ZnF4 · C-terminale Zinkfinger-Domäne 4



# 1 EINFÜHRUNG

Neutrophile Granulozyten sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems und stellen die größte Population der im Blut zirkulierenden Leukozyten des Menschen dar. Sobald eine Inflammation im Körper registriert wird, werden diese Zellen als Erstantwort an den Ort des Geschehens gelockt, um das Pathogen mittels ihrer vorhandenen Mechanismen zu beseitigen (Németh, Sperandio, & Mócsai, 2020).

Wie wichtig neutrophile Granulozyten im Rahmen der Immunantwort wirklich sind, zeigt sich insbesondere, wenn entweder zu wenig neutrophile Granulozyten (Neutropenie) vorhanden sind oder eine Störung in der Funktion neutrophiler Granulozyten vorliegt. Neutropenien können durch eine Störung der Zellausreifung (Zeidler, Germeshausen, Klein, & Welte, 2009), eine gestörte Freisetzung aus dem Knochenmark (Dotta, Tassone, & Badolato, 2011) oder durch Auto- oder Alloantikörperbildung bedingt sein (van den Berg & Kuijpers, 2011).

Ist die Funktion von Neutrophilen gestört, kann es sich unter anderem auch um genetische Defekte handeln, wie zum Beispiel die Leukozytenadhäsionsdefizienz (LAD). Hierbei werden drei verschiedene Formen unterschieden (Typ I-III). Die Gemeinsamkeit dieser drei Typen besteht darin, dass die zugrunde liegenden Mutationen, die Adhäsions- und Aktivierungsprozesse in Leukozyten betreffen und somit zu einer gestörten Leukozytenrekrutierung führen (Schmidt, Moser, & Sperandio, 2013). Erkrankte erleiden häufige, schwerwiegende Infektionen, die, je nach Defekt, bereits im Kindes- und Jugendalter zum Tod führen können (van de Vijver et al., 2012).

## 1.1 NEONATALE SEPSIS

---

Weltweit sterben jährlich ca. 1,4 Millionen Neugeborene an Infektionen. Die Sepsis bleibt trotz medizinischer Fortschritte und intensiver Forschung die häufigste Todesursache bei Neugeborenen, insbesondere bei Frühgeborenen mit geringem Geburtsgewicht (Stoll et al., 2015). Reife Neugeborene und Frühgeborene leiden häufiger unter Infektionen als Kinder und Erwachsene, da potentielle Erreger bei Neonaten auf ein unreifes humorales

sowie auch zelluläres Immunsystem treffen (Levy, 2007). Neuesten Untersuchungen zufolge zeigt sich auch beim angeborenen Immunsystem eine Art „immunologisches Gedächtnis“ bzw. scheint eine Art Reifung zu existieren, so dass Zellen des angeborenen Immunsystems auf eine erneute Exposition mit einem Pathogen effizienter reagieren als bei Erstexposition (Saeed et al., 2014). Aufgrund dessen ist es nicht verwunderlich, dass Neugeborene eine höhere Inzidenz einer Sepsis haben und diese Inzidenz mit sinkendem Gestationsalter steigt (Fanaroff et al., 2007).

Erschwerend zu ihrer physiologischen und immunologischen Unreife kommt hinzu, dass die Frühgeburtlichkeit bereits durch eine Infektion der Mutter induziert sein kann und Frühgeborene häufig nach Geburt einer intensivmedizinischen Betreuung bedürfen. Durch die Verwendung von Fremdmaterial, im Sinne von Kathetern und Beatmungshilfen, besteht ein zusätzliches Infektionsrisiko, das nicht zu vernachlässigen ist.

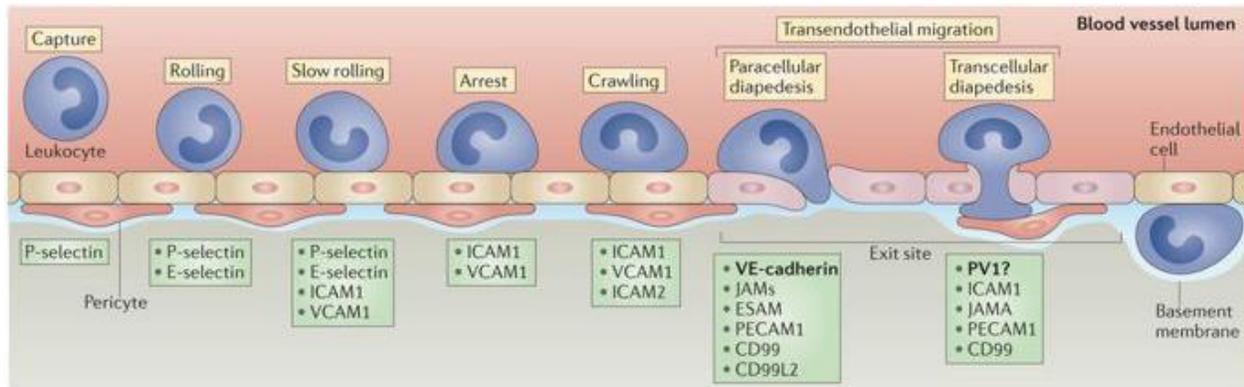
Die genauen Mechanismen und Unterschiede zwischen den Zellen des angeborenen Immunsystems von Neugeborenen im Vergleich zu Kindern und Erwachsenen im Hinblick auf ihre Fähigkeit Infektionen zu bekämpfen, sind bisher noch unzureichend beschrieben und erklärt.

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten, ihre Ontogenese und welche bisherigen Hinweise auf mögliche Unterschiede in ihre Funktion vorhanden sind, soll in den nächsten Abschnitten genauer betrachtet werden.

## 1.2 REKRUTIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

---

Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus postkapillären Venolen zum Ort der Inflammation ist in den vergangenen Jahrzehnten intensiv erforscht worden und der Ablauf der nacheinander folgenden Schritte ist genau definiert (Németh et al., 2020). Neuesten Untersuchungen zufolge gibt es jedoch gewebsspezifische Unterschiede in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten (Margraf, Ley, & Zarbock, 2019). Um einen Überblick zu gewinnen, wird nun im Folgenden der „klassische Weg“, wie in Abb. 1 dargestellt, mit den einzelnen Ereignissen wie Einfangen, Rollen, Adhäsion, Crawling und der Transmigration beschrieben (Ley, Laudanna, Cybulsky, & Nourshargh, 2007; Nourshargh & Alon, 2014).



**Abb. 1: Kaskade der Leukozytenrekrutierung. Übernommen von Vestweber (2015).**

Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierung in einer postkapillären Venole. Durch Interaktion von Selektinen und Selektin-Liganden wird die Zelle eingefangen und rollt am Endothel entlang. Die Adhäsion und das Crawlen wird dann durch  $\beta$ 2-Integrine vermittelt. Anschließend erfolgt die Transmigration zur abluminalen Seite der Venole. Hierbei interagieren die Zellen mit weiteren Oberflächenmolekülen und Pericyten, bis sie zuletzt durch die Basalmembran gelangen.

### 1.2.1 EINFANGEN UND ROLLEN

Sobald eine Inflammation im Körper registriert wird, werden die Zellen des angeborenen Immunsystems, die sich am Ort des Geschehens befinden, wie Makrophagen, Mastzellen und dendritische Zellen durch die Aussendung von so genannten pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) oder damage-associated molecular patterns (DAMPs) aktiviert. Diese wiederum setzen pro-inflammatorische Zytokine frei, die das Endothel postkapillärer Venolen zur Expression bestimmter Oberflächenmolekülen stimulieren und somit Leukozyten aus dem Blut zum Ort der Inflammation leiten können (Vestweber, 2015). Das Endothel exprimiert zum „Einfangen“ der neutrophilen Granulozyten P- und E-Selektin auf der luminalen Seite. Diese Selektine können an P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), E-Selektin Ligand 1 (ESL-1), CD44 und L-Selektin auf den Neutrophilen binden und somit den Prozess des Rollens induzieren. Langsames Rollen entsteht durch die Aktivierung des  $\beta$ 2-Integrins Leukocyte function associated antigen 1 (LFA-1) (McEver, 2015). Ein kürzlich von unserer Forschungsgruppe entdeckter, alternativer Mechanismus zur Aktivierung von LFA-1 zeigt, dass es über die Bindung von E-Selektin an PSGL-1 zur Freisetzung von Calprotectin (MRP8/14) kommt. Freigesetztes MRP8/14 bindet an den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR-4) und führt somit zu einer myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88) und Ras-related protein 1 (Rap-1) abhängigen Aktivierung von LFA-1 (Pruenster et al., 2015).

Durch die Interaktion der Zellen mit dem Endothel und dem konstanten Blutfluss bilden sich zudem sogenannte „Tethers“. Dies sind Membranausstülpungen am hinteren Ende der neutrophilen Granulozyten, die sich nach Abriss vom Endothel durch den kontinuierlichen Blutfluss um die Zelle wickeln und somit das Rollen und die Aktivierung der Zellen begünstigen und zugleich auch die Zellen verlangsamen (Sundd et al., 2012).

### 1.2.2 AKTIVIERUNG UND ADHÄSION

---

Zur weiteren Aktivierung der neutrophilen Granulozyten kommt es durch die Ausschüttung von Chemokinen (wie zum Beispiel Interleukin-8). CXCRL spezifische Chemokine binden an CXC auf neutrophilen Granulozyten und verursachen eine Aktivierung der  $\beta$ 2-Integrine mit Konformationsänderung der  $\beta$ 2-Integrine, LFA-1 und macrophage-antigen-1 (Mac-1). Durch diese Konformationsänderung erhöht sich deren Affinität, so dass sie an die vom Endothel exprimierten Oberflächenmoleküle wie intercellular-adhesion-molecule-1 (ICAM-1) und intercellular-adhesion-molecule-2 (ICAM-2) binden. Sobald diese Bindung erfolgt, kommt es zur Adhäsion der neutrophilen Granulozyten am Endothel. Gerade die Interaktion zwischen LFA-1 und ICAM-1 führt zur festen Adhäsion (Phillipson et al., 2006).

### 1.2.3 CRAWLING UND TRANSMIGRATION

---

Um aus dem Gefäß in das geschädigte oder entzündete Gewebe zu gelangen, müssen neutrophile Granulozyten durch das Endothel transmigrieren. Hierfür benötigen sie eine geeignete Stelle im Endothel und diese finden sie, indem sie am Endothel entlangwandern. Diesen Prozess nennt man Crawling, er wird besonders durch die Interaktion von ICAM-1 und Mac-1 mediiert (Phillipson et al., 2006).

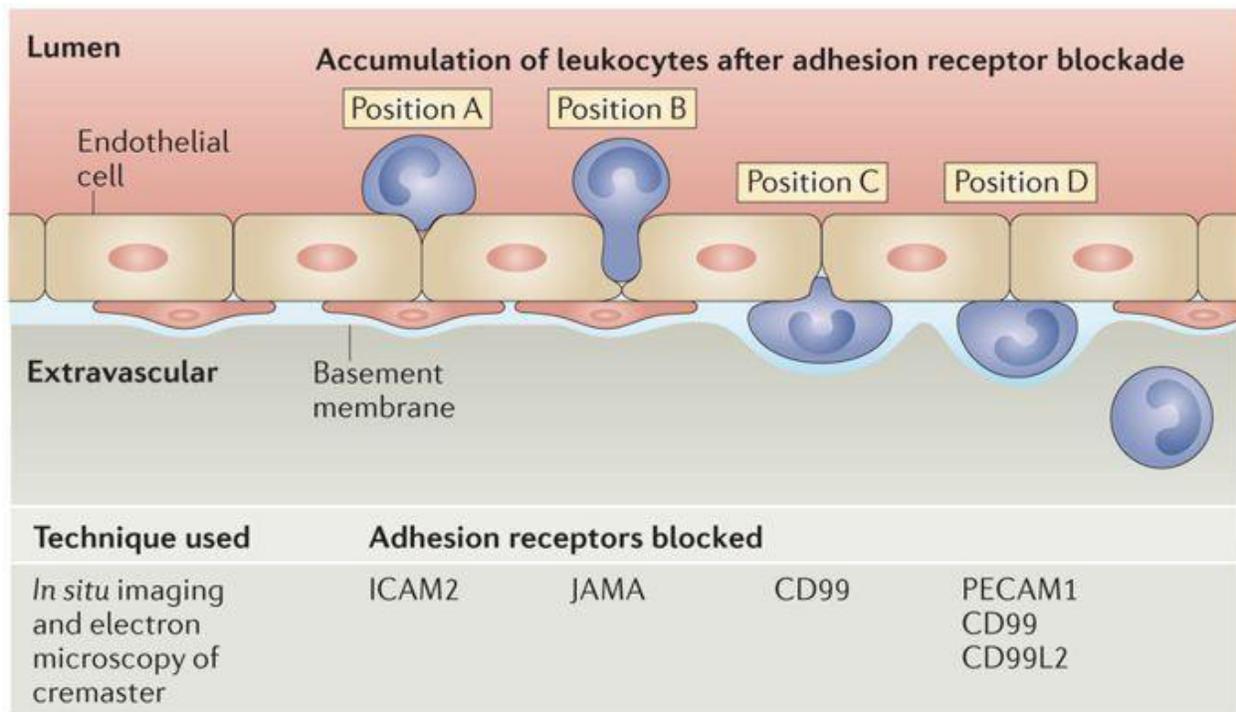
Der genaue Mechanismus der Transmigration ist bisher noch nicht vollständig eruiert und die Gesamtheit der daran beteiligten Moleküle ist Gegenstand aktueller Forschung. Klar ist jedoch, dass neutrophile Granulozyten häufig Zell-Zell-Kontakte (cell-junctions) als Ort der transendothelialen Migration wählen und somit eher parazellulär als transzellulär ins Gewebe migrieren (Vestweber, 2015).

Damit neutrophile Granulozyten parazellulär transmigrieren können, muss zunächst der Zell-Zell-Kontakt, der die Zellen üblicherweise fest miteinander verbindet, gelockert werden. Mehreren unterschiedlichen Untersuchungen zufolge scheint vascular

endothelial cadherin (VE-Cadherin), ein Oberflächenmolekül des Endothels, hierbei eine Rolle zu spielen. Dieses wird je nach Stimulus und Zweck der Öffnung des Zell-Zell-Kontakts in unterschiedlicher Weise modifiziert und ermöglicht somit die Transmigration (Vestweber, 2015). Des Weiteren sind einige Adhäsionsmoleküle, die sich auf den Endothelzellen oder den neutrophilen Granulozyten befinden, notwendig für eine erfolgreiche Transmigration. Hierunter fallen ICAM-1, ICAM-2, vascular-cell-adhesion molecule-1 (VCAM-1) und junktionale Adhäsions-Proteine zum Beispiel: JAM-A, JAM-B, JAM-C, endothelial-cell-selective adhesion-molecule 1 (ESAM-1), platelet-endothelial-cell-adhesion-molecule (PECAM-1; auch bekannt als CD31), CD99, CD99 antigen-like protein 2 (CD99L2) und poliovirus receptor (PVR) (Muller, 2015). Damit eine bestmögliche Interaktion zwischen neutrophilem Granulozyt und Endothelzelle stattfinden kann, richtet sich das lateral border recycling compartment (LBRC), ein Retikulum mit tubulo-vesikulär ähnlicher Membran im lateralen Teil der Endothelzelle, stets in Richtung des Neutrophilen Granulozyten aus. Das LBRC enthält unter anderem PECAM-1, CD99 und JAM-A.

Die Funktion der einzelnen Adhäsionsmoleküle im Rahmen der Transmigration wurde anhand der Verwendung blockierender Antikörper und Knock-Out Mäuse (vollständige Depletion des Gens) erforscht.

Nach Stimulation mit Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) im Cremaster-Muskel-Modell zeigte sich bei Mäusen mit einer Depletion für ICAM-2, dass neutrophile Granulozyten auf der luminalen Seite des Endothels über den Zell-Zell-Kontakten verbleiben (Woodfin et al., 2009). Bei JAM-A<sup>-/-</sup> Knock-Out Mäusen finden sich neutrophile Granulozyten an den Zell-Zell-Kontakten, können jedoch nicht hindurch. Ist PECAM-1 nicht vorhanden, bleiben die Neutrophilen zwischen Endothelzelle und Basalmembran hängen (Woodfin et al., 2007). Erfolgt die Inflammationsinduktion durch Tumor-necrosis-factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) transmigrieren die neutrophilen Granulozyten problemlos, so dass hierfür die oben genannten Rezeptoren redundant zu sein scheinen. Bei der Blockade von CD99 und CD99L2 bleiben neutrophile Granulozyten zwischen Endothel und Basalmembran stecken, unabhängig davon, ob die Stimulation mittels IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$  erfolgt (Bixel et al., 2010). In Abb. 2 werden die einzelnen bisher bekannten Positionen während der Transmigration dargestellt.



**Abb. 2: Sequenzielle Abfolge der Transmigration. Adaptiert nach Vestweber (2015).**

Die Deletion oder Blockade der untenstehenden Moleküle führen zur Anhäufung neutrophiler Granulozyten in der angegebenen Position. Diese Ergebnisse wurden mittels *in vivo* Untersuchungen generiert.

## 1.3 ONTOGENESE NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

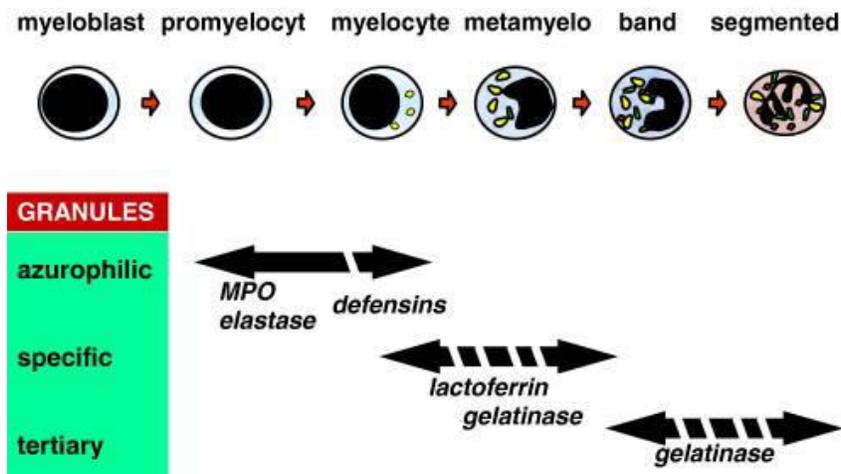
### 1.3.1 HÄMATOPOIESE

Die Bildung von Blutzellen im Menschen, die sogenannte Hämatopoiese, beginnt bereits in der dritten Gestationswoche im Dottersack (primitive Hämatopoiese). Hier entstehen erste myeloide Zellen unter anderem Megakaryozyten und Makrophagen. Ab der fünften Woche, der so genannten pro-definitiven Phase der Hämatopoiese, werden im Dottersack erste Vorstufen neutrophiler Granulozyten gebildet. In der siebten bis achten Gestationswoche verlagert sich die Hämatopoiese zunehmend in die Leber. Ab diesem Zeitpunkt spricht man von der definitiven Hämatopoiese. Erst ab der 32. Gestationswoche erfolgt die Bildung neutrophiler Granulozyten im Knochenmark (Lawrence, Corriden, & Nizet, 2018).

Bei Mäusen verkürzt sich diese Zeitspanne entsprechend der Schwangerschaftsdauer von ca. 21 Tagen. Erste in Blutgefäßen zirkulierende myeloide Zellen werden bei Mäusen

mit Einsetzen der Herzaktivität an Embryonaltag 8.5 (E8.5) beschrieben (McGrath, Koniski, Malik, & Palis, 2003). Diese entstammen dem Dottersack. Die definitive Hämatopoese zeigt sich bei Mäusen in der Aorto-Gonado-Mesonephron (AGM) Region und der Leber ab E12 und im Knochenmark ab E16-17 (Christensen, Wright, Wagers, & Weissman, 2004).

Die einzelnen Stufen der Differenzierung sind in Abb. 3 abgebildet. Mit der Ausreifung neutrophiler Granulozyten geht vor allen Dingen die Kondensation und Lobulierung des Zellkerns einher und die Bildung und Speicherung spezifischer Granula, die u.a. der Abwehr gegen Mikroorganismen dienen. Der Myeloblast ist eine noch unreife Vorstufe mit einem großen Zellkern und noch fehlenden Granula. In den darauffolgenden Vorstufen (Promyelozyt, Myelozyt und Metamyelozyt) sind bereits primäre und sekundäre Granula vorhanden. Erst danach werden tertiäre Granula und sekretorische Vesikel gebildet.



**Abb. 3: Differenzierung neutrophiler Granulozyten. Übernommen von van den Berg & Kuijpers (2011).**

Von links nach rechts zeigt sich die zunehmende Kondensation des Kerns und die beginnende Lobulierung. Erst ab dem Promyelozyten-Stadium treten erste Granula auf.

Neutrophile Granulozyten zirkulieren, sobald sie aus dem Knochenmark freigesetzt werden, für ca. zehn bis zwölf Stunden im peripheren Blut. Anschließend transmigrieren sie in das Gewebe und überleben dort für zwei weitere Tage, um dann durch programmierten Zelltod zu sterben, sofern sie nicht vorher zur Beseitigung von

Mikroorganismen gebraucht werden. Täglich werden ungefähr  $5-10 \times 10^{10}$  neue Granulozyten gebildet (van den Berg & Kuijpers, 2011).

Man unterscheidet bei neutrophilen Granulozyten zwischen:

- Den Zellen, die im Blut zirkulieren (zirkulierender Pool)
- Den Zellen, die am Endothel adhäreren (marginaler Pool)
- Den Vorstufen und proliferierenden Zellen im Knochenmark (proliferativer Pool)

Bei gesunden Erwachsenen sind im proliferierenden Pool zehn Mal mehr Neutrophile vorzufinden als im zirkulierenden Pool, so dass im Falle einer Infektion eine große Zahl neutrophiler Granulozyten freigesetzt werden kann.

Nun stellt sich die Frage, ob die geschilderte Differenzierung von neutrophilen Granulozyten mit Erwerb ihrer Funktionalität in dieser Weise auch beim Neugeborenen abläuft. Der bisherige Kenntnisstand soll im folgenden Abschnitt erläutert werden.

### 1.3.2 FUNKTIONALITÄT NEUTROPHILER GRANULOZYTEN IN ABHÄNGIGKEIT ZUM GESTATIONSALTER

---

Während der fetalen Ontogenese nimmt auch die Anzahl der vorhandenen neutrophilen Granulozyten im Blut zu. Ab der 32. Gestationswoche haben Feten weniger als 20% der Neutrophilen-Zahl im Vergleich zu Erwachsenen im peripheren Blut. Bei noch unreiferen Frühgeborenen sind es sogar nur ungefähr 8%. Selbst reife Neugeborene erreichen nur ca. 25% (Carr & Huizinga, 2000). Die bloße Anzahl unreifer Vorstufen im peripheren Blut nimmt mit zunehmendem Gestationsalter ab und erreicht ungefähr zwei Wochen nach Geburt den Status von Erwachsenen (S. M. Lawrence et al., 2018). Abgesehen von einer geringeren Anzahl von neutrophilen Granulozyten bei Neonaten gibt es auch funktionelle Unterschiede (Koenig, Bliss, & Sperandio, 2021).

#### 1.3.2.1 UNTERSCHIEDE IN DER EXPRESSION VON OBERFLÄCHENMOLEKÜLEN

---

In unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten von Früh- und Reifgeborenen weniger L-Selektin und PSGL-1 exprimieren (Strunk et al., 2004). PSGL-1 ist einer der Hauptliganden für Selektine, insbesondere P-Selektin, die vom Endothel exprimiert werden und somit das Rollen neutrophiler Granulozyten

ermöglichen (Tchamtchi, Smith, & Mariscalco, 2000). Des Weiteren exprimiert das Endothel Neugeborener weniger P- und E-Selektin im Vergleich zu Erwachsenen, was das Rollen von Leukozyten erschwert (Nussbaum et al., 2013). Hinzu kommt, dass die Unterscheidung zwischen Aktivierung und Expression von Mac-1 und LFA-1 in neutrophilen Granulozyten Früh- und Reifgeborener unzureichend ist und das langsame Rollen bzw. das Anhalten der Zellen somit ebenfalls gestört ist (Nussbaum et al., 2013).

#### 1.3.2.2 BAKTERIZIDE GRANULA UND DEGRANULATION

---

Die Fähigkeit zur Degranulation und somit zur Ausschüttung der darin befindlichen bakteriziden Proteine (Bakterien permeabilisierendes Protein (BPI), Elastase und Lactoferrin) ist bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen im Vergleich zu adulten Neutrophilen Granulozyten reduziert. Die Ausschüttung dieser Proteine ist bei Frühgeborenen am geringsten (Nupponen et al., 2002).

BPI spielt eine wichtige Rolle für die Bekämpfung gramnegativer Bakterien wie zum Beispiel *Escherichia coli*. Die Tatsache, dass der Gehalt an BPI in den Granula bei Frühgeborenen und reifen Neugeborenen im Vergleich zu adulten reduziert ist, könnte einen Hinweis darauf geben, wieso eine Infektion mit *E.coli* häufig zur neonatalen Sepsis führt.

