

Aus dem
Institut für kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand:
Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Src-Tyrosinkinasen und deren Rolle bei der Leukozytenrekrutierung
in vitro* und *in vivo

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



Vorgelegt von
Tanja Kristina Eggersmann
aus München

München 2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Markus Sperandio

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Alexander Bartelt

Prof. Dr. Jürgen Bernhagen

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Ina Rohwedder

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2022

Meiner Familie

*Für den gläubigen Menschen steht Gott am
Anfang, für den Wissenschaftler am Ende aller seiner
Überlegungen.*

Max Planck

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
1.	Adhäsionskaskade der Leukozyten im Entzündungsprozess.....	1
1.1.	Einfangen und Rollen.....	3
1.2.	Aktivierung, Adhäsion und Abflachung.....	7
1.3.	Kriechen adhärenter Zellen und Transmigrieren.....	8
2.	Familie der Proteintyrosinkinasen (PTK).....	11
2.1.	Familie der Src-Tyrosinkinasen (SFK).....	12
3.	<i>Hck</i>^{-/-}<i>Fgr</i>^{-/-}<i>Lyn</i>^{-/-} Knockout Maus.....	14
4.	<i>Lyz2</i>^{EGFP} Maus.....	15
5.	Tyrosinkinaseinhibitoren.....	16
5.1.	Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib.....	17
6.	Hypothese und Fragestellungen.....	18
II.	MATERIAL UND METHODEN.....	19
1.	Material.....	19
1.1.	Geräte.....	19
1.2.	Mikroskope und Zubehör.....	20
1.3.	Allgemeine Substanzen.....	20
1.4.	Reagenzien für die Histologie.....	21
1.5.	Lysepuffer für Polymerasekettenreaktion.....	22
1.6.	Superfusionslösung I und II für <i>in vivo</i> Experimente.....	22
1.7.	Blockierende Antikörper für Flusskammern.....	22
1.8.	Verbrauchsmittel.....	22
1.9.	Narkosemittel.....	23
1.10.	Software.....	23
2.	Versuchstiere.....	25
2.1.	Genotypisierung der Versuchstiere.....	25
2.2.	Tierhaltung.....	28
3.	Versuchsmethoden.....	29
3.1.	Analgosedierung und Lagerung.....	29
3.2.	Chirurgische Technik.....	30

3.3.	Untersuchung der Leukozytenrekrutierung	33
3.3.1.	rmTNF- α -Entzündungsmodell	33
3.3.2.	Intravitalmikroskopie	35
3.3.3.	<i>In vitro</i> Flusskammern	38
3.3.4.	Perivaskuläre Leukozyten	39
4.	Datenauswertung	41
4.1.	Auswertung Intravitalmikroskopie	41
4.2.	Auswertung <i>in vitro</i> Flusskammern	44
4.3.	Auswertung perivaskuläre Leukozyten	44
5.	Statistische Auswertung	46
III.	ERGEBNISSE	47
1.	Einfluss von Src-Tyrosinkinase auf die Leukozytenrekrutierung	47
1.1.	Leukozytenrollen – Anteil rollender Zellen und Rollgeschwindigkeit	47
1.2.	Leukozytenadhäsion	50
1.3.	Abflachung und Kriechen adhärenter Zellen	51
1.4.	Extravasation – Extravasationseffizienz	54
2.	Off-target Effekte	56
3.	<i>In vitro</i> Flusskammern	57
IV.	DISKUSSION	60
1.	Diskussion des Materials und der Methodik	60
2.	Diskussion der <i>in vivo</i> Ergebnisse	61
2.1.	Leukozytenrollen–Anteil der rollenden Zellen und Rollgeschwindigkeit	61
2.2.	Adhäsion und Adhäsionseffizienz	62
2.3.	Abflachung und Kriechen	63
2.4.	Extravasation	63
3.	Diskussion der off-target Effekte	66
4.	Diskussion der <i>in vitro</i> Flusskammern	66
V.	ZUSAMMENFASSUNG	68
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	71
VII.	ANHANG	86

1.	Abbildungsverzeichnis.....	86
2.	Tabellenverzeichnis	86
VIII.	PUBLIKATIONSVERZEICHNIS.....	87
1.	Publikationen im Rahmen des Promotionsstudiums.....	87
IX.	DANKSAGUNG.....	88
X.	AFFIDAVIT	89

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A., Aa.	Arteria (Arterie), Arteriae (Arterien)
AG	Arbeitsgruppe
Abl	Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog 1, Tyrosinproteinkinase Abl-1
ALL	Akut lymphatische Leukämie
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	breakpoint cluster region, Region von Chromosomenbruchstellen
Btk	Bruton's tyrosine kinase, Bruton-Tyrosinkinase
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CAIDAG-GEFI	calcium-diacylglycerol guanine nucleotide exchange factor 1
CD	Cluster of Differentiation, Unterscheidungsgruppen
CD44	Cluster of Differentiation 44
CD62E	E-Selektin
CD62L	L-Selektin
CD62P	P-Selektin
cKit	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase, CD117, Stammzellfaktor-Rezeptor, Rezeptortyrosinkinase, potenziell krebsauslösendes Gen
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CP	Chronische Phase (einer Leukämie)
CXCL-1	Chemokin (C-X-C Motif) Ligand 1
CXCR-2	Chemokin (C-X-C Motif) Rezeptor 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, standardisiertes Nährmedium für die Zellkultur
DNA	Deoxyribonucleic acid/Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal-Growth Factor, epidermaler Wachstumsfaktor
EMA	Europäische Arzneimittelagentur
EOS	Eosinophile Granulozyten
ESL-1	E-Selektin-Ligand-1
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations

FDA	U. S. Food and Drug Administration
fs	Femtosekunde
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1, CD54, intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IL-1	Interleukin-1
ITAM	Immunreceptor tyrosine-based activation motif, Immunrezeptor Tyrosin-basierendes Aktivierungsmotiv in der konservierten Sequenz von vier Aminosäuren
IVM	Intravital microscopy, Intravitalmikroskopie
JAM	junctional adhesion molecule, junktional Adhäsionsmolekül
Jak	Januskinase
kD	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Ko	Knock-out, gezielte Deaktivierung von Genmaterial
KC	Keratinocyte-derived Chemokine, entspricht CXCL-1
LFA-1 (αLβ2)	Lymphocyte function-associated antigen-1, Lymphozyten assoziiertes Antigen-1
LoxP	locus of X-over P1
LPS	Lipopolysaccharide
Lyz 2	Lysozyme M Locus
Mac-1 (αMβ2)	Monozyten-Adhäsion Complex-1
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minute
μl	Mikroliter
M., Mm.	Musculus, Musculi
mM	Millimolar
Monos	Mononukleäre Zellen
MST1	Mammalian Sterile Twenty-like protein kinase 1
MW	Mittelwert (Mean)

mW	Megawatt
NA	Numerische Apertur
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
NE	Neutrophilen Elastase
NET	neutrophil extracellular trap, Netzwerk extrazellulärer Fasern
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
OPO	optisch parametrischer Oszillator
PECAM-1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1, CD31, Thrombozyten/Endothel-Zelladhäsionsmolekül
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptors, von Blutplättchen abgeleitete Wachstumsfaktor-Rezeptoren
PCR	Polymerase chain reaction/Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PLCy2	Phospholipase-gamma-2
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	Polymorphonukleäre Zellen, neutrophile Granulozyten
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PTK	Proteintyrosinkinase
RAB	Ras-related protein in brain, Ras-ähnliches Protein im Gehirn
Rap 1	Ras-proximate-1/ras-related protein 1
RFF	Rolling Flux Fraction, Anteil rollender Zellen
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
SCR	Short Consensus Repeats, Konsensussequenz
SEM	Standard Error of Mean, Standardfehler
s	Sekunde
SFK	Src-family-kinase, Src-Familien-Kinase, Src-Tyrosinkinasen-Familie
SH4	Src-like-homology 4-Domäne
SPF	spezifisch pathogenfreier Hygienestatus
Syk	Spleen tyrosine kinase, Milztyrosinkinase
rmTNF-α	rekombinanter muriner Tumornekrosefaktor- α

RAGE	Receptor for advanced glycation endproducts
VE-Cadherin	Vascular-Endothelial Cadherin, CD144
VEGF	Vascular-Endothelial Growth Factor
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1, CD106, vaskuläres Zelladhäsionsmolekül-1
VLA-3 ($\alpha_3\beta_1$)	Very late Antigen-3
VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$)	Very late Antigen-4
VLA-6 ($\alpha_6\beta_1$)	Very late Antigen-6
VVO	Vesikulovaskuläre Organellen
WBC	White Blood Cell Count, Gesamtleukozytenzahl
WT	Wildtyp
°C	Grad Celsius

I. EINLEITUNG

1. Adhäsionskaskade der Leukozyten im Entzündungsprozess

Das Immunsystem von Säugetieren besteht aus dem angeborenen und erworbenen Immunsystem, welches durch humorale und zelluläre Antwortmechanismen eng miteinander verknüpft den Körper vor Infektionen und Autoimmunreaktionen schützen soll^{1,2}. Hauptakteure des angeborenen Immunsystems sind Neutrophile Granulozyten. Im menschlichen Blut gehören 55-70% aller Leukozyten zur Subpopulation der Neutrophilen Granulozyten. Sie werden kontinuierlich aus myeloischen Vorläuferzellen hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark gebildet (Leukopoese) und können bei Entzündungsprozessen in erhöhter Anzahl ausgeschüttet und zum Ort der Entzündung geschickt werden³. Dabei entstehen aus myeloischen Vorläuferzellen neben Neutrophilen Granulozyten weitere granulozytäre Zellen wie basophile und eosinophile Granulozyten⁴. Neutrophile exprimieren auf ihrer Zelloberfläche eine Reihe von Rezeptoren u.a. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (z.B. Chemokine), Fc-Rezeptoren (z.B. Fc γ -Rezeptor), Adhäsionsrezeptoren (z.B. Integrine und Selektine), Zytokinrezeptoren und Pattern-Recognition Rezeptoren (z.B. Toll-like Rezeptoren). Diese Rezeptoren stellen sicher, dass Neutrophile am Ort der Entzündung inflammatorische Reaktionen erkennen und auf pathogene Invasion reagieren können⁵. Die Lebensdauer von neutrophilen Granulozyten ist begrenzt und wird je nach Literatur und Untersuchungsmodell mit ungefähr 10 Stunden angegeben^{6,7}. Neutrophile Granulozyten gehören zu den ersten Leukozyten, die ins entzündete Gewebe rekrutiert werden. In Mäusen, die in dieser Arbeit als Versuchstiere genutzt werden, sind nur 25%-40% der zirkulierenden Leukozyten Neutrophile Granulozyten⁸.

Jedoch folgen andere Subpopulationen der myeloischen Reihe, wie eosinophile Granulozyten oder Monozyten, einem ähnlichen Rekrutierungsprozess wie dem der Neutrophilen Granulozyten^{3,9}.

Die theoretischen Grundlagen dieses Rekrutierungsprozesses ins entzündete Gewebe gehen bereits auf Entdeckungen des 19. Jahrhunderts von Dutrochet (1824) und Cohnheim (1877) zurück und entwickelten sich im Laufe jahrzehntelanger Wissenschaft zu einer gut untersuchten, aufeinander aufbauenden Kaskade von folgenden Einzelschritten. Die Rekrutierungskaskade startet mit dem sogenannten Einfangen („capture/tethering“) der Leukozyten aus dem Blutstrom. Dem erfolgreichen Einfangen folgt sogleich das Rollen entlang des entzündeten Endothels (=Trigger)^{1,3,10}. Beide Schritte werden durch Selektine vermittelt, welche mit glykosylierten Liganden wie PSGL-1 (P-Selektin Glykoprotein Ligand-1) interagieren¹¹. Diese Zell-Endothel-Kontakte sind initial temporär und lösen sich nach kurzer Zeit wieder ab. Durch die Bindung von Leukozyten exprimiertem β_2 -Integrin LFA-1 (Lymphocyte function-associated antigen-1, $\alpha L\beta_2$, CD11a/CD18) an ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1, CD54) auf Endothelzellen, drosseln Leukozyten ihre Rollgeschwindigkeit (langsames Rollen, „slow rolling“). Durch Interaktion rollender Leukozyten mit Chemokinen, die auf der Endothelschicht lokalisiert sind, wird schließlich die feste Adhäsion („full arrest/firm adhesion“) von Leukozyten an die endotheliale Oberfläche induziert. Anschließend verformen sich Leukozyten („spreading“) und kriechen („intraluminal crawling“) entlang des Endothels via Mac-1 (Monozyten-Adhäsion Complex-1, $\alpha M\beta_2$, CD 11b/CD18) und ICAM-1, um den passenden Platz für Ihre Auswanderung („Extravasation/Transmigration“) entweder über den para- oder den [^]transzellulären Weg ins extravaskuläre Gewebe zu finden. Die beschriebene Leukozytenrekrutierung ist in Abbildung 1 im Detail dargestellt^{3,4,10,12}.

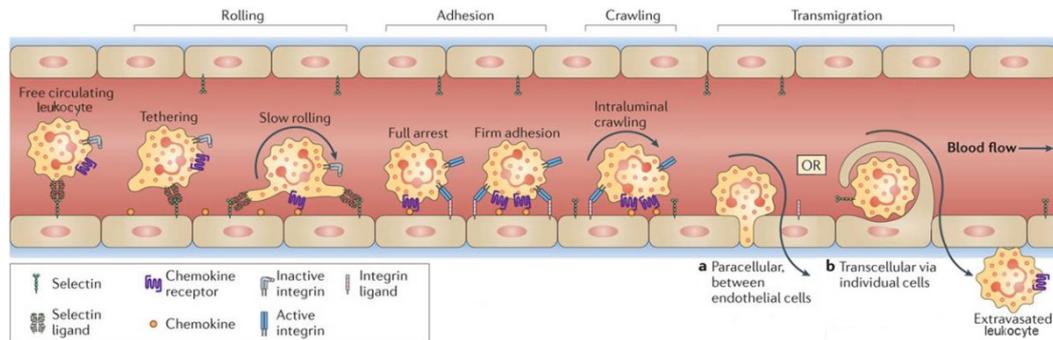


Abbildung 1: Die Leukozytenrekrutierungskaskade

Die Rekrutierung der frei zirkulierenden Leukozyten beginnt mit dem Einfangen der Zellen aus dem fließenden Blutstrom und deren Rollen entlang der Gefäßwand. Beide Schritte werden durch Selektine vermittelt und bereiten die Zelle auf die nachfolgende Adhäsion vor. Während des Rollens werden β_2 -Integrine auf den Leukozyten aktiviert, worauf die Rollgeschwindigkeit weiter gesenkt wird und es schließlich zu einer festen Adhäsion an der Endothelwand kommt. Anschließend sucht sich die Zelle einen geeigneten Ort für die Extravasation (modifiziert nach ¹⁰).

1.1. Einfangen und Rollen

Der erste Schritt der Leukozytenrekrutierung, das Einfangen der Leukozyten aus dem Blutfluss („Capture“), findet in postkapillären Venolen statt ^{13,14}. Da sich Erythrozyten in kleinen Gefäßen an zentralen Strömungsschichten orientieren, werden Leukozyten an die Endothelwand gedrängt, wodurch ihre Rekrutierung im Prozess des Einfangens begünstigt wird ¹⁵. Dieser initiale Schritt der Leukozytenrekrutierungskaskade ist durch Selektine und ihrer Liganden vermittelt.

Selektine gehören zur Familie der C-Typ Lektine und sind Calcium-bindende Transmembranglykoproteine, welche an glykosylierte Liganden binden. Die am NH_2 -Terminus gelegene Lektindomäne der Selektine ist für die Kohlenhydrat-Bindung verantwortlich. Benachbart folgt die EGF-like Domäne (Epidermal-Growth Factor like-Domäne), die die Ausrichtung und Präsentation der Selektin-Liganden-Bindung koordiniert. Short Consensus Repeats (SCR) sorgen für eine Verbindung der EGF-like Domäne zur Transmembrandomäne, welche wiederum mit einer kurzen zytoplasmatischen Kette am C-Terminus verbunden ist, die für die

Signaltransduktion verantwortlich ist (Abbildung 2) ^{16,17}.

Es gibt 3 Selektine: L-, E- und P-Selektin ¹⁶. Deren Präfixe sind auf die zugehörigen Zelltypen zurückzuführen, auf denen sie entdeckt wurden. L-Selektin ist auf den Mikrovilli der Leukozyten ^{18,19}, E-Selektin auf aktivierten Endothelzellen ^{20,21} und P-Selektin in den α -Granula der Thrombozyten (englisch: platelets), aber auch in den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen zu finden ^{16,22-25}.

P-Selektin (CD62P) kann innerhalb von wenigen Minuten nach Stimulation der Zelle durch Entzündungsmediatoren zur Zelloberfläche mobilisiert werden und ist für das Einfangen der Neutrophilen zu Beginn der Kaskade verantwortlich ²⁶. Die schnelle Aktivierung kann durch Histamin, Thrombin oder andere proinflammatorisch wirkende Substanzen getriggert werden ¹⁷. Außerdem kann eine Regulation auf Transkriptionsebene durch Stimuli wie LPS (Lipopolysaccharide) oder rmTNF- α (rekombinanter muriner Tumornekrosefaktor- α) innerhalb von wenigen Stunden stattfinden ²⁷.

L-Selektin (CD62L) ist konstitutiv auf allen Leukozyten exprimiert. Im Weiteren kann L-Selektin enzymatisch von der Zelloberfläche ins Blutplasma freigesetzt werden. L-Selektin ist bei akuter Entzündung für das „secondary capture“ verantwortlich, bei dem adhärenente Leukozyten weitere freie Leukozyten abfangen ²⁶. Neben seiner Funktion als Rollrezeptor spielt L-Selektin auch eine wichtige Rolle als Signalmolekül und bei der Einwanderung von Lymphozyten in sekundär lymphatische Organe ²⁸. Dies wurde vor allem für L-Selektin beim Menschen gezeigt ²⁹⁻³¹.

E-Selektin (CD62E) wird erst durch einen verstärkten Entzündungsreiz (z.B. durch $\text{mTNF-}\alpha$ und Interleukin-1) über transkriptionelle Hochregulation und somit zeitverzögert auf dem Endothel exprimiert und trägt mit der Aktivierung von Leukozyten zusammen mit Chemokinen zum Übergangsschritt von langsamen Rollen zur festen Adhäsion bei ^{21,32-34}.

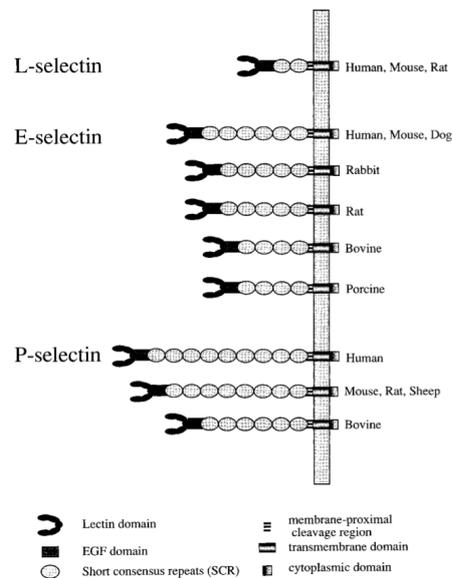


Abbildung 2: Struktureller Aufbau von L-, E-, und P- Selektin

Selektine weisen eine NH_2 -terminale Lektindomäne auf, gefolgt von einer EGF-like Domäne und einer variablen Anzahl von SCR. Im Anschluss folgt eine Transmembrandomäne mit kurzem zytoplasmatischen Ende. E- und P-Selektin haben in unterschiedlichen Spezies eine verschiedene Anzahl an SCR. Hier dargestellt Selektine des Menschen und verschiedener Tiere ¹⁶. *Abkürzungen: EGF-like Domäne=Epidermal-Growth Factor like-Domäne; SCR=Short Consensus Repeats*

Die dazugehörigen Selektin Liganden sind vor allem durch die spezifische Kohlenhydratdeterminante Sialyl Lewis X (sLe^x), die alle drei Selektine mit niedriger Affinität binden kann, charakterisiert ¹¹. Im Kontext von Entzündungsreaktionen gehören der P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1, CD162), der E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1) und CD44 zur den relevanten Vertretern der Selektin-Liganden ³⁵. PSGL-1 stellt in der Leukozytenrekrutierungskaskade den wichtigsten Selektin-Liganden dar, indem er an P-, E und L-Selektin bindet ²⁶. Bindungen zwischen Selektin und Selektin-Ligand werden durch die Blutströmung

begünstigt und verstärkt (catch bonds)^{1,36}, während bei Sistieren der Blutströmung die Trennung der Bindungen erfolgt (slip bonds)³⁶. Neben der Funktion als Adhäsionsmolekül induzieren Selektine auch Signaltransduktionsprozesse in Leukozyten. So bewirkt die Verbindung von P- oder E-Selektin mit PSGL-1/CD162 bzw. die Interaktion von E-Selektin mit CD44 die Aktivierung der Src-Kinasen Fgr, Hck und Lyn. Konsekutiv wird dadurch spleen tyrosinase kinase (Syk)-vermittelt die Bruton's Tyrosin Kinase (Btk) aktiviert^{1,37}. Dies löst u.a. eine Konformationsänderung im β_2 -Integrin LFA-1/CD11a in die aktivierte Form („extended“ Konformation) aus und bewirkt dadurch das Abbremsen der Leukozyten von ungefähr 5 auf 3 $\mu\text{m/s}$, welches als langsames Rollen bezeichnet wird¹³. Während LFA-1 konstitutiv auf der Zelloberfläche vorhanden ist, wird das Integrin Mac-1/CD11b über die Interaktion E-Selektin und ESL-1 aktiviert und vermehrt exprimiert³⁸. Der detaillierte Signalweg ist hierbei unbekannt (Abbildung 3).

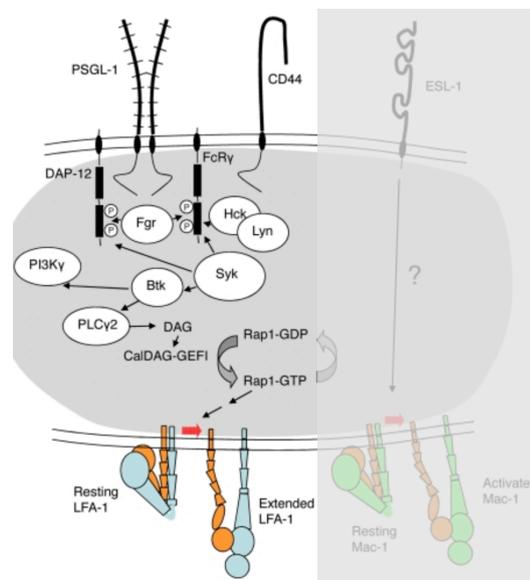


Abbildung 3: Selektinabhängige intrazelluläre Signalwege in Neutrophilen

Die Interaktion von Selektin-Liganden an Selektine aktiviert multiple Kinasen im Zellinneren, welche schlussendlich zur Aktivierung von Integrinen führen. Die Aktivierung von LFA-1 wird u.a. über die Interaktion von P-Selektin oder E-Selektin an PSGL-1/CD162 bzw. die Bindung von E-Selektin an CD44 und

Aktivierung von SFK, Syk und Btk ausgelöst (modifiziert nach³⁹). *Abkürzungen: LFA-1=Lymphocyte function-associated antigen-1; PSGL-1=P-Selektin Glykoprotein Ligand-1; CD=Cluster of Differentiation; SFK=Src Familien Kinase; SYK=spleen tyrosine kinase; Btk=Bruton's tyrosine kinase*

1.2. Aktivierung, Adhäsion und Abflachung

Entlang des aktivierten Endothels finden im nächsten Schritt Chemokinrezeptoren (G-Protein gekoppelte Rezeptoren) rollender Leukozyten den Kontakt zu Chemokinen, welche auf dem Endothel präsentiert werden⁴⁰. Hierdurch werden Integrine aktiviert, die zur Integrin-vermittelten Adhäsion führen¹. Wichtige Integrinfamilien bei der Leukozytenrekrutierung myeloischen Ursprunges gehören den Gruppen der β_1 - und β_2 -Integrinen an⁴¹. β_1 -Integrine wie VLA-4 (Very late Antigen-4, $\alpha_4\beta_1$) oder die bereits beschriebenen β_2 -Integrine wie LFA-1 und Mac-1 sind Heterodimere aus nicht-kovalent gebundenen transmembranen Glykoproteinen Typ I und verändern während der Aktivierung ihre Konformation⁴². Die Konformationsänderung führt anschließend zu einer verstärkten Bindung an ihre Liganden. So bindet LFA-1 an ICAM (Intercellular adhesion molecule), VLA-4 an VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1, CD106) und Mac-1 an ein Set von Liganden der extrazellulären Matrixproteinen und Proteinen des Komplementsystems. Diese Liganden sind u.a. an der Endotheloberfläche exprimiert¹⁰. Integrine kommunizieren dadurch als transmembrane Zelladhäsionsmoleküle in einer dynamischen Interaktion zwischen extrazellulären Adhäsionsmolekülen und dem intrazellulären Aktinzytoskelett und verbinden Zellen mit der Extrazellulärmatrix.

Auf Neutrophilen Granulozyten sind vor allem β_2 -Integrine exprimiert, die in drei wesentlichen Konformationsanordnungen existieren, die ihre Liganden Affinität und somit Aktivität widerspiegeln: eine inaktive Form mit niedriger Affinität zum Liganden (abgewinkelte Formation), eine intermediäre Form mit mittlerer Affinität

zum Liganden (gestreckte Formation), eine aktive Form mit hoher Affinität zum Liganden (gestreckte Formation mit Veränderungen transmembranären Domänen). Integrine selbst haben keine enzymatische Aktivität und sind daher auf intrazelluläre Signaling-Moleküle mit enzymatischer Aktivität angewiesen, die die Änderung der Integrinkonformation erkennen und weiterleiten. Integrine sind außerdem bidirektionale Signalmoleküle der Plasmamembran, die sowohl in Signalwegen, ausgehend vom Zytoplasma der Zelle („Integrin Inside-out signaling“), als auch ausgehend von der Bindung an ihre Liganden („Integrin Outside-in signaling“) beteiligt sind^{7,43,44}. Die Integrinaktivierung führt dann zu weiteren intrazellulären Signalschritten der festen Zelladhärenz, Zellverformung durch Aktinzytoskelettveränderungen und Zellmigration, die als Outside-in Weg bezeichnet werden⁴⁵. Bei beschriebener Integrinaktivierung und Stärkung der Leukozytenadhäsion spielen Src Familien Kinase (SFKs) eine wichtige Rolle⁴⁶.

1.3. Kriechen adhärenter Zellen und Transmigrieren

Der letzte Schritt der Rekrutierungskaskade stellt die Auswanderung der Leukozyten durch die Venenwand ins extravasale Gewebe dar (Diapedese). Zunächst suchen die adhärenenten Zellen in einer Kriechbewegung entlang des Endothels („intraluminal crawlen“) eine geeignete Stelle, bevor sie anschließend dort transmigrieren. Der bereits gezeigte „Outside-in Signalweg“ ist ein entscheidender Schritt der Kriechbewegung. Philippson et al. zeigte, dass Neutrophile und Monozyten via Mac-1/ICAM-1 (Integrin/Ligand) „crawlen“ können⁴⁷. Anschließend durchqueren die Zellen bei der Transmigration aus dem Gefäß ins Gewebe folgende drei Schichten: Endothelzellen, Basalmembran und Perizyten¹. Die Transmigration kann dabei abhängig vom Stimulus und der Endstrombahn sowohl parazellulär (zwischen Zell-Zellkontakten) als auch transzellulär (durch die Zelle hindurch) stattfinden¹⁰. Für gewöhnlich wird von

Neutrophilen der parazelluläre Weg zwischen Endothelzellen bevorzugt, welcher ca. 5-15 Minuten dauert ¹. Dabei wird durch die Interaktion von Integrinen auf adhärenen Leukozyten mit endothelalem ICAM-1/CD54 die Dissoziation von VE-Cadherin, einem Verbindungselement zwischen Endothelzellen, bewirkt. Die Lösung der Verbindung von benachbarten Endothelzellen ermöglicht Leukozyten den parazellulären Weg. Bei der Auswanderung spielen neben ICAM1/CD54 auch PECAM1/CD31 (platelet/endothelial-cell-adhesion molecule), VCAM-1/CD106, JAM-A (junctional adhesion molecule A) und JAM-C (junctional adhesion molecule C) eine wichtige Rolle ^{48,49}. Die beiden Möglichkeiten der Transmigration und deren Mechanismen sind in Abbildung 4 gezeigt.

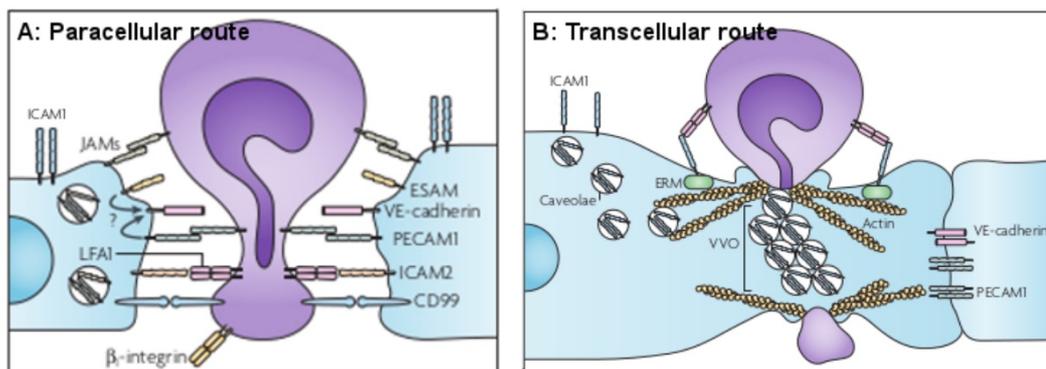


Abbildung 4: Darstellung der zwei Transmigrationsrouten von Neutrophilen

A: Der parazelluläre Weg zeigt die Route der Leukozyten zwischen zwei Endothelzellen und deren Rezeptoren. Die Interaktion von ICAM-1/CD54 und angehefteten Leukozyten induziert die Ablösung von VE-Cadherin, so dass anschließend benachbarte und verbundenen Endothelzellen gelöst bzw. geöffnet werden und Leukozyten dazwischen transmigrieren können. Weitere wichtige Verbindungsmoleküle sind z.B. PECAM-1/CD31 und JAM-A.

B: Der transzelluläre Weg verläuft direkt durch die Endothelzelle hindurch. Caveolae - also kleine Einbuchtungen -, die ICAMs enthalten, formen VVO, welche einen Kanal für die transzelluläre Transmigration bilden (modifiziert nach ¹). *Abkürzungen: ICAM-1=Intercellular adhesion molecule-1; CD=Cluster of Differentiation; VE-Cadherin=vascular endothelial cadherin; PECAM-1=platelet/endothelial-cell-adhesion molecule-1; JAM-A=junctional adhesion molecule A; VVO=Vesikulovaskuläre Organellen*

Weitere genaue Mechanismen der Transmigration sind im Detail noch nicht ausreichend verstanden. Es gibt Hinweise, dass die Integrine VLA3 (Very late Antigen-3, $\alpha_3\beta_1$) und VLA6 (Very late Antigen-6, $\alpha_6\beta_1$) gemeinsam mit Neutrophilen Elastase (NE) eine Rolle spielen. Kürzlich konnte unsere Arbeitsgruppe auch zeigen, dass Neutrophile die Basalmembran nach Translokation und Präsentation von VLA3, VLA4 und NE an die Zelloberfläche, welche zuvor in Vesikeln gespeichert waren, durchqueren. Dieser Vorgang wird initiiert durch die Interaktion der Neutrophilen mit dem Endothel und ist abhängig von PECAM-1/ICAM-1 und CXCL1 (chemokine (C-X-C motif ligand 1) sowie der Serin/Threonin Proteinkinase MST1 (Mammalian Steril Twenty-like protein kinase 1). Der Vesikel-Transport wird zudem von RAB GTPasen (G-Protein) reguliert, v.a. Rab 27a. Die Funktionalität von Rab27 wird durch die beiden Rab27 Adaptoren Synaptotagmin-like Protein 1 (JFC1) und Munc13-4 (UNC13D) reguliert⁴⁶. Sobald die Neutrophilen das Gefäß passiert haben, bewegen sie sich im Interstitium sowohl Integrin-abhängig als auch Integrin-unabhängig entlang eines Chemokin-Gradienten zum Ort der Entzündung⁵⁰. Im entzündeten Gewebe greifen schließlich unterschiedliche Abwehrstrategien. Neutrophile Granulozyten können eingedrungene Pathogene unschädlich machen, indem sie diese in ihr Zellinneres aufnehmen und verdauen (Phagozytose) oder Enzyme und proinflammatorische Zytokine aus gespeicherten Granula freisetzen, um Keime zu zerstören und die Entzündungsreaktion gleichzeitig zu verstärken (Exozytose). Außerdem können die Immunzellen reaktive Sauerstoffradikale bilden, um mit diesen Molekülen Krankheitserreger zu bekämpfen. Ein weiterer Abwehrmechanismus wird als „NETosis“ (NET = neutrophil extracellular trap) beschrieben. Dabei wird Desoxyribonukleinsäure (DNA) von Neutrophilen Granulozyten in Form von netzartigen Strukturen gebildet, was dann meist zum Zelltod führt^{51,52}. Neutrophile

Granulozyten selbst werden am Lebensende von Makrophagen phagozytiert⁵³. Neben ihres nützlichen Beitrages in der Rolle der Immunabwehr, tragen Neutrophile Leukozyten auch zur Pathophysiologie von akuten und chronischen inflammatorischen Erkrankungen - zum Beispiel im Rahmen einer überschießenden Entzündungsreaktionen - bei.

2. Familie der Proteintyrosinkinasen (PTK)

Die Tyrosinkinasen sind eine Familie von Proteinkinasen, die als Enzyme in eine Vielzahl verschiedener biologischer Prozesse eingebunden sind. Man unterteilt diese Gruppe in 58 Rezeptortyrosinkinasen und 32 Non-Rezeptortyrosinkinasen/zytoplasmatische Tyrosinkinasen (z.B. Syk, Jak, Src-Kinase). Abbildung 5 zeigt den Stammbaum der Familie. Beide Familien sind, wie bereits beschrieben, in wichtige Signaltransduktionsprozesse eingebunden. Ausgelöst z.B. durch eine Ligandenbindung modifizieren sie Enzyme oder Proteine durch die Übertragung von Phosphatgruppen auf Tyrosinreste (Tyrosinphosphorylierung). Die Phosphorylierung bewirkt eine Aktivierung bzw. Inaktivierung des Zielproteins. Mögliche Folgen einer Phosphorylierung sind unter anderem Proliferation, Regeneration, Zellzyklus-Progression oder Apoptose-Inhibition⁵⁴.

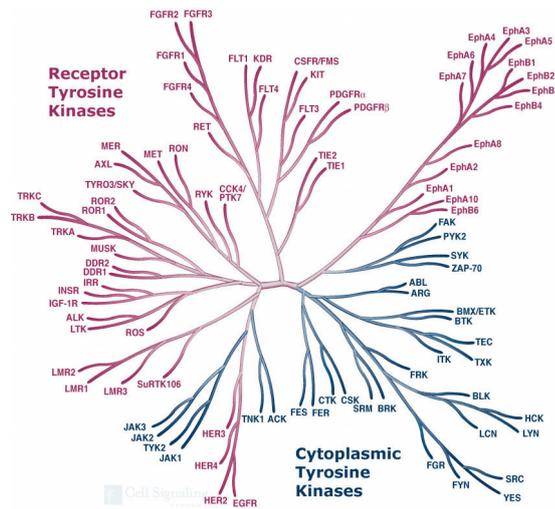


Abbildung 5: Familie der Tyrosinkinasen

Die Graphik zeigt die große Familie der Tyrosinkinasen. In roter Farbe sind die Rezeptortyrosinkinasen und deren Verwandtschaft dargestellt. In blauer Farbe ist die Familie der Non-Rezeptortyrosinkinasen (zytoplasmatische Tyrosinkinasen) und ihr Stammbaum skizziert (Cell Signaling Technology Inc. 1999-2013).

Subfamilie	Vorkommen
Src	Ubiquitär, Neuronen-spezifische Isoform
Fyn	Ubiquitär, T-Zell-spezifische Isoform (Fyn-T)
Yes	Ubiquitär
Hck	Neutrophile, Monozyten
Fgr	Neutrophile, Monozyten, Gehirn
Lyn	Neutrophile, Monozyten, B-Zellen, Gehirn
Blk	B-Zellen
Lck	T-Zellen, NK-Zellen
Frk	Epithelzellen

Tabelle 1: Zellpopulationsabhängige Expression der Src-Tyrosinkinasen

Aufgrund ihres Vorkommens kann man die Tyrosinkinasen in drei Untergruppen unterteilen. Src, Fyn und Yes zählen zu den häufigsten Non-Rezeptortyrosinkinasen, die in den meisten Geweben exprimiert werden. Hck, Fgr, Lyn, Blk und Lck sind typisch für hämatopoetische Zellen. Frk repräsentiert eine Untergruppe, die vor allem in Epithelzellen zu finden ist. Hck, Fgr und Lyn sind in fetter Schriftart hervorgehoben, da sie die prädominanten Src-Kinasen in Neutrophilen sind und in dieser Arbeit untersucht wurden⁵⁴.

2.1. Familie der Src-Tyrosinkinasen (SFK)

Die Familie der Src-Tyrosinkinasen (Src Family Kinase, SFK) gehört zu der größten Familie der Non-Rezeptortyrosinkinasen. Der Dreibuchstaben-Code Src

steht für die Kurzform Sarkom und wird zu dem ersten identifizierten viralen Onkogen gezählt, da es die Potenz besitzt, Tumore zu verursachen. Für dessen Entdeckung erhielten J. Michael Bishop und Harold E. Varmus im Jahr 1989 den Medizinnobelpreis⁵⁵.

Die Familie der Src-Tyrosinkinasen besitzt insgesamt neun Mitglieder mit sehr kurzen Namen. Src, Fyn und Yes, die der SrcA Subfamilie angehören, und ubiquitär exprimiert werden. Hck, Fgr, Lyn, Blk und Lck werden zur SrcB Subfamilie gezählt und sind typisch für hämatopoetische Zellen. Frk gehört zu einer dritten eigenen Untergruppe, die vor allem in Epithelzellen zu finden ist. Hck, Fgr und Lyn sind die Src-Kinasen, die in Neutrophilen Granulozyten exprimiert sind (Abbildung 6)^{54,56}. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die Subfamilien der Src-Tyrosinkinase und deren Gewebeexpressionen.

Die Struktur der Src-Kinasen besteht am C-terminalen Ende aus einer „Src-like-homology 4“-Domäne (SH4-Domäne), die für die Verankerung in die Zellwand und die Funktion der Kinaseaktivität verantwortlich ist. An die SH4-Domäne schließt sich die sogenannte „unique domain“ an, die für jede Kinase mit 50-80 Aminosäuren individuell und spezifisch für die Interaktion mit deren Substraten ist. Es folgen anschließend eine SH3-Domäne (verantwortlich für die Interaktion mit prolinreichen Sequenzen), eine SH2-Domäne (verantwortlich für die Interaktion mit tyrosinreichen Sequenzen) und schlussendlich eine SH1-Domäne, welche ATP bindet und katalysiert^{57,58}.

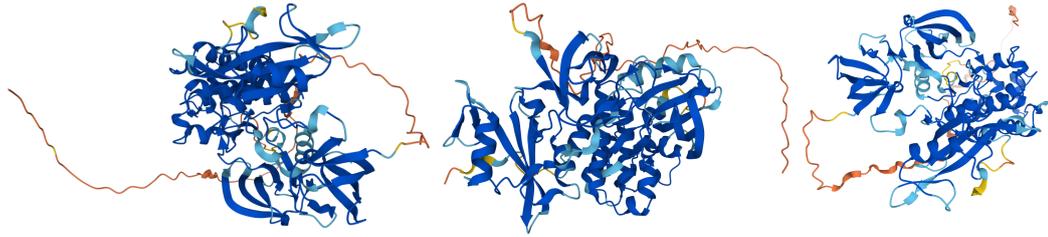


Abbildung 6: 3D-Proteinstrukturen der Src-Tyrosinkinase Hck, Fgr und Lyn

Die Animation wurde mit dem Programm AlphaFold® erstellt, das einen Konfidenzwert zwischen 0 und 100 für jede Proteinstruktur berechnet. Regionen mit geringem Konfidenzwert (<70) sind ungefaltete Proteinabschnitte. Die drei Kinasen Hck, Fgr und Lyn (von links nach rechts) haben insgesamt jeweils eine Molekülmasse von ca. 60 Dalton^{59,60}. *Legende des Konfidenzwertes: dunkelblau >90; hellblau >70; gelb >50; orange <50*^{60,61}

Src-Kinasen sind v.a. an der Phosphorylierung von Oberflächenrezeptoren beteiligt und fungieren zusammen mit Syk als intrazelluläre Moleküle, die Signalprozesse einleiten. Eine gut untersuchte Funktion der Src-Tyrosinkinase im Immunsystem ist ihre Rolle in der Integrin-Signalkaskade. Es wurde gezeigt, dass Hck, Fgr und Lyn den „Outside-in Signalweg“ durch β_1 - und β_2 -Integrine in Neutrophilen und Makrophagen vermitteln^{62,63,64}.

3. *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Knockout Maus

Um die genauere Funktion und phänotypischen Auswirkung der Gene Hck, Fgr und Lyn in der Leukozytenrekrutierungskaskade zu ermitteln, wurden für die *in vivo* Experimente sogenannte Triple-Knockout Mäuse verwendet. Dabei sind die drei spezifischen Gene Hck, Fgr und Lyn durch Veränderung gezielt genetisch inaktiviert (*Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}*), so dass auf Ihre Funktion geschlossen werden kann. Durch die Kreuzung von Single-Knockouts (*Hck^{-/-}* und *Fgr^{-/-}*) zu *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}*-Double-Knockout Mäusen und im weiteren Schritt weitere Kreuzung der Double-Knockouts mit einer *Lyn^{-/-}*-Single-Knockout Maus entstand der verwendete Genotyp *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}*. Die Nachkommen sind fertil und weisen keinen

offenkundig veränderten Phänotyp auf⁶⁵⁻⁶⁸.

Die Funktionen der Gene *Hck*, *Fgr* und *Lyn* wurde in jüngster Vergangenheit bereits intensiv an Single-Knockouts untersucht. Obwohl es einige Hinweise darauf gibt, dass die Src-Kinasen für den reibungslosen Integrin-Signalweg entscheidend sind, zeigt ein Blick in die Literatur, dass *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} Monozyten und Makrophagen Auswanderungsdefekte *in vitro* und *in vivo* zeigen^{64,69,70}. In weiteren Arbeiten zeigte sich, dass von *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}-Knockout Mäusen isolierte Neutrophile als Zeichen eines gestörten Integrin Outside-in Signaling nur eingeschränkt ihre Form als Vorbereitung für die Auswanderung (sogenanntes „spreaden“) verändern können, Defizite in der festen Adhärenz zeigen und vermindert an aktivierte Thrombozyten adhärieren können^{62,71}. In anderen Modellen zeigten sich *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} Mäuse vollständig von der Entwicklung Autoantikörper-induzierten Arthritiden und blasenbildenden Hauterkrankungen oder vor bakteriell ausgelösten Pneumonien geschützt^{72,73}.