Lactoferrin, das sowohl bakterizid als auch gegen Viren wirkt, ist ebenfalls in Früh- und Reifgeborenen reduziert, reife Neugeborene erreichen ca. die Hälfte der Konzentration von Erwachsenen, was ebenfalls darauf hindeutet, dass Neonaten ein höheres Infektionsrisiko haben, da sie die Mikroorganismen nur unzureichend bekämpfen können (Lawrence, Corriden, & Nizet, 2017).

#### 1.3.2.3 PHAGOZYTOSE

---

Neutrophile Granulozyten von reifen Neugeborenen phagozytieren Pathogene mit einer ähnlichen Effektivität wie adulte sowohl im gramnegativen als auch im grampositiven Bereich, wohingegen Neutrophile von Frühgeborenen <32 Gestationswochen Bakterien langsamer phagozytieren (Lawrence et al., 2017). Ursächlich hierfür erscheint das Fehlen opsonisierender Faktoren, im Sinne maternaler Immunglobuline, die erst im letzten Trimester der Schwangerschaft plazentar übertragen werden. Eine Bestätigung dieser

Theorie zeigte sich nach der Gabe von Immunglobulinen im Rahmen der neonatalen Sepsis, anschließend normalisierte sich die Phagozytose-Leistung der Frühgeborenen, jedoch hatte dieser Therapieversuch keinen signifikanten Effekt auf die Mortalität (Fujiwara et al., 1997).

#### 1.3.2.4 NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETs)

---

NETs werden von Neutrophilen gebildet, indem sie Chromatin, welches mit antibakteriellen Stoffen wie Defensin, Lactoferrin, Myeloperoxidase, Elastase und citrullinierten Histonen besetzt ist, freisetzen und somit Bakterien einfangen und töten. Die Zellstruktur wird hierbei zerstört, die neutrophilen Granulozyten gehen dann in den programmierten Zelltod (Brinkmann & Zychlinsky, 2012). NETs können durch verschiedene Signalwege gebildet werden. Eine Signalkaskade wird durch Lipopolysaccharid (LPS) oder TNF- $\alpha$  ausgelöst und benötigt die Produktion von Reactive Oxygen Species (ROS) und die Aktivierung der NADPH-Oxidase (Remijsen et al., 2011). Obwohl neutrophile Granulozyten Neugeborener in der Lage sind ROS und NADPH-Oxidase zu produzieren, werden bei Stimulation über diesen Signalweg signifikant weniger NETs gebildet als im Vergleich zu adulten (Lipp et al., 2017). Die Bildung von NETs scheint bei Neonaten nicht primär über diesen Signalweg zu funktionieren. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass neutrophile Granulozyten Neugeborener NETs bilden können durch einen ROS unabhängigen Signalweg, wenn sie *Candida albicans* und Fibronectin ausgesetzt sind (Byrd et al., 2016). Eine fehlende NET-Bildung scheint somit nicht zwangsläufig der Grund für ein erhöhtes Infektionsrisiko bei Früh- und Reifgeborenen zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neutrophile Granulozyten auch während der Gestation einem Reifungsprozess unterliegen und nicht sofort mit dem Zeitpunkt der Geburt vollständig funktionsfähig sind. Welche genauen Mechanismen zu einer reduzierten Phagozytose-Leistung, einer geringeren Expression diverser Oberflächenmoleküle und einer verminderten Degranulation führen, ist bisher noch ungeklärt.

### 1.3.3 TRANSKRIPTOM-ANALYSE

---

Um einen genaueren Anhaltspunkt dafür zu finden, wodurch die neutrophilen Granulozyten von Erwachsenen und Neugeborenen sich unterscheiden, wurde in unserem Labor eine Genexpressions-Analyse (Transkriptom-Analyse) durchgeführt. Hierbei wurde die Transkriptom-Analyse neutrophiler Granulozyten von Frühgeborenen <37 Schwangerschaftswochen (SSW), reifen Neugeborenen >37 SSW und Erwachsenen miteinander verglichen.

Eine Transkriptom-Analyse ermöglicht qualitative und quantitative Aussagen über die Aktivität von Genen. Die von unserem Labor durchgeführte Transkriptom-Analyse wurde anhand der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Micro-Array-Technik mit zuvor definierten Zielgenen durchgeführt. Hierfür wurde komplementäre Ribonukleinsäure (RNA) aus neutrophilen Granulozyten isoliert und in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese cDNA wurde mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert, die Testgruppen (reife Neugeborene und Frühgeborene) erhalten jeweils einen unterschiedlichen Farbstoff im Vergleich zur Referenzgruppe. Auf einem vorgefertigten Objektträger befindet sich die fixierte cDNA der Zielgene in einzelnen Reihen angeordnet. Die markierten Proben werden mit der cDNA des Arrays hybridisiert und man erhält ein Fluoreszenzsignal mit einer bestimmten Intensität. Diese Intensitäten können anhand mathematischer Modelle einen Hinweis auf die Aktivität der Gene in den jeweiligen Testgruppen im Vergleich zur Referenzgruppe liefern (Hofman, 2005).

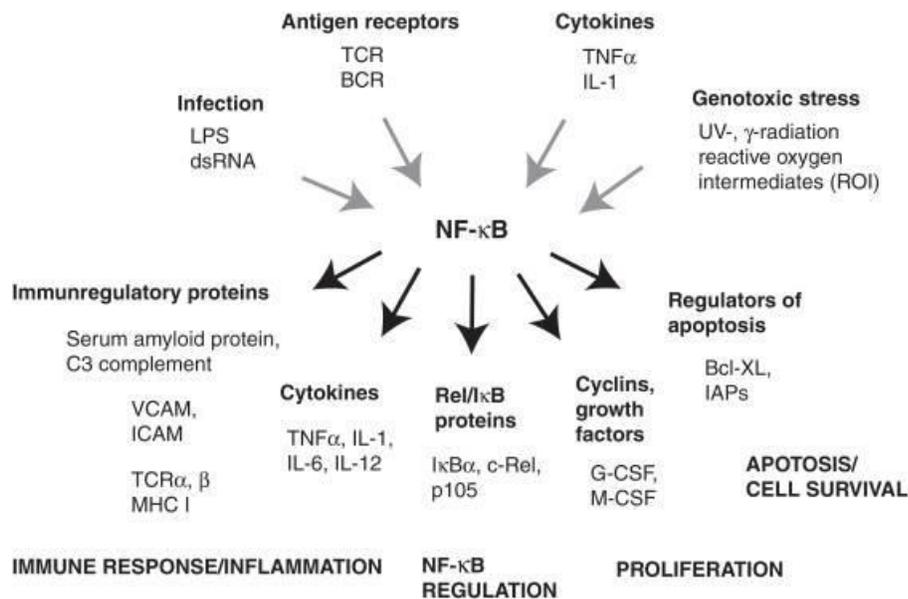
Die verwendeten Zielgene und die Ergebnisse der Transkriptom-Analyse werden in Abschnitt 5.2. dargestellt.

## 1.4 NF- $\kappa$ B

---

Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF- $\kappa$ B), wurde in den 80-er Jahren erstmalig beschrieben und ist ein Transkriptionsfaktor, der in nahezu allen tierischen Zellen vorhanden und an mehreren Signalwegen beteiligt ist (Sen & Baltimore, 1986). NF- $\kappa$ B wurde besonders bekannt durch seine Rolle im angeborenen Immunsystem im Hinblick auf bakterielle Infektionen. Dieser Transkriptionsfaktor wird durch Zytokine und Rezeptoren stimuliert und hat mehrere Untereinheiten, die sowohl Homo- als auch

Heterodimere bilden können (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Bei Säugetieren werden fünf Untereinheiten unterschieden, die bis zu 15 verschiedene Dimere bilden können, die jeweils eine andere Funktion übernehmen. Jede Untereinheit, dazu gehören p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF- $\kappa$ B1), und p100/52 (NF- $\kappa$ B2), hat eine aus 300 Aminosäuren bestehende homologe Rel Domäne (RHD) (Baldwin, 1996; Ghosh, May, & Kopp, 1998). Genau genommen handelt es sich somit nicht nur um einen Transkriptionsfaktor, sondern um eine Familie von Transkriptionsfaktoren, wenn man von NF- $\kappa$ B spricht. Welche unterschiedliche Funktionen NF- $\kappa$ B hat und durch welche Stimuli eine Aktivierung verursacht werden kann, wird in Abb. 4 dargestellt.



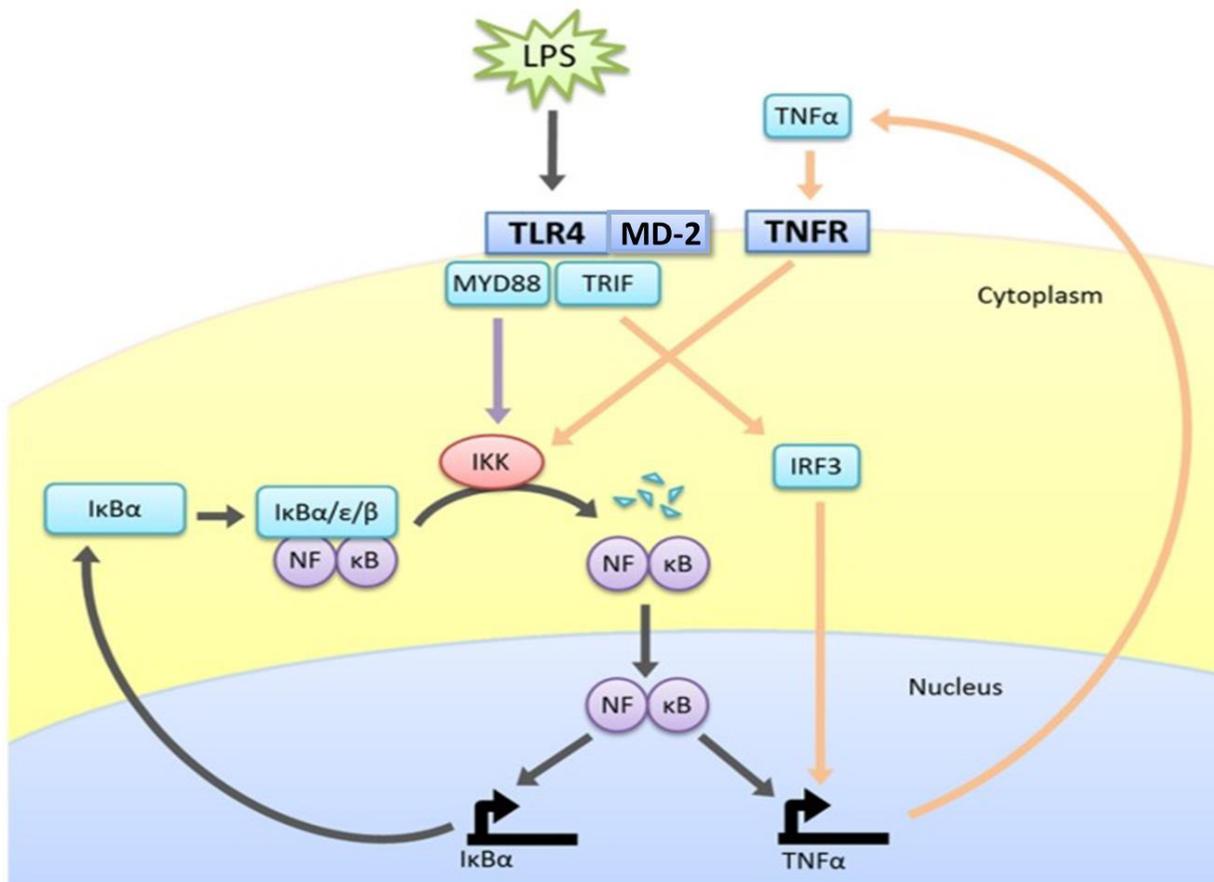
**Abb. 4: NF- $\kappa$ B Aktivatoren und Zielgene. Übernommen von Oeckinghaus and Ghosh (2009).**

Durch diese schematische Darstellung wird die hohe Anzahl aktivierender Stimuli und Zielgene von NF- $\kappa$ B angedeutet. Einige dieser Zielgene sind Regulatoren von NF- $\kappa$ B wie zum Beispiel *TNFAIP3* (A20), welches selbst von NF- $\kappa$ B reguliert wird und dadurch eine auto-regulatorische Feedback-Schleife generiert (Oeckinghaus & Ghosh, 2009). Dieses Zielgen wird im folgenden Kapitel näher beschrieben. Aufgrund der Vielzahl der Aktivatoren und Effektoren von NF- $\kappa$ B beschränken wir uns nun auf die Funktion im angeborenen Immunsystem und die Wirkung im Falle einer auftretenden Inflammation.

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch Inflammation kann durch zwei verschiedene Signalwege ausgelöst werden. Hierbei unterscheidet man den kanonischen und non-kanonischen Signalweg. Wir betrachten nun zunächst einmal den gesamten kanonischen Signalweg in mehreren Schritten.

Ein für uns wichtiger und in der Wissenschaft häufig genutzter Stimulus für eine simulierte intrauterine Infektion ist LPS (L. Li, Kang, & Lei, 2010). LPS ist in der Membran gram-negativen Bakterien vorhanden und wird vom angeborenen Immunsystem direkt als PAMP Molekül erkannt.

LPS schließt eine Gruppe von Molekülen ein, die aus drei Teilregionen bestehen: dem Lipid, einer Kernregion und den Polysacchariden. Im Blut bindet LPS an Lipopolysaccharid bindendes Protein und dieser Komplex wiederum bindet an TLR-4 auf der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten und aktiviert die in Abb. 5 abgebildete Signalkaskade.



**Abb. 5: Vereinfachte Darstellung des LPS-induzierten kanonischen NF- $\kappa$ B Signalwegs. Modifiziert übernommen von Sharp, Ma, Saunders, and Norman (2013).**

I $\kappa$ B, zytoplasmatischer Inhibitor von NF- $\kappa$ B (alpha, beta and epsilon Isoformen sind in diesem Modell zusammen dargestellt); IKK, I $\kappa$ B Kinase; LPS, Lipopolysaccharid; MD-2, Myeloid Differentiation factor 2; MyD88, myeloid differentiation primary response gene 88; NF- $\kappa$ B, nuclear factor kappa B; TLR4, Toll-like receptor 4; TNF $\alpha$ , tumor-necrosis-factor- alpha; TNFR, tumor-necrosis-factor-receptor; TRIF, TIR-Domain-containing-adaptor-inducing-interferon-b.

Damit diverse LPS Moleküle von TLR-4 erkannt und gebunden werden können, bildet TLR-4 ein Heterodimer mit MD-2 an der Zelloberfläche. Nachdem LPS an TLR-4 gebunden hat, gibt es zwei mögliche Signalwege. Signalweg 1 wird durch die Rekrutierung von Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein (TIRAP) an die zytoplasmatische Domäne von TLR-4 ausgelöst (Horng, Barton, Flavell, & Medzhitov, 2002; Yamamoto, Sato, Hemmi, et al., 2002). TIRAP aktiviert MyD88 (Horng et al., 2002; Wesche, Henzel, Shillinglaw, Li, & Cao, 1997; Yamamoto, Sato, Hemmi, et al., 2002), welches seinerseits Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (IRAK4) (S. Li, Strelow, Fontana, & Wesche, 2002; Suzuki, Suzuki, & Yeh, 2002), Interleukin-1 receptor-

associated kinase 1 (IRAK1) (Gottipati, Rao, & Fung-Leung, 2008) und TNF- $\alpha$  receptor associated factor 6 (TRAF6) (Muroi & Tanamoto, 2008; Ross, Yang, Dower, Volpe, & Guesdon, 2002) bindet. IRAK1 wird durch IRAK4 phosphoryliert (S. Li et al., 2002), dadurch löst sich der IRAK1/TRAF6 Komplex vom Rezeptor (Gottipati et al., 2008). TRAF6 interagiert anschließend mit einem Komplex, der unter anderem transforming growth factor-beta-activated kinase-1 (TAK1) enthält. Dieser Komplex wird erst nach Translokation ins Zytoplasma und anschließender Ubiquitylierung aktiv. IRAK1 wird durch das Proteasom erkannt und abgebaut (Jiang, Ninomiya-Tsuji, Qian, Matsumoto, & Li, 2002). Die TAK1 phosphoryliert den I $\kappa$ B kinase complex (IKK), welcher aus zwei katalytischen Untereinheiten (IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ ) und einer regulatorischen (IKK $\gamma$ ) besteht (Irie, Muta, & Takeshige, 2000; C. Wang et al., 2001). Der IKK phosphoryliert dann seinerseits nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor (I $\kappa$ B) und aktiviert somit NF- $\kappa$ B.

Über den zweiten Signalweg ist noch nicht alles bekannt. Betrachtet man MyD88-defiziente Mäuse, wird bei einer Stimulation mit LPS eine verspätete NF- $\kappa$ B Aktivierung beobachtet (Covert, Leung, Gaston, & Baltimore, 2005). Diese verzögerte Aktivierung beschreibt einen Signalweg, der mit der Bindung von TRIF-related adapter molecule (TRAM) an TLR-4 beginnt (Fitzgerald, Rowe, & Golenbock, 2004; Yamamoto, Sato, Hemmi, Uematsu, et al., 2003; Yamamoto, Sato, Mori, et al., 2002) und somit als Brücke zwischen TLR-4 und TRIF dient (Yamamoto, Sato, Hemmi, Hoshino, et al., 2003; Yamamoto, Sato, Hemmi, Uematsu, et al., 2003). Hierdurch werden zwei non-kanonische IKKs aktiviert TANK-bindende Kinase 1 (TBK1) und IKK $\epsilon$  (Fitzgerald et al., 2003; Hacker & Karin, 2006; Hemmi et al., 2004), die dann interferon regulatory factor 3 (IRF3) phosphorylieren. IRF3 transloziert dann in den Zellkern (Nukleus) (Fitzgerald et al., 2003; Hemmi et al., 2004) und reguliert die Transkription von TNF- $\alpha$ . Dies wiederum wird in den Extrazellulär-Raum sezerniert und bindet dann an Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1 (TNFR-1). Durch diese Bindung wird über zwei weitere Moleküle der IKK Komplex per Phosphorylierung aktiviert, was wiederum zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt. Bei diesem Signalweg handelt es sich um eine autokrine „langsame“ Aktivierung durch TNF- $\alpha$ .

## 1.5 A20 (*TNFAIP3*)

---

A20, auch bekannt als Tumor Nekrose Faktor (TNF)- $\alpha$  induziertes Protein 3 (*TNFAIP3*), ist ein zytoplasmatisches Zinkfinger-Protein, welches einen wesentlichen Part in der Regulation von NF- $\kappa$ B während der Immunantwort im Rahmen einer Entzündungsreaktion übernimmt (Vereecke, Beyaert, & van Loo, 2009) (Coornaert, Carpentier, & Beyaert, 2009). Die Funktion von A20 in unterschiedlichsten Zelltypen wurde in den vergangenen Jahren intensiv erforscht und hierbei zeigte sich zunehmend, dass diese weit über die Inhibition von NF- $\kappa$ B hinausgeht (Catrysse, Vereecke, Beyaert, & van Loo, 2014). Gerade durch die Untersuchung von *TNFAIP3*<sup>-/-</sup>-Knock-out Mäusen wurde deutlich, dass dieses Protein von großer Bedeutung in der Immunregulation und Physiologie verschiedener Organe ist, da diese Mäuse auf proinflammatorische Reize mit einer Hyperinflammation reagieren und frühzeitig an Multi-Organ-Versagen und Kachexie versterben (Lee, 2000). Näher betrachtet hat dieses Protein allein schon durch seinen Aufbau multiple Funktionsmöglichkeiten.

In Abb. 6 ist die Protein-Struktur von A20 abgebildet. Die N-terminale Ovarian-tumor-domain (OTU) beinhaltet die C103 katalytische Cystein-Einheit, die für die K63-Deubiquitylierung verantwortlich ist (Wertz et al., 2004). Die C-terminale Zinkfinger-Domäne (ZnF4) ist für die Ubiquitylierung von abzubauenen Zielproteinen verantwortlich (Wertz et al., 2004). Durch die Markierung mit K48-Ubiquitin werden diese Proteine vom Proteasom erkannt. Beide Domänen agieren synergistisch, um das NF- $\kappa$ B Signal zu inhibieren. Die Znf7 Einheit bindet Poly-Ubiquitin, welches die Suppression von NF- $\kappa$ B unterstützt (Verhelst et al., 2012). A20 muss für eine ausreichende Funktion entweder ein Zielprotein oder dem Zielprotein zugehörige Proteine binden. TRAF Moleküle, welches Zielmoleküle sind, werden an der OTU Domäne gebunden, wohingegen, das C-Terminale Ende Proteine wie A20-binding protein (ABIIN1 und 2), TAX1 binding protein (TAX1BP1) und NF- $\kappa$ B essential modulator (NEMO) bindet (Shembade & Harhaj, 2012). Diese Moleküle fungieren als Adapterproteine und bringen somit A20 in die Nähe von Poly-Ubiquitin-Ketten. Zur Veranschaulichung der Signalwege, die A20 beeinflusst, ist in Abb. 6 die durch Stimulation von TNF- $\alpha$  ausgelöste Signalkaskade schematisch dargestellt.

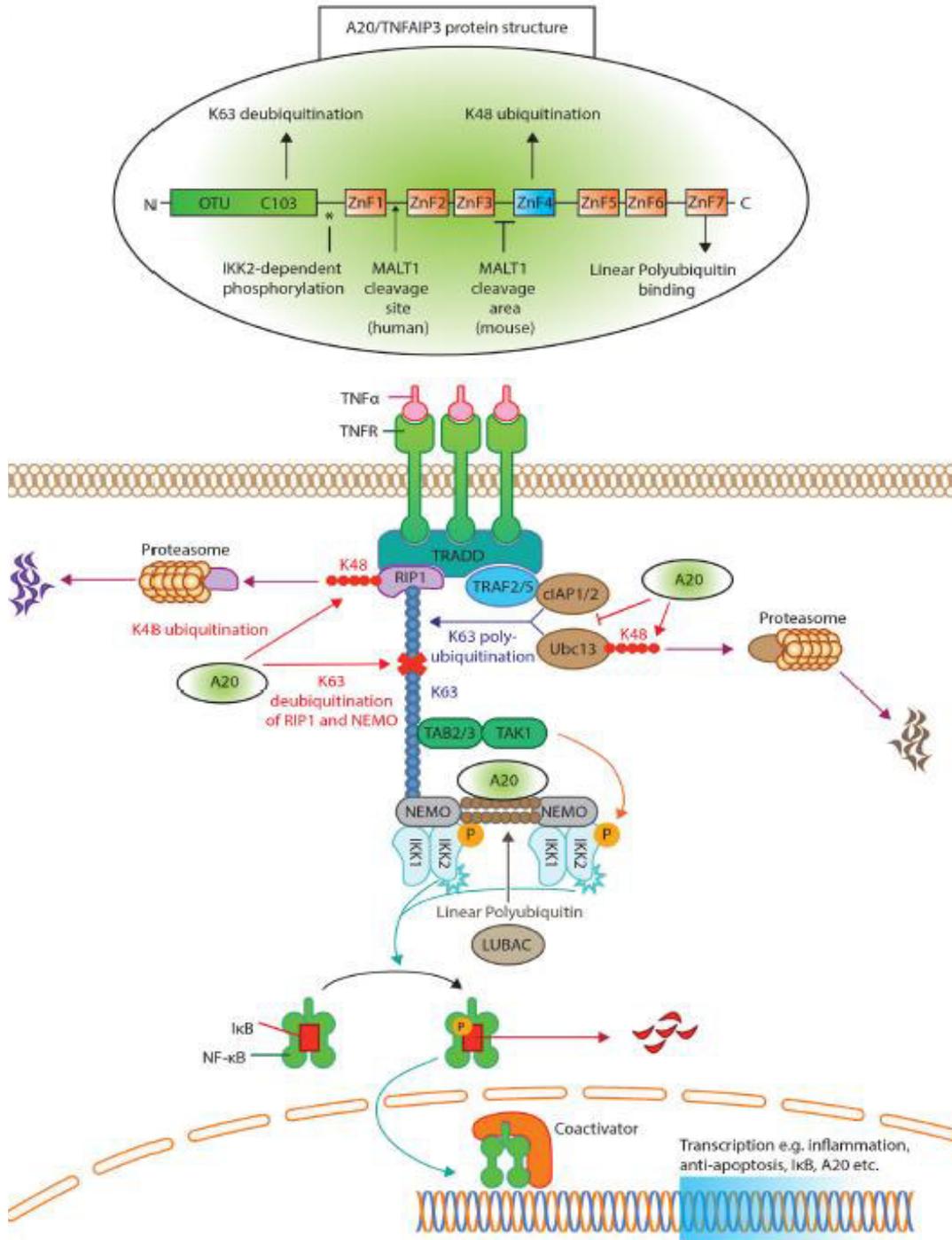


Abb. 6: Protein-Struktur von A20 und schematische Darstellung der Signal-Kaskade nach TNF- $\alpha$  Stimulation in einer Immunzelle. Übernommen von Das, Chen, Hendriks, and Kool (2018).