4. *Lyz2*^{EGFP} Maus

Hämatopoetische Zellen myeloischen Ursprunges können durch genetisches Einbringen eines grün fluoreszierenden Proteins mit der Abkürzung GFP (green fluorescent protein) markiert und anschließend durch Fluoreszenzmikroskopie bei einer Wellenlänge von 395-475 nm detektiert werden⁷⁴. Das Protein GFP (Länge: 238 Aminosäure; Masse: 26,9 kD) stammt aus der Qualle *Aequorea victoria* und wurde 1962 von dem Japaner Osamu Shimomura vor der Westküste Nordamerikas erstmals entdeckt. Durch die gen-spezifische Fusion des grün leuchtenden Proteins mit anderen Proteinen und somit Möglichkeit der Markierung und visuellen Darstellung von Zellpopulationen *in vivo* oder gesamten lebenden Organismen erlangt diese Entdeckung große Bedeutung für die Zellbiologie. Der Entdecker des

GFP Osamu Shimomura und seine Weiterentwickler Martin Chalfie und Roger Y. Tsien erhielten daher im Jahr 2008 den Nobelpreis für Chemie⁷⁵⁻⁷⁷. GFP ist nicht zellschädigend und eignet sich daher in dieser Arbeit zur Visualisierung von Zellbewegungen der myeloischen Reihe, insbesondere der neutrophilen Granulozyten im Musculus cremaster. In dieser Arbeit wurde EGFP verwendet (enhanced green fluorescent), welches stärker fluoresziert und photostabiler ist. Die Entwicklung der ersten Mauslinie, in der die Zellen der myeloischen Reihe grün fluoreszieren, wurden bei Faust et al. beschrieben. Hierbei wird das EGFP in den murinen Lysozyme M Genlocus (*Lyz2*) eingebracht und durch homologe Rekombination vervielfältigt. Transgene Mäuse (*Lyz2*^{EGFP}) entwickeln sich unauffällig und sind fertil⁷⁴.

5. Tyrosinkinaseinhibitoren

Um die potenziell schädliche Wirkung von Src-Tyrosinkinasen therapeutisch einzusetzen, wurden pharmakologische Inhibitoren dieser Enzyme in den letzten Jahrzehnten entwickelt.

Eine Screening-Analyse von insgesamt 25.000 Molekülen der Firma Vichem Chemie Research[®] und der Semmelweis-Universität in Budapest zeigte eine Reihe von vielversprechenden Verbindungen mit inhibitorischen Wirkungen auf Src-Kinasen. Hierbei erwies sich der Wirkstoff Dasatinib, welcher bereits in der Onkologie im klinischen Einsatz ist, als besonders interessant. Erste *ex vivo* Versuche wurden mit dieser Substanz bereits an Neutrophilen durchgeführt und zeigten effektive Ergebnisse. Im Mausmodell zeigte sich nach oraler Applikation von Dasatinib eine Verminderung der Adhäsion von Leukozyten⁷⁸ in Dosierungen, wie sie bereits aus der Onkologie bekannt sind^{79,80}. Weitere Versuche der Arbeitsgruppe Mócsai zeigten auch eine hemmende Wirkung von Dasatinib bei

auto-inflammatorischen Erkrankungen⁷⁸. Daher wird Dasatinib im Folgenden genauer charakterisiert.

5.1. Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib

Dasatinib (Handelsnamen SPRYCEL[®]) ist ein spezifischer Tyrosinkinase-Inhibitor von BCR-ABL-Kinase, c-KIT, PDGFR und von Src-Kinasen. Der Wirkstoff wird oral (in Tabletten- oder Pulverform) aufgenommen und hepatisch eliminiert. Er besitzt eine 96% Plasmaproteinbindung und eine Halbwertszeit von 5-6 Stunden⁸¹. Dasatinib erhielt erstmals im Jahr 2006 seine Zulassung sowohl durch die FDA (U. S. Food and Drug Administration), als auch durch die EMA (Europäische Arzneimittelagentur) für die Behandlung von Erwachsenen mit chronisch myeloischer Leukämie (CML) in der chronischen Phase (CP) und Erwachsenen mit Philadelphia-Chromosom-positiver akuter lymphatischer Leukämie (ALL), die resistent oder intolerant gegenüber einer Erstlinientherapie mit Imatinib (Glivec[®]) waren (sogenannte Zweitlinientherapie). Im Verlauf der Jahre wurde Dasatinib mittlerweile auch in der Erstlinien-Therapie der CML-CP eingesetzt. Seit 2017 gab es auch eine Zulassungserweiterung für Kinder und Jugendliche mit CML-CP⁸²⁻⁸⁵. Abbildung 7 zeigt die chemische Struktur des Wirkstoffes.

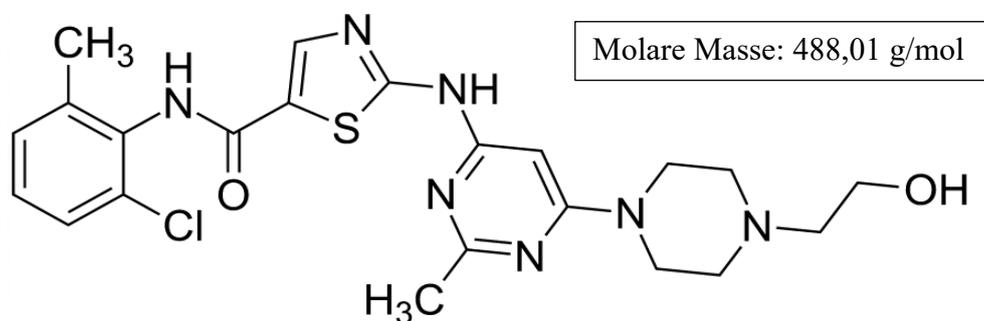


Abbildung 7: Struktur-, Summenformel und Gewicht des Wirkstoffes Dasatinib

N-(2-Chlor-6-methylphenyl)-2-({6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-2-methyl-4-pyrimidinyl} amino)-1,3-thiazol-5-carboxamid (C₂₂H₂₆ClN₇O₂S) gehört zur Wirkstoffklasse der Zytostatika und wird zu den Tyrosinkinaseinhibitoren gezählt⁸³⁻⁸⁶.

6. Hypothese und Fragestellungen

Diese Arbeit untersuchte die Rolle der SFK in der Neutrophilenrekrutierungskaskade im akuten Entzündungsmodell *in vitro* und *in vivo*. Die Untersuchung fand in Wildtyp-Mäusen als auch in Src-Tyrosinkinase (*Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}*)-Triple-Knockout Mäusen unter der Gabe des Src-Tyrosinkinase Inhibitors Dasatinib statt. Zur Visualisierung der Leukozyten wurde in einigen Experimenten eine *Lyz2^{EGFP}* Maus verwendet, bei der die Zellen der myeloischen Reihe (vor allem Neutrophile) grün fluoreszieren ⁷⁴.

Unsere Studie wurde mit der Hypothese durchgeführt, dass Src-Tyrosinkinase bei der Neutrophilenrekrutierung im Rahmen von Entzündungsprozessen beteiligt sind und die Rekrutierung von Neutrophilen durch den Src-Tyrosinkinase Inhibitor Dasatinib gehemmt werden kann.

Hieraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- 1) Ist die SFK-Funktion entscheidend für die Rollgeschwindigkeit von Neutrophilen *in vivo*?
- 2) Welche Effekte zeigen Src-Kinasen in der Adhäsion von Leukozyten *in vivo* und welche Rolle spielt Wandschubspannung (=wall shear stress) dabei?
- 3) Welche Auswirkungen haben SFKs auf die Extravasation der Leukozyten?

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Material

1.1. Geräte

Gerät	Herstellerangaben
Chirurgisches Instrumentarium	F.S.T. Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Coulter-Counter	Beckman Coulter AC T8, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Durchflusszytometer	Beckman Coulter Gallios Flow Cytometer, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
DVD-Recorder	Panasonic DVD Video Recorder LQ-MD800, Panasonic Europe GmbH, Wiesbaden, Deutschland
Elektrokauter	Elektro-Cautery Device, Gemini, Braintree, Scientific Inc, Ma, USA
Heizplatte	Isopad Icon-CHP, Pentair Thermal Management, Siegen, Deutschland
Idexx ProCyte Dx hematology analyzer	Idexx Europe B.V, Kornwestheim/Deutschland
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved, LO, LaborOptik, Lancing, UK
pH-Meter	WTW Series InoLab, XYLEM Analytics, Weilheim, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Spritzenpumpe	Harvard Apparatus, Holiston, MA, USA
Thermo Mixer F1.5	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Videorekorder	Panasonic MD 830, Wiesbaden, Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie 2; Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waage	Mettler Toledo AB 104-S-A, Gießen, Deutschland
Wärmebad	Julabo EM; Julabo, Seelbach, Deutschland
Zellflow	Heraeus Laminair, HA 2248, Hanau, Deutschland
Zentrifuge	Merck Eurolab Galaxy Mini, Darmstadt, Deutschland
	Heraeus Megafuge 1.0R, Heraeus, Hanau, Deutschland

	Hettich; Rotanta/K Rotina 420R, Mirko 200R; Universal 30RF; Andreas Hettich GmbH & Co Tuttlingen, Deutschland
--	---

1.2. Mikroskope und Zubehör

	Gerätenamen	Hersteller
<i>In-vivo</i> Mikroskop	Olympus BX51 WI Olympus SZ61 Olympus SZX7	Olympus, Hamburg, Deutschland
Durchlicht	Olympus TH4-200	Olympus, Hamburg, Deutschland
Blitzbeleuchtungssystem	SP-20	Rapp Opto-Electronics, Hamburg, Deutschland
Mikroskop-Tisch	EXFO Motorized Platform	Gibraltar Burleigh, Thorlabs, Newton, NJ, USA
CCD-Kamera	Kappa CF8 HS	Kappa Optronics GmbH, Gleichen, Deutschland
Kamera-PC	LaVision ImagerPro X	LaVision Biotec, Bielefeld, Deutschland
Objektive	Objektiv 5x Objektiv 10x Objektiv 20x Objektiv 40x Objektiv 60x	Zeiss Achrostigmat 5x/0,12W ∞ / Olympus LUM Plan FI 10x/0.30W ∞ / Olympus XLU Plan FI 20x/0,95W ∞ / Olympus LUM Plan FI/IR 40x/0.8W ∞ / Olympus LUM Plan FI/IR 60x/0.9W ∞ / 0
Lichtmikroskop	Axioskop SPOTInsight CCD Kamera	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
konfokales Mikroskop	SP5, 63x, 1.4 NA Ölimmersion	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
VHS-Rekorder	Panasonic	Panasonic, Japan

1.3. Allgemeine Substanzen

Reagenzien	Hersteller
Agarose Gel (2%)	Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, Missouri, USA
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Hoffmann- La Roche AG, Grenzach Wyhlen

Bovines Serumalbumin (BSA) 2mg/ml	Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, Missouri, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, Missouri, USA
Casein 10%	Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, Missouri, USA
Chloroform-Phenol- Isoamylalkohol-Mischung	Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, Missouri, USA
Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM)	Thermo Fisher, Waltham, MA USA
Heparin-Natrium-25000	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1- piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, Missouri, USA
Kaliumchlorid (KCl)	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, Missouri, USA
Methylcellulose	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
N ₂ 95%, CO ₂ 5%	Linde AG, München, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumbikarbonat (NaHCO ₃)	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Rekombinanter muriner Tumornekrosefaktor- α (rmTNF- α)	Genaxxon, Bioscience, Ulm, Deutschland

1.4. Reagenzien für die Histologie

Reagenzien	Hersteller
Eukitt® Medium	O.Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland
Giemsa-Lösung	Abcam, Cambridge, MA
Essigsäure (0,03%)	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol-Reihe (70%, 96%, 100%)	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
May Grunwald Lösung	Abcam, Cambridge, MA
PFA (Paraformaldehyd in PBS, 4%)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Phosphatpuffer (0,1 Molar, pH 7,4) mit 5% Ethanol	Abcam, Cambridge, MA
Xylol	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland

1.5. Lysepuffer für Polymerasekettenreaktion

Reagenzien	Konzentration	Hersteller
EDTA	10 mM	Invitrogen AG, Carlsbad, Kalifornien, USA
Tris-HCl, pH 7,6	10 mM	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
SDS	0,5%	Roth GmbH, Wiesbaden, Deutschland
NaCl	10 mM	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg vor der Höhe, Deutschland
Proteinase K	15 µl/ml Lysepuffer	Roche AG, Basel, Schweiz

1.6. Superfusionslösung I und II für *in vivo* Experimente

Superfusionslösung I	Menge g (Gramm) gelöst in l (Liter)
NaCl	292,9 g
KCl	13,3 g
CaCl ₂	11,2 g
MgCl ₂	7,7 g
deionisiertes H ₂ O	3,8 l

Superfusionslösung II	Menge g (Gramm) gelöst in l (Liter)
NaHCO ₃	57,5 g
deionisiertes H ₂ O	3,8 l

1.7. Blockierende Antikörper für Flusskammern

Reagenzien	Konzentration	Hersteller
rmE-Selektin (CD62E Fc chimera)	20µg/ml	R&D Systems
rmICAM-1 (CD54 Fc chimera)	15µg/ml	R&D Systems
rmKC/CXCL-1	15µg/ml	R&D Systems
rmPECAM-1 (CD31)	20µg/ml	R&D Systems
LFA-1 (Alexa Fluor 546) (CD11a/CD18rat anti mouse)	20µg/ml	BioLegend

1.8. Verbrauchsmittel

Produkt	Hersteller
BD Microtainer K2E Tubes	Becton, Dickson and Company, MD, USA
Eppendorf Tubes®	Eppendorf, Deutschland

Faden (Stärke 6.0)	Resorba, Nürnberg, Deutschland
Glaskapillaren (0,04x0,4mm)	VitroCom, Mountain Lakes, USA
Kanülen	Becton Dickinson and Company, MD, USA
Labeling Kit	Thermo Fisher, Waltham, MA USA
Leukoplast 5x1,25m	BSN medical GmbH
Nahtmaterial (6.0) Monofilament (nicht-resorbierbar)	Daclon Nylon
Objekträger SuperFrost®	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland)
Pasteur Pipetten	Brand GmbH & Co
Pipetten (1, 2, 5, 10, 25ml)	Falcon, Corning
Polyethylenschlauch PE 90	Becton Dickinson and Company, MD, USA
Polyethylenschlauch PE 10	Becton Dickinson and Company, MD, USA
Spritze (1, 10ml)	Omnican, Braun, Melsungen, Deutschland
Spritze (2, 5, 20ml)	Becton Dickinson and Company, MD, USA
Tube (5ml)	Becton Dickinson and Company, MD, USA
Tube (15ml)	Greiner Bio-One, International
Tube (50ml)	Falcon, Corning
Cell strainer, 40ug Nylon	Falcon, Corning

1.9. Narkosemittel

Wirkstoff	Handelsnamen	Hersteller
Ketamin	Ketavet (100mg/ml)	Pharmacia GmbH
Xylazin	Rompun 2%	Bayer Health Care
Natriumchlorid	NaCl	Fresenius Kabi GmbH

1.10. Software

Software	Hersteller/Entwickler
Adobe Photoshop & Illustrator CS6	Adobe
AlphaFold Monomer V 2.0.	EMBL-EBI, Deepmind
Circusoft Instrumentation	Wayland et Johnson
Endnote X7.4	Thomson Reuter
Fiji Image J	AMD
ImageJ 1.49	National Institute of Health
Imaris 7.4	Bitplane
Inspector Pro	La Vision Biotech
Kaluza 1.3	Beckman Coulter
Microsoft Office Version 16.37	Microsoft

Sigma Plot V12.0	Systat Software GmbH
SPOT-Basic	SPOT Imaging
Prism 6.05	Graphpad
VCL-Player	VideoLAN Team
VirtualDub Version 1.9.11	Avery Lee

2. Versuchstiere

Die verwendeten Tiere entsprachen dem genetischen Hintergrund C57/BL6 WT und wurden über Charles River, Sulzfeld, Deutschland und Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich erworben. *Lyz2*^{EGFP} Mäuse wurden durch Professor Thomas Graf, Centre for Genomic Regulation, Barcelona, Spanien und SFK-Knockout Mäuse (*Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-}) durch Professor Atilla Mócsai, Semmelweis University School of Medicine, Budapest, Ungarn zur Verfügung gestellt^{74,87,88}. Die in der Auswertung berücksichtigten männlichen Tiere befanden sich im Alter von 10-30 Wochen und wogen zwischen 20-40g. Alle Experimente fanden in den Laborräumen des Walter-Brendel-Zentrums für Experimentelle Medizin, München, Deutschland statt. Die Tierexperimente wurden von der Regierung von Oberbayern, Deutschland, AZ 55.2-1-54-2531-80-76/12 genehmigt. Nach Abschluss des Experiments wurden alle Tiere sofort durch zervikale Dislokation getötet.

2.1. Genotypisierung der Versuchstiere

Zum Nachweis des vorliegenden Genotypus wurde an jeder Maus eine Genotypisierung durch Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) durchgeführt. Bei dieser Methode wurde ein spezifischer DNA-Abschnitt durch eine *in vitro* durchgeführte DNA-Replikation amplifiziert. Dieser Vorgang umfasste 20-40 Zyklen. Jeder Zyklus beinhaltete drei aufeinanderfolgende Schritte. Im ersten Schritt wurde die Matrizen-DNA durch Erhitzen auf etwa 95°C in Einzelstränge separiert. Im Folgenden wurden durch Zugabe von spezifischen Primern und einer Primer-spezifischen Temperatur die Anlagerung der Primer an den komplementären DNA-Einzelstrang ermöglicht (Tabelle 2).

Primer	5'- 3' Ende	Firma
Hck Fw	GCT CCA TAG ATC CGT CGT GCC ATT TCC	Metabion
Hck Rev	GTT GTT TGG TCC CAG CTT GCT GGA GG	Metabion
Fgr Fw	CAA GGC CGG ACT TCG TCC GTC TTT CC	Metabion
Lyn BF2	CAT AGC CTG AGT TAG TTC CCT AGC	Metabion
Lyn BR1	TCA CAT ATG AAC ATG TGT GTA CAT GTC	Metabion
Lyn 6.3	GTG CTT AAT GAC ATC ACC ATG CAT TAG G	Metabion
5' neo	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CTC TCC ACC	Metabion
3' neo	GCA TCG CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG	Metabion

Tabelle 2: Spezifische Primer der SFK-Knockouts

Alle Oligonukleotide sind in 5'-3'-Orientierung aufgelistet.

Die Temperatur lag in der Regel zwischen 40°C und 70°C. Im letzten Schritt verlängerte eine thermostabile DNA-Polymerase die Primer bei einer Arbeitstemperatur von 70°C-72°C am freien 3'OH-Ende mit Hilfe von Desoxyribonukleosidtriphosphate. Theoretisch kann sich pro Zyklus die Menge der DNA verdoppeln, so dass es nach 20-40 Zyklen rechnerisch zu einer Vervielfältigung um den Faktor 10^6 - 10^{12} kommt. Daher sind wenige Zellen als Ausgangsmaterial für eine erfolgreiche PCR ausreichend. Der Nachweis der vervielfältigten DNA erfolgte im Anschluss an die PCR durch eine Gel-Elektrophorese (2% Agarose Gel) (Abbildung 8) ^{89,90}.

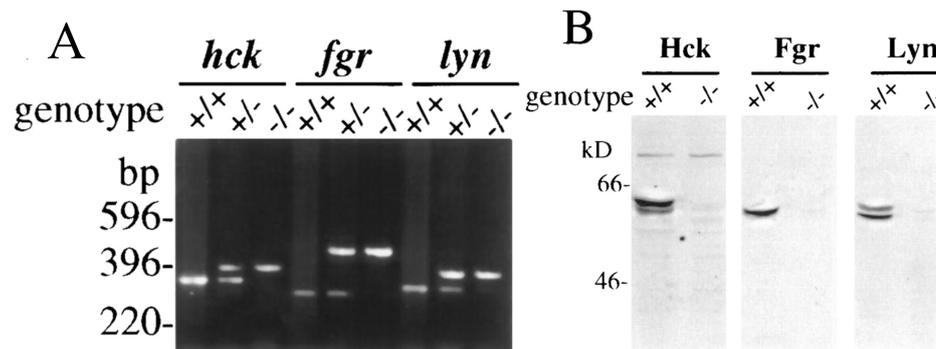


Abbildung 8: Genotypisierung von Wildtyp und SFK-Knockout

Genotyp der Nachkommen von heterozygoten Eltern. DNA wurde von murinen Schwanzbiopsaten isoliert und durch PCR und Westernblot analysiert. **A)** zeigt murine DNA vom Wildtyp (+/+), triple heterozygot (+/-) und triple homozygot (-/-) in der PCR. **B)** $Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}$ exprimieren kein Hck, Fgr und Lyn Proteine im Vergleich zum Wildtyp (+/+) im Westernblot ⁹⁰. *Abkürzungen: bp=Basenpaaren; kD=Kilodalton PCR=Polymerasekettenreaktion; DNA=Desoxyribonukleinsäure*

Tabelle 3 zeigt die Genotypus-spezifischen PCR-Bedingungen.

	Erwarteter Genotyp	
	<i>Lyz2</i> ^{EGFP}	SFK-Knockout
Volumen	25µl	25µl
Vorlauf	3min 95°C	3min 95°C
Denaturation	15s 95°C	15s 95°C
Annealing	15s 60°C	15s 65°C
Polymerisation	15s 72°C	15s 72°C
Nachlauf	7min 72°C	5min 72°C
Zyklen	35	35
Dauer	45min	45min
Ende	4°C ∞	4°C ∞

Tabelle 3: Polymerasekettenreaktion zur Genotypisierung

Die Tabelle zeigt die detaillierte PCR-Bedingungen zur Genotypisierung von *Lyz2*^{EGFP} und SFK-Knockout.

Abkürzungen: Lyz2^{EGFP}=Lysozym2 enhanced green fluorescent protein; SFK=Src-Familien-Kinase; µl=mikroliter; s=Sekunden; min=Minuten; °C=Grad Celsius

Als Probenmaterial wurde das distale Ende des Schwanzes verwendet. Um an das Genmaterial zu gelangen, wird die Schwanzspitze in einen mit Proteinase K versetzten Lyse-Puffer gegeben. Das Gemisch wurde in einem Thermomixer

(Eppendorf, Deutschland) bei 55°C und 700 rpm (Umdrehung per Minute) über Nacht aufbereitet. Am Morgen des Folgetages wurde die Temperatur für eine Stunde auf 85°C erhöht, um die enzymatische Wirkung der Proteinase K zu deaktivieren. Nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chloroform und anschließendem Vortexen, setzten sich nach Zentrifugation (14,000 rpm, 6 min.) zwei Phasen ab. Die obere Phase wurde in ein Eppendorf Tube (Eppendorf, Deutschland) mit 2,5 ml 100% Ethanol und 5M NaCl vermischt und anschließend zentrifugiert (15,000 rpm, 10 min, 4°C). Nachdem der Überschuss abgekippt wurde, wurde das Pellet zweimal in 70% Ethanol gewaschen und im Thermomixer bei 55°C getrocknet. Bis zur Analyse der PCR wurde das Pellet in einer Tris-EDTA-basierte Pufferlösung bei -20°C aufbewahrt.

2.2. Tierhaltung

Die Tierhaltung im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin (München, Deutschland) unter der Leitung eines Fachtierarztes lief unter spezifisch pathogenfreiem Hygienestatus (SPF) mit geschlossenem Barriersystem und Überdruckbelüftung. Der Hygienestatus der Tierhaltung wurde regelmäßig mit Hilfe von Sentinel-Mäusen überprüft und nach den Empfehlungen des Verbandes europäischer Labortier-wissenschaftlicher Gesellschaften (Federation of European Laboratory Animal Science Associations; FELASA) durchgeführt ⁹¹. Die Käfige wurden mit 80°C heißem Wasser gewaschen und einmal pro Woche autoklaviert. Die Mäuse wurden gewichtsabhängig in Standard Makrolon Käfigen (Käfig Typ II long, 370 cm², Tecniplast GmbH, Deutschland) gehalten. Bei einem Körpergewicht von über 20 g wurden maximal 5 Tiere in einem Käfig Typ II long untergebracht. Die Tiere erhielten Standardfutter für Labornager (Haltungsfutter V 1536, ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) und Wasser aus Trinkflaschen ad libitum. Zuchttiere erhielten außerdem ein hochkalorisches Zuchtfutter (Abbed®). Als

Einstreu wurde zertifizierte, staubarme Weichholzfaser (Abbed®) verwendet. Die Raumtemperatur wurde mit einer Toleranz von $\pm 3^{\circ}\text{C}$ konstant auf 22°C und die Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 60% gehalten. Die Räume der Tierhaltung durchliefen einen standardisierten regelmäßigen Tag- und Nachtrhythmus mit einer Tag-Phase von 8 Uhr morgens bis 20 Uhr abends. Als Enrichment kam zertifiziertes grobes Einstreu (Nestbaumaterial NGB E-011, Faserbreite 3,5 mm, E-012, Faserbreite 4 mm + NBU E014, Faserbreite 120 mm, Abbed®) zum Einsatz. Additiv wurden zertifizierte, autoklavierbare Spieltunnel aus Nagerhölzern eingesetzt. In der Zucht kamen des Weiteren Mäusehäuschen aus zertifiziertem, rotem Kunststoff als Rückzugsort für die Tiere zum Einsatz^{92,93}.

3. Versuchsmethoden

3.1. Analgosedierung und Lagerung

Für die Analgosedierung der Versuchstiere wurde eine Kombinationsmedikation aus dem Analgetikum und Anästhetikum Ketamin und dem zentralen und peripheren α_2 -Adrenozeptor-Agonist Xylazin verwendet (siehe II. 1.9). Die Applikation erfolgte intraperitoneal und gewichtsadaptiert (0.1ml Ketamin-Xylazin-Lösung/8g Körpergewicht). Um eine suffiziente Tiefe der Analgosedierung sicherzustellen, wurde erst nach einer 30-minütigen Wartezeit mit der Präparation begonnen. Um den Erhalt der Körpertemperatur zu gewährleisten, wurde die Maus zu Beginn der Präparation auf einer Wärmeplatte (35°C) rücklings gelagert und mit Hilfe von medizinischem Tape (Leukoplast®) an den Gliedmaßen stabil fixiert. Um einen Rückfall der Zunge in den Rachen zu vermeiden und zusätzlich den Operationssitus nachfolgend besser zugänglich zu machen, wurde der Kopf des Tieres in Reklination gebracht. Zu Verhinderung der Austrocknung der Schleimhäute wurde jedem Tier Bepanthen® Augensalbe (Hoffman-La Roche

AG) appliziert.

3.2. Chirurgische Technik

Die chirurgische Präparation erfolgte stereomikroskopisch assistiert (Olympus SZ61 oder Olympus SZX7). Abbildung 9 und 10 zeigt im Folgenden exemplarisch die angewandte chirurgische Technik. Um eine Sicherstellung der Atmung der Maus während des gesamten Versuches zu gewährleisten, wurde zu Beginn der Operation das Tier nach atraumatischer Darstellung der Halsmuskulatur und Präparation des subkutanen Fett- und Bindegewebes chirurgisch tracheotomiert und mit Hilfe eines Trachealtubus (Innendurchmesser: 0,76 mm; Außendurchmesser 1,22 mm, Polyethylenschlauch (PE), BD Intramedic™, MD, USA) intubiert. Die Fixierung der Trachealkanüle erfolgte mit Fäden (Fadenstärke 6.0) an der Trachea (Abbildung 10 A-B). Ein arterieller Zugang wurde in Hinblick auf Volumentherapie, Blutentnahmen und Narkoseapplikation über die A. carotis interna gewählt. Nach Darstellung und Eröffnung des Gefäßes wurde ein heparinisierte (20 U/ml) Katheter (Innendurchmesser: 0,28 mm; Außendurchmesser 0,61 mm, Polyethylenschlauch (PE), BD Intramedic™, MD, USA) in das Gefäß vorgeschoben. Die Fixierung des intraarteriellen Katheters erfolgte ebenfalls mit Fäden (Fadenstärke 6.0) (Abbildung 10 C-D).

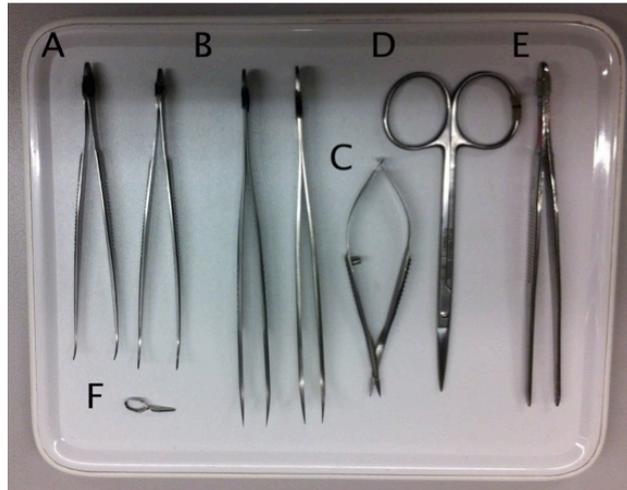


Abbildung 9: Chirurgisches Instrumentarium zur Tierpräparation

(A) Kurze feine anatomische Pinzetten, (B) lange feine anatomische Pinzetten, (C) feine Schere, (D) grobe Schere, (E) grobe Pinzette, (F) Mikrogefäßclip

Nach Intubation der Trachea und Katheterisierung der Arterie wurde die Maus auf eine spezielle Präparation-Platte umgelagert und fixiert.

Für diese Arbeit wurde das M. cremaster-Modell verwendet, deren Methode erstmals bei Baez et al. 1970 beschrieben wurde und heute gut etabliert ist⁹⁴⁻⁹⁶. Das transparente, dünne und gut durchblutete Gewebe des M. cremaster erfüllt die benötigten Voraussetzungen der *in vivo* Bildgebung am Mausmodell.

Es folgte die skrotale Hautinzision und vorsichtige Präparation des M. cremaster, der schrittweise mit dünnen Nadeln auf der Präparations-Platte fixiert und glatt aufgespannt wurde (Abbildung 10 E-F). Um das Gewebe vor Austrocknung zu schützen und eine dadurch verursachte Veränderung des Gewebes zu verhindern, wurde der Muskel regelmäßig mit Superfusions-Pufferlösung befeuchtet. Die finale Superfusionslösung wird in einem 1000 ml Zylinder als Vorratslösung im Verhältnis 100 ml Superfusionslösung I (NaCl 292,9 g, KCl 13,3 g, CaCl₂ 11,2 g und MgCl₂ 7,7 g in 3,8 Liter deionisiertem Wasser gelöst) und 800 ml deionisiertes Wasser plus 100 ml Superfusionslösung II (NaHCO₃ 57,5 gelöst in 3,8 Liter deionisiertem Wasser gelöst) hergestellt. Die Pufferlösung wurde in der

Vorbereitung auf das Experiment auf die Körpertemperatur (37°C) des Tieres erwärmt und mit 95% N_2 und 5% CO_2 (Linde AG, München, Deutschland) mittels eines Schaumspenders begast, um das Auskristallisieren von Salzen zu vermeiden. Die detaillierte Zusammensetzung des Puffers findet sich auch unter II. 1.6 ⁹⁷. Neben der Funktion, das lebende Muskelgewebe während des Experimentes unter standardisierten Bedingungen zu halten und vor Austrocknung zu schützen, macht man sich außerdem die Vorteile der Wasserimmersion in der Mikroskopie zu nutzen. Wasser zwischen Gewebe und Objektiv stabilisiert den optischen Weg und erhöht die optische Auflösung durch Erhöhung der numerischen Apertur (NA) ⁹⁵.

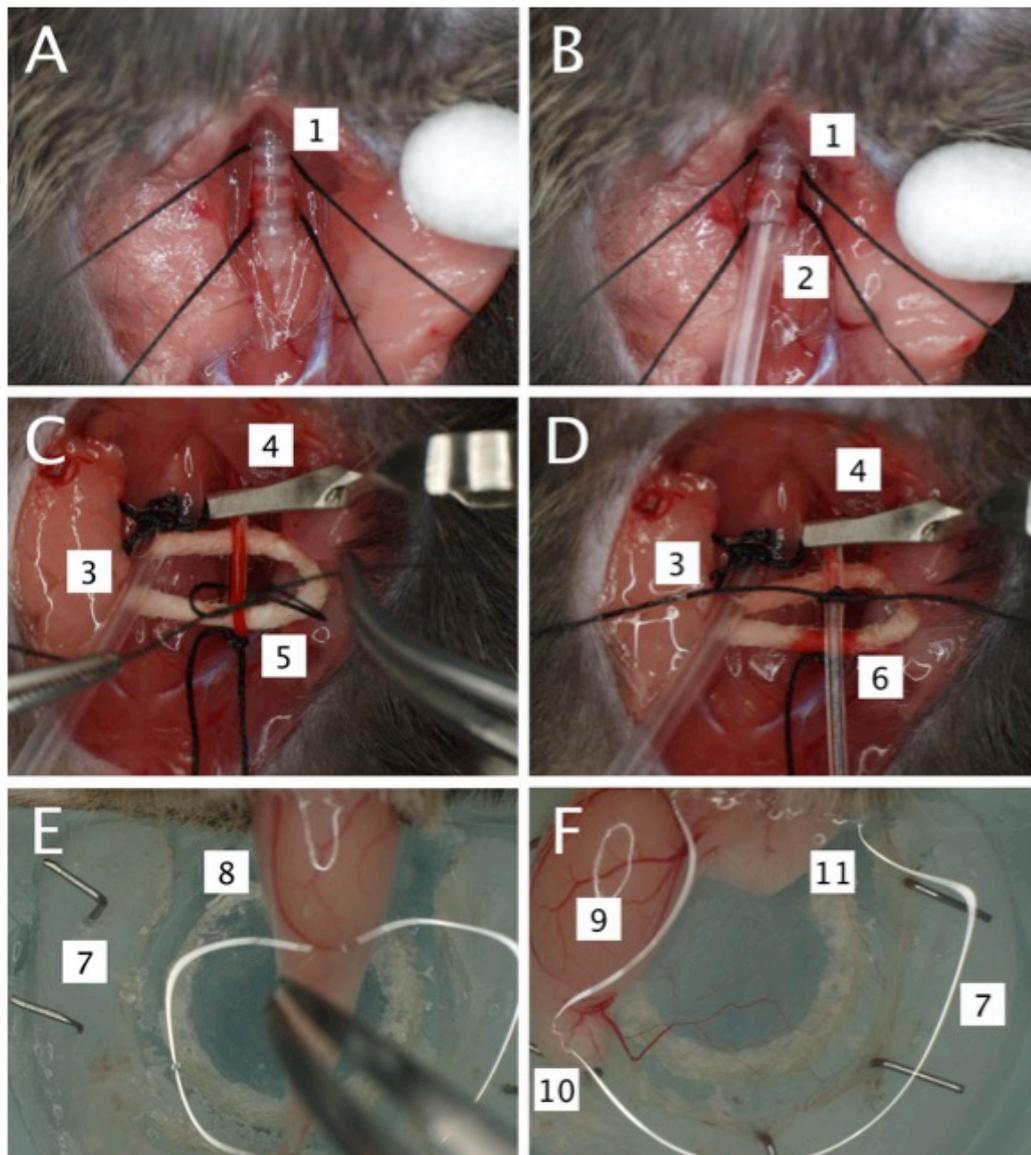


Abbildung 10: Chirurgische Operationstechnik in Einzelschritten

(A) Nach atraumatischer Präparation von Haut- und Bindegewebe wurde die Trachea (1) des Versuchstieres freigelegt. Zwei Fäden werden unter der Trachea vorgelegt, um den Tubus im Verlauf zu fixieren. (B) Nach Inzision der Trachea Einführen des Trachealtubus und Fixierung durch vorgelegte Fäden (2). (C) Präparation der Arteria carotis. Zur Blutungskontrolle intermittierendes Abbinden des kaudalen Teiles durch Faden (5) und des kranialen Anteiles durch Mikrogefäßclip (4). Der Tubus hielt den Atemweg frei (3). (D) Inzision der Arterie durch mikrochirurgische Schere und Einführen des Katheters mit Hilfe einer feinen anatomischen Pinzette (6) durch gleichzeitige Öffnung des Clips (4). Fixierung des Katheters durch vorgelegten Faden. (E) Freipräparation des Scrotums (8) und Aufspannen des kaudalen Endes Musculus cremaster auf bereitstehende Pins (7). (F) Sorgfältige Präparation des gesamten Muskels über die Platte und Befestigung (7, 10, 11). Das Scrotum (9) wurde zur Seite präpariert.

3.3. Untersuchung der Leukozytenrekrutierung**3.3.1. rmTNF- α -Entzündungsmodell**

Um den Einfluss der Src-Tyrosinkinase Familie (SFKs) auf die Leukozytenrekrutierung im entzündeten Gewebe zu untersuchen, wurden Experimente mit rekombinantem murinem Tumornekrosefaktor- α (rmTNF- α) in *Lyz2^{EGFP}* Wildtyp-Mäusen und *Lyz2^{EGFP}* SFK-Knockout Mäusen durchgeführt. Rekombinanter muriner Tumornekrosefaktor ist eine glykosylierte Polypeptidkette von 156 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 17,3 kD. Durch die Injektion des Zytokins in das Versuchstier wird eine Akute-Phase-Reaktion einer Entzündung ausgelöst⁹⁸.

Lyz2^{EGFP} Wildtyp-Mäuse wurden mit 2, 10 oder 20 mg pro Kilogramm (kg) Körpergewicht (KG) Tyrosinkinase-Inhibitoren (Dasatinib in Methylcellulose als hydrophiler Trägerstoff gelöst) oder nur Methylcellulose-Lösung (Kontrolle) oral vorbehandelt. *Lyz2^{EGFP}* SFK-Knockout Mäuse erhielten Methylcellulose-Lösung oder 10mg/kg pro Körpergewicht Dasatinib per os zur Überprüfung von unspezifischen Reaktionen (off-target Effekten). Durch die Injektion von 500 ng des Zytokins rmTNF- α in das murine Skrotum wird eine starke

Entzündungsreaktion ausgelöst, die mit der Expression einer Vielzahl von Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel einhergeht^{34,99}. Zwei Stunden post injectionem startete die Präparation des M. cremaster wie unter 3.2 beschrieben (Abbildung 11 A-B).

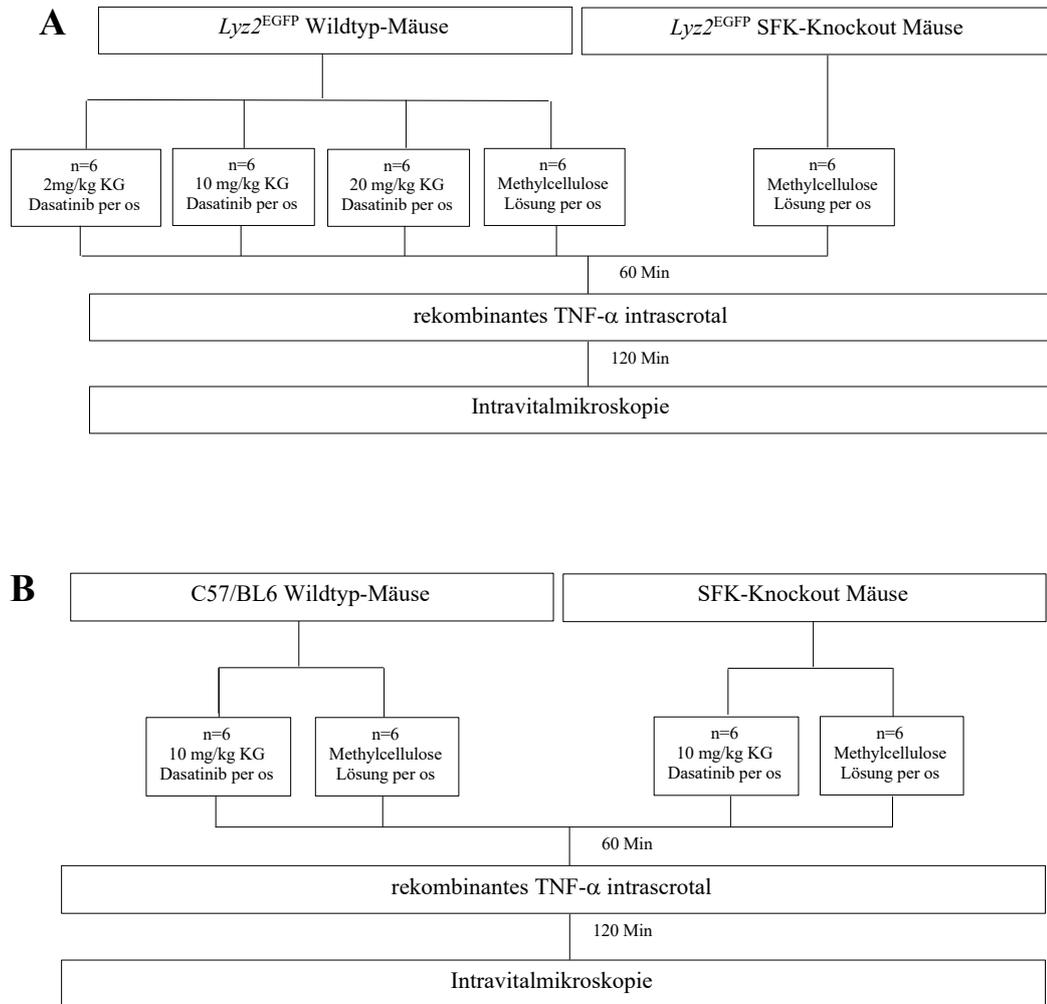


Abbildung 11: Versuchsaufbau im rmTNF- α Entzündungsmodell I

Im Experimentaufbau (A) wurden die einzelnen Schritte der Leukozytenrekrutierungskaskade unter dem Einfluss aufsteigender Dosierung von Dasatinib per os im Vergleich zur wirkstofffreien Kontrolle mit Methylcellulose (=Placebo) per os untersucht. Die SFK-Knockout Maus erhielt zur Vergleichbarkeit der Bedingungen ebenfalls Methylcellulose per os als Placebo. Im Experimentaufbau (B) wurden unspezifische Effekte untersucht. Hierfür wurde der SFK-Knockout mit 10mg/kg Körpergewicht Dasatinib gefüttert. Die Untersuchung der Wildtypmaus (C57/BL6 WT) galt als Kontrolle. 60 Minuten nach Fütterung wurde der Entzündungsreiz mit rmTNF- α ins murine Scrotum gesetzt. 120 Minuten später begannen die intravitalmikroskopischen Aufnahmen. *Abkürzungen: rmTNF- α =rekombinanter muriner*

Tumornekrosefaktor- α ; SFK=Src-Familien-Kinase; KG=Körpergewicht der Maus; per os=Fütterung durch den Mund; kg= Kilogramm

3.3.2. Intravitalmikroskopie

Intravitalmikroskopie (IVM) ist eine gut etablierte Methode, um physiologische Prozesse in der Mikrozirkulation *in vivo* zu beobachten. Die Methode wurde erstmals 1661 von Marcello Malpighi beschrieben, der bewegende Partikel in den Kapillaren einer Froschlunge entdeckte¹⁰⁰. Bis heute wurde die Methode stetig weiterentwickelt und angepasst^{101,102}. *In vivo* Beobachtungen der Leukozytenrekrutierung fanden für diese Arbeit an einem konventionellen Durchlichtmikroskop Olympus BX51 WI Mikroskop (Olympus, Hamburg), 40x Vergrößerung mit einem Wasserimmersions-Objektiv (Olympus Mplan FI/RI, 0.8 NA, Wasser-Immersion) und einer CCD-Kamera (KAPPA® CF 8HS, Gleichen, Deutschland) zur Videoaufzeichnung statt (Abbildung 12). Der präparierte Cremaster-Muskel wurde während des gesamten Experimentes, wie bereits beschrieben, kontinuierlich mit auf Körpertemperatur erwärmter Superfusionslösung (siehe II. 1.6 und 3.2) befeuchtet. Postkapilläre Venolen wurden digital mit dem Programm Virtual Dub (Version 1.9.11) und analog mit einem VC-Video-Recorder (Panasonic, Japan) aufgenommen. Die Blutflussgeschwindigkeit des zu untersuchenden Gefäßes wurde vor jeder Videoaufnahme mit einer dualen Photodiode gemessen und mit dem Programm Circusoft Instrumentation (Wayland&Johnson, 1967, Hockessin, USA) ausgewertet. Die gemessene Blutflussgeschwindigkeit der Mittellinie wird durch einen empirischen Faktor 1,6 in die mittlere Blutflussgeschwindigkeit umgewandelt¹⁰³. Der Blutfluss in den analysierten Gefäßen zeigte Geschwindigkeiten zwischen 800 und 5500 $\mu\text{m/s}$. Der Blutgefäßdurchmesser (μm) wurde am Experimentende am Bildausschnitt mit Hilfe eines

Bildbearbeitungsprogramms (Fiji Image J) gemessen. Der Gefäßdurchmesser der ausgewerteten Gefäße war zwischen 20-40 μm . Nach Beendigung der Aufnahmen wurde 50 μl arterielles Blut über den A. Karotis-Katheter entnommen, um die Anzahl der weißen Blutkörperchen im Blut des Tieres zu bestimmen. Das Blut wurde in einem heparinisierten Röhrchen (BD Microtainer K2E Tubes, Becton, Dickson and Company, USA) gesammelt und mit Hilfe des ProCyte Dx® (IDEXX, Kornwestheim/Deutschland) ausgewertet.