TNF- $\alpha$  bindet an seinen Membran-Rezeptor und aktiviert somit die receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIP1) und TRAF2/TRAF5. Hierdurch wird der TNFR-Komplex gebildet (Brenner, Blaser, & Mak, 2015; Micheau & Tschopp, 2003). Das ubiquitin-conjugating enzyme 13 (Ubc13) und cellular inhibitor of apoptosis protein (cIAP)1/2 vermitteln die K63-Polyubiquitinierung von RIP1. RIP1–Polyubiquitin dient als Zellträger, um NEMO zu aktivieren und um den TAK1-TAB2/3 Komplex zu transformieren (Shembade & Harhaj, 2012). Der lineare ubiquitin-chain-assembly-complex (LUBAC) ubiquitinyliert NEMO und aktiviert somit einen weiteren IKK-NEMO-Komplex (Tokunaga, 2013; Tokunaga et al., 2009). Die TAK1 phosphoryliert und aktiviert die IKK, welche IKK2 beinhaltet, die schließlich I $\kappa$ B phosphoryliert (Alkalay et al., 1995; Chen, Parent, & Maniatis, 1996). Die phosphorylierte I $\kappa$ B wird mittels K48 poly-ubiquitinyliert und dann abgebaut (Hayden & Ghosh, 2012). Während dieses Prozesses wird NF- $\kappa$ B freigesetzt (Catrysse et al., 2014) und es erfolgt die Translokation in den Zellkern. Für die Inhibition von NF- $\kappa$ B entfernt A20 die K63 Polyubiquitin-Ketten von RIP1 und NEMO und unterbricht hiermit die Interaktion von nachgeschalteten Proteinen. Darüber hinaus sorgt A20 für den Abbau von RIP1 und Ubc13 mittels einer Markierung mit K48 Poly-Ubiquitin-Ketten (Bosanac et al., 2010; Wertz et al., 2004). A20 stört auch die Interaktion von Ubc13 mit cIAP1/2, um eine erneute Bindung von K63 Ubiquitin zu verhindern (Shembade, Ma, & Harhaj, 2010). Zuletzt bindet die Zinkfinger-Domäne (ZnF7) von A20 lineares Ubiquitin, daraufhin löst sich LUBAC vom IKK/NEMO Komplex (Tokunaga, 2013; Verhelst et al., 2012) und inhibiert eine weitere Phosphorylierung von IKK (Skaug et al., 2011).

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Möglichkeiten von A20 in die Signalkaskade einzugreifen, um NF- $\kappa$ B zu inhibieren, machen deutlich wie komplex die Regulation einer Immunantwort sein kann und wie viele Abhängigkeiten hierdurch entstehen.

Wie A20 sich in neutrophilen Granulozyten auswirkt und welche genaue Funktion dieses Protein in neutrophilen Granulozyten von Neugeborenen übernimmt, ist bisher noch nicht ausreichend erforscht.

## 2 HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG

Basierend auf den Untersuchungen zur Funktion neutrophiler Granulozyten im Laufe der fetalen Entwicklung in der Maus und beim Menschen scheint eine ontogenetische Regulation der Neutrophilen-Funktion sehr wahrscheinlich. Diese Annahme gilt daher als zugrundeliegende Hypothese dieser Arbeit.

Um diese Hypothese zumindest im Ansatz zu belegen, ist das Ziel der Arbeit, Faktoren in neutrophilen Granulozyten zu identifizieren, die zur Regulation der Funktion neutrophiler Granulozyten bei Feten beitragen. Hierfür konnte ich auf Daten einer entsprechenden Transkriptom-Analyse, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, zurückgreifen und A20 und den non-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg als potenziell negative Regulatoren in fetalen neutrophilen Granulozyten untersuchen.

## 3 MATERIALIEN

### 3.1 VERSUCHSTIERE

---

*Lyz2<sup>GFP</sup>* Männchen wurden zur terminierten Verpaarung mit C57Bl/6 Wildtyp Weibchen für die Intravitalmikroskopie verwendet. Diese Mäuse exprimieren enhanced green fluorescent protein (EGFP) unter der Kontrolle des *Lyz2* Locus, das in myelomonozytären Zellen exprimiert ist (Faust, Varas, Kelly, Heck, & Graf, 2000) und somit anhand der Fluoreszenz von anderen Blutzellen differenziert werden kann. Da diese Mäuse vorwiegend neutrophile Granulozyten fluoreszenzmarkieren, werden die Mäuse auch als Neutrophilen-Reporter Mäuse bezeichnet.

C57BL/6 Wildtyp (WT) Mäuse wurden von Janvier Labs (Saint Berthevin, France) bezogen. Alle Mäuse wurden im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität gehalten und im Falle der *Lyz2-EGFP* auch dort gezüchtet. Jegliche Tierversuche wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchsanträge Az. 122/12 und 163/15).

#### 3.1.1 GENOTYPISIERUNG

---

Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgt in unserem Labor mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus Hautproben aus dem Schwanz der Tiere. Die Genotypisierung ist sowohl für die Zucht als auch die Versuche relevant und wird für jedes Tier genau dokumentiert.

Exemplarisch ist der Ablauf der PCR für die Genotypisierung der *Lyz2<sup>GFP</sup>* in Tab. 1 dargestellt. In Tab. 2 werden die verwendeten Primer aufgeführt.

**Tab. 1: PCR Protokoll für *Lyz2<sup>GFP</sup>***

	Temp.	Dauer
Start Denaturierung	95°C	3 min
Denaturierung	95°C	15 sec
Annealing	60°C	15 sec
Extension	72°C	15 sec
Final extension	72°C	7 min

**Tab. 2: Primer für Genotypisierung**

Primer	Oligoname		5'-3'	Company
<i>Lyz2<sup>GFP</sup></i>	MLYSUP	Fw	AGGCTGTTGGGAAAGGAGGG	metabion
<i>Lyz2<sup>GFP</sup></i>	MLP1	Rv WT	TCGGCCAGGCTGACTCCATA	metabion
<i>Lyz2<sup>GFP</sup></i>	EGFPDWN	Rv <i>Lyz2<sup>GFP</sup></i>	GTCGCCGATGGGGGTGTT	metabion

### 3.2 ZELLINIEN

Hoxb8-SCF      Immortalisierte, murine myeloide Vorläuferzellen (G. G. Wang et al., 2006) wurde uns freundlicherweise von der AG Walzog bereitgestellt.

CHO Zellen      SCF-generierende CHO (*Chinese hamster ovary*) Zellen, wurde uns freundlicherweise von der AG Walzog bereitgestellt.

HEK 293T- Zellen      Diese Zelllinie wurde uns freundlicherweise von der AG Walzog bereitgestellt.

### 3.3 PUFFER UND LÖSUNGEN

#### Superfusionspuffer

131.89 mM	Natriumchlorid (NaCl)
4.68 mM	Kaliumchlorid (KCl)
2.66 mM	Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )
2.13 mM	Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )
18 mM	Natriumformiat (NaHCO <sub>2</sub> )

Verwendet für die Intravitalmikroskopie zur Befeuchtung und Wärmung des Dottersacks. Die Lösung wurde kontinuierlich gewärmt.

<b>Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)<sup>++</sup> Puffer (pH 7,4)</b>		<b>250 ml</b>
	HBSS	250 ml
0.25%	Bovine serum albumin (BSA)	625 mg
10 mM	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes)	596 mg

Hanks-Balanced-Salt-solution ist eine Salzlösung, mit der der pH und die osmotischen Verhältnisse reguliert werden. In unserem Labor wurde diese Lösung um BSA und Hepes ergänzt. Der Puffer wurde als Medium für die neutrophilen Granulozyten zur Aufreinigung genutzt, um ein möglichst optimales Milieu für die Zellen zu schaffen.

#### **FACS Puffer**

1% BSA in PBS

#### **Erythrozyten-Lysepuffer**

20,05g Ammoniumchlorid (NH<sub>4</sub>Cl) 1,5M  
 2,1g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO<sub>3</sub>) 0,1M  
 0,93g Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 0,01M  
 250ml Aqua ad injectabilia

#### **Narkose: Ketamin/Xylazin**

125 mg kg<sup>-1</sup> Ketamin  
 25 mg kg<sup>-1</sup> Rompun 2% (Xylazin) in NaCl 0,9%

### 3.4 MEDIEN

---

#### **Medium für Hoxb8-SCF**

500 ml RPMI  
 1 mM L-Glutamin  
 5% SCF Überstand (CHO Zellen)  
 10% Fetal calf serum (FCS)  
 1 mM Penicillin/Streptomycin  
 1µM Östradiol  
 30µM β-Mercaptoethanol

Nach Transduktion  
+ 10µg/ml Puromycin

### Differenzierungsmedium für Hoxb8-SCF

500 ml	RPMI
1 mM	L-Glutamin
5%	SCF Überstand (CHO Zellen)
10%	FCS
1 %	Penicillin/Streptomycin
30µM	β-Mercaptoethanol

Nach Transduktion  
+ 10µg/ml Puromycin

### Medium für CHO Zellen

	RPMI	500 ml
1 mM	L-Glutamin	
10%	FCS	
1 %	Penicillin/Streptomycin	

### Medium für HEK293T Zellen

	RPMI	500 ml
25 mM	HEPES	
10%	FCS	

## 3.5 SUBSTANZEN

---

**Tab. 3: Rekombinante Proteine**

Substanz	Firma
rmCXCL1 (Kc)	Immunotools (Friesoythe; Deutschland)
rmICAM-1	R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, USA)
rmTNF-α	R&D Systems
rmE-selectin	R&D Systems
rmPECAM-1	R&D Systems
LPS	Sigma (St. Louis, Missouri, USA)

Tab. 4: Weitere Substanzen

Substanz	Firma
7-AAD	Beckman Coulter (Brea, Kalifornien, USA)
Antibody Diluent with Background Reducing Components	Dako (Carpinteria, Kalifornien, USA)
BSA	PAA Laboratories (Cölbe, Deutschland)
DMSO	Sigma
DNA Ladder 100bp	peQLab (Erlangen, Deutschland)
EDTA	Sigma
Fetal calf serum (FCS), heat-inactivated	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)
FACS Lysepuffer	BD (Heidelberg, Deutschland)
Flow-Count™ Fluorosperes	Beckman Coulter
Fluoromount-G	Biozol/Southern Biotech
Glutamax	Invitrogen
Glycerin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Hank`sche Lösung 500ml ohne Phenolrot	Apotheke (LMU, München, Deutschland)
Hemacolor Schnellfärbung v. Blutausstrichen	
Lsg.1 Methanol	MERCK (Darmstadt, Deutschland)
Hemacolor Schnellfärbung Lsg.2 Farblösung rot	MERCK
Hemacolor Schnellfärbung Lsg.3 Farblösung blau	MERCK
HEPES	Sigma
Isopropanol/2-Propanol	Roth
Ketavet (100mg/ml)	Pharmacia GmbH (Berlin, Deutschland)
NaCl 0,9%	Fresenius Kabi GmbH (Bad Homburg v. d. Höhe Deutschland)
Lipopolysaccharid from E. coli (Stoll et al.)	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
Phosphate-buffered-Saline (PBS)	Invitrogen
Penicillin-Streptomycin, liquid	Invitrogen
Polymorphoprep	Axia-Shield PoC AS (Dundee, UK)
Puromycin	Thermofisher (Waltham, Massachusetts, USA)
Rompun 2% (Xylazin)	Bayer (Leverkusen, Deutschland)
SDS ultra pure	Roth
Türk`s solution	MERCK
Trypanblaulösung	MERCK

## 3.5.1 ANTIKÖRPER

Tab. 5: Primäre Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Reaktion	Isotyp	Klon	Firma
CD11a (LFA-1)	APC	rat anti m*	IgG2a,κ	M17/4	eBioscience (San Diego, Kalifornien, USA)
CD11b (Mac-1)	PE	rat anti m	IgG2b,κ	M1/70	BioLegend (San Diego, Kalifornien, USA)
CD11b (Mac-1)	Brill. Viol. 510	rat anti m	IgG2b,κ	M1/70	BioLegend
CD15	APC	mouse anti h	IgG1 κ	W6D3	BioLegend
CD18	FITC	rat anti m	IgG2a,κ	C71/16	Pharmingen (San Diego, Kalifornien, USA)
CD44	Brill. Viol. 570	rat anti h, m	IgG2b,κ	IM7	BioLegend
CD62E	-	rat anti m	IgG1	9A9	InVivo (Henningsdorf, Deutschland)
CD62L	FITC	rat anti m	IgG2a,κ	MEL-14	BioLegend
CD66abcde	PE	mouse anti h	IgG2b	TET2	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, Deutschland)
CD115	APC	rat anti m	IgG2a,κ	AFS98	BioLegend
CD117 (c-Kit)	APC	rat anti m	IgG2b	2B8	eBioscience
CD162 (PSGL-1)	PE	rat anti m	IgG1	2PH1	Pharmingen
CD182 (CXCR2)	APC	rat anti m	IgG2a	242216	R&D Systems
Ly6G	eFluor 405	rat anti m	IgG2a,κ	1A8	BioLegend
Ly6G/Ly6C (Gr-1)	eFluor 405	rat anti m	IgG2b	RB6-8C5	BioLegend
Isotype control	FITC	rat anti m	IgG2a,κ		eBioscience
Isotype control	PE	rat anti m	IgG1		eBioscience
Isotype control	APC	rat anti m	IgG2a	RTK2758	BioLegend
Isotype control	Brill. Viol 570	rat anti h, m	IgG2b,κ	RTK4530	BioLegend
Isotype control	eFluor 405	rat anti m	IgG2a,κ		BioLegend
Isotype control	eFluor 405	rat anti m	IgG2b		eBioscience

\*h – human, m – murin

### 3.6 KITS

---

EasySep Human Neutrophil Enrichment Kit	STEMCELL Technologies (Vancouver, Kanada)
RNeasy Mini Kit enthält RLT-Puffer	Qiagen (Hilden, Deutschland) Applied Biosystems™
High-Capacity cDNA Reverse Transkription Kit	Thermo Fisher Scientific
TaqMan™ Gene Expression Master Mix	Life Technologies (Carlsbad, Kalifornien, USA)

### 3.7 AUSSTATTUNG

---

Intravital BX51WI microscope	Olympus (Tokio, Japan)
TrimScope	LaVision Bio Tec (Bielefeld, Deutschland)
Gallios flow cytometer	Beckman Coulter
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge 5427R	Eppendorf (Wesseling, Deutschland)
Tischzentrifuge	Labnet International (Edison, New Jersey, USA)
pH meter 720	InoLab vertrieben von Thermo Fisher Scientific
Pipetten Research Plus	Eppendorf
Protein Electrophoresis and Blotting	BioRad (Hercules, Kalifornien, USA)
Power Supplies	BioRad
Vortex-Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, New York, USA)
Inkubator	Binder (Tuttlingen, Deutschland)
Peq MIX Plus	PeqLab

Thermo Mixer F1.5	Eppendorf
PCR machine T Advanced	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Balance AB 104-S-A	Mettler Toledo
Nano Drop 2000	Thermo Fisher Scientific
StepOnePlus Real-Time PCR Systems	Thermo Fisher Scientific

### 3.8 VERBRAUCHSMATERIALIEN

---

Cell strainer, 40µm Nylon	Corning (New York, USA)
Sterilfilter (0,2-0,80µm)	WEPA (Arnsberg, Deutschland)
96-Well Platte	Corning
Flask, 25cm <sup>2</sup>	Corning
Flask, 75cm <sup>2</sup>	Corning
Flask, 175cm <sup>2</sup>	Corning
Kryoröhrchen	Corning
Multifly Safety Kanüle (grün)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Spritzen in 1 und 10ml	Braun (Melsungen, Deutschland)
Insulinspritzen 1ml	Braun
Spritzen in 2,5 und 20ml	BD
Kanülen	BD
Falcon, 15ml	Greiner (Solingen, Deutschland)
Falcon, 50ml	Corning
Objektträger (Mattrand, ohne Mattrand)	Thermo Fisher Scientific
Deckglas (rund)	Thermo Fisher Scientific
Perfusionsbesteck Ecloflo	Dispomed (Gelnhausen, Deutschland)
Pipetten, 1, 2, 5, 10, 25ml	Corning
Pasteur Pipetten	Brand (Wertheim, Deutschland)

### 3.9 SOFTWARE

---

Kaluza 2.1

Beckman Coulter

Prism 9.1.0

Graphpad

Image J 1.49

National Institute of Health (Bethesda,  
Maryland, USA)

Inspector Pro

LaVision Biotech

EndNote X9

Thomson Reuter (Toronto, Kanada)

## 4 METHODEN

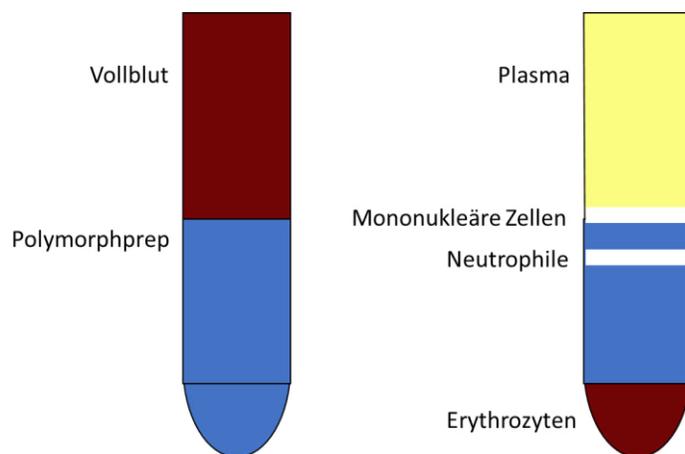
### 4.1 AUFREINIGUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN

#### 4.1.1 ISOLATION HUMANER NEUTROPHILER GRANULOZYTEN AUS NABELSCHNURBLUT

Rekrutiert wurden alle Schwangeren, die keine relevanten Vorerkrankungen oder Infektionen während der Schwangerschaft und eine Geburt per Kaiserschnitt hatten. Eine Blutentnahme erfolgte nur bei vorliegender Einverständniserklärung.

Die Blutentnahme erfolgte aus der Nabelschnurvene nach Abnabelung mithilfe einer Multifly Safety Kanüle und 10ml Citratröhrchen. Daraufhin wurden jeweils 5ml Blut vorsichtig auf 5ml Polymorphoprep™ in einem 15ml Falcon geschichtet, so dass sich die beiden Phasen nicht vermischten.

Es erfolgte eine 30-minütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und 500g ohne Bremse. Nachdem das Plasma und die Schicht der Monozyten abgesaugt und verworfen wurden, konnten mithilfe einer Glaspipette die neutrophilen Granulozyten-Schicht aufgenommen und in ein Falcon überführt werden.



**Abb. 7: Schichtung des Gradienten vor und nach Zentrifugation schematisch.**

Links: vor Zentrifugation Vollblut und Polymorphoprep 1:1 geschichtet; rechts nach Zentrifugation. Die zweite Bande bilden die neutrophilen Granulozyten.

Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS und eine Zentrifugation mit 300g über 5 Minuten.

Um noch verbliebene Erythrozyten zu entfernen, erfolgte eine Lyse mit einem vorgefertigten Erythrozyten-Lysepuffer, der 1:10 mit aqua ad iniectabilia vorverdünnt wurde. Das Zellpellet wurde mit ca. 5-10ml dieser Lösung für max. 5 Minuten inkubiert. Es folgten zwei weitere Waschschriffe mit einer Zentrifugation (300g für 5 Minuten). Hierbei wurde das Zellpellet in HBSS resuspendiert. Die Zellen wurden in ein definiertes Volumen in HBSS aufgenommen und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Hierfür wurde Türk'sche Lösung in einer 1:10 Verdünnung verwendet (10µl Probe, 90µl Türks). Für die weitere Aufreinigung mittels Easy Sep Neutrophil Enrichment Kit musste eine Konzentration von  $5 \times 10^7$  Zellen/ml eingestellt werden. Die nächsten Schritte entsprechen dem Protokoll des EasySep Kits. Die Reinheit der Proben wurde mittels fluorescence-activated cell sorting (FACS) bestimmt. Die Blutentnahme aus der Nabelschnurvene wurde von der Ethikkommission der LMU München unter dem Geschäftszeichen 249-08 genehmigt.

#### 4.1.2 ISOLATION NEUTROPHILER GRANULOZYTEN AUS ADULTEN PROBANDEN

---

Rekrutiert wurden gesunde Probanden aus unserem Labor nach mündlichem Einverständnis. Die Blutentnahme erfolgte ebenfalls mit einer Multifly Safety Kanüle und 10ml Citratröhrchen. Den Probanden wurde ca. 40ml Vollblut entnommen. Die weiteren Isolationsschritte entsprechen 4.4.1. Die Blutentnahme von gesunden Probanden wurde von der Ethikkommission der LMU München unter dem Geschäftszeichen 611-15 genehmigt.

## 4.2 ZELLKULTUR

---

### 4.2.1 ZELLKULTURBEDINGUNGEN

---

Jegliche Arbeiten in der Zellkultur wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) kultiviert. Grundsätzlich wurden sowohl Suspensions- als auch adhärenente Zellen anhand ihrer Dichte (bei adhärenenten

anhand Konfluenz) passagiert. In der Regel fand dies spätestens jeden zweiten Tag statt. Medienwechsel und Waschschriffe beinhalteten meist eine Zentrifugation von 5 Minuten bei 300g, Absaugen des Überstandes und Resuspension in neuem Medium oder beim Waschen in einer Lösung von sterilem PBS mit 1% FCS.

#### 4.2.2 ZELLZAHLBESTIMMUNG

---

Die Anzahl lebender Zellen wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierfür wurde der Zellsuspension eine bestimmten Menge Trypanblau-Lösung zugesetzt (Verdünnung 1:2) und 10µl davon in die Zählkammer pipettiert. Trypanblau dringt nur in defekte Zellmembranen ein, so dass alle nicht blau gefärbten – demnach transparenten Zellen als lebend galten.

#### 4.2.3 PRODUKTION VON ÜBERSTÄNDEN

---

Der für die Hoxb8-SCF Kultur benötigte Wachstumsfaktor SCF wurde mithilfe von CHO Zellen gewonnen. Diese adhären Zellen produzieren SCF als rekombinantes Protein. Die Zellen wurden in für diesen Zelltyp geeignetem Medium kultiviert. Sobald sie eine Konfluenz von >90% erreichten, wurde der Überstand in ein steriles Falcon pipettiert und mit einer Porengröße von 0,2µm steril-filtriert, aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

#### 4.2.4 KULTUR VON HOXB8-SCF PROGENITOR-ZELLEN

---

Die begrenzte Verfügbarkeit neutrophiler Granulozyten bei Neugeborenen, human oder murin, stellt ein Problem für die Erforschung molekularer Mechanismen in der Ontogenese neutrophiler Granulozyten dar. Eine Möglichkeit eine nahezu unbegrenzte Menge neutrophiler Granulozyten untersuchen zu können, bietet die Nutzung von immortalisierten Zelllinien. Für das Maussystem existiert für neutrophile Granulozyten die Zelllinie Hoxb8. Hierfür wurde in isolierten myeloide Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von weiblichen C57BL/6 Mäusen ein Retrovirus eingeschleust, der diese Vorläuferzellen in Abhängigkeit von Östrogen unbegrenzt proliferieren lässt, ohne eine Ausdifferenzierung der Zellen zu verursachen. Klasse 1 Hox-Transkriptionsfaktoren ermöglichen die Expansion hämatopoetischer Progenitorzellen. Die dysregulierte Expression dieser Transkriptionsfaktoren zeigt sich bei der humanen als auch bei der

murinen, myeloischen Leukämie (G. G. Wang et al., 2006). Eine übermäßige Produktion von Hoxb8 und Hoxa9 führt zu einem Differenzierungs-Stop in stem cell factor (SCF) und granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) abhängigen myeloiden Progenitor-Zellen (Calvo, Sykes, Pasillas, & Kamps, 2000; Fischbach et al., 2005; Knoepfler, Sykes, Pasillas, & Kamps, 2001; Owens & Hawley, 2002). Die Fähigkeit dieser Transkriptionsfaktoren die Differenzierung anzuhalten und eine unbegrenzte Anzahl myeloider Progenitor-Zellen zu generieren, wurde von Wang et al. (2006) genutzt. Sobald dem Kulturmedium das Östrogen entzogen wird, sind diese Transkriptionsfaktoren inaktiv und eine Differenzierung der Zellen beginnt ohne weitere Proliferation. Im Falle von Hoxb8-SCF Zellen entstehen neutrophile Granulozyten. Bei Zugabe von GM-CSF differenzieren die Zellen zu Makrophagen. Die in dieser Arbeit verwendeten Hoxb8-SCF Zellen wurden uns freundlicherweise von Hans Häcker aus dem St. Jude Children's Research Hospital in Memphis zur Verfügung gestellt.

Die Progenitor-Zellen wurden in 75cm<sup>2</sup> Flaschen kultiviert. Je nach Zelldichte wurden sie spätestens alle zwei Tage gesplittet und mit frischem Östradiol-haltigem Medium versorgt. Das Gesamtvolumen innerhalb der Flaschen betrug 25 bis max. 30ml. Es erfolgte ein regelmäßiger Flaschenwechsel.