Die Multiphotonen-Mikroskopie wurde zur Visualisierung der Leukozytenrekrutierung mit einem TriMScope (LaVisionBiotec, Bielefeld, Deutschland) durchgeführt. Das Gerät ist mit einem Olympus BX51 Mikroskop und einem Ultra II Titan: Saphir-Laser (Coherent, Dieburg, Germany) mit einer Pulsdauer von 200fs und Pulswiederholung von 80 MHz ausgestattet. Ein optisch parametrischer Oszillator (OPO, Chameleon OPO; APE, Berlin, Deutschland) generiert einen Lichtstrahl von 1275 nm mit einer Leistung von 640–700 mW. Für das Scannen des Gewebes des M. cremaster verwendeten wir 400x400 μm mit 1680x1680 Pixel and 200 Zeilen pro Sekunden und hinterließen dabei keine sichtbaren Schäden im Gewebe. Für die Darstellung wurde ein Objektiv Olympus XLUMPlanFl 20x/0.95W mit 2 mm Arbeitsabstand zum Präparat genutzt. Die verwendeten Farbkanäle waren: blau (447/60 nm), grün (525/50 nm), orange (580/60 nm), hellrot (624/40 nm) und dunkelrot (665/60 nm). Photoelektronenvervielfacher für den blauen Kanal war Hamamatsu H6780-01 und H6780-20 für die anderen Kanäle ¹⁰⁴. Abbildung 12-14 zeigen im Detail den Experimentaufbau und die visuelle Darstellungsmöglichkeit der postkapillären Venolen.

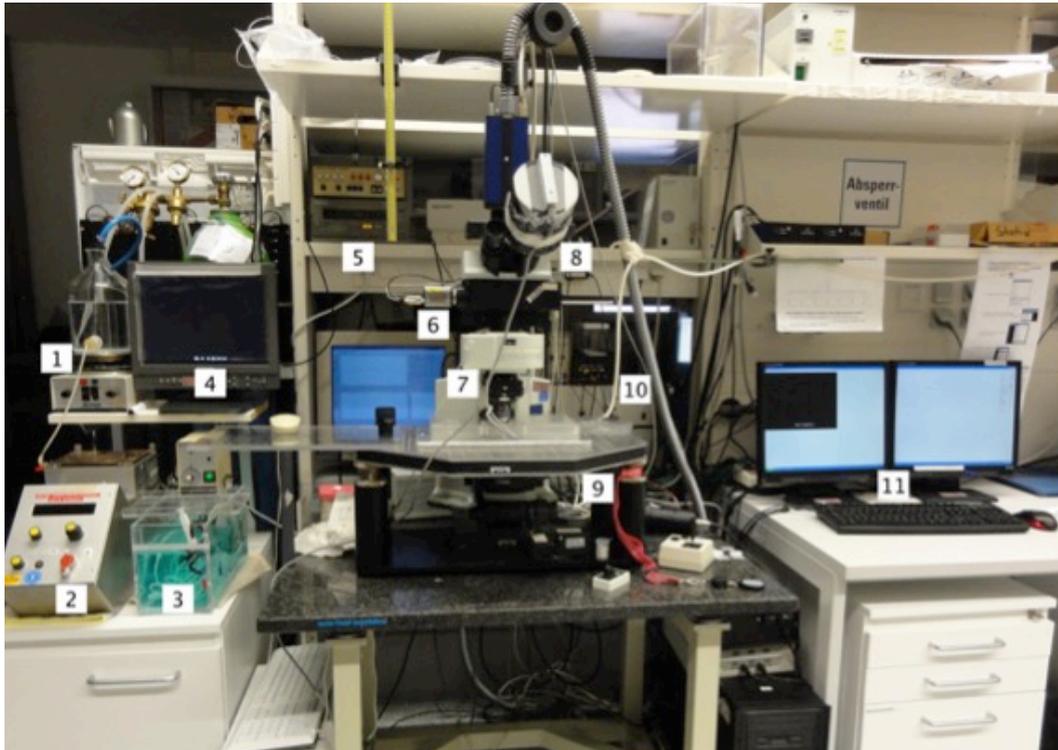


Abbildung 12: Aufbau des Intravitalmikroskops

(1) Superfusionspufferlösung auf einer Heizplatte, angepasst an die Körperkerntemperatur des Versuchstieres. Der Puffer wurde kontinuierlich mit einem Gasgemisch (95% N₂, 5% CO₂) begast. (2) Pumpe für den Transport des Superfusionspuffers zum Präparat, (3) Heizbad für Superfusionspuffer, (4) Bildschirm, (5) analoger Videorecorder, (6) Olympus BX51 WI Mikroskop, (7) Objektiv, (8) duale Photodiode zur Messung der Blutflussgeschwindigkeit, (9) motorisierte Objektstisch für die Ausrichtung des Objektes in xyz-Achse, (10) Plastikschlauch für den Abtransport der gebrauchten Superfusionslösung, (11) Computer für digitale Aufzeichnung (eigene Aufnahme).

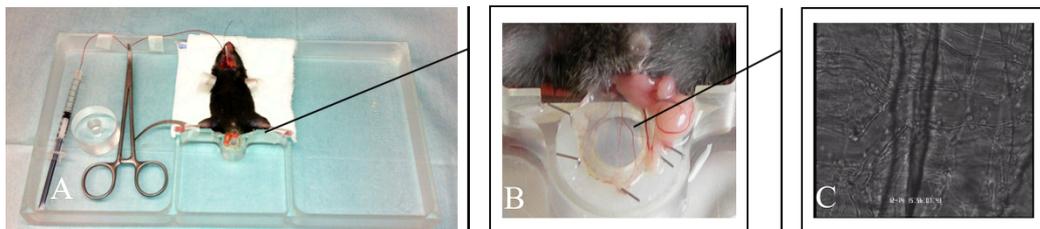


Abbildung 13: *In vivo* Experimentaufbau

(A) Narkotisiertes Versuchstier in Rückenlage mit liegendem Trachealkatheter und arteriellem Zugang für die Blutabnahme. Der Katheter wurde an eine 1 ml Spritze mit heparinisiertem Natriumchlorid (NaCl) zur Gewährleistung der Katheterdurchgängigkeit angeschlossen. (B) Bildausschnitt eines Musculus cremaster nach chirurgischer Präparation und Freilegung kurz vor Experimentbeginn. (C) Bildausschnitt der Videoaufnahme, die eine postkapilläre Venole des Musculus cremaster zeigt (eigene Aufnahmen).

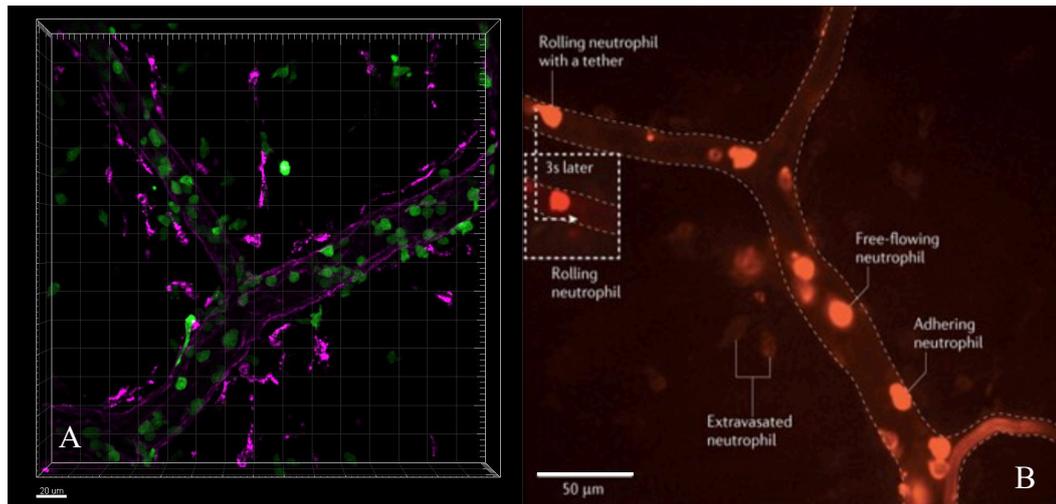


Abbildung 14: Aufnahme des M. cremaster einer $Lyz2^{EGFP}$ Maus

Die Aufnahme erfolgte mittels 2-Photonen Laserscanning Mikroskopie. (A) In unserem Experiment zeigten sich die Endothelwand mit Antikörper gegen CD31+ (violett gefärbt) und die $Lyz2^{EGFP}$ Leukozyten (grün gefärbt); Maßstab 20 µm. Zur Datenauswertung wurde jedoch das konventionelle Bild als etablierte Methode verwendet (siehe Abbildung 13 und Kapitel Datenauswertung 4.) (eigene Aufnahme). (B) Exemplarische Darstellung einer postkapillären Venole und Leukozytenrekrutierungskaskade mit Markierung der Leukozyten in rot und deren einzelne Auswanderungsschritte; Skalierungsbalken 50 µm¹⁰.

3.3.3. *In vitro* Flusskammern

Das Adhären und Kriechen („crawling“) Neutrophiler Granulozyten an der Gefäßwand wurde mit Experimenten in Flusskammern *in vitro* imitiert¹⁰⁵. Hierfür wurden Glaskapillaren (Rectangular Boro Capillaries 0,04x0,4mm ID VitroCom, Mountain Lakes, USA) für 3 Stunden mit rmE-Selektin (CD62E Fc chimera, R&D Systems, 20µg/ml), rmICAM-1 (CD54 Fc chimera, R&D Systems, 15µg/ml) und rmKC/CXCL-1 (R&D Systems, 15µg/ml) beschichtet und anschließend mit 10% Casein (Sigma-Aldrich) für zwei Stunden geblockt. Die Flusskammern wurden im Vorfeld mit heparinisiertem Natriumchlorid (NaCl)-Lösung gefüllt und bei 4°C über Nacht gelagert. Zu Beginn des Versuches wurde die A. carotis von C57/BL6-Wildtyp- beziehungsweise SFK-Knockout Mäusen wie in II. 3.2. beschrieben präpariert. Über diesen Katheter erfolgte die nachfolgende Blutabnahme. Das gewonnene Vollblut wurde dann in eine Perfusionsspritze überführt, die an die

Flusskammer angeschlossen wurde. Anschließend wurde die Flusskammer mit Blut gefüllt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten, während der die Neutrophilen Granulozyten an der inneren Flusskammeroberfläche adhären konnten, wurde das Vollblut durch eine hochpräzise Perfusionspumpe mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; 1% bovines Serumalbumin (BSA), 1 mM Calciumchlorid, 1 mM Magnesiumchlorid, 10 mM Puffersubstanz Hepes) mit einer Flussgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ bei einer Wandschubspannung von 3-4 dyn/cm^2 durch die Flusskammer perfundiert. Im Verlauf wurde die Wandschubspannung sukzessive erhöht, um die Adhärenz bei steigender Wandschubspannung zu untersuchen. Die beschriebenen Bedingungen in der Kammer ahmen die Flussbedingungen von Blut in postkapillären Venolen nach (Detachment-Assay).

In einer weiteren Versuchsreihe wurden Flusskammern, wie oben beschrieben, vorbereitet und mit Vollblut von C57/BL6-Wildtyp- und SFK-Knockout Mäusen perfundiert, welches zuvor für 10 min mit einem fluoreszierenden LFA-1 Antikörper (Alexa Fluor 546, clone 2D7, BioLegend, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) inkubiert wurde. Anschließend wurden adhären Zellen mit einem konfokalen Mikroskop (Leica System SP5, 63x, 1.4 NA Ölimmersion, xyzT Serie) auf ein LFA-1 Signal untersucht (LFA-1 Clustering).

3.3.4. Perivaskuläre Leukozyten

Um einen potenziellen Effekt der Tyrosinkinase-Inhibitoren auf die Extravasation der Leukozyten zu untersuchen, wurden rmTNF- α behandelte M. cremaster mit 4% PFA (Paraformaldehyd in PBS, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) fixiert und mit Giemsalösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Hierfür wurden die Mäuse wie unter 3.3.1. behandelt (detaillierter Versuchsaufbau siehe auch Abbildung 15). Die Narkose der Tiere und Präparation des M. cremaster

wurde wie unter 3.1 und 3.2 beschrieben durchgeführt. Nach Darstellung des Muskels wurde dieser auf einer Kunststoffplatte faltenfrei ausgebreitet und kontinuierlich mit 4% PFA (4°C) zur Fixierung beträufelt. Im Folgenden wurden Hoden und Nebenhoden atraumatisch vom Muskel gelöst. Nach Abtrennung des Muskels mit der Präparierschere wurde das gesamte Präparat auf einem Objektträger (Super Frost®, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) platziert (sogenannte wholemount-Technik). Sobald die Ränder des Muskels getrocknet waren, wurde der Objektträger bis zum Beginn der Giemsa-Färbung in 4% PFA bei 4°C mindestens über Nacht aufbewahrt. Es folgte die Präparation des zweiten M. cremaster in gleicher Weise.

Für die Giemsa-Färbung wurden die Objektträger aus dem Paraformaldehyd entnommen, vorsichtig getrocknet und unter 0,1 M Phosphat Puffer (Abcam, Cambridge, pH 7,4) mit 5% Ethanol für 3x5 Minuten gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger erneut vorsichtig getrocknet und mit Giemsa (Azur-Eosin-Methylenblaulösung) für 3 Minuten gefärbt. Nach diesem Färbeschritt folgte das vorsichtige Waschen unter fließendem Wasser. Zur Differenzierung wurden die Präparate in 0,03% Essigsäure (Merck, Deutschland) für 20-30 Minuten aufbewahrt. Sobald rotgefärbte Strukturen sichtbar wurden, folgte die Dehydrierung der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) für jeweils 1 Minute und darauffolgend in Xylol (zweimal, jeweils 5 Minuten) (Merck, Deutschland). Abschließend wurden die Präparate mit Eukitt® Medium (O.Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland) eingebettet.

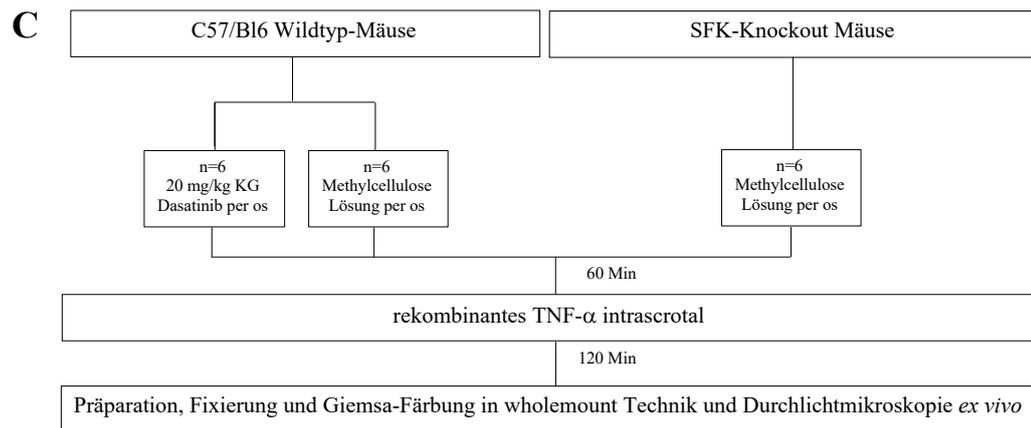


Abbildung 15: Versuchsaufbau im rmTNF- α Entzündungsmodell II

Im Experimentaufbau C wurden Wildtyp-Mäuse mit 20mg/kg KG Dasatinib oder Methylcellulose (Kontrolle) per os gefüttert. Der SFK-Knockout erhielt zur Vergleichbarkeit ebenfalls Methylcellulose per os. Anschließend erfolgte wie analog zu Experiment A und B (Abbildung 11) eine Stunde später der Entzündungsreiz mit rmTNF- α ins Scrotum. Nach 2 Stunden begann die Präparation des M. cremaster für die histologische Analyse. Anschließend erfolgte die Fixierung des Präparats mit 4% PFA, Färbung mit Giemsalösung und Lichtmikroskopie. *Abkürzungen: SFK=Src-Familien-Kinase; KG=Körpergewicht der Maus; per os= Fütterung durch den Mund; rmTNF- α =rekombinanter muriner Tumornekrosefaktor- α ; M=musculus; PFA=Paraformaldehyd*

4. Datenauswertung

4.1. Auswertung Intravitalmikroskopie

Auf Basis der Videoaufnahmen und Blutentnahmen am Experimentende wurden die nachfolgend beschriebenen Parameter ausgewertet und berechnet (Tabelle 4)⁹⁵.

Parameter	Definition	Einheit
Anzahl rollender Zellen (Leukocyte rolling flux = RF)	Anzahl rollender Leukozyten, die innerhalb einer Minute eine vertikale Linie im Gefäß passieren (Roll-Flux)	n/min
Anteil rollender Zellen (Leukocyte rolling flux fraction = RFF)	Roll-Flux dividiert durch die Anzahl aller Leukozyten, die das Gefäß in einer Minute passieren	%
Rollgeschwindigkeit	Geschwindigkeit, mit der	$\mu\text{m/s}$

	Leukozyten vorübergehend oder durchgehend Kontakt mit dem Endothel haben	
Gefäßdurchmesser	Orthogonale Distanz gemessen zwischen zwei gegenüberliegenden Endothelzellen	µm
Adhärente Zellen/mm²	Anzahl an Leukozyten, die mehr als 30 Sekunden am Endothel adhären/pro mm ² Gefäßendotheloberfläche	n/mm ²
Adhäsionseffizienz	Anzahl an adhären Leukozyten/pro mm ² Gefäßendothel und Leukozyten im Blut (WBC)	%

Tabelle 4: Definition der analysierten Parameter mit Einheiten

Die Tabelle zeigt die wichtigsten Parameter und Definitionen für die Beurteilung der Leukozytenrekrutierungskaskade in der Intravitalmikroskopie (modifiziert nach ⁹⁵). *Abkürzungen: n=Anzahl; WBC=white blood cell count, Leukozytengesamtzahl*

Während die Länge des Gefäßes durch einmalige Messung ermittelt wurde, wurde der mittlere Gefäßdurchmesser [µm] durch dreimalige Messung an drei repräsentativen Stellen zwischen zweier gegenüberliegenden Endothelzellen ermittelt. Voraussetzung für weitere Datenanalyse war ein Gefäßdurchmesser zwischen 20 und 40 µm und ein Gefäß, in dem alle rollenden und adhären Zellen in der Fokusebene gut sichtbar waren. Die Anzahl rollender Zellen pro Minute wurde mit dem Programm VCL Player visuell ausgewertet und definiert als die Anzahl rollender Zellen, die innerhalb einer Minute eine vertikale Linie im Gefäß passieren (Roll-Flux) ⁹⁵. Da diese Berechnung nicht den individuell unterschiedlichen systemischen Leukozyten-Anteil berücksichtigt, wurde außerdem die Rolling Flux Fraction ermittelt. Zur Berechnung des Anteils rollender Zellen (Rolling Flux Fraction in %) wurde der Roll-Flux durch die Anzahl aller

Leukozyten (WBC) [Zellen/ μl], die das Gefäß in einer Minute passieren, die mittlere Blutflussgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$] und die Querschnittsebene eines Gefäßes [μm^2] geteilt (siehe Formel 1):

$$\text{Formel 1} \quad \text{Anteil rollender Zellen} = \frac{\text{Leukozyten Roll - Flux}}{WBC \times \left(\frac{v_{\text{Blut}}}{1,6}\right) \times r_{\text{Gefäß}}^2 \times \pi}$$

(WBC: Anzahl Gesamtleukozyten/ μl ; v_{Blut} : Blutflussgeschwindigkeit; 1,6: Korrekturfaktor bei der Umwandlung in die Geschwindigkeit des mittleren Blutflusses; r: mittlerer Gefäßradius)

Die Anzahl adhärenter Zellen pro Gefäß wurde ebenfalls visuell mit dem Programm VCL Player ausgewertet. Zellen wurden als adhärent bewertet, wenn sie sich nicht mehr als ihren Zelldurchmesser innerhalb 30 Sekunden bewegten ⁹⁵. Die Adhäsionseffizienz [%] wurde aus der Anzahl adhärenter Zellen pro Endotheloberfläche [μm^2] und der Anzahl Gesamtleukozyten (WBC) [Zellen/ μl] berechnet (siehe Formel 2):

$$\text{Formel 2} \quad \text{Adhäsionseffizienz} = \frac{\text{adhärente Zellen}}{d_{\text{Gefäß}} \times l_{\text{Gefäß}} \times \pi} \times WBC^{-1}$$

(d: Durchmesser des Gefäßes, l: Länge des Gefäßes, WBC: Anzahl Leukozyten/ μl)

Da die Leukozytenrekrutierung durch Scherkräfte des fließenden Blutes am Endothel maßgeblich beeinflusst wird, fließt dieser Parameter ebenfalls in die Datenauswertung mit ein ¹⁰⁶⁻¹⁰⁸. Scherrate (wall shear rate) in der Einheit [s^{-1}] wurde nach Long *et al.*, 2004 und Smith *et al.*, 2003 berechnet ^{109,110} (siehe Formel 3) und zum Vergleich hämodynamischer Parameter zwischen den Experimentgruppen angewandt (siehe Tabelle 5). Wandschubspannung (wall shear stress) [dyn/cm^2] berechnet sich aus der Scherrate und der Viskosität des Blutes (siehe Formel 4). Wandschubspannung ist für P- oder E-Selektin abhängiges Rollen der Leukozyten unerlässlich ^{111,112}.

Formel 3
$$\text{Scherrate } yw = 4,9x \frac{8v_{\text{Blut}}}{dv_{\text{essel}}}$$

(yw: Scherrate/wall shear rate; vBlut: Blutflussgeschwindigkeit; dvessel: Gefäßdurchmesser)

Formel 4
$$\text{Wandschubspannung } \tau_w = \eta \times yw$$

(τ_w : Wandschubspannung/wall shear stress; η : Viskosität; yw: Scherrate/wall shear rate)

4.2. Auswertung *in vitro* Flusskammern

Für diese Versuche wurden Kapillaren, wie in 3.3.3 beschrieben, mit E-Selektin, ICAM-1 und CXCL1 beschichtet und mit Blut aus der A. carotis von C57/BL6 und SFK-Knockout Mäusen autoperfundiert. Um das Kriechen („crawling“) zu untersuchen, wurde ein repräsentativer Flusskammerausschnitt für 10 Minuten bei konstanter Wandschubspannung mit einem Olympus BX51WI Mikroskop mit Wasserimmersionsobjektiv (x40/0.8NA, Olympus) und einer CCD-Kamera (Model CF8/1, Kappa, Gleichen, Deutschland) aufgenommen¹¹³. Die Kamera nahm alle 3 Sekunden ein Bild auf, sodass Videos mit 20 Bildern pro Minute entstanden. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurde ungefähr eine Wandschubspannung von 3-4 dyn/cm^2 erzeugt. Neutrophile durften sich 3 Minuten adhärent zeigen. In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Wandschubspannung kontinuierlich alle 30 Sekunden erhöht. Die Wandschubspannung wurde mit einer hochpräzisen Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, Holiston, MA, USA) sukzessive bis auf 3200 dyn/cm^2 erhöht und die Adhärenz der Zellen beurteilt. Die erhobenen Parameter wurden mit Hilfe der Fiji Software (Version 2.0) ausgewertet.

4.3. Auswertung perivaskuläre Leukozyten

Objektträger (SuperFrost®, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) mit Giemsa-gefärbtem M. cremaster wurden mit einem Lichtmikroskop (Zeiss Axioskop 40) mit den Objektiven 40x EC-Plan-Neofluar (Ölimmersion, NA: 1,3) und 60x A-Plan (Ölimmersion, NA: 1,25) und einer SPOTInsight CCD Kamera

analysiert. Dabei wird der M. cremaster zuvor als vollständiges Organ auf einen Objektträger aufgebracht (wholamount), vorsichtig dünn ausgezogen, fixiert und anschließend Giemsa-gefärbt (siehe 3.3.4). Die Messungen und Speicherung der Bilder erfolgten mit dem Programm SPOT Basic. Pro M. cremaster wurden 10 Venolen ausgewertet. Da das Gesichtsfeld des Mikroskops größer als der Bildausschnitt auf dem Bildschirmmonitor der dazugehörigen Kamera ist, wurde zu Beginn die Größe des Gesichtsfelds der Kamera mit einem Messokular vermessen. Der Durchmesser eines Gesichtsfelds betrug 230 μm . Im Folgenden wurden deshalb gerade-verlaufende und das gesamte Gesichtsfeld ausfüllende Venolen für die Analyse ausgewählt. Die Gefäßlänge betrug daher im Folgenden für jedes Gefäß 230 μm . Der Gefäßdurchmesser in μm wurde auch *ex vivo* durch dreimalige Messung an drei unterschiedlichen repräsentativen Stellen ermittelt. Um das rechnerische Ergebnis der perivaskulären Zellen nicht fälschlichen Gefäßen zuzuordnen, wurde darauf geachtet, dass das auszuwertende Gefäß im Gesichtsfeld nicht von anderen Gefäßen umgeben war (siehe Abbildung 16). Um eine Beeinflussung des Ergebnisses bei der Auswertung zu verhindern, erfolgte die Datenanalyse verblindet und die Zuordnung zum Experiment nach Auswertung.

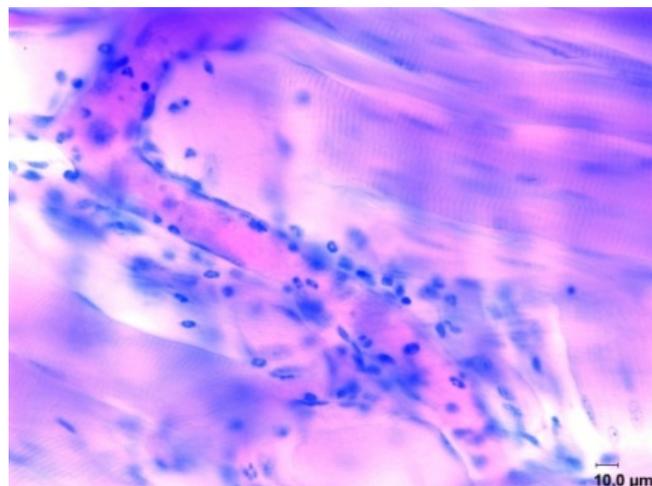


Abbildung 16: Giemsa-gefärbter M. cremaster der Wildtyp-Kontrolle

Es zeigen sich perivaskulär ausgewanderte Leukozyten, die in mononukleäre Leukozyten, sowie eosinophile

und polymorphkernige Granulozyten differenziert werden (wholemout des Musculus cremaster mit Giemsa-Färbung). Die Gesamtlänge des Gefäßes im Bildausschnitt betrug 230 μm . Kein benachbartes Gefäß zeigte sich im Blickfeld. Maßstab 10 μm (eigene Aufnahme).

5. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden mit Sigma Plot 12.0 graphisch dargestellt und ausgewertet.

Leukozytenanzahl, Gefäßdurchmesser, Anteil rollender Leukozyten, Wandschubspannung und Leukozytenrollgeschwindigkeit wurden zwischen den normalverteilten mehrfaktoriellen univariaten Gruppen mit Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Dunn's Test oder Wilcoxon Rank Sum Test (Vergleich Experimentgruppe vs. Kontrollgruppe) untersucht. Der Vergleich von zwei Gruppen ohne Normalverteilung erfolgte mit Mann-Whitney-U-Test. Zur Überprüfung der Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test angewandt. $p < 0,05$ definiert das Signifikanzniveau (*). Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler.

III. ERGEBNISSE

1. Einfluss von Src-Tyrosinkinase auf die Leukozytenrekrutierung

Um den Effekt der Src-Familien-Kinasen (SFK) auf die Leukozytenrekrutierung zu untersuchen, wurden intravitalmikroskopische Experimente unter inflammatorischen Bedingungen durch rmTNF- α -Gabe - wie in II. Material und Methoden beschrieben - durchgeführt.

Die Überprüfung der Vergleichbarkeit der hämodynamischen Parameter findet sich in Tabelle 5. Es zeigt sich in den einzelnen Vergleichsgruppen kein signifikanter Unterschied in den hämodynamischen Parametern der Venolen des M. cremaster.

	Anzahl der Mäuse (n)	Anzahl der Venolen (n)	Durchmesser [μm]	Blutflußgeschwindigkeit [$\mu\text{m/s}$]	Scherrate [s^{-1}]
Kontrolle	6	43	34 \pm 1	2186 \pm 183	1572.8 \pm 144.7
2 mg/kg Dasatinib	6	25	32.1 \pm 0.9	2008 \pm 194	1524.8 \pm 128.8
10 mg/kg Dasatinib	6	16	34.2 \pm 1,4	2506 \pm 495	1844.5 \pm 380
20 mg/kg Dasatinib	6	24	32.7 \pm 1,0	2025 \pm 281	1570.2 \pm 238.3
SFK-KO	6	29	29.13 \pm 0.72	1583 \pm 134	1335 \pm 109

Tabelle 5: Vergleich hämodynamischer Parameter

Die Daten sind dargestellt in Mittelwert \pm Standardabweichung bei n=6 pro Gruppe. Hierbei zeigt sich die Vergleichbarkeit der Gruppen. In der statistischen Auswertung mittels ANOVA Test zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den 5 Gruppen (Durchmesser: p=0.4494, Blutflußgeschwindigkeit: p=0.8097, Scherrate p=0.7375).

1.1. Leukozytenrollen – Anteil rollender Zellen und Rollgeschwindigkeit

Zuerst wurde der Anteil rollender Zellen in den unterschiedlich dosierten Dasatinib-

behandelten Gruppen (2mg/kg, 10mg/kg, 20mg/kg Körpergewicht), der *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Gruppe und der Kontrollgruppe erfasst. Die Rolling Flux Fraction (RFF) ist definiert als der Anteil rollender Leukozyten pro Gesamtzahl der Leukozyten, welche das Gefäß pro Minute passierten (siehe auch Definition unter II.4.1). Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Behandlung mit dem Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp (Kontrolle) die RFF nicht signifikant veränderte ($0.12-0.17 \pm 0.03$). Jedoch zeigte sich ein signifikanter Anstieg in der *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Gruppe (0.24 ± 0.03) im Vergleich zum unbehandelten Wildtyp (Kontrolle) (siehe Abbildung 17 A). Interessanterweise zeigte sich sowohl in der Dasatinib-Gruppe als auch in der *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Gruppe eine signifikant höhere Leukozytenanzahl (Leukozyten Count) nach rmTNF- α Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 17 B). Beim Anteil der Neutrophilen (Neutrophilen Count) an der Gesamtleukozytenzahl (WBC) zeigte sich jedoch nur in der *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Gruppe ein signifikanter Unterschied (Abbildung 17 C). Aufgrund dieser Beobachtung wurden die Daten auf den Neutrophilen Count adjustiert. Hierbei zeigten sich nun vergleichbare Werte des Anteils rollender Zellen der Neutrophilen in den untersuchten Gruppen (Abbildung 17 D). Die Rollgeschwindigkeit der Leukozyten in rmTNF- α -stimulierten Venolen war in der Kontrollgruppe mit $6,58 \pm 0,08 \mu\text{m/s}$ signifikant niedriger als in der SKF-Knockout Gruppe ($11,21 \pm 0,06 \mu\text{m/s}$). In den Versuchsgruppen nach Dasatinib-Applikation beobachten wir einen konzentrationsabhängigen, signifikanten Anstieg der Rollgeschwindigkeit (Abbildung 17 E). In der Gruppe mit der höchst-konzentrierten Dasatinib-Gabe (20mg/kg Körpergewicht) betrug die Rollgeschwindigkeit mit $14,96 \pm 0,05 \mu\text{m/s}$ mehr als das Doppelte des Wertes der Kontrollgruppe (Abbildung 17 E, F). Zusammenfassend zeigte sich somit eine dosisabhängige Erhöhung der Rollgeschwindigkeit am Endothel nach Dasatinib-

Behandlung.

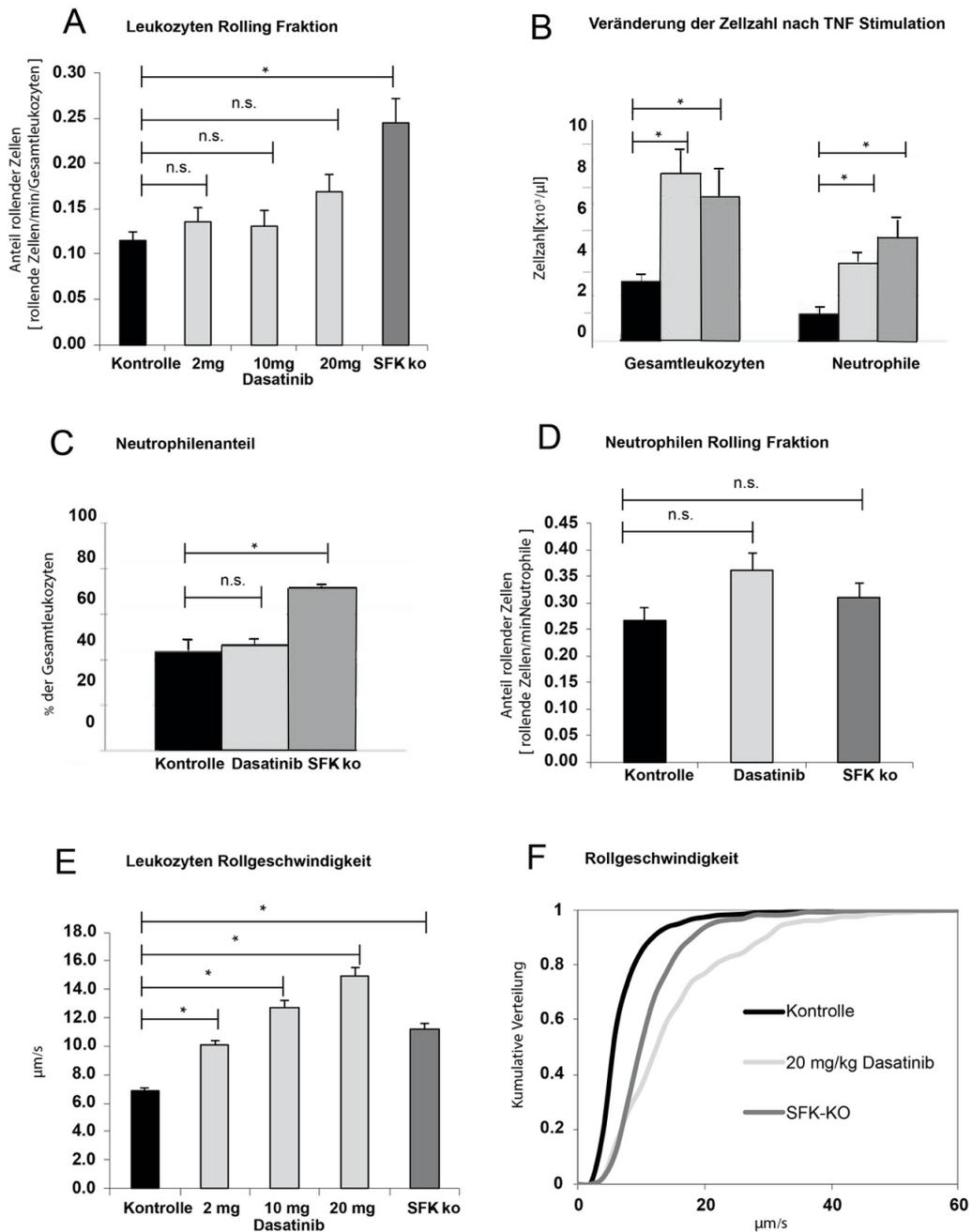


Abbildung 17: Leukozytenrollen und Rollgeschwindigkeit

In $\text{rmTNF-}\alpha$ stimulierten Venolen des *M. cremaster* *in vivo* zeigt (A) die Analyse des Anteils rollender Zellen in allen 5 Gruppen (definiert als Anzahl an rollenden Zellen pro Gesamtleukozytenzahl, die pro Minute das Gefäß passieren); (B) die Gesamtleukozytenzahl und Neutrophilenanzahl in der Kontrollgruppe, der mit 20 mg/kg KG Dasatinib behandelten *Lyz2*^{EGFP}-Gruppe und der SFK-Knockout Gruppe nach $\text{rmTNF-}\alpha$ Gabe; (C) den prozentualen Neutrophilenanteil der Kontrollgruppe, der mit 20 mg/kg KG Dasatinib behandelten *Lyz2*^{EGFP}-Gruppe und der SFK-Knockout Gruppe nach $\text{rmTNF-}\alpha$ Gabe; (D) den Neutrophilen Anteil rollender Zellen (definiert als die Anzahl an rollenden Zellen pro Minute, normalisiert auf die Neutrophilenanzahl); (E)

die Leukozytenrollgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$; (F) die kumulative Verteilung der Leukozytenrollgeschwindigkeit der Kontrollgruppe, der mit 20 mg/kg KG Dasatinib behandelten $\text{Lyz2}^{\text{EGFP}}$ -Gruppe und der SFK-Knockout Gruppe nach $\text{rmTNF-}\alpha$ Gabe. (MW \pm SEM bei $n=6$ pro Gruppe; * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; n.s.=nicht signifikant) *Abkürzungen: M.=Musculus; mg/kg=Milligramm pro Kilogramm; KG=Körpergewicht der Maus; Lyz2=Lysozyme M Genlocus 2; EGFP=enhanced grün fluoreszierendes Protein; SFK=Src-Familien-Kinase; rmTNF- α =rekombinanter muriner Tumornekrosefaktor- α ; ko=Knockout; MW \pm SEM=Mittelwert \pm Standardfehler; n=Anzahl; p=Signifikanzniveau*

1.2. Leukozytenadhäsion

Im nächsten Schritt untersuchten wir, wie sich die Inhibition und der Verlust von SFK auf die Adhäsion auswirkt. In der Dasatinib-Gruppe zeigte sich dosisunabhängig zunächst kein signifikanter Unterschied in der Zahl der adhärenen Zellen pro mm^2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (2 mg/kg KG: 982,97 Zellen/ mm^2 , 10 mg/kg KG: 1147,69 Zellen/ mm^2 and 20 mg/kg KG: 676,55 Zellen/ mm^2 , Kontrollgruppe: 819,76 Zellen/ mm^2). In der $\text{Hck}^{-/-}\text{Fgr}^{-/-}\text{Lyn}^{-/-}$ Gruppe konnte jedoch ein signifikanter Anstieg an adhärenen Zellen pro mm^2 im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden (SFK: 2066,38 Zellen/ mm^2) (Abbildung 18 A). Wie bereits im Vorkapitel gezeigt, erhöht sowohl die Dasatinib-Behandlung als auch die genetische Depletion von $\text{Hck}^{-/-}\text{Fgr}^{-/-}\text{Lyn}^{-/-}$ die Gesamtzahl an zirkulierenden Leukozyten im Blut. Es zeigte sich somit bei der Berechnung der Adhäsionseffizienz (adhärente Zellen/ mm^2 /Gesamtleukozyten) eine sowohl signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Leukozytenadhäsion in der Dasatinib-Gruppe (Adhäsionseffizienz bei 2mg/kg KG: $0,32\pm 0,05$, 10 mg/kg KG: $0,19\pm 0,03$, 20 mg/kg KG: $0,11\pm 0,01$) als auch eine signifikante Reduktion in den $\text{Hck}^{-/-}\text{Fgr}^{-/-}\text{Lyn}^{-/-}$ depletierten Mäusen ($0,37\pm 0,02$) im Vergleich zur Kontrollgruppe ($0,46\pm 0,04$) (Abbildung 18 B). Nachdem die Leukozytenadhäsion auf die Anzahl zirkulierender Neutrophilen normiert und dadurch die Neutrophilen-Adhäsionseffizienz berechnet wurde, zeigte sich weiterhin, dass sich sowohl in der

Dasatinib-Gruppe als auch in der *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Gruppe die Adhäsionseffizienz im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verringert (Kontrollgruppe $1,04 \pm 0,08$, Dasatinib 20mg/kg KG: $0,25 \pm 0,05$, SFK-Knockout: $0,48 \pm 0,04$) (Abbildung 18 C).