Die eingefrorenen Progenitor-Zellen wurden in einem Stickstofftank in Kryoröhrchen aufbewahrt. Durchschnittlich wurden zwischen  $5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in einem Medium aus Dimethylsulfoxid (DMSO) und FCS (Verhältnis 1:10) eingefroren. Hierfür wurden die in Kultur gehaltenen Zellen zunächst gezählt, anschließend für fünf Minuten bei 300g abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das vorhandene Zellpellet wurde im auf Eis vorgekühlten Einfriermedium aufgenommen und auf die Kryoröhrchen verteilt. Danach wurden die Zellen übergangsweise (max. 48h) bis zur Überführung in den Stickstofftank in einem Isopropanol-haltigen Rondell bei -80°C aufbewahrt. Das Rondell wurde vorher ebenfalls auf Eis gelagert. Aufgetaut wurden die Vorläuferzellen, indem sie zunächst einige Minuten in einem Wasserbad angewärmt und daraufhin in 10ml vorgewärmtes Kulturmedium aufgenommen wurden. Um das DMSO zu entfernen wurden die Zellen abzentrifugiert (5min bei 300g) und der Überstand abgesaugt. Anschließend wurde das Pellet in 25ml Medium resuspendiert und in eine 75cm<sup>2</sup> Flasche überführt. Hierfür wurden die in Kultur gehaltenen undifferenzierten Progenitor-Zellen aus den Flaschen in 50ml

Falcons gepoolt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Glaspipette abgesaugt. Das Zellpellet wurde 2x in warmem PBS mit 1%FCS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^5$ /ml in Differenzierungsmedium aufgenommen und in einer 75cm<sup>2</sup> Flaschen kultiviert und bei hoher Zelldichte gesplittet. An Tag 6 waren die Vorläuferzellen zu neutrophilen Granulozyten differenziert.

Die zellmorphologische Beurteilung erfolgte mittels Ausstrichs auf einem Objektträger und anschließender Diff-Quick Färbung der Zellen. Hierfür wurden 50µl Zellsuspension auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Die Zellen wurden dann in Methanol fixiert (60 Sekunden) und anschließend für 60 Sekunden in Färbelösung 1 und für 30 Sekunden in Färbelösung 2 getaucht. Abschließend wurde der Objektträger mit Wasser gespült und luftgetrocknet. Die Zellen wurden dann mit einem Ölimmersionsmikroskop in 100x Vergrößerung mikroskopiert und anhand Färbemuster und Zellkernmorphologie ausgewertet.

### 4.3 REKRUTIERUNG NEUTROPHILER GRANULOZYTEN IN VIVO

---

#### 4.3.1 TERMINIERTE VERPAARUNG

---

Homozygote *Lyz2<sup>GFP</sup>* Männchen wurden mit *C57Bl/6* Wildtyp Weibchen am Nachmittag zusammengesetzt. Am nächsten Morgen wurde geprüft, ob sich bei den Weibchen ein Vaginalpfropf (Plug) gebildet hatte. Bei positivem Ergebnis wurde dieser Zeitpunkt als Tag 0,5 (E0.5) gezählt.

#### 4.3.2 PRÄPARATION DES DOTTERSACKS

---

Für die Experimente wurden die Schwangerschaftszeitpunkte E14.5 und E17.5 verwendet.

Die schwangeren Mäuse erhielten eine intramuskuläre Anästhesie bestehend aus Ketamin (125mg/kg) und Xylazin (25mg/kg), welches in 10ml/kg 0,9% NaCl gelöst wurde. Nach Prüfung der Anästhesietiefe erfolgte ein vertikaler Schnitt in der rechten Flanke. Hierbei wurden zunächst die Haut und Muskulatur durchtrennt und anschließend das

Peritoneum mit einer stumpfen Pinzette erfasst und ebenfalls vorsichtig durchtrennt, ohne den Darm oder Uterus zu verletzen. Daraufhin wurde ein Uterushorn mit Wattetupfern vorsichtig aus der Bauchhöhle gezogen. Somit konnten bis zu drei Feten dargestellt werden. Während der Präparation am Uterus wurde das Präparationsgebiet stets mit warmer Superfusionslösung beträufelt, so dass das Gewebe nicht austrocknete. Um den Dottersack des einzelnen Feten darzustellen, musste die Uterusmuskulatur durchtrennt werden, ohne den Dottersack zu verletzen. Dies erfolgte mittels semizirkulären Schnitts zwischen zwei Feten. Der Schnitt konnte durch Anheben der bereits durchtrennten Uterusmuskulatur erweitert werden. Durch diese Art der Präparation konnten pro Versuch bis zu drei Feten, die nebeneinander lagen, mikroskopiert werden. Die Feten wurden bei auf dem Rücken liegender Maus in eine Petrischale (35x10mm) auf einer speziell für den Versuch gebauten Bühne gebettet. Die Feten wurden auch in der Petrischale mit warmer Superfusionslösung (37°C) warm und feucht gehalten. Über den Feten wurde mit einer Vorrichtung ein dünnes Deckgläschen gelegt. Hierbei musste sichergestellt werden, dass ausreichend Flüssigkeit unter dem Deckglas war.

#### 4.3.3 LPS-INDUZIERTE INFLAMMATION DES DOTTERSACKS

---

Für die LPS-induzierte Inflammation erfolgte die Präparation des Dottersacks in zwei Schritten. Zunächst wurden die schwangeren Mäuse anästhesiert und der Uterus wurde wie oben beschrieben exponiert. Dann erfolgte entweder eine Injektion von LPS 100µg in 100µl 0,9% NaCl Lösung oder von reiner 0,9% NaCl Lösung (Kontrollbedingung) in die Uterushöhle zwischen zwei benachbarten Feten. Die Injektion erfolgte mittels einer 1ml Insulinspritze. Der Uterus wurde in die Bauchhöhle reponiert und die Wunde wurde mit einer Klemme verschlossen. Nach zwei Stunden Inkubationszeit wurden die Feten nach vollendeter Präparation mikroskopiert.

#### 4.3.4 INTRAVITALMIKROSKOPIE DES DOTTERSACKS

---

Die Intravitalmikroskopie erfolgte mit einem Olympus BX51WI Mikroskop, ausgestattet mit einem Wasserimmersionsobjektiv (20x, 0.95 NA, Olympus). Die Feten waren heterozygote *Lyz2-EGFP* Tiere, so dass myelo-monozytäre Zellen, vornehmlich

neutrophile Granulozyten, durch die Expression von EGFP mit entsprechendem Filter-Set in den Gefäßen grün fluoreszierten.

Betrachtet wurden nur Gefäße mit einer ausreichenden Flussgeschwindigkeit. Die Gefäße wurden mit einer CCD Kamera (Model CF8/1, Kappa) für eine Minute in einem geeigneten field of view (FOV) aufgezeichnet und auf einer externen Festplatte für die spätere Analyse gespeichert. Pro Fetus wurden 1-4 Gefäße aufgenommen.

#### 4.3.5 AUSWERTUNG DER INTRAVITALMIKROSKOPIE

---

Zur Analyse der Videos wurde Image J (<https://imagej.nih.gov/nih-image/>) verwendet.

Ausgewertet wurde in diesen Experimenten die Anzahl rollender und adhärenter Zellen an der Gefäßwand im betrachteten FOV. Als adhärent galt eine Zelle, wenn sie sich für mindestens 30s an derselben Stelle im FOV befand. Des Weiteren wurden Gefäßdurchmesser und Länge bestimmt.

### 4.4 FLUSSKAMMEREXPERIMENTE (REKRUTIERUNG IN VITRO)

---

Um beurteilen zu können, wie sich aus Hoxb8-SCF Zellen *in vitro* differenzierte neutrophile Granulozyten unter Flussbedingungen verhalten, verwendeten wir ein etabliertes Flusskammermodell (Smith, Sperandio, Galkina, & Ley, 2004).

#### 4.4.1 VORBEREITUNG DER FLUSSKAMMERN

---

Hierfür wurden Glaskapillaren (0,2 x 2 mm ID VitroCom, Mountain Lakes, USA) mit murinen rekombinanten Proteinen beschichtet, die während einer Inflammation auf der Endotheloberfläche exprimiert werden. Je nach Kombination dieser Proteine konnte das Rollverhalten oder die Adhäsion der Zellen beurteilt werden. Diese Glaskapillaren wurden an eine Hochpräzisionspumpe angeschlossen, die die Kapillare mit konstanter Geschwindigkeit (0,115ml/min) und shear stress (1 dyne/cm<sup>2</sup>) perfundiert.

Die Vorbereitung der Kammern erfolgte am Vortag der Versuche. Die fertigen Flusskammern wurden im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Zunächst wurden die Glaskapillaren auf die gewünschte Größe von ca. 3cm gebrochen, mit 99% Ethanol und aqua ad iniectabilia gereinigt und anschließend per Vakuum

getrocknet. Anschließend wurden die Kapillaren mit den rekombinanten Proteinen in verschiedenen Ansätzen beschichtet:

Rollkammern:

- 1) rm P-Selektin (15µg/ml) in PBS + 0,1% BSA
- 2) rm E-Selektin (20µg/ml) in PBS + 0,1% BSA

Rollen + Adhäsionskammern:

- 1) rm E-Selektin (20µg/ml) + ICAM-1 (15µg/ml) in PBS + 0,1% BSA
- 2) rm E-Selektin (20µg/ml) + ICAM-1 (15µg/ml) + CXCL-1 (15µg/ml) in PBS + 0,1% BSA

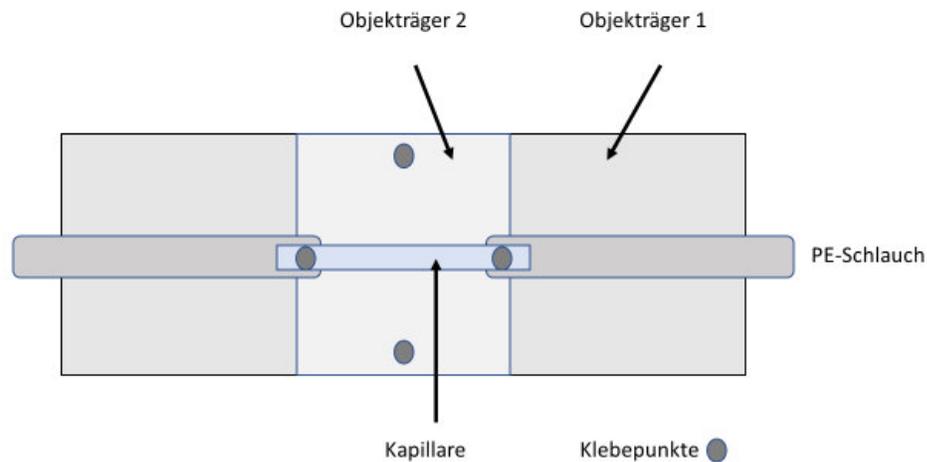
Kontrollkammern:

- 1) PBS + 0,1% BSA

Das Beschichten erfolgte, indem die Kapillaren in den gemischten Ansatz getaucht wurden, bis sie sich vollgesogen hatten. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen entstehen und die Kapillare vollständig beschichtet ist. Anschließend wurden die Objektträger (ca. 76 x 26 x 1 mm, Thermo, Deutschland) beschriftet und beklebt. Damit die Kapillare auf einem geraden Untergrund liegt, wurde eine Art Sockel gebaut, indem auf einen Objektträger mittig ein Rechteck eines zweiten Objektträgers geklebt (2-Komponentenkleber, UHU) wurde. Die aufgeklebten Objektträger wurden mittels eines Glasschneiders geschnitten. Die Kapillaren wurden mitsamt Einlauf- und Auslaufschlauch auf diesen Sockel geklebt. Damit das eigentliche Sichtfeld nicht beeinträchtigt wurde, wurde die Kapillare nur am Übergang zu den Schläuchen mit Sockel verklebt. Hiermit konnte gleichzeitig dafür gesorgt werden, dass die Schläuche die Kapillare dicht verschließen. Als Einlaufschlauch wurde ein längeres Stück eines Perfusionsbestecks (ca. 10-15cm, 23G, 0,6 mm; ECOFLO®) mit Adapter zum Anschließen der Spritze gewählt, der Auslauf sollte nicht länger als 5cm sein und war aus demselben Material.

Drei Stunden nach Beschichtung wurden die fertigen Flusskammern und Schläuche mit Casein 5% (casein from bovine milk, Sigma, Deutschland) gespült und für 2h inkubiert, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Vor Nutzung der Flusskammern am Versuchstag wurden die Kammern auf Raumtemperatur gebracht und mit NaCl 0,9% gespült. Falls die Kammer zu diesem Zeitpunkt undicht war, wurde sie nicht für den Versuch verwendet.



**Abb. 8: Schematische Darstellung einer Flusskammer.**

In dieser Abbildung ist der Aufbau einer Flusskammer dargestellt. Der zweite Objektträger wird auf den ersten Objektträger mit 2-Komponentenkleber geklebt. Die Kapillare wird an den Übergängen zum PE-Schlauch auf den zweiten Objektträger geklebt.

#### 4.4.2 VORBEREITUNG DER ZELLEN

Die ausdifferenzierten Hoxb8-SCF neutrophilen Granulozyten wurden aus den Flaschen gepoolt, abzentrifugiert bei 300g für 5 Minuten, auf eine Konzentration von 500.000 Zellen/ml eingestellt und in einem 50ml Falcon im Inkubator für eine Stunde inkubiert. Ungefähr 1-1,5ml der Zellsuspension wurden in 2ml Spritzen (BD) aufgenommen und vor dem Einspannen in die Pumpe noch mehrfach geschwenkt. Für jede Kammer wurde eine neue Spritze verwendet.

#### 4.4.3 FLUSSKAMMER- MIKROSKOPIE

Ein repräsentatives FOV wurde über 10 Minuten mit einem Olympus BX51WI Mikroskop mit Wasserimmersionsobjektiv (20x, 0.95 NA, Olympus) und angeschlossener CCD

Kamera (CF8/1, Kappa, Germany) beobachtet und 6min hiervon aufgezeichnet. Nach Ablauf der Zeit wurde das Video und die Pumpe gestoppt.

#### 4.4.4 AUSWERTUNG DER FLUSSKAMMEREXPERIMENTE

---

Ausgewertet wurde die Anzahl rollender Zellen, die Rollgeschwindigkeit und die Adhäsion per FOV. Für die Anzahl der rollenden Zellen per FOV wurde das FOV für eine Minute beobachtet und die rollenden Zellen ausgezählt. Als adhärent galt eine Zelle, wenn sie sich länger als 30s innerhalb der betrachteten Minute an der gleichen Stelle im FOV befand.

Die Rollgeschwindigkeit wurde mittels Image J ermittelt. Die zurückgelegte Strecke der einzelnen Zellen wurde von Bild zu Bild ermittelt und eine Durchschnittsgeschwindigkeit errechnet. Um eine mittlere Geschwindigkeit der Zellen zu erhalten wurde der Mittelwert von 10 Neutrophilen und deren Durchschnittsgeschwindigkeit bestimmt.

#### 4.5 DURCHFLUSSZYTOMETRIE

---

##### 4.5.1 DIFFERENZIERUNG DER HOXB8-SCF ZELLEN

---

Die Ausreifung der Hoxb8-SCF Neutrophilen wurde anhand der Expression von GR-1, Ly6G, CD11b und c-kit beurteilt. Hierbei wurden jeweils undifferenzierte Hoxb8-SCF Zellen mit bereits zur Differenzierung angesetzten Zellen an Tag 3 und Tag 6 verglichen. Zusätzlich wurde noch zwischen lebenden und toten Zellen mittels 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD), einem Marker, welcher eine hohe Bindungskapazität an DNA hat und nur von toten Zellen aufgenommen wird, unterschieden.

Die Proben wurden mit Antikörpern gegen Ly6G, GR-1, c-kit, CD11b und CD115 für 20min im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit FACS Puffer und einer fünfminütigen Zentrifugation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Danach erfolgte eine Resuspension der Zellen in 300µl FACS Puffer.

Die Messung erfolgte mit einem Beckman Coulter Gallios™ Flow Cytometer und die Analyse mit Kaluza® Flow Analysis Software (Beckman Coulter).

#### 4.5.2 OBERFLÄCHENPROTEINE AUF DIFFERENZIIERTEN HOXB8-SCF ZELLEN

---

Zur Charakterisierung der Hoxb8-SCF Neutrophilen wurde die Expressionshöhe der Oberflächenantigene  $\alpha$ L-Integrin (LFA-1, CD11a),  $\alpha$ M-Integrin (Mac-1, CD11b), CXCR2 (CD182), CD18, CD44, PSGL1 (CD162) und L-Selektin (CD62L) mit der Expression der genannten Oberflächenantigene von Ly6G<sup>+</sup> neutrophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut und Knochenmark von C57Bl/6 WT Mäusen verglichen. Die Oberflächenantigene wurden mit den in Abschnitt 3.5.1 aufgeführten Antikörpern detektiert.

Zur Gewinnung von Neutrophilen aus C57Bl/6 WT Mäusen wurden die Mäuse für die Blutentnahme narkotisiert. Die Blutentnahme bei den Mäusen erfolgte retroorbital. Es wurden ca. 500 $\mu$ l Blut mit einer Glaskapillare entnommen und in einem EDTA Blutröhrchen aufgefangen. Anschließend wurden die Mäuse für die Entnahme des Knochenmarks per Genickbruch getötet. Für die Gewinnung Neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark wurden Femur und Tibia entnommen und in einer Petrischale mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Knochen an beiden Enden eröffnet und das Knochenmark wurde mit einer Kanüle (20G) und kaltem PBS aus dem Knochenmarkskanal über einen Cell Strainer (40 $\mu$ m) in ein 50ml Falcon gespült, bis kein Mark mehr in den Knochen zu sehen war. Die Suspension wurde auf 20ml mit PBS aufgefüllt, danach erfolgte ein Waschschrift mit 5-minütiger Zentrifugation bei 4°C. Die Probenaufbereitung und Messung erfolgten wie in 4.5.1 beschrieben.

#### 4.5.3 TRANSDUKTIONSEFFIZIENZ VON A20-GFP IN HOXB8-SCF ZELLEN

---

Die Transduktionseffizienz und Selektion über Puromycin wurde anhand der Expression von GFP gemessen.

#### 4.5.4 REINHEIT DER HUMANEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

---

Neutrophile Granulozyten, fetal und adult, wurden anhand ihrer Oberflächenexpression von CD15 und CD66 charakterisiert. Hierfür wurden 100 $\mu$ l der aufgereinigten Zellsuspension, wie in 4.1 beschrieben, verwendet. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD15 und CD66 für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert und anschließend mit HBSS gewaschen. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und

die Zellen in 100µl FACS Puffer resuspendiert. Die Probe wurde mit einem Beckman Coulter Gallios™ Durchflusszytometer gemessen.

Proben mit einer Reinheit von über 95% neutrophilen Granulozyten (CD15 und CD66 doppelt positiv) wurden für die RNA Isolation und Real Time PCR verwendet. Proben mit nicht ausreichender Reinheit wurden verworfen.

## 4.6 RNA UND DNA

---

### 4.6.1 RNA ISOLATION

---

Nach Aufreinigung der neutrophilen Granulozyten (siehe 4.1) wurden die Zellen in RLT Puffer (Teil des RNeasy Mini Kits®) mit Zugabe von β-Mercaptoethanol lysiert. Je nach Zellmenge wurden die Zellen in RLT Puffer (350µl +3,5µl β-Mercaptoethanol oder ab  $>5 \times 10^6$  Zellen in 600µl+6µl β-Mercaptoethanol) aufgenommen. Anschließend konnte das Lysat entweder sofort weiterverarbeitet oder bis zu Weiterverarbeitung bei -80°C eingefroren werden.

Für die Isolation der RNA wurde das RNeasy Mini Kit® von Qiagen verwendet. Die Isolation erfolgte gemäß des Hersteller-Protokolls. Zunächst wurde das Lysat über eine Shredder-Säule homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Zugabe von 70-prozentigem Ethanol. Danach folgten einige Waschschrte mit unterschiedlicher Zentrifugationsdauer und -stärke, um bestehende Verunreinigungen zu entfernen. Die isolierte RNA wurde in 20µl Nuclease-freiem Wasser eluiert und in einem autoklavierten Eppendorf-Röhrchen (1,5ml) auf Eis gelagert. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die RNA bei -80°C gelagert.

### 4.6.2 MESSUNG DER RNA-KONZENTRATION

---

Die Messung der RNA-Konzentration erfolgte per Nanodrop 2000® und dazugehöriger Software. Hierbei erfolgt zunächst eine Blanko-Messung mit Nuklease-freiem Wasser zur Kalibrierung des Geräts. Anschließend wurde ein Mikroliter des Eluats verwendet, um die Konzentration zu bestimmen. Das Gerät misst über ein Absorptionsspektrum von 190-840nm Wellenlänge. RNA sollte eine maximale Absorption bei ca. 260nm haben. Um

mögliche Verunreinigungen auszuschließen, wird ein Quotient von 260/280 und 260/230nm bestimmt, der bei reiner RNA in beiden Fällen über 2 liegen sollte.

#### 4.6.3 REVERSE TRANSKRIPTION

Für die angestrebte PCR musste nun die RNA in komplementäre sogenannte cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wurde der High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® von Applied Biosystems™ verwendet. Pro Reaktion wurden 12µl RNA mit 8µl Master-Mix in ein PCR-Röhrchen pipettiert und auf Eis bis zur Transkription gelagert.

**Tab. 6: Bestandteile und Volumina pro Reaktion der reversen Transkriptase**

	Volumen (µl)
10x RT Puffer	2,0
25xdNTP Mix (100mM)	0,8
10x Random Primers	2,0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0
Nuklease freies Wasser	2,2
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>8</b>

Die Transkription erfolgte mit einem TAdvanced PCR Cycler von Biometra in vier Schritten gemäß Protokoll des Kits.

**Tab. 7: Schritte der reversen Transkription**

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
<b>Temperatur</b>	25°C	37°C	85°C	4°C
<b>Zeit</b>	10min	120min	5min	-

Zuletzt wurde die cDNA Konzentration mittels Nanodrop bestimmt und eine Konzentration von 100ng/µl eingestellt. Die fertigen Proben wurden bei -20°C gelagert.

#### 4.6.4 POLYMERASE-KETTENREAKTION

---

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ermöglicht die Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz *in vitro* (Mullis, 1990).

Hierbei kann man die Standard PCR von der so genannten quantitativen real-time (Echtzeit) PCR (qRT-PCR) unterscheiden, die eine Quantifizierung des PCR Produkts bei jedem Amplifikationszyklus ermöglicht.

#### 4.6.5 REAL-TIME PCR

---

Die umgeschriebene cDNA (siehe 4.6.) wurde für die qRT-PCR verwendet. Diese wurde mit einem StepOne Real Time PCR System von Thermo Fisher Scientific und TaqMan™ Gene Expression Assays und dem TaqMan™ Gene Expression Master Mix von Life Technologies durchgeführt.

Die Quantifizierung des PCR Produkts bei jedem Amplifikationszyklus wird durch eine Fluoreszenzmessung ermöglicht, je höher das Fluoreszenzsignal, desto größer ist auch die Menge an produzierter DNA.

Mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte sequenz-spezifische Oligonukleotide der Ziel-DNA werden TaqMan-Sonden genannt, welche in unserem Labor für die Real-Time PCR verwendet wurden. Sie werden mit einem Donor-Fluorochrom (Reporter), und einem Akzeptor-Fluorochrom (dark quencher) markiert. Bei intakter Taqman-Sonde stehen Donor- und Akzeptor-Fluorochrom in räumlicher Nähe zueinander und somit absorbiert das Akzeptor-Fluorochrom die Fluoreszenz des Reporters und die Energie wird als Hitze freigegeben.

Durch Bindung der Sonde an die Zielsequenz, wird durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase die Sonde hydrolysiert. Dadurch erfolgt eine räumliche Trennung des Donor- und Akzeptor-Fluorochroms, so dass der dark quencher die Fluoreszenz des Reporters nicht mehr absorbieren kann und seine Energie als Fluoreszenz emittiert wird. Diese Fluoreszenz des Reporter-moleküls kann nach jedem Zyklus gemessen werden. Mit Zunahme der Amplifikate entsteht somit ein stärkeres Fluoreszenzsignal. (Arnemann, 2019).

Um die Expression eines bestimmten Transkripts bestimmen zu können, muss dieses mit einem Transkript eines so genannten house keeping gene (HKG) in Vergleich gesetzt

werden, das in jeder der Zelle des Organismus unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen exprimiert wird. So kann sichergestellt werden, dass die Amplifikation technisch korrekt funktioniert. Hierfür wurden Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Actin B verwendet.

Für jeden Probanden wurden Triplikate der gleichen Probe angesetzt. Als Negativ-Kontrolle wurde Wasser verwendet. Die Daten, darunter auch der threshold cycle (Ct), welcher dem ersten messbaren PCR Produkt entspricht, wurden mit der StepOne Plus Software und Excel analysiert. GAPDH und Actin B wurden als interner Standard zur Normalisierung verwendet. Die Ermittlung der relativen Genexpressions-Unterschiede erfolgte mittels der  $2^{-(CT(HKG) - CT(GOI))}$  Methode.

Der  $\Delta Ct$  Wert beschreibt die Differenz zwischen dem Ct-Wert der Probe des Zielgenes und dem Ct des HKG. Die Formel  $R = 2^{-\Delta Ct}$  ermöglicht die Berechnung der relativen Expressionsunterschiede zwischen zwei Proben. Bei der Verwendung von TaqMan Primern geht man von einer 100%-igen Effizienz der Real-Time PCR aus.

**Tab. 8: Bestandteile und Volumina pro Reaktion der Real-Time PCR**

	Volumen in $\mu$ l
TaqMan Gene Expression Master Mix	10
TaqMan Gene Expression Assay	1
cDNA (100ng/ $\mu$ l)	2
H <sub>2</sub> O	7
<b>Gesamtvolumen pro Reaktion</b>	<b>20</b>

**Tab. 9: Schritte der real-time PCR und Dauer**

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
UDG Inkubation	50°C	2 min	
AmpliTaQ Gold, UP Enzymaktivierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	40
Annealing/Elongation	60°C	1 min	40

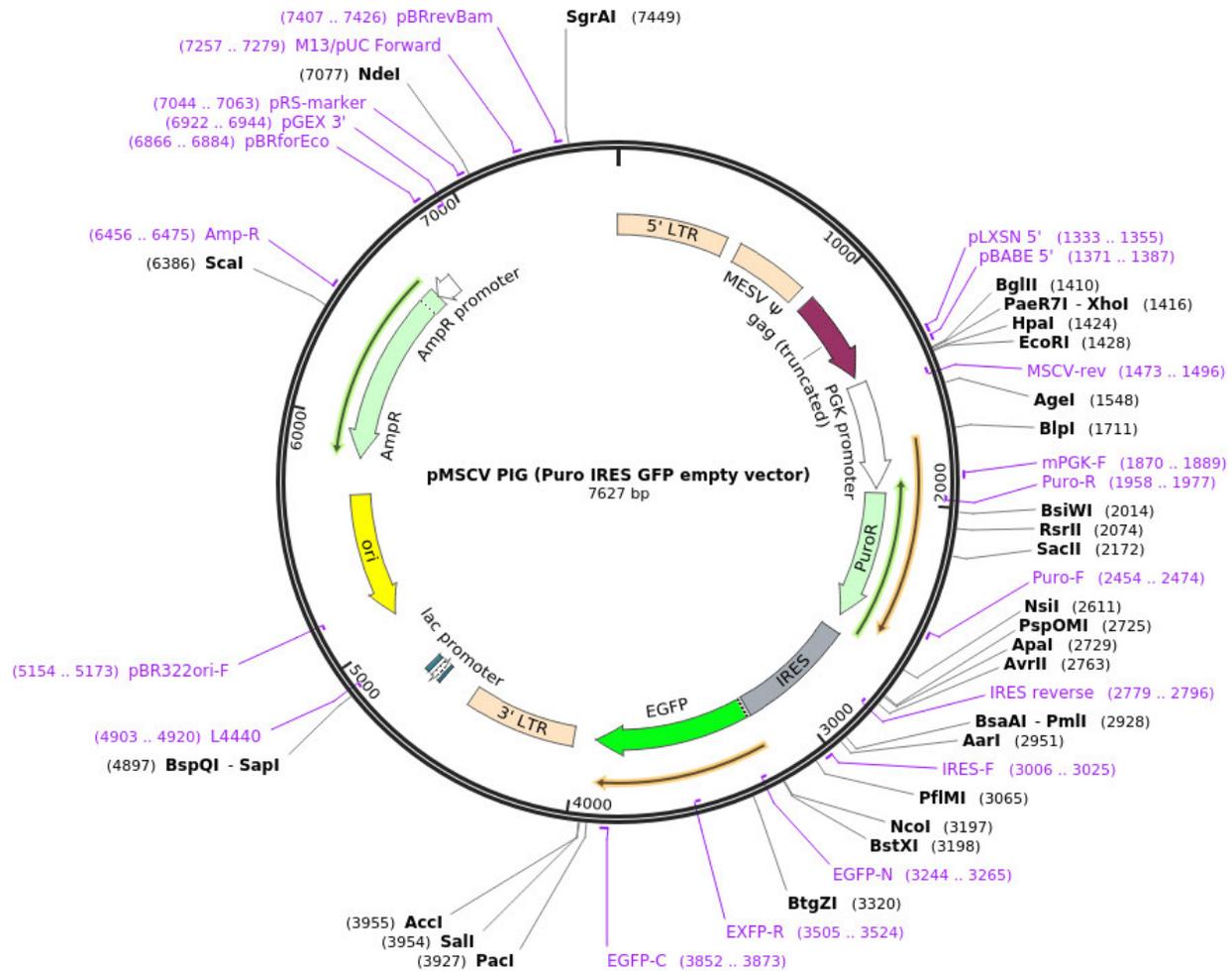
#### 4.6.6 RETROVIRALE TRANSDUKTION VON HOXB8-SCF ZELLEN

---

Die retrovirale Transduktion von Hob8-SCF Zellen erfolgte in Zusammenarbeit mit Melanie Salvermoser aus der AG Walzog. Die Plasmidaufreinigung und Klonierung wurden von ihr durchgeführt. Die verwendeten Materialien und Virus-produzierenden Zellen wurden uns freundlicherweise von der AG Walzog bereitgestellt. Die retrovirale Transduktion erfolgte nach einem in der AG Walzog etablierten Protokoll, das sich insgesamt über sieben Tage erstreckt.

Abb. 9 ist eine schematische Darstellung des murinen stem cell virus (pMSCV) Vektor-Plasmids. Hierbei handelt es sich um einen retroviralen Leer-Vektor in den Zielgene an verschiedenen Stellen eingebaut werden können.

Dieser Vektor ermöglicht eine Selektion der erfolgreich transduzierten Zellen durch eine Antibiotikaresistenz (Puromycin) und zusätzlich über Fluoreszenzmarkierung mit EGFP.



**Abb. 9: Schematische Vektorkarte von pMSCV PIG (Puro IRES EGFP empty vector). Übernommen von: <http://n2t.net/addgene:21654>.**

Der Vektor enthält ein Puromycin Resistenzgen, EGFP Gen als Reporter und eine IRES Region, welche für internal ribosomal entry site steht. Das zu klonierende Gen wird meist vor die IRES gesetzt und das Reportergen folgt danach.

#### 4.6.7 VIRUSPRODUKTION UND TRANSDUKTION

Tag 1: Zunächst wurden die HEK239T- Zellen in einer 6-Well Platte mit einer Zellzahl von 300.000-500.000/Well in 2ml Medium (RPMI + 10% FCS+ 25mM HEPES) ausplattiert und bis zum nächsten Tag im Inkubator bebrütet.

Tag 2: Es erfolgte ein Medium Wechsel ohne die Zugabe von 25mM HEPES. Anschließend wurde die Transfektion durchgeführt.

Für jedes Well wurde der folgende Transfektions-Mix vorbereitet:

250 µl OPTIMEM I (Invitrogen)  
+ 12 µl Lipofectamine 2000 (Invitrogen)

Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur

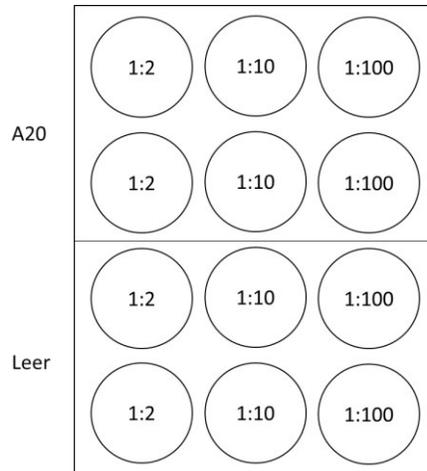
250 µl OPTIMEM I (Invitrogen)  
+ 1 µg A20-EGFP oder Leervektor  
+ 2 µg pVSV-G (Envelope)  
+ 3 µg pCMV ΔR8.9 (Package)

Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur

Beide Ansätze wurden dann miteinander vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Pro Well wurden dann 500µl langsam zu den Zellen dazu pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von sechs Stunden fand ein erneuter Medium Wechsel ohne HEPES statt.

Tag 3: Bebrütung der Zellen ohne weiteren Medium Wechsel.

Tag 4: Der von den HEK293T-Zellen produzierte virushaltige Überstand wurde abpipettiert (ein Überstand für A20-EGFP und einen für den Leervektor) und mit einem 0,45µm Sterilfilter steril filtriert. Die HEK293-T Zellen erhielten neues Medium (RPMI mit 1% Penicillin/Streptomycin+ 25mM HEPES+10%FCS). Die zu transduzierenden undifferenzierten Hoxb8-SCF Zellen wurden nun in eine 12-Well Platte mit einer Zellzahl von 200.000 pro Well in 500µl Medium (Hoxb8-SCF Medium) auf die einzelnen Wells verteilt. Nun wurde der virushaltige Überstand in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen hinzugegeben. Das Endvolumen jedes Wells betrug 1ml. Die Zellen wurden anschließend für 72h bebrütet.



**Abb. 10: Ansicht einer 12-Well Platte mit den angesetzten Verdünnungen.**

Tag 5: Es erfolgte eine erneute Gewinnung von Überstand der HEK293T- Zellen und die Wiederholung der Infektion, wie an Tag 4.

Tag 7: Die einzelnen Ansätze wurden pro Plasmid zusammengeführt und für 5min bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in Hoxb8-SCF Medium resuspendiert und in eine 25cm<sup>2</sup> Flasche überführt.

Sobald die Zellen gut angewachsen waren, wurde zur anschließenden Selektion Puromycin (1µg/ml) hinzugefügt und die Zellen wie oben beschrieben kultiviert.

Der Erfolg der Transduktion und somit der Überexpression von A20 in den Hoxb8-SCF Zellen erfolgte per Durchflusszytometrie. Zellen, die erfolgreich transduziert wurden, exprimierten ebenfalls EGFP.

#### 4.7 STATISTISCHE ANALYSE

---

Alle Daten wurden mit Graph Pad Prism 9 Software analysiert. Für Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde ein T-test (ungepaart) oder ein Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Für multiple Vergleiche wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit einer Sidak-Korrektur durchgeführt. Ein p-Wert < 0.05 wurde als statistisch signifikant bewertet.

## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 ADHÄSIONSUNTERSCHIEDE IN ABHÄNGIGKEIT VOM GESTATIONSALTER IN VIVO

Ziel dieses Experiments war es, herauszufinden, ob neutrophile Granulozyten zu unterschiedlichen Gestationszeitpunkten funktionelle Unterschiede unter Inflammationsbedingungen zeigen. Hierfür verwendeten wir die Intravitalmikroskopie an murinen Dottersackgefäßen.

Untersucht wurde die Anzahl adhärenter Zellen am Gefäßendothel unter Inflammations- und Kontrollbedingungen in Abhängigkeit des Gestationsalters (E14.5 und E17.5).

Hierfür wurden schwangere WT-Mäuse wie in 4.3.2 beschrieben präpariert. Die Inflammation wurde mit intrauteriner Injektion von 100µg LPS induziert, die Kontrollgruppe erhielt 100µl NaCl.



**Abb. 11: Präparation des Dottersacks und Positionierung.**

Links: rechtsseitiger Flankenschnitt mit Exposition zweier Feten bei noch intakter Uterusmuskulatur. Rechts: Exponierter Fetus umhüllt vom Dottersack in einer mit Silikon gefüllten Petrischale. Um diese Exposition zu erreichen, musste die Uterusmuskulatur durchtrennt werden.

Mikroskopiert wurden die beiden Feten zwischen denen die Injektion mit entweder LPS oder NaCl durchgeführt wurde. Die Anzahl der verwendeten Mäuse und auf Video aufgezeichneten Gefäße sind in Tab. 10 dargestellt.

**Tab. 10: Übersicht intravitralmikroskopischer Experimente im Dottersack**

Gestationsalter	Bedingung	Mäuse (n)	Anzahl Gefäße (n)	Gefäßdurchmesser Mittelwert in $\mu\text{m} \pm \text{SD}$
E14.5	LPS	3	8	55,4 $\pm$ 10
E14.5	NaCl	4	7	47,9 $\pm$ 7
E17.5	LPS	5	9	48,6 $\pm$ 14
E17.5	NaCl	6	11	46,9 $\pm$ 15

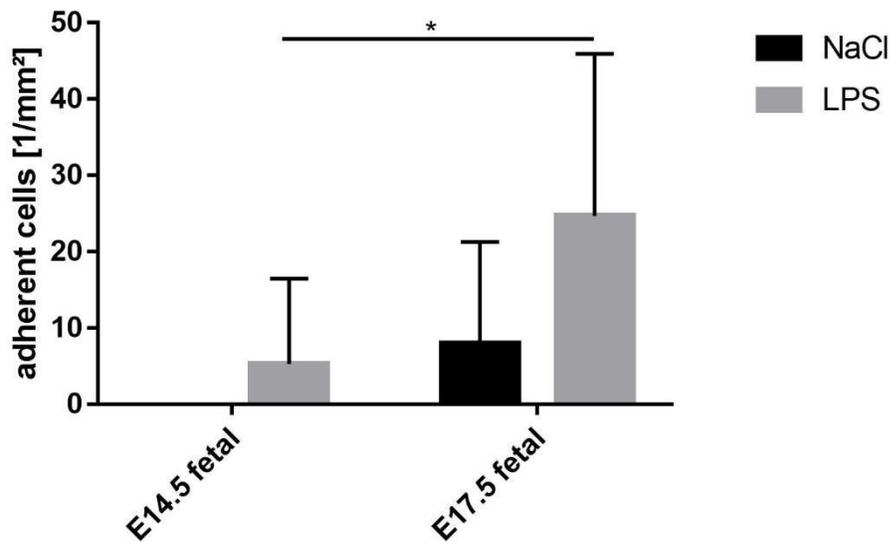
\* Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gefäßdurchmessern für die verschiedenen Gruppen (ANOVA mit Sidak-Korrektur).

Abb. 12 zeigt den Mittelwert adhärenter Zellen pro  $\text{mm}^2$  am Gefäßendothel zu den beiden Gestationszeitpunkten unter Kontroll- und Inflammationsbedingung.

In der Kontrollbedingung waren zum Gestationszeitpunkt E14.5 keine adhärenen Zellen am Gefäßendothel nachweisbar. Zum späteren Gestationszeitpunkt zeigten sich im Vergleich im Mittel 6,5 Zellen/ $\text{mm}^2$ . Unter Inflammationsbedingung zeigten sich zu beiden Gestationszeitpunkten Zellen am Gefäßendothel. Im Mittel zeigten sich 5,3 Zellen/ $\text{mm}^2$  zum Zeitpunkt E14.5 und 24,7 Zellen/ $\text{mm}^2$  zum Zeitpunkt E17.5.

Es waren somit deutlich mehr adhärenente neutrophile Granulozyten über 30sec an der Gefäßwand bei einem Gestationsalter von 17.5 Tagen vorzufinden als bei einem Gestationsalter von 14.5 Tagen.

Des Weiteren deutet die fehlende Adhäsion in der Kontrollbedingung bei E14.5 darauf hin, dass das reine chirurgische Trauma keine gesteigerte Leukozytenrekrutierung und Auswanderung in diesem Gestationsalter auslöst. Selbst unter Inflammationsbedingungen fällt diese deutlich geringer aus als zum späteren Gestationszeitpunkt von E17.5.



**Abb. 12: Adhäsion in Abhängigkeit von Gestationsalter und Experimentalbedingung.**

Anzahl adhärenter Zellen/mm<sup>2</sup>, schwarze Balken Kontrollbedingung NaCl, graue Balken LPS (Mittelwert ± standard error of mean (SEM), \* p < 0.05, 2way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test).

## 5.2 VALIDIERUNG DER TRANSKRIPTOMANALYSE

Die Transkriptomanalyse wurde durchgeführt, um zu sehen, ob die *in vitro* bereits vorgefundenen funktionellen Unterschiede (Nussbaum et al., 2013) der neutrophilen Granulozyten in Abhängigkeit von Gestationsalter beim Menschen auch auf Genexpressions-Ebene bestehen.

Diese Hypothese bestätigte sich insofern, dass sich einige Unterschiede in der Expression bestimmter Gene zwischen Neutrophilen adulter Probanden und neugeborener Probanden bzw. Frühgeborenen zeigten. Hierbei wurden folgende differenziell regulierten Gene identifiziert, die in Neugeborenen hochreguliert waren:

*TNFAIP3*: Das Genprodukt, auch bekannt als A20, ist ein zytoplasmatisches Zinkfingerprotein mit Ubiquitin-modulierender Funktion, das die NF-κB Aktivität inhibiert und den durch TNF-α mediierten programmierten Zelltod verhindert (Lee, 2000).

*IRAK3*: Das Genprodukt, auch bekannt als IRAK-M, inhibiert TLR-Signale und wirkt somit anti-inflammatorisch (Kobayashi, Hernandez, Galán, Janeway, Medzhitov & Flavell, 2002)

*IL1R2*: Das Genprodukt ist ein Rezeptor für Interleukin 1, der als löslicher Rezeptor auch die Aktivität des IL-1 R1 blockiert (Uchikawa et al., 2015).

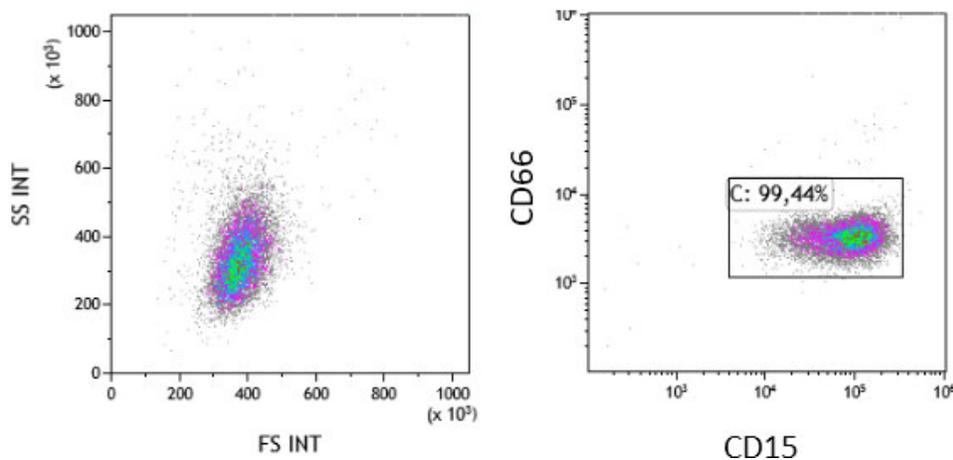
*IL6ST*: Das Genprodukt, auch bekannt als GP130, ist Teil einer Signalkaskade, die von vielen Zytokinen genutzt wird. Gp130 erleichtert die Bindung von IL-6 an dessen Rezeptor (Hibi et al., 1990)

*IL10*: Das Genprodukt ist ein anti-inflammatorisches Zytokin, das von Immunzellen produziert wird. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Immunantwort (Ip, Hoshi, Shouval, Snapper, & Medzhitov, 2017).

Die differenzielle Regulation dieser Zielgene soll im Folgenden mittels qRT-PCR verifiziert werden.

### 5.2.1 REINHEITSPRÜFUNG DER NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Nach Aufreinigung der neutrophilen Granulozyten wie in 4.1 beschrieben wurde die Reinheit mittels FACS Analyse überprüft. Proben mit einer Reinheit von über 95% neutrophiler Granulozyten (CD15 und CD66 doppelt positiv) wurden weiterverwendet. Abb. 13 stellt exemplarisch die Gating-Strategie der Durchflusszytometrie dar.

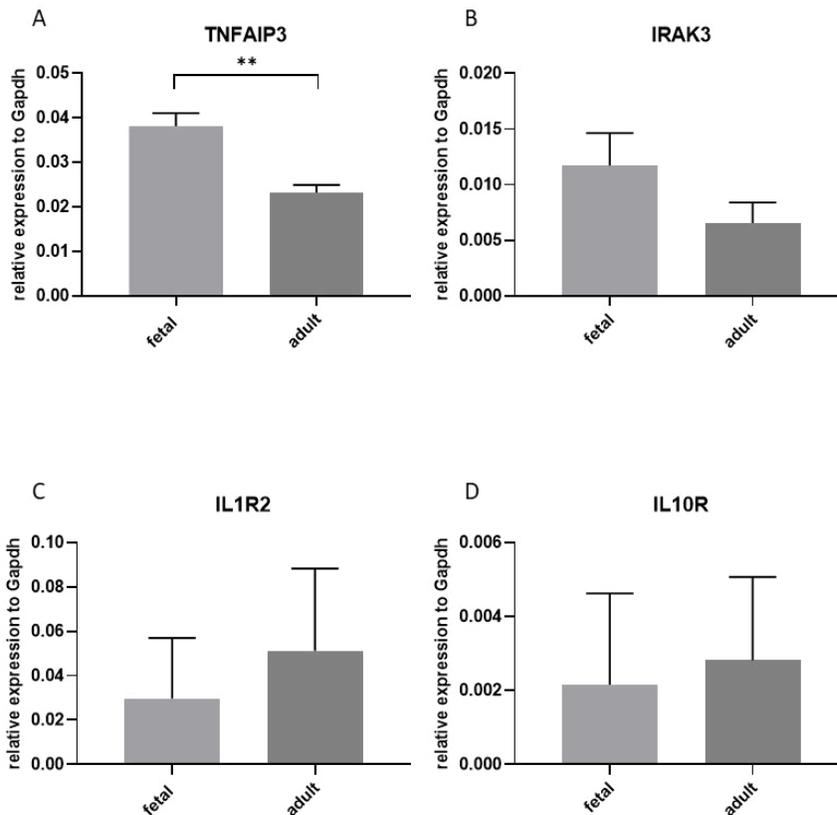


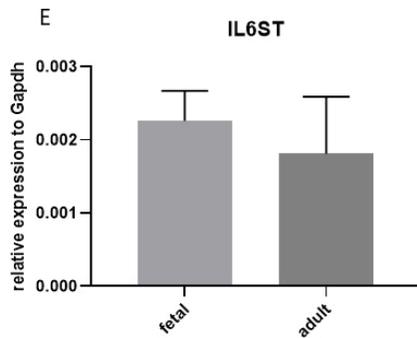
**Abb. 13: Gating-Strategie zur Reinheitsüberprüfung der aufgereinigten neutrophilen Granulozyten.**

Links abgebildet ist der Vorwärts (FS) und-Seitwärts-Scatter (SS) der die Zellen nach Größe und Granularität aufzeichnet. Rechts im Bild zeigt sich eine sowohl für CD66 wie auch CD15 positive Population.

### 5.2.2 EXPRESSION DER ZIELGENE IN ADULTEN UND NEUGEBORENEN NEUTROPHILEN GRANULOZYTEN

Die Transkriptomanalyse zeigt eine veränderte Expression der in Tabelle 11 aufgeführten Gene in Neugeborenen im Vergleich zu Adulten. Um zu validieren, ob diese Expression auch mittels Einzelmessung der jeweiligen mRNA existiert, wurden drei adulte Proben und drei Proben von Neugeborenen (>37 Wochen GA) mittels Real-Time PCR untersucht. Das Ergebnis der Transkriptomanalyse bestätigt sich wie in Abbildung 14 A und B dargestellt für *TNFAIP3* und tendenziell auch für *IRAK3* per qRT-PCR. Für die Zielgene *IL10R*, *IL1R2* und *IL6ST*, dargestellt in Abbildung 14 C, D und E, konnte die veränderte Expression nicht auf RNA-Ebene nachgewiesen werden.





**Abb. 14: Relative Expression der Zielgene (dargestellt sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen).**

A) relative Expression von *TNFAIP3* in Bezug auf GAPDH in adulten und Neugeborenen Neutrophilen Granulozyten, n adult = 3, n fetal =3. B) relative Expression von *IRAK3* in Bezug auf GAPDH, n adult = 3, n fetal =3. C) relative Expression von *IL10R* in Bezug auf GAPDH, n adult = 4, n fetal =4. D) relative Expression von *IL1R2* in Bezug auf GAPDH, n adult = 4, n fetal =4. E) relative Expression von *IL6ST* in Bezug auf GAPDH, n adult = 5, n fetal =4.

### 5.2.3 ZUSAMMENFASSENDER BEURTEILUNG DER ZIELGENE

---

In der durchgeführten real-time PCR ließ sich insbesondere *TNFAIP3* als relevantes Zielgen validieren. Das Genprodukt A20 wirkt anti-inflammatorisch und ist auf mRNA Ebene in fetalen neutrophilen Granulozyten hochreguliert, so dass zu erwarten ist, dass das Genprodukt auch vermehrt produziert wird und eine anti-inflammatorische Wirkung auf die Zelle ausübt. In der Tat zeigte sich in Western-Blot Experimenten, die in unserer AG durchgeführt wurden, dass A20 auch auf Proteinebene in fetalen Neutrophilen hochreguliert ist.

### 5.3 CHARAKTERISIERUNG HOXB8-SCF WILDTYP ZELLEN

---

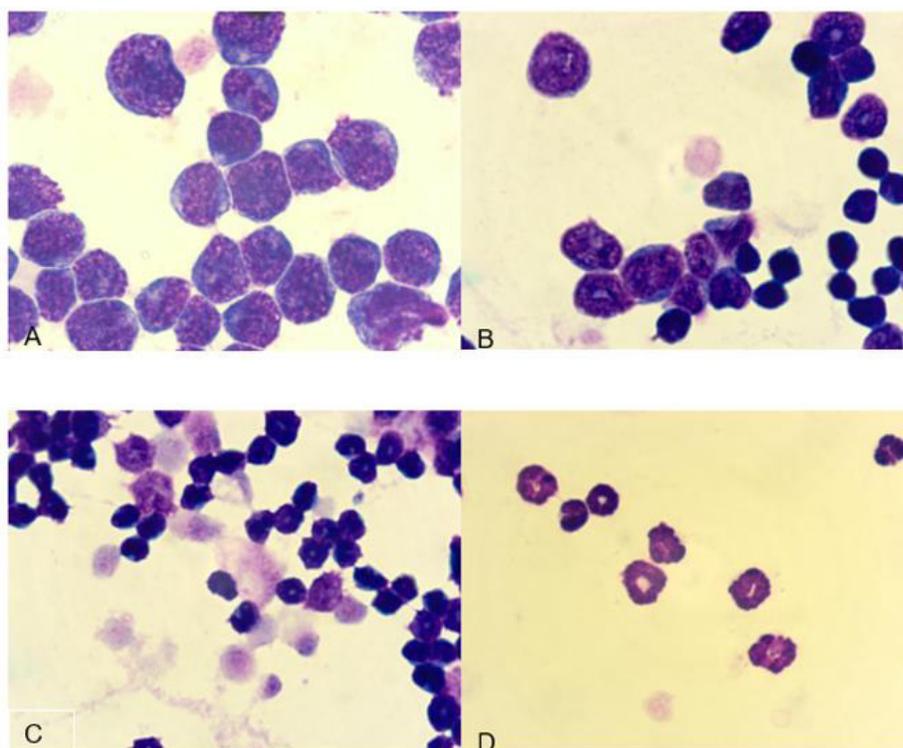
Da fetale Proben nicht uneingeschränkt zugänglich und auch nicht stets verfügbar sind, wurde als Alternativmöglichkeit ein murines Zellsystem mit der Möglichkeit der genetischen Manipulation etabliert, das zur Simulation der fetalen Neutrophilen dienen sollte.