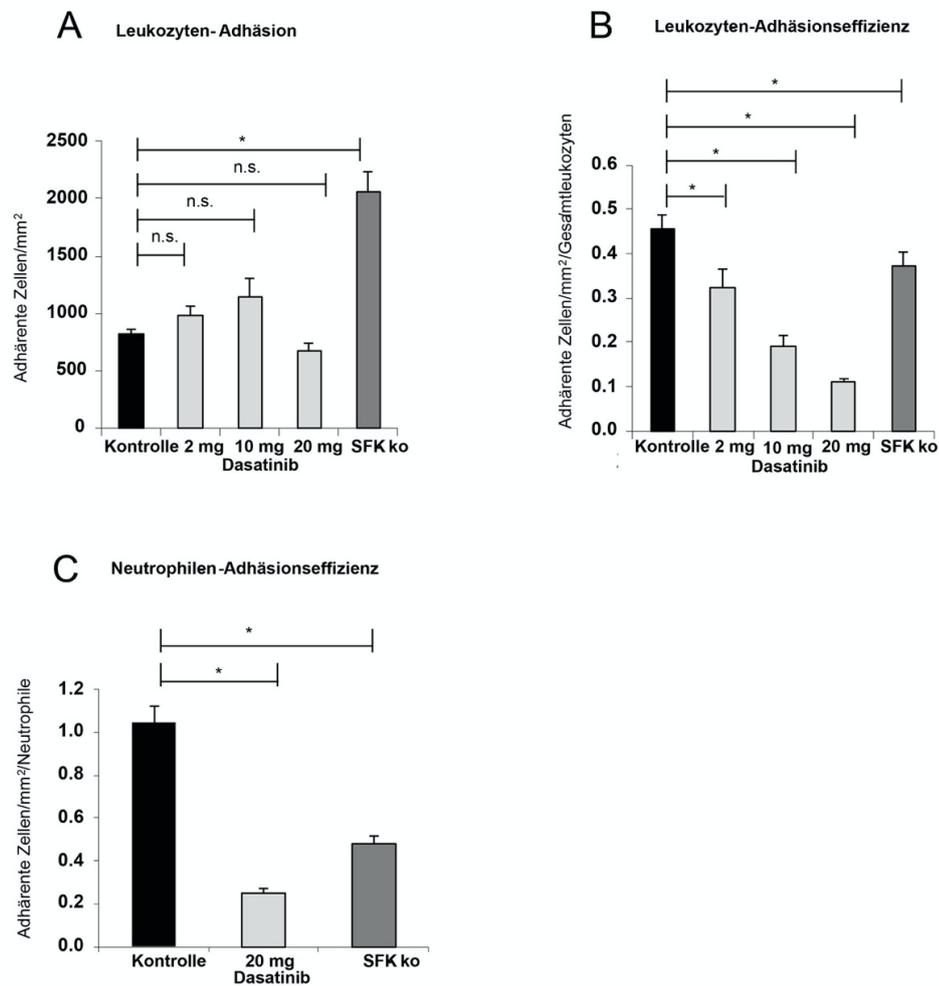


Abbildung 18: Leukozytenadhäsion und Adhäsionseffizienz

In $rmTNF-\alpha$ stimulierten Venolen des *M. cremaster* *in vivo* zeigt (A) die Analyse adhärenter Leukozyten/mm² in allen 5 Gruppen während 1-minütiger Beobachtungszeit; (B) die Leukozyten-Adhäsionseffizienz in allen 5 Gruppen (definiert als Anzahl an adhärenter Zellen/mm² bezogen auf die Gesamtleukozytenzahl im Blut); (C) die Neutrophilen-Adhäsionseffizienz der Kontrollgruppe, 20 mg/kg KG Dasatinib behandelten Gruppen und der SFK-Knockout Gruppe (definiert als Anzahl an adhärenter Zellen/mm² bezogen auf die Neutrophilenzahl im Blut). (MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe; * p < 0,05 vs. Kontrollgruppe; n.s.=nicht signifikant) *Abkürzungen:* *M.*=*Musculus*; *mg/kg*=*Milligramm pro Kilogramm*; *KG*=*Körpergewicht der Maus*; *SFK*=*Src-Familien-Kinase*; *ko*=*Knockout*; *MW \pm SEM*=*Mittelwert \pm Standardfehler*; *n*=*Anzahl*; *p*=*Signifikanzniveau*

1.3. Abflachung und Kriechen adhärenter Zellen

Nach einer erfolgreichen und festen Adhäsion verändern Neutrophile Granulozyten

im nächsten Schritt ihre Form hin zu einer flachen, an das Endothel angepassten Zellform (sogenanntes Flattening/Postarrest-Deformation). Um die Bedeutung der SFK-Funktion *in vivo* zu überprüfen, wurde das unter 3.3.1 beschriebene rmTNF- α -induzierte Entzündungsmodell verwendet. Zur Analyse der Parameter wurde - wie bei Frommhold et al. beschrieben ¹¹⁴ -, Durchmesser der adhärenen Zelle longitudinal zur Gefäßwand und im Lot zur Gefäßwand gemessen. Überraschenderweise zeigten sich bei der Analyse keine signifikanten Unterschiede in der Abflachung der Zellen in den verglichenen Gruppen (siehe Abbildung 19 A). Im nächsten Schritt kriechen die Zellen entlang der Endothelwand („crawling“), um einen geeigneten Ort für ihre Auswanderung zu finden. Nach gleichem Experiment-Aufbau (siehe 3.3.1) wurde im Zeitraffer über 15 Minuten Beobachtungszeit die kriechenden Zellen entlang des Endothels und deren Richtung analysiert (Abbildung 19 C). Bei schwacher Adhäsion der Zellen an das Endothel ist eine Kriech-Richtung entlang der Blutflussrichtung zu erwarten und gegen die Blutflussrichtung unwahrscheinlich. Interessanterweise zeigte sich hierbei kein signifikanter Unterschied in der Kriechrichtung in den Gruppen. Allen Versuchsgruppen war es möglich, sich gegen die Flussrichtung (schwarze Linie) und in Flussrichtung (rote Linie) zu bewegen. Bei einem Blick auf die Kriech-Geschwindigkeit (Crawling-Geschwindigkeit) zeigt sich jedoch eine Durchschnittsgeschwindigkeit von $10,68 \pm 0,43 \mu\text{m}/\text{min}$ in der Kontrollgruppe, während Neutrophile sich sowohl nach Dasatinib-Inhibition mit $11,78 \pm 0,55 \mu\text{m}/\text{min}$ als auch im Knockout mit $12,30 \pm 0,52 \mu\text{m}/\text{min}$ signifikant schneller bewegten (Abbildung 19 B). Interessanterweise krochen Neutrophile des SFK-Knockouts ($99,27 \pm 3,7 \text{ s}$) und die mit den Inhibitoren behandelten Neutrophilen ($101,85 \pm 3,4 \text{ s}$) eine kürzere Zeitperiode im Vergleich zur Kontrolle ($130,73 \pm 4,4 \text{ s}$) (Abbildung 19 D).

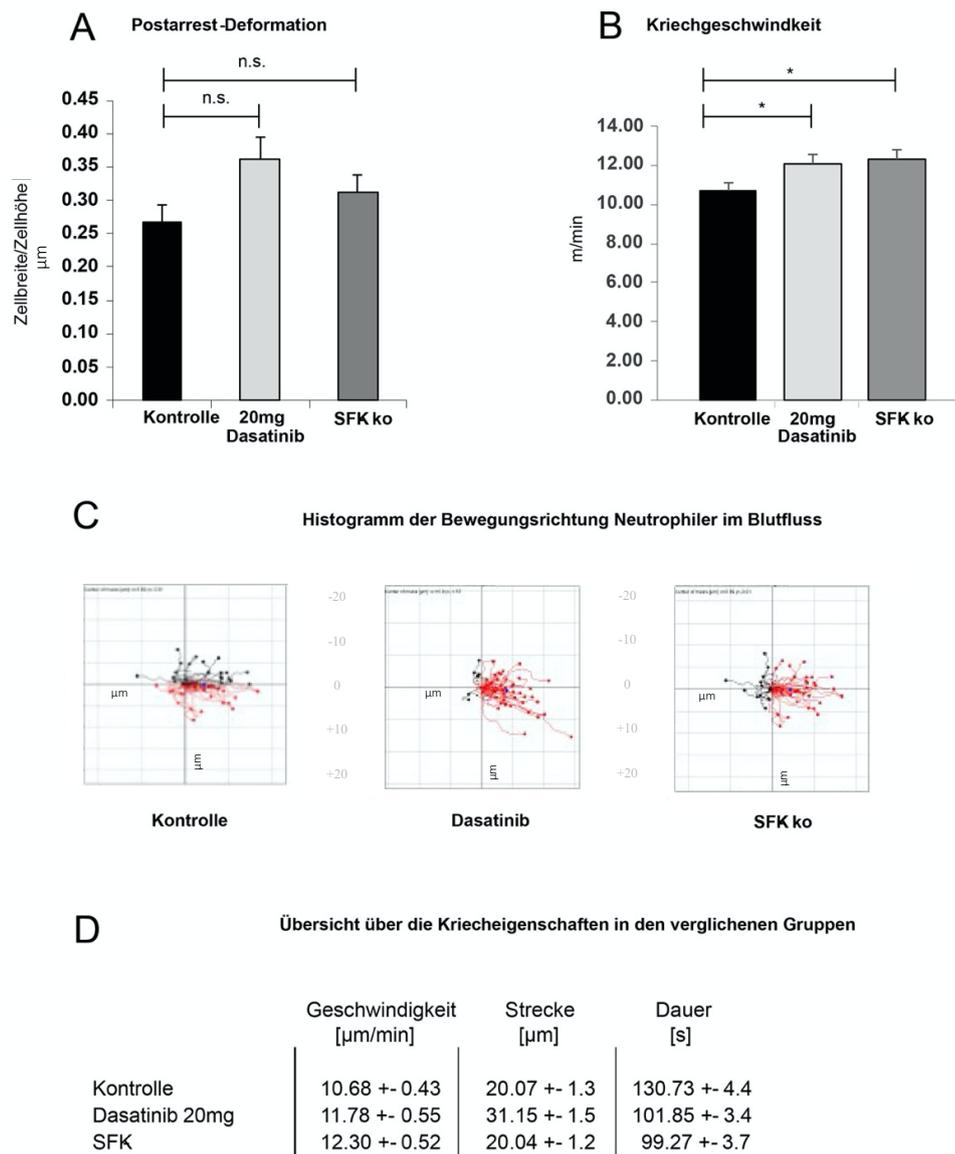


Abbildung 19: Kriecheigenschaften der Neutrophilen

(A) Postarrest-Deformation (Abflachung) adhärenter Zellen war in *rmTNF-α* stimulierten Venolen des *M. cremaster in vivo* ohne signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Abflachung der Zellen wurde durch die Ratio Zellbreite/Zellhöhe adhärenter Neutrophilen an der Endothelwand in der Kontrollgruppe, 20 mg/kg KG Dasatinib behandelten Gruppen und der SFK-Knockout Gruppe berechnet; (B) Kriechgeschwindigkeit (Crawling-Geschwindigkeit) von adhärenter Neutrophilen in $\mu\text{m}/\text{min}$ in den drei Vergleichsgruppen; (C) Kriechen („crawling“) von adhärenter Neutrophilen wurde in 15-minütigen Zeitraffer-Videos analysiert und als Histogramm in den drei Gruppen dargestellt. Die rote Linie stellt die Bewegung mit dem Blutfluss, die schwarze Linie gegen den Blutfluss dar; ein Kästchen entspricht $10 \mu\text{m}$ (D) zeigt eine tabellarische Übersicht über Kriechgeschwindigkeit (in $\mu\text{m}/\text{min}$), Streckenlänge (in μm) und Dauer der Kriechbewegung (in s) in den drei Vergleichsgruppen. (MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe; * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; n.s.=nicht signifikant) *Abkürzungen: rmTNF-α=rekombinanter muriner Tumornekrosefaktor-*

α ; M.=Musculus; mg/kg=Milligramm pro Kilogramm; KG=Körpergewicht der Maus; SFK=Src-Familien-Kinase; min=Minute; μ m=Mikrometer; s= Sekunden; ko=Knockout; MW \pm SEM=Mittelwert \pm Standardfehler; n=Anzahl; p= Signifikanzniveau

1.4. Extravasation – Extravasationseffizienz

Im nächsten Schritt war die Anzahl ausgewanderter Neutrophiler im rmTNF- α -stimulierten M. cremaster nach Giemsa-Färbung beurteilt worden. Ein repräsentatives Bild der Kontrollgruppe, der Dasatinib-behandelten Gruppe und der *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Gruppe zeigt Abbildung 20 A. Es wurden signifikant weniger ausgewanderte Leukozyten nach Dasatinib-Behandlung ($393,56 \pm 32,8$ Zellen/mm²) und in den *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Mäusen ($430,01 \pm 42,6$ Zellen/mm²) als im Vergleich zur Kontrollgruppe ($631,97 \pm 68,3$ Zellen/mm²) beobachtet (Abbildung 20 B). Wenn man die perivaskulären Zellen nach ihrer Subpopulation differenziert, zeigte sich, dass insbesondere Neutrophile Granulozyten (PMN) von der Reduktion im Knockout betroffen sind (Dasatinib: $348 \pm 51,3$ Zellen/mm², *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}*: $299 \pm 72,9$ Zellen/mm², Kontrolle: $574 \pm 43,7$ Zellen/mm²) (Abbildung 20 D). Wir kalkulierten die Extravasationseffizienz, definiert als die Ratio zwischen ausgewanderten Zellen (Zellen/mm²) und adhären Zellen (Zellen/mm²), um zwischen einer reduzierten Extravasation, erzeugt durch eine reduzierte Adhäsion, oder eines spezifischen Extravasationsdefekt unterscheiden zu können. Die Extravasationseffizienz als Zeichen eines spezifischen Auswanderungsdefektes zeigte den geringsten Wert in der *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Gruppe (0.21). Auch in der Dasatinib-Gruppe (0.34) zeigte sich eine um mehr als 50% verringerte Auswanderungs-Effizienz im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,77) (Abbildung 20 C). Insgesamt zeigte sich also die Extravasation von Neutrophilen ins perivaskuläre Gewebe sowohl durch die Inhibition von SFK mit Dasatinib als auch durch die Defizienz von SFK durch *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* signifikant gestört.

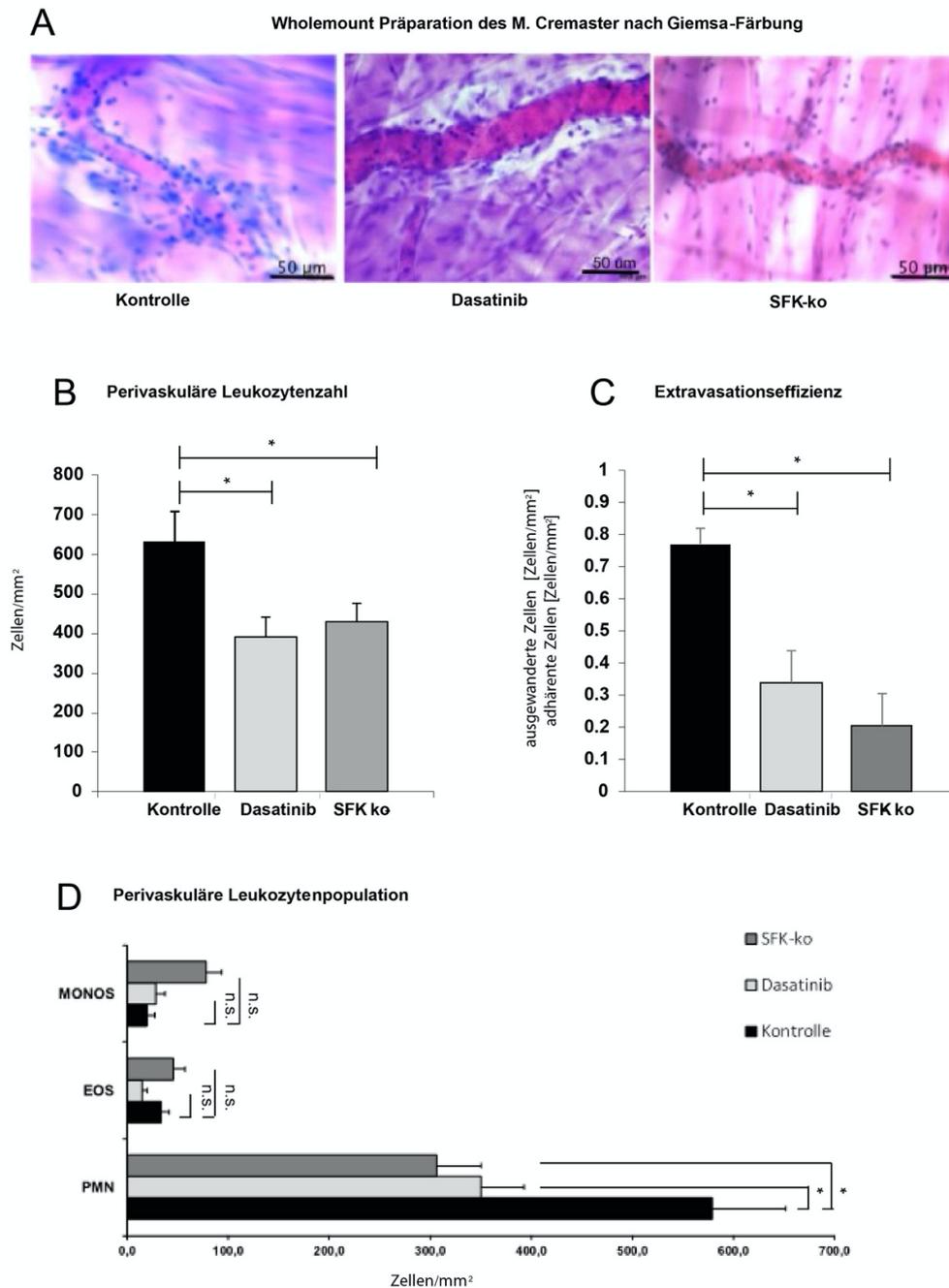


Abbildung 20: Darstellung der Extravasation und Extravasationseffizienz

(A) Exemplarische Darstellung eines M. Cremaster nach $rmTNF-\alpha$ Gabe *in vivo* und anschließender Giemsa-Färbung (sogenanntes wholemount Präparat) in der Kontrollgruppe, der mit 20 mg/kg KG Dasatinib behandelten $Lyz2^{EGFP}$ -Gruppe und der SFK-Knockout Gruppe; Maßstab 50 μm ; (B) Gesamtzahl ausgewanderter Leukozyten/mm² in den 3 Vergleichsgruppen nach $rmTNF-\alpha$ Gabe; (C) Effizienz der Auswanderung definiert als Ratio zwischen ausgewanderten Zellen (Zellen/mm²) und adhärenente Zellen (Zellen/mm²) in den 3 Vergleichsgruppen nach $rmTNF-\alpha$ Gabe; (D) Ausgewanderte Zellen/mm² in der Leukozytendifferenzierung in den 3 Vergleichsgruppen nach $rmTNF-\alpha$ Gabe. (MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe; * p < 0,05 vs. Kontrollgruppe; n.s.=nicht signifikant) *Abkürzungen: M=Musculus; rmTNF- α =rekombinanter*

muriner Tumornekrosefaktor- α ; mg/kg=Milligramm pro Kilogramm; KG=Körpergewicht der Maus; Lyz2=Lysozyme M Genlocus 2; EGFP=enhanced grün fluoreszierendes Protein; SFK=Src-Familien-Kinase; PMN=Polymorphonukleäre Zellen; EOS=Eosinophile Granulozyten; Monos= Mononukleäre Zellen; ko=Knockout; MW \pm SEM=Mittelwert \pm Standardfehler; n=Anzahl; p=Signifikanzniveau

2. Off-target Effekte

Um herauszufinden, ob Dasatinib in den *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} Gruppe zu weiteren (unspezifischen) Effekten (sogenannte off-target Effekte) führt, wurden aufbauend auf die bereits beschriebenen Experimente eine weitere *in vivo* Versuchsreihe durch Fütterung von 10mg/kg Körpergewicht Dasatinib (behandelt) an SFK-Knockout im Vergleich zu Fütterung mit reiner Methylcellulose (unbehandelt) durchgeführt. Die Wildtyp-Maus gilt als Kontrolle (Versuchsaufbau Abbildung 11 B). Bei dem Anteil rollender Zellen konnte gegenüber einer unbehandelten *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} Kontrolle kein zusätzlicher Effekt von Dasatinib (10mg/kg KG) in der *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} Gruppe beobachtet werden. Gegenüber den Kontrollgruppen kam es sowohl in der Dasatinib-behandelten *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} Gruppe als auch im Wildtyp zu einer leichten Steigerung ohne Signifikanz. Eine zu den Vorversuchen analoge Normalisierung auf die Neutrophilen ergab keinen signifikanten Unterschied in den verglichenen Gruppen (Abbildung 21 A und B). Während die aus den Vorversuchen bekannte Abnahme der Adhäsion und Adhäsionseffizienz nach Dasatinib-Behandlung in der Kontrollgruppe zu beobachten war, blieb die Adhäsion und Adhäsionseffizienz in der *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} Gruppe nach Dasatinib Behandlung unverändert (Abbildung 21 C und D). Mit dieser Versuchsreihe konnten unspezifische Effekte von Dasatinib in der *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} Gruppe für die untersuchten Parameter ausgeschlossen werden.