### 5.3.1 MIKROSKOPISCHE DIFFERENZIERUNG MURINER HOXB8-SCF ZELLEN

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben, differenziert. Die morphologische Charakterisierung erfolgte durch Diff-Quick Färbung wie in Kapitel 4.2.7 beschrieben. Diese Färbung entspricht einer Pappenheim Färbung, die typischerweise für Blutausstriche verwendet wird. Kernlose Zellen wie zum Beispiel Erythrozyten erscheinen rosa, Leukozyten-Zellkerne erscheinen rotviolett und Kerne der neutrophilen Granulozyten erscheinen hellviolett.

Erwartungsgemäß erscheinen die Vorläuferzellen an Tag 0 noch deutlich größer als die differenzierten Granulozyten und auch das Kern Plasma Verhältnis verschiebt sich im Verlauf der Differenzierung zugunsten des Plasmas.

An Tag 4 der Differenzierung zeigten sich bereits erste polymorph-kernige Zellen. Die vollständige Differenzierung zu segment-kernigen neutrophilen Granulozyten wurde an Tag 6 erreicht wie in Abb. 14 ersichtlich.

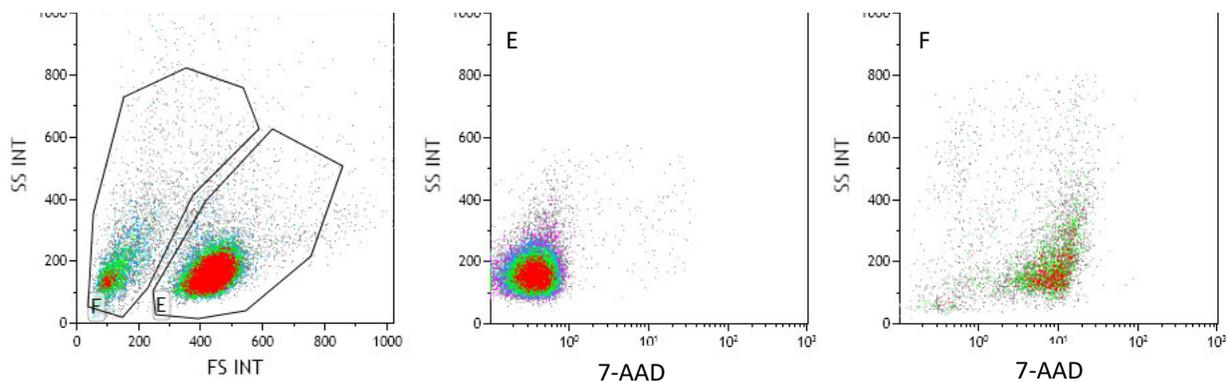


**Abb. 14: Diff-Quick Färbungen dargestellt mit einem Öl-Immersion-Objektiv in 100x Vergrößerung.**

(A) Hoxb8-SCF: undifferenziert an Tag 0, (B) Tag 2: beginnenden Kondensation des Zellkerns, (C) Tag 4: erste differenzierte Zellen sichtbar, (D) Tag 6: vollständig differenzierte murine Hoxb8-SCF neutrophile Granulozyten.

### 5.3.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE CHARAKTERISIERUNG VON HOXB8-SCF ZELLEN

Zur näheren Charakterisierung wurden Hoxb8-SCF Zellen zu unterschiedlichen Differenzierungszeitpunkten (Tag 0, Tag 3 und Tag 6) durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenmarker CD11b und Ly6G, GR-1 untersucht. Zusätzlich wurde der Differenzierungsgrad noch anhand der Expression von c-Kit, einem Marker für die Tyrosinkinase KIT (c-kit) bestimmt. C-Kit wird insbesondere von hämatopoetischen Stammzellen gebildet. Die Vitalität der Zellen wurde anhand von 7-AAD ermittelt. 7-AAD ist ein Fluoreszenzfarbstoff und interkaliert mit DNA.

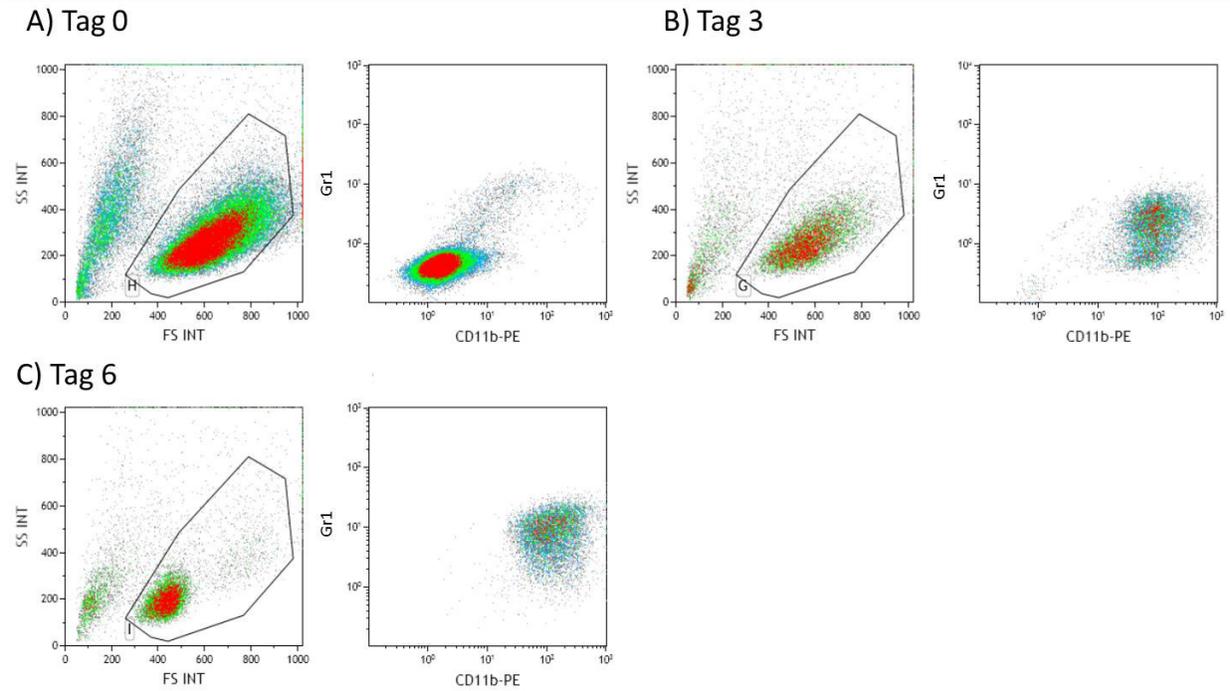


**Abb. 15: Vitalität der undifferenzierten Zellen.**

Die Unterscheidung erfolgte unter Verwendung von 7-AAD, einem Marker, der in tote Zellen eindringen kann, nicht aber lebenden Zellen. Die in Gate E liegenden Zellen sind vital und weisen keine Färbung auf und in Gate F zeigt sich eine hohe Expression von 7-AAD, dementsprechend sind diese Zellen tot.

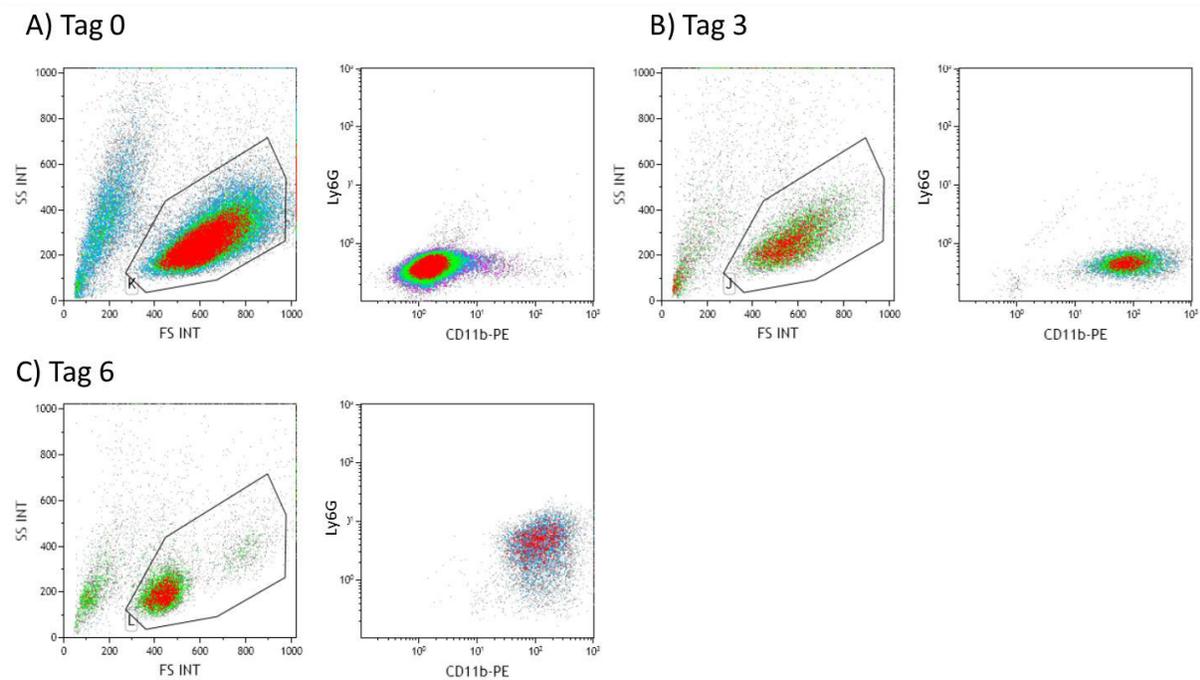
In Abb. 15 wird exemplarisch die Gating-Strategie bezüglich der Vitalität der Zellen dargestellt. Die nachfolgenden Ergebnisse beziehen sich nur auf die lebende Population (Gate E).

Wie in Abb. 16 zu sehen, exprimieren undifferenzierte Hoxb8 SCF Zellen wenig GR-1 und wenig CD11b. Bei myeloiden Vorläuferzellen wird auch noch keine hohe Expression erwartet, diese sollte jedoch mit dem Grad der Differenzierung ansteigen, wie sich auch in Abb. 16 darstellt. An Tag 6 zeigt sich eine deutliche Expression von CD11b und GR-1. CD11b wird von vielen Leukozyten exprimiert. GR-1 kann von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten exprimiert werden.



**Abb. 16: Gr-1 Expression im Laufe der Differenzierung.**

A) undifferenziert, B) an Tag 3 der Differenzierung und C) an Tag 6 der Differenzierung, demnach vollständig differenzierte Zellen.

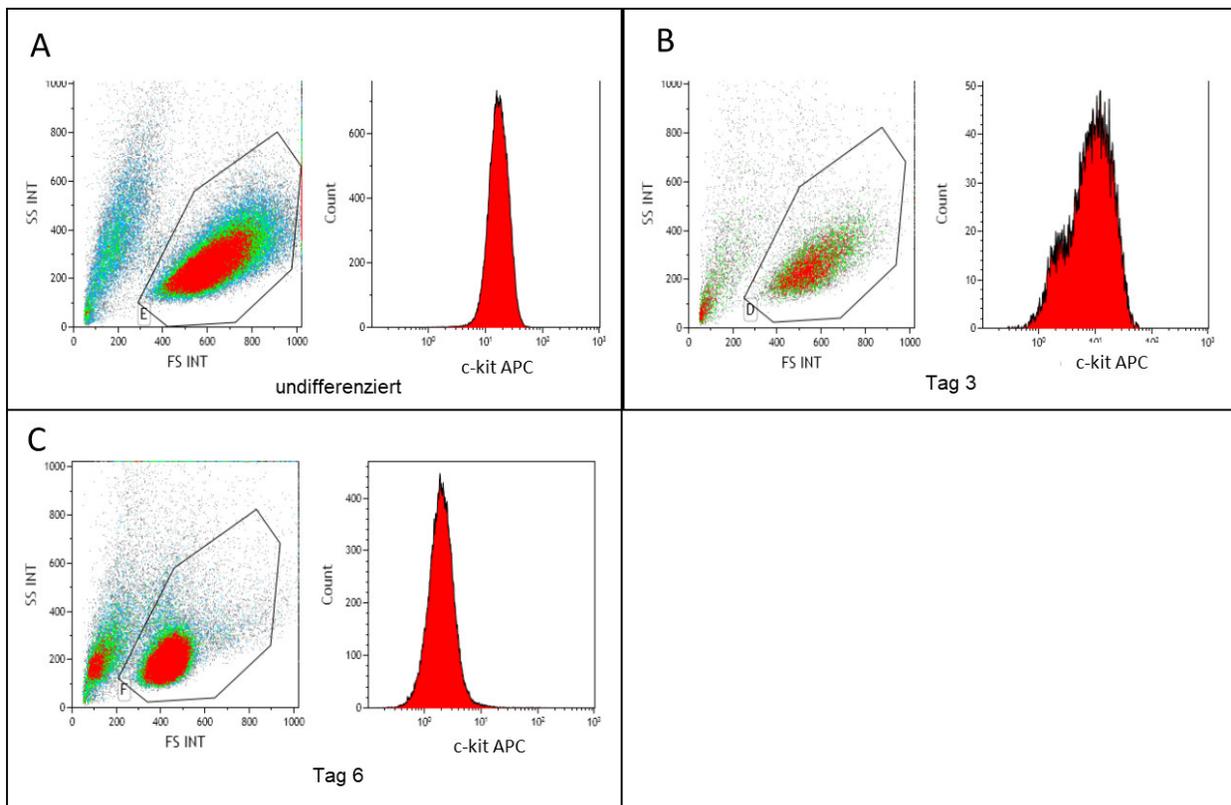


**Abb. 17: Expression von Ly6G während der Differenzierung.**

A) zeigt die Expression an Tag 0, B) an Tag 3 und C) an Tag 6. Betrachtet wurden wieder nur die lebenden Zellen.

Um sicher zu gehen, dass es sich auch um neutrophile Granulozyten handelt, wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen Ly6G angefärbt. Abb. 17 zeigt die Expression des Oberflächenantigens. Mit zunehmender Differenzierung zeigt sich eine erhöhte Expression von Ly6G. Auffällig ist hierbei, dass an Tag 3 nur wenig Zellen bereits Ly6G exprimieren. An Tag 6 zeigen deutlich mehr Zellen eine Expression von Ly6G.

Zuletzt wurde der Differenzierungsgrad der Zellen noch anhand des Oberflächenmarkers c-Kit betrachtet, einem Antigen, das insbesondere auf Stammzellen exprimiert wird. Hierbei zeigt sich deutlich, dass die Zellen im Laufe der Differenzierung ihren Vorläuferzellcharakter verlieren, wie in Abb. 18 dargestellt.



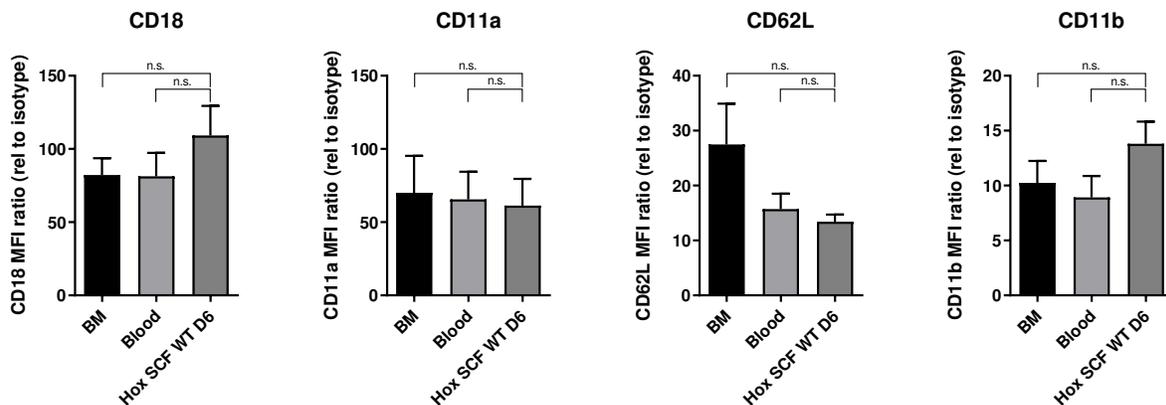
**Abb. 18: Expression von c-Kit (CD117) während der Differenzierung.**

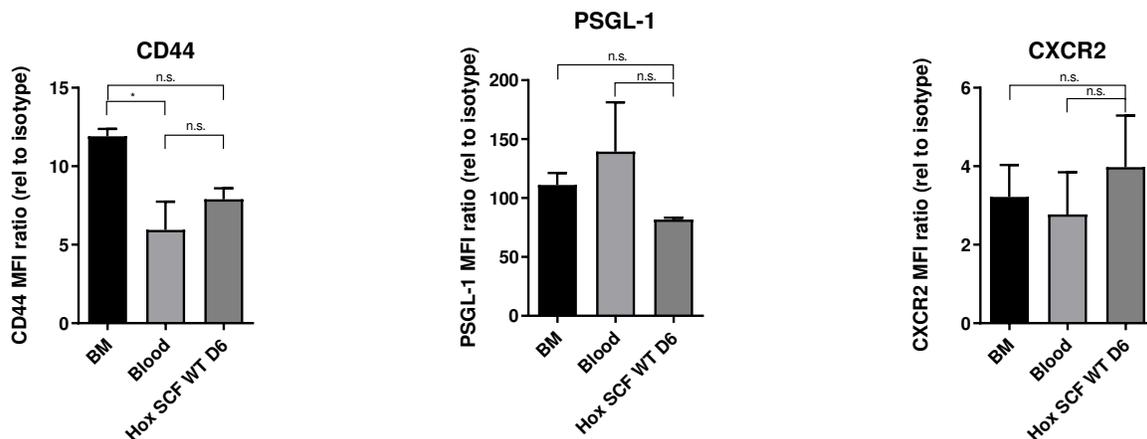
A) Tag 0, B) Tag 3 und C) Tag 6, es zeigt sich eine deutliche Abnahme der c-Kit Expression. Zunehmende Differenzierung und Verlust des Vorläuferzellcharakters.

### 5.3.3 OBERFLÄCHEN-ANTIGEN EXPRESSION DER HOXB8-SCF NEUTROPHILEN

Um Hoxb8-SCF Neutrophile näher zu charakterisieren und um sicherzustellen, dass sie murinen Neutrophilen wirklich ähneln, wurden sie mit Granulozyten aus dem peripheren Blut und aus dem Knochenmark von C57Bl/6 Mäusen im Hinblick auf ihre Expression einiger Oberflächen-Antigenen verglichen. Betrachtet wurden  $\alpha$ L-Integrin (LFA-1, CD11a),  $\alpha$ M-Integrin (Mac-1, CD11b), CXCR2 (CD182), CD18, CD44, PSGL1 und L-Selektin (CD62L).

Diese Moleküle sind wichtig für die Funktion neutrophiler Granulozyten, da sie entscheidend für die Aktivierung, das Rollen und die Adhäsion am Endothel sind. Um Hoxb8-SCF Zellen als „Neutrophilen-ähnliche“ Zellen nutzen zu können, sollten sie eine ähnliche Expression dieser Oberflächenmolekülen zeigen, wie murine Neutrophile.





**Abb. 19: Oberflächen-Antigen Expression adhäsions-relevanter Moleküle auf Hoxb8-SCF Neutrophilen und WT Neutrophilen aus dem peripheren Blut und Knochenmark.**

Mean fluorescence intensity (MFI) ratio (relative to isotype control) von CD11a, CD11b, CD18, CXCR2, CD44, PSGL1, CD62L (n=3, Mittelwert  $\pm$  SEM,  $p < 0,01$ , ungepaarter t-Test).

Es zeigte sich bis auf CD44 kein signifikanter Unterschied zwischen Hoxb8-SCF Neutrophilen und den Neutrophilen aus dem peripheren Blut und Knochenmark bezüglich der Oberflächen-Antigen Expression im Hinblick auf adhäsions-relevante Moleküle, wie in Abb. 19 dargestellt. Dies bedeutet, dass Hoxb8-SCF neutrophile Granulozyten eine ähnliche Oberflächen-Antigen Expression haben, wie murine neutrophile Granulozyten und sich als Zellsystem für die Simulation fetaler neutrophiler Granulozyten gut eignen könnten zumindest im Hinblick auf adhäsions-relevante Moleküle.

#### 5.3.4 ROLL- UND ADHÄSIONSVERHALTEN VON WT HOXB8 NEUTROPHILEN

Um zu testen, wie sich Hoxb8-SCF Neutrophile unter Flussbedingungen *in vitro* verhalten, wurden Flusskammerversuche durchgeführt. Der Versuchsaufbau erfolgte, wie in Kapitel 4.4 beschrieben.

Zunächst untersuchten wir, ob Hoxb8-SCF Neutrophile ein ähnliches Rollverhalten zeigen, wie murine Neutrophile aus dem peripheren Blut. Hierfür wurden die Flusskammern entweder mit P- oder E-Selektin beschichtet und das Rollverhalten beobachtet. Die Rollgeschwindigkeit wurde, wie in 4.4.4 beschrieben, ermittelt. Die Anzahl adhärenter Zellen wurde ebenfalls bestimmt. Für murine neutrophile Granulozyten aus dem peripheren Blut wurde bereits beschrieben, dass unter P-Selektin Coating höhere

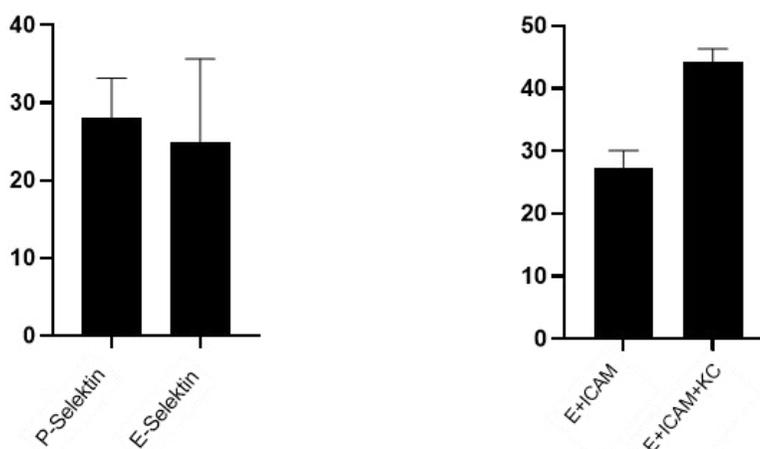
Rollgeschwindigkeiten auftreten als unter E-Selektin Coating (Sperandio, Pickard, Unnikrishnan, Acton, & Ley, 2006), so dass wir bei den Hoxb8-SCF Neutrophilen ein ähnliches Verhalten vermuteten.

Bei Kammern mit P-Selektin Beschichtung zeigte sich eine durchschnittliche Roll-Geschwindigkeit von  $1,79\mu\text{m/s}$  im Vergleich zu E-Selektin Kammern mit einer Durchschnittsgeschwindigkeit von  $0,32\mu\text{m/s}$ . Die Tendenz, dass P-Selektin beschichtete Kammern eher das „schnelle Rollen“ hervorrufen und E-Selektin beschichtete Kammern eher das „langsamere Rollen“ ist also vergleichbar und die Zellen sind sich hierin ähnlich. Des Weiteren wurde nun das Adhäsions- und Roll-Verhalten der Zellen betrachtet, wenn die Kammern zusätzlich zu E-Selektin noch mit ICAM-1 beschichtet wurden. ICAM-1 bindet an LFA 1 und Mac-1 auf neutrophilen Granulozyten und ist beteiligt an der Adhäsion und dem Kriechen der neutrophilen Granulozyten am Endothel. Es zeigte sich eine Zunahme der adhärenen Zellen.

Zuletzt erfolgte noch die Untersuchung des Adhäsions- und Rollverhaltens unter Hinzunahme von CXCL-1 (KC), einem Chemokin, das zur Aktivierung von Neutrophilen bei der Inflammation führt. Hierbei wurde eine Zunahme der adhärenen Zellen beobachtet.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Hoxb8-SCF neutrophile Granulozyten ein ähnliches Adhäsions-Verhalten wie WT Neutrophile zeigen.

A) Mittelwert rollender Zellen/ FOV    B) Mittelwert adhärenen Zellen/ FOV

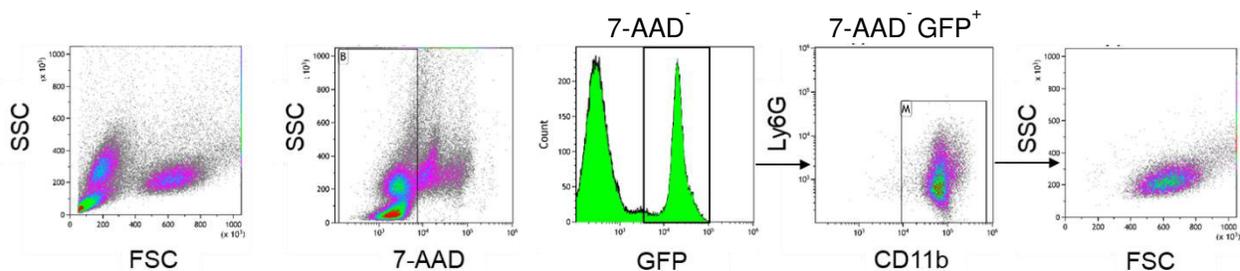


**Abb. 20: Flusskammerergebnisse (Adhäsion und Rollen) der Hoxb8 WT Zellen.**

A) stellt die mittlere Anzahl/FOV der rollenden Zellen je nach Beschichtung dar. B) stellt die Anzahl adhärenen Zellen dar.

## 5.4 NACHWEIS DER TRANSDUKTION VON HOXB8-SCF A20 ÜBEREXPRIMIERTEN ZELLEN

A20 wurde als interessantes Zielgen identifiziert, da es als Inhibitor von NF- $\kappa$ B anti-inflammatorisch wirkt und somit einer Leukozytenrekrutierung und -aktivierung entgegenwirkt. Die Hochregulation von A20 in fetalen neutrophilen Granulozyten könnte bedeuten, dass sich diese Zellen nicht im gleichen Ausmaß aktivieren lassen, wie adulte neutrophile Granulozyten, was zu den *in vivo* Ergebnissen und Ergebnissen aus der Literatur (Sperandio et al., 2013) passen würde. Aus diesem Grund wurde nun A20 in HoxB8-SCF neutrophilen Granulozyten überexprimiert, um sehen zu können, ob dies eine Auswirkung auf ihr Roll- und Adhäsionsverhalten *in vitro* haben könnte. Die Überexpression erfolgte mittels retroviraler Transduktion wie in Kapitel 4.6.6 beschrieben. Die Transduktion wurde in differenzierten Hoxb8-SCF Neutrophilen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. Zellen die erfolgreich transduziert und durch Puromycin selektioniert wurden, exprimieren wie in 4.5.3 beschrieben EGFP und sind Ly6G und CD11b doppelt positiv, wie in Abb. 21 dargestellt.



**Abb. 21: Nachweis der Transduktion anhand der Durchflusszytometrie.**

Betrachtet wurden nur die 7-AAD negativen Zellen. Die 7-AAD negativen und GFP positiven Zellen exprimierten zusätzlich Ly6G und CD11b, was sie als neutrophile Granulozyten charakterisiert.

Diese Dissertation endet mit der Etablierung des Zellsystems und der Herstellung der ersten retroviral transduzierten Hoxb8-SCF neutrophilen Granulozyten. Das Projekt wird in unserem Labor fortgeführt und die ersten funktionellen Testungen in Flusskammern zeigten eine Reduktion der Adhäsion von A20-überexprimierenden Hoxb8-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Hoxb8-Zellen (Rohwedder et al., eingereicht).

## 6 DISKUSSION

Die neonatale Sepsis stellt immer noch eine große Herausforderung dar, sowohl klinisch als auch wissenschaftlich. Gemäß einer von Fleischmann et. al. (2018) durchgeführten Meta-Analyse erkrankten jährlich 2202 Neugeborene pro 100.000 Lebendgeburten an einer Sepsis, dies entspricht 30 Millionen Neugeborenen weltweit, und die Mortalität beträgt 11-19%. Zumal das Mortalitätsrisiko mit zunehmender Frühgeburtlichkeit deutlich weiter steigt (Stoll et al., 2015). Insbesondere Frühgeborene, welche mit einem Gestationsalter <32 Schwangerschaftswochen geboren werden, haben ein deutlich erhöhtes Risiko an einer Sepsis zu erkranken (Kan, Razzaghian, & Lavoie, 2016). Das erhöhte Infektionsrisiko Frühgeborener wurde zunächst mit einem Mangel an maternalen Antikörpern assoziiert, da diese erst in der Spätschwangerschaft plazentar übertragen werden (J. P. van den Berg, Westerbeek, van der Klis, Berbers, & van Elburg, 2011), aber auch das unreife angeborene Immunsystem spielt hierbei eine wichtige Rolle. In den Untersuchungen von Mariscalco et al. (1998) konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten Neugeborener im Vergleich zu adulten neutrophilen Granulozyten unter künstlich erzeugter Wandschubspannung ein geringeres Adhäsionsvermögen aufweisen. Dieser Effekt nahm mit sinkendem Gestationsalter sogar noch zu (Nussbaum et al., 2013).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es Faktoren zu identifizieren, die zur Regulation der Funktion neutrophiler Granulozyten in Feten beitragen. Als Grundlage hierfür diente eine in unserem Labor durchgeführte Transkriptom-Analyse, anhand welcher mehrere Zielgene gefunden werden konnten, die in adulten und fetalen neutrophilen Granulozyten unterschiedlich reguliert und relevant für eine adäquate Immunantwort sind.

Zum einen zeigte sich eine Hochregulation des non-kanonischen Signalwegs von NF- $\kappa$ B (Rohwedder et al., eingereicht), welcher unter anderem eine immunmodulatorische Funktion einnimmt (Millet, McCall, & Yoza, 2013). Zum anderen scheinen Gene des kanonischen Signalwegs von NF- $\kappa$ B bei Neugeborenen herunterreguliert zu sein (Rohwedder et al., eingereicht).

Um diese Hypothese zu bestätigen, untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit eine intrauterine Inflammation in Dottersackgefäßen ausgelöst durch den Stimulus LPS, welches den kanonischen Signalweg von NF- $\kappa$ B aktiviert. Wir konnten zeigen, dass murine neutrophile Granulozyten unreifer Feten (E14.5) in vivo deutlich weniger am Gefäßendothel adhäreren können als im Vergleich zu reiferen Feten (E17.5).

Dies bestätigt frühere Befunde, dass auch neutrophile Granulozyten einem Reifungsprozess unterliegen. So zeigten Sperandio et al. (2013) eine zunehmende Adhäsionsfähigkeit muriner fetaler Neutrophiler mit höherem Gestationsalter, welche nicht allein durch unterschiedliche Mengen an zirkulierenden neutrophilen Granulozyten erklärbar war. Es gab bereits zahlreiche Untersuchungen, die die relevanten Adhäsions-Moleküle in neutrophilen Granulozyten von Erwachsenen und Neugeborenen auf Unterschiede in der Expression untersucht haben. Während keine Unterschiede in der Oberflächenexpression von LFA-1 zwischen Neutrophilen reifer Neugeborener und Erwachsenen festgestellt werden konnten (McEvoy, Zakem-Cloud, & Tosi, 1996; Nussbaum et al., 2013; Strunk et al., 2004), weisen Frühgeborene doch eine deutlich verminderte LFA-1 Expression auf (Strunk et al., 2004). Die Mac-1 Expression zeigt hingegen eine deutliche Abhängigkeit vom Gestationsalter (McEvoy et al., 1996; Nussbaum et al., 2013) und erreicht erst ab ca. dem 11. Lebensmonat ein vergleichbares Expressionslevel zu adulten Neutrophilen. (Storm, Mariscalco, & Tosi, 2008).

Die geringere Expression von Mac-1 auf fetalen Neutrophilen wurde mit der verminderten Kapazität zu adhäreren in Verbindung gebracht, da fetale Neutrophile nicht im gleichen Ausmaß auf stimulierten HUVEC Zellen adhäreren können wie adulte und eine Blockade von Mac-1 bei adulten Neutrophilen eine verminderte Adhärenz der Zellen auslöst, die vergleichbar mit der von fetalen ist (Anderson et al., 1987; Anderson, Rothlein, Marlin, Krater, & Smith, 1990). Die genaue Regulation dieser gestations-abhängigen Expression, ist jedoch noch ungeklärt

Der in unserem Experiment gewählte Stimulus LPS ist insofern von besonderem Interesse, da LPS über die Bindung an TLR-4 über zwei unterschiedliche Signalkaskaden zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt. In vorangegangenen Experimenten in unserem Labor konnte bereits nachgewiesen werden, dass es keine Unterschiede in der Expression von TLR-4 zwischen murinen neutrophilen Granulozyten Neugeborener und Erwachsener gibt (Rohwedder et al., eingereicht), so dass die verminderte Leukozytenrekrutierung und

Aktivierung nicht allein auf eine fehlende Bindung von LPS an TLR-4 zurückzuführen ist, sondern im weiteren Ablauf der Signalkaskade liegen muss. Die Ergebnisse von Raymond et al. (2018) unterstützen diese These, da sie in ihren *ex vivo* Experimenten ebenfalls zeigen konnten, dass insbesondere neutrophile Granulozyten Frühgeborener nach Stimulation mit LPS eine geringere spontane Migration aufweisen im Vergleich zu reifen Neugeborenen und Erwachsenen, obwohl die Plasma-Level von IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und macrophage inflammatory-protein-1  $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) in allen drei Gruppen ähnlich hoch ansteigen (Raymond et al., 2018). Aus diesem Grund war *TNFAIP3* (A20), welches in der Transkriptom-Analyse als relevantes Zielgen identifiziert wurde, und in neutrophilen Granulozyten von Feten hochreguliert ist, besonders interessant. A20 wirkt anti-inflammatorisch und ist bekannt als negativer Regulator des kanonischen NF- $\kappa$ B Signalwegs. Die anti-inflammatorische Wirkung von A20 wurde anhand der Erforschung von A20<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen deutlich. Sie weisen einen hyperinflammatorischen Phänotyp auf und versterben innerhalb der ersten Lebenswochen an Multi-Organ-Versagen im Rahmen der Inflammation (Lee, 2000; Ma & Malynn, 2012). Als ursächlich für die Hyperinflammation in A20<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen wurde die dysregulierte Aktivierung der TLR abhängigen pro-inflammatorischen Signalkaskaden gesehen (Turer et al., 2008). So konnte gezeigt werden, dass A20<sup>-/-</sup> defiziente Mäuse nach einer Injektion mit LPS, welches an TLR-4 bindet und zur Produktion von TNF- $\alpha$  führt, innerhalb von zwei Stunden versterben und auch geringe Dosen von injiziertem TNF- $\alpha$  ebenfalls zum Tod der Mäuse führt (Lee, 2000). In myeloidzellspezifischen A20<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen, zeigte sich das klinische Bild einer spontan auftretenden erosiven Polyarthrititis mit einer vermehrten Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Matmati et al., 2011). A20 defiziente Makrophagen weisen eine erhöhte basale und nach Stimulation mit LPS ebenfalls erhöhte Sekretion von proIL-1 $\beta$  und des Inflammasom Adapters NLR family pyrin domain containing 3 (NLRP 3) auf, welche pro-inflammatorisch wirken und zu einer erosiven Arthritis mit vermehrter Osteoklastenbildung führen können (Polykratis et al., 2019; Vande Walle et al., 2014). A20 scheint also inhibierend auf die Produktion von proIL-1 $\beta$  und von NLRP3 zu wirken und schützt somit womöglich vor Arthritis und Osteoporose. Interessanterweise führt eine myeloid-zellspezifische A20 Defizienz im Rahmen einer Influenza A dazu, dass sich *in vivo* vermehrt Makrophagen und neutrophile Granulozyten in der Lunge befinden und es zu einer besseren Clearance des Virus kommt (Maelfait et

al., 2012). Dies könnte auf einen evolutionären Prozess hindeuten, dass Erwachsene generell eine geringere Expression von A20 aufweisen, um häufige Erreger bekämpfen zu können und es könnte auch eine Erklärung dafür liefern, warum Kinder, ältere und immunsupprimierte Menschen so schwerwiegend daran erkranken. Bezogen auf die fetale Situation ist eine erhöhte A20 Expression in Utero seitens des Fetus wünschenswert, da dort ein Zustand der Immuntoleranz herrscht und der Fetus keinen Pathogenen ausgesetzt ist.

Die unterschiedliche Regulation von A20 in Neugeborenen und Erwachsenen konnten wir in der vorliegenden Arbeit mittels real-time PCR bestätigen. In einem weiteren Schritt wurde in unserem Labor die unterschiedliche Regulation auch auf Proteinebene im Western Blot bestätigt (Rohwedder et al., eingereicht). Bisher gibt es keine Untersuchungen zu einer Überexpression von A20 in neutrophilen Granulozyten. Beschrieben ist jedoch, dass in A20 überexprimierenden HEK293-Zellen eine Stimulation mit TNF- $\alpha$  nicht zu einer Aktivierung von NF- $\kappa$ B führt (Song, Rothe, & Goeddel, 1996).

In Endothelzellen führt eine Überexpression von A20 zu einer Inhibition der Expression von VCAM-1, ICAM-1 and IL-8 auf den Endothelzellen, welche normalerweise bei geringer Wandschubspannung exprimiert werden und somit das Rollen und Adhären von Leukozyten erleichtern (Zeng et al., 2009). A20 ist demnach von großer Bedeutung und womöglich sogar ursächlich für den herunterregulierten kanonischen Signalweg von NF- $\kappa$ B und unterdrückt eine adäquate Rekrutierung von Leukozyten.

Um diese Hypothese zu testen und den Effekt von A20 genauer betrachten zu können, benötigt man fetale neutrophile Granulozyten, welche nicht unbegrenzt zur Verfügung stehen und auch nicht über einen längeren Zeitraum kultivierbar sind. Außerdem ist eine gezielte genetische Manipulation in ausdifferenzierten Zellen, welche nur eine kurze Lebensdauer haben, ebenfalls nicht möglich. Aus diesem Grund etablierten wir das Hoxb8-SCF Zellsystem, um eine ausreichende Anzahl neutrophiler Granulozyten zur Verfügung zu haben, welche im Vorläuferstadium gehalten werden können und genetisch manipulierbar sind.

Wir konnten zeigen, dass sich die Oberflächenantigene der kultivierten Hoxb8-SCF Wildtyp neutrophilen Granulozyten nicht von murinen Granulozyten aus dem peripheren Blut oder dem Knochenmark unterscheiden, so dass wir in Übereinstimmung mit der Literatur keinen Unterschied in ihrer Funktion erwarteten (Chu, McCormick, Mazelyte,

Michael, & Vermeren, 2019; G. G. Wang et al., 2006). In den durchgeführten *in vitro* Flusskammerversuchen testeten wir das Roll- und Adhäsionsverhalten der Hoxb8-SCF neutrophilen Granulozyten. Es zeigte sich eine regelrechte Zunahme der Adhäsion bei Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen auf der Kapillarwand. Die Überexpression von A20 mithilfe eines retroviralen Vektors beeinträchtigte die Stabilität und Teilungsfähigkeit der Zellen nicht. Die Ausdifferenzierung und funktionelle Testung waren nicht mehr Teil der Promotion. Das Projekt wurde jedoch fortgeführt.

Die durchgeführten *in vitro* Flusskammern mit den A20 überexprimierenden neutrophilen Granulozyten zeigten dann wie erwartet eine verringerte Adhäsion im Vergleich zu den Leer-Vektor-Kontroll-Zellen (Rohwedder et al., eingereicht). Durch seine Ubiquitin modifizierende Funktion kann A20 in vielseitiger Weise mit dem kanonischen und non-kanonischen NF- $\kappa$ B Signalweg interferieren. So ist es auch vorstellbar, dass A20 Einwirkung auf die Funktionalität der direkten Pathogen-Bekämpfung in neutrophilen Granulozyten haben könnte. Bisher gibt es aber keine Untersuchungen hierzu.

Bekannt ist, dass fetale neutrophile Granulozyten im Vergleich zu Adulten weniger NETs produzieren (Lipp et al., 2017; Yost et al., 2009). Bei der weiteren Erforschung dieses Phänomens wurde jedoch deutlich, dass neutrophile Granulozyten Neugeborener NETs produzieren können, aber mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung (Marcos et al., 2009). Gerade diese verzögerte Reaktion deutet auf eine zusätzliche Regulation der NET Formation bei Feten hin. Die genauere Untersuchung ergab, dass neutrophile Granulozyten Frühgeborener und reifer Neugeborener einige Tage nach der Geburt ähnlich viele NETs produzieren können wie Erwachsene und sich der anfänglich gefundene Unterschied nur in neutrophilen Granulozyten zeigte, die aus Nabelschnurblut isoliert wurden. Yost et al. konnten einige Peptide identifizieren, welche in Nabelschnurblut und im peripheren Blut von Neugeborenen während der ersten Lebensstage vorhanden waren, und als mögliche Inhibitoren der NET Bildung in Frage kommen (Yost et al., 2016). Wie es aber zu der Bildung dieser Inhibitoren kommt ist bisher unklar.

Neutrophile Granulozyten Frühgeborener und reifer Neugeborener weisen neben funktionellen auch quantitative Unterschiede zu den Neutrophilen Erwachsener im Blut auf, da sie noch nicht über einen ausreichenden marginalen Pool verfügen. Ein Mechanismus, um zumindest die Anzahl zu kompensieren, scheint eine längere

Lebensdauer zu sein. Diese verlängerte Lebensdauer ist durch eine verzögerte Apoptose neonataler neutrophiler Granulozyten bedingt (Allgaier, Shi, Luo, & Koenig, 1998; Hanna, Graboski, Laskin, & Weinberger, 2004). Ob A20 in fetalen neutrophilen Granulozyten eine anti-apoptotische Wirkung hat und ob dies einer der Gründe für die Hochregulation in fetalen Neutrophilen ist, ist bisher noch nicht geklärt und könnte mit Hilfe des etablierten Hoxb8-SCF untersucht werden. Die verlängerte Lebensdauer ist für das inflammatorische Geschehen relevant, da es zu einer prolongierten Inflammation und dysregulierten Immunantwort führen kann. In einer Untersuchung von Campbell und Kollegen (2019) konnten die Autoren zeigen, dass Frühgeborene signifikant geringere Mengen an löslichem IL-6-Rezeptor alpha (sIL-6R $\alpha$ ) im Plasma aufweisen als reife Neugeborene und Erwachsene. Dies könnte dazu führen, dass IL-6 zu keiner adäquaten Aktivierung von Endothelzellen und Gewebsmakrophagen führt, und dadurch das Inflammationsgeschehen gestört wird. Ob diese prolongierte Inflammation in der Ontogenese neutrophiler Granulozyten einen definitiven Stellenwert hat, ist nicht gesichert. Es zeigt jedoch die Komplexität der Regulation neutrophiler Granulozyten im Rahmen der Entwicklung und die Herausforderungen an das angeborene Immunsystem, eine adäquate Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Prozessen zu wahren.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das angeborene Immunsystem einem Entwicklungsprozess unterliegt und bei Neugeborenen die Leukozytenrekrutierung und -aktivierung vermindert ist. Die Hochregulation des non-kanonischen Signalwegs von NF- $\kappa$ B und des Proteins A20 kommen als potenzielle Ursache hierfür in Frage, da sie eine immunmodulatorische bzw. anti-inflammatorische Rolle einnehmen. Die Befunde stellen einen wichtigen Ansatzpunkt in der zukünftigen Erforschung der ontogenetischen Regulation neutrophiler Granulozyten dar. Es bedarf aber definitiv noch weiterer Untersuchungen, um den anti-inflammatorischen Einfluss von A20 nachweisen zu können. Bisher gibt es noch keine *in vivo* Experimente mit neutrophilen Granulozyten, die A20 überexprimieren und somit die fetale Situation simulieren. In den bisherigen *in vitro* Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bestätigt sich Hypothese eines verminderten Rollens und Adhäsion bei A20 Überexpression. Ob es hierfür kompensatorische Mechanismen gibt, muss aber *in vivo* getestet werden.

Vielversprechende Ergebnisse dafür, dass A20 ein hoch relevantes Protein ist und therapeutisch genutzt werden kann, zeigt sich zum Beispiel in der Transplantationsforschung. In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von A20 in allogenen Inselzellen des Pankreas zu einem besseren Outcome bei Diabetes Typ 1 Patienten nach Transplantation führt, da es zu einer geringeren Abstoßung durch die anti-inflammatorische Wirkung von A20 kommt (Zammit et al., 2019). In der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen gibt es auch Hinweise dafür, dass eine Verminderung von A20 zur Pathogenese dieser beiträgt (Perga et al., 2017). Prinzipiell scheint es denkbar, in Früh- und Reifgeborenen Einfluss auf A20 zu nehmen. So könnte eine kurzfristige Inhibition von A20 in Neugeborenen vielleicht zu einer adäquaten Immunantwort führen, jedoch ist A20 nicht isoliert nur in neutrophilen Granulozyten vorhanden, sondern in nahezu allen Zellen mit weiteren Funktionen als nur die Inhibition von NF- $\kappa$ B. Die Expression von A20 und die damit einhergehende pro- oder anti-apoptotische Funktion des Proteins scheint von Zelltyp zu Zelltyp zu variieren (Daniel et al., 2004; Daniel et al., 2006; Grey, Arvelo, Hasenkamp, Bach, & Ferran, 1999; Longo

et al., 2003; Longo et al., 2005; Patel et al., 2006; Tran et al., 2009), so dass es schwierig sein könnte, eine gezielte Therapie mit dem Target A20 zu entwickeln. Vor allem da sie im Falle der neonatalen Sepsis systemisch angewendet werden müsste. Die Erforschung des angeborenen Immunsystems, insbesondere der neutrophilen Granulozyten und ihre Entwicklung, bleibt ein spannendes und wichtiges Forschungsgebiet, da wir auch trotz modernster Medizin die neonatale Sepsis noch nicht verhindern können und auch in noch zu vielen Fällen den Kampf gegen sie verlieren.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Alkalay, I., Yaron, A., Hatzubai, A., Orian, A., Ciechanover, A., & Ben-Neriah, Y. (1995). Stimulation-dependent I kappa B alpha phosphorylation marks the NF-kappa B inhibitor for degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(23), 10599-10603. doi:10.1073/pnas.92.23.10599
- Arnemann, J. (2019). Taqman-Sonden. In A. M. Gressner & T. Arndt (Eds.), *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik* (pp. 2260-2261). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Baldwin, A. S., Jr. (1996). The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, *14*, 649-683. doi:10.1146/annurev.immunol.14.1.649
- Bixel, M. G., Li, H., Petri, B., Khandoga, A. G., Khandoga, A., Zarbock, A., . . . Vestweber, D. (2010). CD99 and CD99L2 act at the same site as, but independently of, PECAM-1 during leukocyte diapedesis. *Blood*, *116*(7), 1172-1184. doi:10.1182/blood-2009-12-256388
- Bosanac, I., Wertz, I. E., Pan, B., Yu, C., Kusam, S., Lam, C., . . . Hymowitz, S. G. (2010). Ubiquitin binding to A20 ZnF4 is required for modulation of NF-kappaB signaling. *Mol Cell*, *40*(4), 548-557. doi:10.1016/j.molcel.2010.10.009
- Brenner, D., Blaser, H., & Mak, T. W. (2015). Regulation of tumour necrosis factor signalling: live or let die. *Nat Rev Immunol*, *15*(6), 362-374. doi:10.1038/nri3834
- Brinkmann, V., & Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*, *198*(5), 773-783. doi:10.1083/jcb.201203170
- Byrd, A. S., O'Brien, X. M., Laforce-Nesbitt, S. S., Parisi, V. E., Hirakawa, M. P., Bliss, J. M., & Reichner, J. S. (2016). NETosis in Neonates: Evidence of a Reactive Oxygen Species-Independent Pathway in Response to Fungal Challenge. *J Infect Dis*, *213*(4), 634-639. doi:10.1093/infdis/jiv435
- Calvo, K. R., Sykes, D. B., Pasillas, M., & Kamps, M. P. (2000). Hoxa9 immortalizes a granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-dependent promyelocyte capable of biphenotypic differentiation to neutrophils or macrophages, independent of enforced meis expression. *Mol Cell Biol*, *20*(9), 3274-3285. doi:10.1128/mcb.20.9.3274-3285.2000
- Carr, R., & Huizinga, T. W. (2000). Low soluble FcRIII receptor demonstrates reduced neutrophil reserves in preterm neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*, *83*(2), F160. doi:10.1136/fn.83.2.f160
- Catrysse, L., Vereecke, L., Beyaert, R., & van Loo, G. (2014). A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol*, *35*(1), 22-31. doi:10.1016/j.it.2013.10.005
- Chen, Z. J., Parent, L., & Maniatis, T. (1996). Site-specific phosphorylation of I kappa B alpha by a novel ubiquitination-dependent protein kinase activity. *Cell*, *84*(6), 853-862. doi:10.1016/s0092-8674(00)81064-8
- Christensen, J. L., Wright, D. E., Wagers, A. J., & Weissman, I. L. (2004). Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS Biol*, *2*(3), E75. doi:10.1371/journal.pbio.0020075

- Chu, J. Y., McCormick, B., Mazelyte, G., Michael, M., & Vermeren, S. (2019). HoxB8 neutrophils replicate Fcγ receptor and integrin-induced neutrophil signaling and functions. *J Leukoc Biol*, *105*(1), 93-100. doi:10.1002/jlb.1ab0618-232r
- Coornaert, B., Carpentier, I., & Beyaert, R. (2009). A20: central gatekeeper in inflammation and immunity. *J Biol Chem*, *284*(13), 8217-8221. doi:10.1074/jbc.R800032200
- Covert, M. W., Leung, T. H., Gaston, J. E., & Baltimore, D. (2005). Achieving stability of lipopolysaccharide-induced NF-kappaB activation. *Science*, *309*(5742), 1854-1857. doi:10.1126/science.1112304
- Daniel, S., Arvelo, M. B., Patel, V. I., Longo, C. R., Shrikhande, G., Shukri, T., . . . Ferran, C. (2004). A20 protects endothelial cells from TNF-, Fas-, and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation. *Blood*, *104*(8), 2376-2384. doi:10.1182/blood-2003-02-0635
- Daniel, S., Patel, V. I., Shrikhande, G. V., Scali, S. T., Ramsey, H. E., Csizmadia, E., . . . Ferran, C. (2006). The universal NF-kappaB inhibitor a20 protects from transplant vasculopathy by differentially affecting apoptosis in endothelial and smooth muscle cells. *Transplant Proc*, *38*(10), 3225-3227. doi:10.1016/j.transproceed.2006.10.167
- Das, T., Chen, Z., Hendriks, R. W., & Kool, M. (2018). A20/Tumor Necrosis Factor α-Induced Protein 3 in Immune Cells Controls Development of Autoinflammation and Autoimmunity: Lessons from Mouse Models. *Front Immunol*, *9*, 104. doi:10.3389/fimmu.2018.00104
- Dotta, L., Tassone, L., & Badolato, R. (2011). Clinical and genetic features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) syndrome. *Curr Mol Med*, *11*(4), 317-325.
- Fanaroff, A. A., Stoll, B. J., Wright, L. L., Carlo, W. A., Ehrenkranz, R. A., Stark, A. R., . . . Poole, W. K. (2007). Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol*, *196*(2), 147.e141-148. doi:10.1016/j.ajog.2006.09.014
- Faust, N., Varas, F., Kelly, L. M., Heck, S., & Graf, T. (2000). *Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages* (Vol. 96).
- Fischbach, N. A., Rozenfeld, S., Shen, W., Fong, S., Chrobak, D., Ginzinger, D., . . . Lawrence, H. J. (2005). HOXB6 overexpression in murine bone marrow immortalizes a myelomonocytic precursor in vitro and causes hematopoietic stem cell expansion and acute myeloid leukemia in vivo. *Blood*, *105*(4), 1456-1466. doi:10.1182/blood-2004-04-1583
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., . . . Maniatis, T. (2003). IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat Immunol*, *4*(5), 491-496. doi:10.1038/ni921
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., & Golenbock, D. T. (2004). Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes Infect*, *6*(15), 1361-1367. doi:10.1016/j.micinf.2004.08.015
- Fujiwara, T., Taniuchi, S., Hattori, K., Kobayashi, T., Kinoshita, Y., & Kobayashi, Y. (1997). Effect of immunoglobulin therapy on phagocytosis by polymorphonuclear leucocytes in whole blood of neonates. *Clin Exp Immunol*, *107*(3), 435-439. doi:10.1046/j.1365-2249.1997.d01-957.x

- Ghosh, S., May, M. J., & Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol*, *16*, 225-260. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.225
- Gottipati, S., Rao, N. L., & Fung-Leung, W. P. (2008). IRAK1: a critical signaling mediator of innate immunity. *Cell Signal*, *20*(2), 269-276. doi:10.1016/j.cellsig.2007.08.009
- Grey, S. T., Arvelo, M. B., Hasenkamp, W., Bach, F. H., & Ferran, C. (1999). A20 inhibits cytokine-induced apoptosis and nuclear factor kappaB-dependent gene activation in islets. *J Exp Med*, *190*(8), 1135-1146. doi:10.1084/jem.190.8.1135
- Hacker, H., & Karin, M. (2006). Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Sci STKE*, *2006*(357), re13. doi:10.1126/stke.3572006re13
- Hayden, M. S., & Ghosh, S. (2012). NF-kappaB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions. *Genes Dev*, *26*(3), 203-234. doi:10.1101/gad.183434.111
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., . . . Akira, S. (2004). The roles of two I kappa B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection. *J Exp Med*, *199*(12), 1641-1650. doi:10.1084/jem.20040520
- Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., & Kishimoto, T. (1990). Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, *63*(6), 1149-1157.
- Hofman, P. (2005). DNA Microarrays. *Nephron Physiology*, *99*(3), p85-p89. doi:10.1159/000083764
- Hornig, T., Barton, G. M., Flavell, R. A., & Medzhitov, R. (2002). The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature*, *420*(6913), 329-333. doi:10.1038/nature01180
- Ip, W. K. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S., & Medzhitov, R. (2017). Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*, *356*(6337), 513-519. doi:10.1126/science.aal3535
- Irie, T., Muta, T., & Takeshige, K. (2000). TAK1 mediates an activation signal from toll-like receptor(s) to nuclear factor-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Lett*, *467*(2-3), 160-164. doi:10.1016/s0014-5793(00)01146-7
- Jiang, Z., Ninomiya-Tsuji, J., Qian, Y., Matsumoto, K., & Li, X. (2002). Interleukin-1 (IL-1) receptor-associated kinase-dependent IL-1-induced signaling complexes phosphorylate TAK1 and TAB2 at the plasma membrane and activate TAK1 in the cytosol. *Mol Cell Biol*, *22*(20), 7158-7167. doi:10.1128/mcb.22.20.7158-7167.2002
- Knoepfler, P. S., Sykes, D. B., Pasillas, M., & Kamps, M. P. (2001). HoxB8 requires its Pbx-interaction motif to block differentiation of primary myeloid progenitors and of most cell line models of myeloid differentiation. *Oncogene*, *20*(39), 5440-5448. doi:10.1038/sj.onc.1204710
- Koenig, J. M., Bliss, J. M., & Sperandio, M. (2021). Normal and Abnormal Neutrophil Physiology in the Newborn. In R. P. S. A. D. R. W. Benitz (Ed.), *Fetal and Neonatal Physiology, 2-Volume Set 6th Edition* (6th ed., Vol. 2): Elsevier.
- Lawrence, S. M., Corriden, & Nizet. (2017). Age-Appropriate Functions and Dysfunctions of the Neonatal Neutrophil. *Frontiers in pediatrics*, *5*, 23-23. doi:10.3389/fped.2017.00023

- Lawrence, S. M., Corriden, R., & Nizet, V. (2018). The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev*, *82*(1). doi:10.1128/MMBR.00057-17
- Lee, E. G., Boone, D.L., Chai, S., Libby, S. L., Chien, M., Lodolce, J. P., Ma, A. (2000). Failure to Regulate TNF-Induced NF- $\kappa$ B and Cell Death Responses in A20-Deficient Mice. *Science*, *289*(5488), 2350-2354. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3582399/pdf/nihms-444169.pdf>
- Levy, O. (2007). Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates. *Nat Rev Immunol*, *7*(5), 379-390. doi:10.1038/nri2075
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, *7*(9), 678-689. doi:10.1038/nri2156
- Li, L., Kang, J., & Lei, W. (2010). Role of Toll-like receptor 4 in inflammation-induced preterm delivery. *Mol Hum Reprod*, *16*(4), 267-272. doi:10.1093/molehr/gap106
- Li, S., Strelow, A., Fontana, E. J., & Wesche, H. (2002). IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*(8), 5567-5572. doi:10.1073/pnas.082100399
- Lipp, P., Ruhnau, J., Lange, A., Vogelgesang, A., Dressel, A., & Heckmann, M. (2017). Less Neutrophil Extracellular Trap Formation in Term Newborns than in Adults. *Neonatology*, *111*(2), 182-188. doi:10.1159/000452615
- Longo, C. R., Arvelo, M. B., Patel, V. I., Daniel, S., Mahiou, J., Grey, S. T., & Ferran, C. (2003). A20 protects from CD40-CD40 ligand-mediated endothelial cell activation and apoptosis. *Circulation*, *108*(9), 1113-1118. doi:10.1161/01.Cir.0000083718.76889.D0
- Longo, C. R., Patel, V. I., Shrikhande, G. V., Scali, S. T., Csizmadia, E., Daniel, S., . . . Ferran, C. (2005). A20 protects mice from lethal radical hepatectomy by promoting hepatocyte proliferation via a p21waf1-dependent mechanism. *Hepatology*, *42*(1), 156-164. doi:10.1002/hep.20741
- Maelfait, J., Roose, K., Bogaert, P., Sze, M., Saelens, X., Pasparakis, M., . . . Beyaert, R. (2012). A20 (Tnfaip3) deficiency in myeloid cells protects against influenza A virus infection. *PLoS Pathog*, *8*(3), e1002570. doi:10.1371/journal.ppat.1002570
- Margraf, A., Ley, K., & Zarbock, A. (2019). Neutrophil Recruitment: From Model Systems to Tissue-Specific Patterns. *Trends Immunol*, *40*(7), 613-634. doi:10.1016/j.it.2019.04.010
- McEver, R. P. (2015). Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*, *107*(3), 331-339. doi:10.1093/cvr/cvv154
- McGrath, K. E., Koniski, A. D., Malik, J., & Palis, J. (2003). Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood*, *101*(5), 1669-1676. doi:10.1182/blood-2002-08-2531
- Micheau, O., & Tschopp, J. (2003). Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, *114*(2), 181-190. doi:10.1016/s0092-8674(03)00521-x
- Muller, W. A. (2015). The regulation of transendothelial migration: new knowledge and new questions. *Cardiovasc Res*, *107*(3), 310-320. doi:10.1093/cvr/cvv145
- Mullis, K. B. (1990). Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin (Paris)*, *48*(8), 579-582.

- Muroi, M., & Tanamoto, K. I. (2008). TRAF6 distinctively mediates MyD88- and IRAK-1-induced activation of NF-kappaB. *J Leukoc Biol*, *83*(3), 702-707. doi:10.1189/jlb.0907629
- Németh, T., Sperandio, M., & Mócsai, A. (2020). Neutrophils as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, *19*(4), 253-275. doi:10.1038/s41573-019-0054-z
- Nourshargh, S., & Alon, R. (2014). Leukocyte migration into inflamed tissues. *Immunity*, *41*(5), 694-707. doi:10.1016/j.immuni.2014.10.008
- Nupponen, I., Turunen, R., Nevalainen, T., Peuravuori, H., Pohjavuori, M., Repo, H., & Andersson, S. (2002). Extracellular release of bactericidal/permeability-increasing protein in newborn infants. *Pediatr Res*, *51*(6), 670-674. doi:10.1203/00006450-200206000-00002
- Nussbaum, C., Gloning, A., Pruenster, M., Frommhold, D., Bierschenk, S., Genzel-Boroviczeny, O., . . . Sperandio, M. (2013). Neutrophil and endothelial adhesive function during human fetal ontogeny. *J Leukoc Biol*, *93*(2), 175-184. doi:10.1189/jlb.0912468
- Oeckinghaus, A., & Ghosh, S. (2009). The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *1*(4), a000034. doi:10.1101/cshperspect.a000034
- Owens, B. M., & Hawley, R. G. (2002). HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*, *20*(5), 364-379. doi:10.1634/stemcells.20-5-364
- Patel, V. I., Daniel, S., Longo, C. R., Shrikhande, G. V., Scali, S. T., Czismadia, E., . . . Ferran, C. (2006). A20, a modulator of smooth muscle cell proliferation and apoptosis, prevents and induces regression of neointimal hyperplasia. *Faseb j*, *20*(9), 1418-1430. doi:10.1096/fj.05-4981com
- Perga, S., Martire, S., Montarolo, F., Navone, N. D., Calvo, A., Fuda, G., . . . Bertolotto, A. (2017). A20 in Multiple Sclerosis and Parkinson's Disease: Clue to a Common Dysregulation of Anti-Inflammatory Pathways? *Neurotox Res*, *32*(1), 1-7. doi:10.1007/s12640-017-9724-y
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C. M., & Kubes, P. (2006). Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, *203*(12), 2569-2575. doi:10.1084/jem.20060925
- Polykratis, A., Martens, A., Eren, R. O., Shirasaki, Y., Yamagishi, M., Yamaguchi, Y., . . . Pasparakis, M. (2019). A20 prevents inflammasome-dependent arthritis by inhibiting macrophage necroptosis through its ZnF7 ubiquitin-binding domain. *Nat Cell Biol*, *21*(6), 731-742. doi:10.1038/s41556-019-0324-3
- Pruenster, M., Kurz, A. R., Chung, K. J., Cao-Ehlker, X., Bieber, S., Nussbaum, C. F., . . . Sperandio, M. (2015). Extracellular MRP8/14 is a regulator of  $\beta$ 2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. *Nat Commun*, *6*, 6915. doi:10.1038/ncomms7915
- Remijsen, Q., Kuijpers, T. W., Wirawan, E., Lippens, S., Vandenabeele, P., & Vanden Berghe, T. (2011). Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ*, *18*(4), 581-588. doi:10.1038/cdd.2011.1
- Rohwedder, I., Heinig, K., Wackerbarth, L., Ballweg, A., Altstätter, J., Ripphahn, M., . . . Sperandio, M. (eingereicht). A20 and the non-canonical NF- $\kappa$ B pathway are key regulators of

neutrophil recruitment during fetal ontogeny. -

- Ross, K., Yang, L., Dower, S., Volpe, F., & Guesdon, F. (2002). Identification of threonine 66 as a functionally critical residue of the interleukin-1 receptor-associated kinase. *J Biol Chem*, *277*(40), 37414-37421. doi:10.1074/jbc.M205160200
- Saeed, S., Quintin, J., Kerstens, H. H., Rao, N. A., Aghajani-refah, A., Matarese, F., . . . Stunnenberg, H. G. (2014). Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*, *345*(6204), 1251086. doi:10.1126/science.1251086
- Schmidt, S., Moser, M., & Sperandio, M. (2013). The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Mol Immunol*, *55*(1), 49-58. doi:10.1016/j.molimm.2012.11.006
- Sen, R., & Baltimore, D. (1986). Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell*, *47*(6), 921-928.
- Sharp, G., Ma, H., Saunders, P., & Norman, J. (2013). A Computational Model of Lipopolysaccharide-Induced Nuclear Factor Kappa B Activation: A Key Signalling Pathway in Infection-Induced Preterm Labour. *PloS one*, *8*, e70180. doi:10.1371/journal.pone.0070180
- Shembade, N., & Harhaj, E. W. (2012). Regulation of NF-kappaB signaling by the A20 deubiquitinase. *Cell Mol Immunol*, *9*(2), 123-130. doi:10.1038/cmi.2011.59
- Shembade, N., Ma, A., & Harhaj, E. W. (2010). Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes. *Science*, *327*(5969), 1135-1139. doi:10.1126/science.1182364
- Skaug, B., Chen, J., Du, F., He, J., Ma, A., & Chen, Z. J. (2011). Direct, noncatalytic mechanism of IKK inhibition by A20. *Mol Cell*, *44*(4), 559-571. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.015
- Smith, Sperandio, M., Galkina, E. V., & Ley, K. (2004). Autoperfused mouse flow chamber reveals synergistic neutrophil accumulation through P-selectin and E-selectin. *J Leukoc Biol*, *76*(5), 985-993. doi:10.1189/jlb.1003483
- Song, H. Y., Rothe, M., & Goeddel, D. V. (1996). The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *93*(13), 6721-6725. doi:10.1073/pnas.93.13.6721
- Sperandio, M., Pickard, J., Unnikrishnan, S., Acton, S. T., & Ley, K. (2006). Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro. *Methods Enzymol*, *416*, 346-371. doi:10.1016/s0076-6879(06)16023-1
- Sperandio, M., Quackenbush, E. J., Sushkova, N., Altstatter, J., Nussbaum, C., Schmid, S., . . . von Andrian, U. H. (2013). Ontogenetic regulation of leukocyte recruitment in mouse yolk sac vessels. *Blood*, *121*(21), e118-128. doi:10.1182/blood-2012-07-447144
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Bell, E. F., Shankaran, S., Laptook, A. R., Walsh, M. C., . . . Higgins, R. D. (2010). Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*, *126*(3), 443-456. doi:10.1542/peds.2009-2959
- Stoll, B. J., Hansen, N. I., Bell, E. F., Walsh, M. C., Carlo, W. A., Shankaran, S., . . . Higgins, R. D. (2015). Trends in Care Practices, Morbidity, and Mortality of Extremely Preterm Neonates, 1993-2012. *Jama*, *314*(10), 1039-1051. doi:10.1001/jama.2015.10244

- Strunk, T., Temming, P., Gembruch, U., Reiss, I., Bucsky, P., & Schultz, C. (2004). Differential maturation of the innate immune response in human fetuses. *Pediatr Res*, *56*(2), 219-226. doi:10.1203/01.pdr.0000132664.66975.79
- Sundd, P., Gutierrez, E., Koltsova, E. K., Kuwano, Y., Fukuda, S., Pospieszalska, M. K., . . . Ley, K. (2012). 'Slings' enable neutrophil rolling at high shear. *Nature*, *488*(7411), 399-403. doi:10.1038/nature11248
- Suzuki, N., Suzuki, S., & Yeh, W. C. (2002). IRAK-4 as the central TIR signaling mediator in innate immunity. *Trends Immunol*, *23*(10), 503-506. doi:10.1016/s1471-4906(02)02298-6
- Tcharmtchi, M. H., Smith, C. W., & Mariscalco, M. M. (2000). Neonatal neutrophil interaction with P-selectin: contribution of P-selectin glycoprotein ligand-1 and sialic acid. *J Leukoc Biol*, *67*(1), 73-80. doi:10.1002/jlb.67.1.73
- Tokunaga, F. (2013). Linear ubiquitination-mediated NF-kappaB regulation and its related disorders. *J Biochem*, *154*(4), 313-323. doi:10.1093/jb/mvt079
- Tokunaga, F., Sakata, S., Saeki, Y., Satomi, Y., Kirisako, T., Kamei, K., . . . Iwai, K. (2009). Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF-kappaB activation. *Nat Cell Biol*, *11*(2), 123-132. doi:10.1038/ncb1821
- Tran, T. M., Temkin, V., Shi, B., Pagliari, L., Daniel, S., Ferran, C., & Pope, R. M. (2009). TNFalpha-induced macrophage death via caspase-dependent and independent pathways. *Apoptosis*, *14*(3), 320-332. doi:10.1007/s10495-009-0311-4
- Uchikawa, S., Yoda, M., Tohmonda, T., Kanaji, A., Matsumoto, M., Toyama, Y., & Horiuchi, K. (2015). ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface. *Cytokine*, *71*(2), 238-245. doi:10.1016/j.cyto.2014.10.032
- van de Vijver, E., Maddalena, A., Sanal, O., Holland, S. M., Uzel, G., Madkaikar, M., . . . Roos, D. (2012). Hematologically important mutations: leukocyte adhesion deficiency (first update). *Blood Cells Mol Dis*, *48*(1), 53-61. doi:10.1016/j.bcmd.2011.10.004
- van den Berg, J. M., & Kuijpers, T. W. (2011). Educational paper: Defects in number and function of neutrophilic granulocytes causing primary immunodeficiency. *Eur J Pediatr*, *170*(11), 1369-1376. doi:10.1007/s00431-011-1584-5
- Vande Walle, L., Van Opdenbosch, N., Jacques, P., Fossoul, A., Verheugen, E., Vogel, P., . . . Lamkanfi, M. (2014). Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. *Nature*, *512*(7512), 69-73. doi:10.1038/nature13322
- Vereecke, L., Beyaert, R., & van Loo, G. (2009). The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol*, *30*(8), 383-391. doi:10.1016/j.it.2009.05.007
- Verhelst, K., Carpentier, I., Kreike, M., Meloni, L., Verstrepen, L., Kensche, T., . . . Beyaert, R. (2012). A20 inhibits LUBAC-mediated NF-kappaB activation by binding linear polyubiquitin chains via its zinc finger 7. *Embo j*, *31*(19), 3845-3855. doi:10.1038/emboj.2012.240
- Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*, *15*(11), 692-704. doi:10.1038/nri3908
- Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., & Chen, Z. J. (2001). TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature*, *412*(6844), 346-351. doi:10.1038/35085597

- Wang, G. G., Calvo, K. R., Pasillas, M. P., Sykes, D. B., Hacker, H., & Kamps, M. P. (2006). Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nat Methods*, 3(4), 287-293. doi:10.1038/nmeth865
- Wertz, I. E., O'Rourke, K. M., Zhou, H., Eby, M., Aravind, L., Seshagiri, S., . . . Dixit, V. M. (2004). De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature*, 430(7000), 694-699. doi:10.1038/nature02794
- Wesche, H., Henzel, W. J., Shillinglaw, W., Li, S., & Cao, Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*, 7(6), 837-847. doi:10.1016/s1074-7613(00)80402-1
- Woodfin, A., Reichel, C. A., Khandoga, A., Corada, M., Voisin, M. B., Scheiermann, C., . . . Nourshargh, S. (2007). JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. *Blood*, 110(6), 1848-1856. doi:10.1182/blood-2006-09-047431
- Woodfin, A., Voisin, M. B., Imhof, B. A., Dejana, E., Engelhardt, B., & Nourshargh, S. (2009). Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*, 113(24), 6246-6257. doi:10.1182/blood-2008-11-188375
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., . . . Akira, S. (2003). Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 301(5633), 640-643. doi:10.1126/science.1087262
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Sanjo, H., Uematsu, S., Kaisho, T., . . . Akira, S. (2002). Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature*, 420(6913), 324-329. doi:10.1038/nature01182
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T., . . . Akira, S. (2003). TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol*, 4(11), 1144-1150. doi:10.1038/ni986
- Yamamoto, M., Sato, S., Mori, K., Hoshino, K., Takeuchi, O., Takeda, K., & Akira, S. (2002). Cutting edge: a novel Toll/IL-1 receptor domain-containing adapter that preferentially activates the IFN-beta promoter in the Toll-like receptor signaling. *J Immunol*, 169(12), 6668-6672. doi:10.4049/jimmunol.169.12.6668
- Zammit, N. W., Walters, S. N., Seeberger, K. L., O'Connell, P. J., Korbutt, G. S., & Grey, S. T. (2019). A20 as an immune tolerance factor can determine islet transplant outcomes. *JCI Insight*, 4(21). doi:10.1172/jci.insight.131028
- Zeidler, C., Germeshausen, M., Klein, C., & Welte, K. (2009). Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia. *Br J Haematol*, 144(4), 459-467. doi:10.1111/j.1365-2141.2008.07425.x

## 9 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung dieses Projekt und diese Dissertation nicht möglich gewesen wären.

Zunächst möchte ich mich ausdrücklich bei Herrn Prof. Dr. med. Markus Sperandio bedanken. Seine Begeisterung für die Wissenschaft und seine Leidenschaft für dieses Projekt haben mich vom ersten Moment beeindruckt und ich bin sehr stolz, dass ich ein Teil dieser wundervollen Arbeitsgruppe werden und an diesem Projekt arbeiten durfte. Außerdem möchte ich mich für das in mich gesetzte Vertrauen, die Unterstützung, den Zuspruch und Geduld bedanken. Ganz besonders möchte ich mich aber für die Beratung und Begleitung in Hinblick auf meine Karriere als Ärztin und Wissenschaftlerin bedanken, welche nicht selbstverständlich sind und ein Ausdruck seiner menschlichen Qualitäten.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas W. Flemmer bedanken, der mir den Kontakt zu Herrn Prof. Dr. med. Sperandios Arbeitsgruppe ermöglichte und mich für die Pädiatrie und insbesondere die Neonatologie begeisterte. Von der Arbeit als studentische Hilfskraft in der Neonatologie in Großhadern profitiere ich noch heute in meiner Weiterbildung zur Pädiaterin und erinnere mich sehr gerne an diese Zeit zurück.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Dr. Roland Immler für seine unermüdliche Geduld mit mir bei der Durchführung und Auswertung von Experimenten bedanken und seinen wunderbaren Musikgeschmack, der mich bis heute begleitet.

Auch danke ich Frau Dr. Melanie Salvermoser, die mir mit Rat und Tat zur Seite stand bei den Experimenten mit den Hoxb8-SCF Zellen und mir die Grundzüge der Transfektion und Transduktion beigebracht hat.

Ganz herzlich danke ich Frau Dr. Ina Rohwedder, die immer ein offenes Ohr hatte und mich im Endspurt dieses Projekts mit ihrer Expertise unterstützt hat.

Ich möchte mich bei meiner Arbeitsgruppe für die großartige Zusammenarbeit und das familiäre Miteinander von ganzem Herzen bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei Frau Dr. Angela Fontaine bedanken, die mich täglich im Labor motiviert hat und auch in schwierigen Phasen dieses Projekts meine treue Begleiterin war. Danke, dass du zu meiner besten Freundin geworden bist und immer an mich geglaubt hast.

Abschließend möchte ich mich bei meinem Mann Felix Ballweg bedanken, der mich durch die Höhen und Tiefen des Lebens und auch dieses Projekts begleitet hat und mir nicht von der Seite weicht.

Auch möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, insbesondere bei meiner Mutter, die sich selbst stets zurückgenommen hat und mich mit all ihrer Kraft unterstützt hat, dass ich diesen beruflichen Weg beschreiten konnte.

## 10 APPENDIX

### 10.1 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

---

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Aachen, den 03.06.2022, Annamaria Ballweg