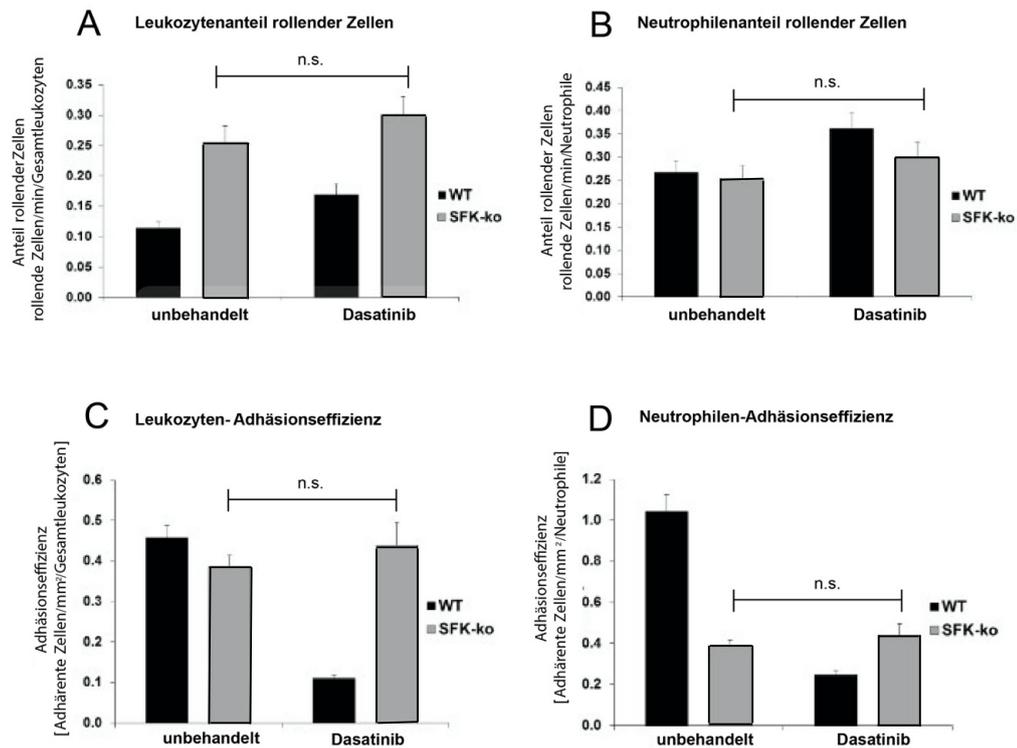


Abbildung 21: Keine Off-Target Effekte durch Dasatinib im SFK-Knockout

Nach der Applikation von Dasatinib (10mg/kg KG) im Knockout Tier zeigen sich *in vivo* keine zusätzlichen unspezifischen Effekten (sogenannte off-target Effekte) im Vergleich zur unbehandelten Knockout Maus. **(A)** Die Rolling Flux Fraction wurde berechnet aus der Anzahl rollender Zellen pro Gesamtleukozytenzahl, die pro Minute das Gefäß passierten oder **(B)** normiert auf die Neutrophilenanzahl im Blut in den Vergleichsgruppen SFK-Knockout gefüttert mit Methylcellulose (unbehandelt) vs. Dasatinib 10mg/kg KG nach rmTNF- α Gabe; **(C)** Effizienz der Adhäsion definiert als Ratio zwischen adhärenenten Zellen/mm² pro Gesamtleukozyten im Blut oder **(D)** normiert auf die Neutrophilenanzahl im Blut in den Vergleichsgruppen SFK-Knockout gefüttert mit Methylcellulose (unbehandelt) vs. Dasatinib 10mg/kg KG nach rmTNF- α Gabe. Die Wildtyp-Maus stellt eine interne Kontrolle dar. (MW \pm SEM bei n=6 pro Gruppe; * p < 0,05 vs. Kontrollgruppe; n.s.=nicht signifikant) *Abkürzungen: mg/kg=Milligramm pro Kilogramm; KG=Körpergewicht der Maus; SFK=Src-Familien-Kinase; rmTNF- α =rekombinanter muriner Tumornekrosefaktor- α ; ko=Knockout; MW \pm SEM=Mittelwert \pm Standardfehler; n=Anzahl; p=Signifikanzniveau*

3. *In vitro* Flusskammern

Bisher deuten unsere Experimente darauf hin, dass die Abwesenheit von SFK im inflammatorischen Entzündungsmodell (rmTNF- α induziert) in einer verringerten Adhäsionsfestigkeit und einem gestörten Auswanderungsprozess der Neutrophilen

resultiert. Nach der festen Adhäsion der Zellen an entzündete Endothel, beginnen Neutrophile zu polarisieren und entlang des Endothels zu kriechen, um einen geeigneten Platz zur Auswanderung zu finden. Dieser Prozess ist vom Integrin Outside-in Signalweg und β_2 -Integrinen abhängig¹¹⁵. Um weitere molekulare Mechanismen und mögliche Effekte der SFK in diesem Vorgang zu studieren, führten wir *in vitro* Flusskammern wie unter 3.3.3 beschrieben durch. Hierfür wurden Glaskapillaren mit E-Selektin, ICAM-1 und CXCL1 beschichtet, um ein entzündetes Endothel zu simulieren. In Bewegungsplots untersuchten wir die Richtung des Kriechens („crawling“) und zeigten, dass Kontroll-Neutrophile fähig sind, sich sowohl in als auch gegen die Blutflussrichtung zu bewegen, während sich SFK-Knockouts bei hohen Flussgeschwindigkeiten nur in Flussrichtung bewegen konnten (Abbildung 22 A). In einem Detachment-Assay zeigten wir eine Wandschubspannungs-abhängige Beeinträchtigung der festen Adhäsion von *Hck*^{-/-} *Fgr*^{-/-} *Lyn*^{-/-} Neutrophilen. Bei einer Wandschubspannung von 140 dyn/cm² konnten nur 36% der SFK-Knockout Leukozyten in der Flusskammer adhären, während 84% der Wildtyp Leukozyten noch adhären waren (Abbildung 22 B). Um mögliche molekulare Mechanismen zu identifizieren, die die beeinträchtigte Adhäsivität von Neutrophilen unter Fluss erklären, analysierten wir im nächsten Schritt Integrin Outside-in Signalwege. Zu diesem Outside-in Signalweg gehören neben der Paxillin Phosphorylierung auch das Integrin Clustering, welches wir untersucht haben. Während wir ein erhöhtes LFA-1 Signal in Wildtyp Neutrophilen detektieren konnten, zeigten sich SFK-defiziente Neutrophile in ihrer Form rund und unpolarisiert ohne LFA-1 Clustering (Abbildung 22 C). Es zeigt sich also, dass SFKs unerlässlich für die Fähigkeit der Zellen sind, ein effizientes Outside-in signaling durchzuführen. Dies resultiert in einem reduzierten Integrin Clustering, welches wiederum dazu führt, dass die Zellen nicht fest am Endothel oder der

Flusskammer adhären können. Die Unfähigkeit, Shearstress standzuhalten, führte in diesen Experimenten zu einem vermehrten Kriechen adhärenter SFK-Knockout Neutrophiler in Flussrichtung und zunehmender Ablösung der Zellen unter höherer Wandschubspannung.

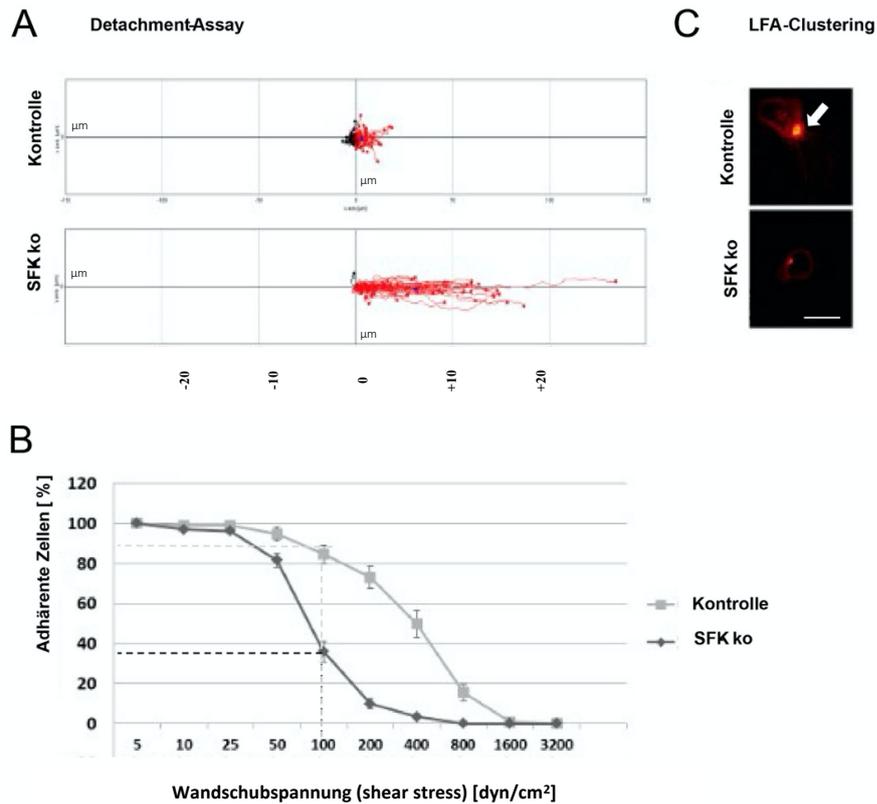


Abbildung 22: Detachment-Assay und LFA-1 Clustering

Ablösung Neutrophiler Granulozyten bei Zunahme der Wandschubspannung (Detachment Assay) *in vitro* (A, B) Der Bewegungsplot (A) zeigte die Kriech-Richtung der Neutrophilen aus der Wildtypkontrollgruppe im Vergleich zum SKF-Knockout in x- und y- Achse in μm . Die rote Linie stellt die Bewegung mit dem Blutfluss, die schwarze Linie gegen den Blutfluss dar. Der Knockout konnte sich bei hoher Flußgeschwindigkeit nur in Flußrichtung (rot) bewegen ($n=6$ pro Gruppe). (B) Mit zunehmender Wandschubspannung zeigte sich eine dramatische Ablösung adhärenter Neutrophiler von der Flusskammer im Knockout. Bei 140 dyn/cm^2 sind nur noch 36% der Neutrophilen der SFK-Knockout Maus adhären (gestrichelte Linie) (C) LFA-1 Clustering im Wildtyp und der SKF-Knockout Maus im Vergleich. Die Kontrolle zeigte ein starkes Signal (weißer Pfeil) für LFA-1 als Zeichen des Clusters im Vergleich zum fehlenden Cluster im Knockout als Zeichen des Verlustes der Adhäsionsfestigkeit. Maßstabsbalken $5 \mu\text{m}$. Abkürzungen: SFK=Src-Familien-Kinase; ko=Knockout; μm =Mikrometer; n =Anzahl; LFA-1=Lymphocyte function-associated antigen-1

IV. DISKUSSION

1. Diskussion des Materials und der Methodik

Die Leukozytenrekrutierungskaskade im Kontext von Entzündungsprozessen zu untersuchen, setzt die Nachahmung eines komplexen Vorganges voraus. Zahlreiche individuelle Einzelprozesse verschiedener Zellen und Zellprodukte, die wiederum aufeinander aufbauen, werden dabei beleuchtet. Daher basiert diese Arbeit auf Tierversuchen, um dem Gesamtorganismus in seiner Komplexität gerecht zu werden. Entscheidend hierbei ist auch die Tatsache, dass PTKs des humanen Genoms und der orthologen Vertebraten vergleichbar sind ⁵⁴.

Es ist hinreichend bekannt, dass sich neutrophile Granulozyten im Blut des Menschen und der Maus in ihrer prozentualen Zusammensetzung unterscheiden, jedoch in ihrer Funktion und Wirkungsweise ähnlich sind, so dass eine Übertragung bei der Betrachtung der Ergebnisse in den humanen Gesamtorganismus möglich scheint ⁸.

Es ist belegt, dass neutrophile Granulozyten als erste Zellpopulation auf einen Entzündungsreiz hin mit der Extravasation beginnen ¹¹⁶. Somit handelt es sich beim hier angewandten Inflammationsmodell bei den detektierten Zellen größtenteils, wie bereits mehrfach in Vorarbeiten gezeigt, um neutrophile Granulozyten ^{117,118}. Es ist jedoch bekannt, dass die anderen Subpopulationen der Leukozyten-Familie einen ähnlichen Auswanderungsprozess durchlaufen ^{119,120}. Somit kann bei der in dieser Arbeit verwendeten videogestützten Analyse nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass wenige andere Leukozyten-Subpopulationen mitberücksichtigt wurden, da die verschiedenen Zellpopulationen durch konventionelle Intravitalmikroskopische-Durchlichtmikroskopie nicht unter-

schieden werden können. Die Erhebung der Daten basierte auf einem gut etablierten Entzündungsmodell im murinen M. cremaster. Der M. cremaster ist ein dünnes und nahezu durchsichtiges Gewebe mit einem hohen Anteil an Vaskularisierung, so dass Leukozyten- und Endothelinteraktion visualisiert und untersucht werden können. Die Versuche wurden nur durch mich ausgewertet, so dass keine interpersonellen Beurteilungsunterschiede zu berücksichtigen sind.

2. Diskussion der *in vivo* Ergebnisse

2.1. Leukozytenrollen–Anteil der rollenden Zellen und Rollgeschwindigkeit

Das Leukozytenrollen als ersten Schritt der Rekrutierungskaskade nach rmTNF- α Stimulation ist vornehmlich E- und P-Selektin abhängig¹²¹. Das ursprüngliche und zur Darstellung vereinfachte Paradigma, dass Leukozytenrollen und die feste Adhäsion am Endothel voneinander getrennte und sequentielle Schritte sind⁴, wird durch die entdeckte Kooperation der Interaktion von E-Selektin mit β_2 -Integrinen inzwischen neu bewertet^{13,99,122,123}. Mäuse, denen β_2 -Integrine fehlen, zeigen in rmTNF- α stimulierten Venolen des M. cremaster eine dreifach erhöhte Rollgeschwindigkeit im Vergleich zum Wildtyp⁹⁹. Dunne et al zeigten im Detail, dass sowohl LFA-1 (CD11a/CD18)-defiziente ($\alpha_L\beta_2$ -Integrin^{-/-}) Mäuse als auch Mac-1 (CD11b/CD18)-defiziente ($\alpha_M\beta_2$ -Integrin^{-/-}) Mäuse eine erhöhte Rollgeschwindigkeit am Endothel besitzen¹²⁴. Unsere Versuche zeigten, dass Src-Familie-Kinasen keine Bedeutung für die Anzahl rollender Neutrophiler zu haben scheint, jedoch die Rollgeschwindigkeit am entzündeten Gefäßendothel beeinflussen. Dies unterstützt die Daten von Gonçalves de Albuquerque et al¹²⁵. Sie zeigen, dass Dasatinib dosisabhängig die Src-Kinasen abhängige Aktivierung von β_2 -Integrinen inhibiert. Dies führt zu einer Zunahme der Rollgeschwindigkeit im Entzündungsprozess¹²⁵. Unsere Experimente unterstützen die Hypothese, dass

es unter inflammatorischen Bedingungen in den Knockout Mäusen aufgrund der hohen Gesamtleukozytenzahl zu Unterschieden in den Rolling Flux Raten kommt. Daher wurden alle Werte auf die Neutrophilenanzahl genormt¹²⁵. Die Bedeutung der SFK beim β_2 -Integrin-abhängigem langsamen Rollen in unserer Arbeit werden durch Ergebnisse von Zarbock et al. unterstützt. Sie zeigten unter *in vivo* und *in vitro* Bedingungen, dass die E-Selektin-vermittelte Phosphorylierung von Syk und das langsame Rollen in SFK-Knockout Mäusen gestört waren^{62,126}.

2.2. Adhäsion und Adhäsionseffizienz

Während in früheren *in vitro* Untersuchungen kein Effekt der *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} Neutrophilen auf die Adhäsion gezeigt werden konnten^{62,63}, konnte diese Arbeit und weitere Experimente der Arbeitsgruppe Sperandio *in vivo* zeigen, dass Src-Familie-Kinasen eine bedeutende Funktion in der Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten aufweisen. Die im Ergebnisteil (Kapitel 1.2) gezeigte signifikant verringerte Adhäsionseffizienz lässt vermuten, dass SFK eine wichtige Rolle bei der Unterstützung der neutrophilen Adhäsion und Bewältigung des Shearstress spielen. Eine Intensivierung der Zell-Endothel-Adhäsion, Kriechen adhärenter Zellen am Endothel und schlussendlich die Auswanderung in das umliegende extravasale Gewebe ist nicht nur von der Bindung von Liganden an deren Integrine abhängig, sondern wird auch vom „Integrin Outside-in Signaling“ Prozess beeinflusst. Während Wildtyp Zellen effizient adhäreren, zeigen Zellen in der Abwesenheit bzw. der Inhibition von SFKs einen Defekt im Outside-in Signalweg. Durch weniger LFA-1 Clustering folgt eine reduzierte Adhäsion und ein leichteres Ablösen der Zellen von der Endothelwand.

Über die Jahre wurden einige Proteine identifiziert, die die Widerstandsfähigkeit der Neutrophilen gegen Shearstress beeinflussen. Dazu gehört neben Coronin1A auch die Non-Rezeptor-Tyrosinkinsase Syk^{114,127}. Um auszuschließen, dass eine SFK-

Defizienz die Oberflächenexpression von relevanten Proteinen für den Prozess des Rollens und Adhärenzens verändert, analysierte unsere Arbeitsgruppe in weiteren Experimenten die Oberflächenexpression von CD18, CD11a, CD11b, CD62L, PSGL1, CXCR2, CD44 durch Durchflusszytometrie in Wildtyp- und SFK-Knockout Neutrophilen. Hierbei zeigte sich keine signifikante Änderung in der Expression der Oberflächenmarker, so dass der beschriebene Adhäsionsdefekt nicht auf die veränderte Expression adhäsionsrelevanter Oberflächenmoleküle zurückzuführen ist ⁴⁶.

2.3. Abflachung und Kriechen

Nachdem Neutrophile Granulozyten am Endothel adhären, verformen sie sich mit Hilfe von Integrinen in eine flache, ausgebreitete Zelle (sog. Postarrest Modifikation) ⁴⁷. Aus *in vitro* Studien ist bekannt, dass isolierte SFK-ko Neutrophile einen Defekt im Verformungsvorgang („spreading“) haben ^{62,128}, so dass wir diese Hypothese in der Arbeit *in vivo* überprüften. Wir konnten insgesamt zeigen, dass SFK zwar keine gestörte Postarrest Modifikation aufweisen, aber unterschiedliche Kriech-Geschwindigkeiten zeigten. Bemerkenswert ist die unterschiedlich beobachtete Kriech-Zeit. Es zeigte sich, dass Neutrophile nach Dasatinib-Behandlung und nach Verlust von SFK die Kriechbewegung nur noch für eine kürzere Dauer im Vergleich zur Kontrollgruppe durchführen. Dieser Effekt scheint auf eine schwächere Adhäsion mit einer reduzierten Resistenz gegen zunehmende Wandschubspannung zurückzuführen zu sein (siehe Diskussion 4. *in vitro* Flusskammer).

2.4. Extravasation

Eine effiziente Auswanderung von Neutrophilen ist Teil einer funktionierenden Immunabwehr. Kovács et al. zeigten kürzlich im K/BxN serum-transfer Arthritis-Model, dass *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Neutrophile keinen intrinsischen Extravasations-

Defekt aufweisen⁷². Dieses Modell imitiert das humane rheumatoide Arthritis-Geschehen, in dem intraperitoneal injiziertes K/B×N Serum eine Autoantikörper-induzierte Entzündungsreaktion in Wildtypmäusen auslöst. *Hck*^{-/-}*Fgr*^{-/-}*Lyn*^{-/-} Mäuse entwickelten jedoch im Vergleich keine klinischen Arthritis-Symptome. Auch zeigte die Triple-Knockout Maus eine normale Ansammlung von myeloischen Zellen im entzündeten Synovialraum *in vivo*, was auf eine ungehinderte Auswanderung perivaskulär schließen lässt⁷². In unseren Experimenten fanden wir im Gegensatz dazu, dass sowohl nach einer Dasatinib-Behandlung als auch in SFK-ko Mäusen signifikant weniger Neutrophile im Vergleich zur Kontrollgruppe perivaskulär im M. cremaster auswandern. Überraschenderweise beobachteten wir außerdem eine verminderte Auswanderungs-Effizienz, so dass wir daraus schließen, dass SFK nicht nur bei der Adhäsion, sondern auch direkt beim Auswanderungsprozess funktionell bedeutsam sind. Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe bestärken diese Annahme im Verlauf. Es konnte im Folgenden gezeigt werden, dass eine um 50% signifikant verringerte Anzahl an ausgewanderten Neutrophilen in der Peritonealhöhle von SKF-Knockout Mäusen nach rmTNF- α Stimulation zu finden war, die sich nicht nur durch die verringerte Anzahl an adhären Zellen ergibt, sondern auf einen SKF-abhängigen intrinsischen Extravasationsdefekt zurückzuführen ist⁴⁶. Ergebnisse aus verschiedenen anderen Entzündungsmodellen mit SKF-Knockout Mäusen, bei denen auch eine verringerte Anzahl an ausgewanderten Neutrophilen beschrieben ist, bestätigen diese Erkenntnisse^{125,129}. Unsere Daten zeigten zusammenfassend einen Defekt in der Auswanderung nach Inhibierung von Hck, Fgr und Lyn im Entzündungsmodell des M. cremaster. In der Diskussion kontroverser Daten muss in jedem Fall auf die Verschiedenheit der Modelle, durch diese die beschriebenen Ergebnisse gewonnen wurden, hingewiesen werden. Unterschiedliche

Gewebearten scheinen bei der SFK-abhängigen Neutrophilenrekrutierung eine Rolle zu spielen.

Des Weiteren untersuchte unsere Arbeitsgruppe in Folgeexperimenten die Bedeutung der SFK im Auswanderungsprozess jenseits der Endothelschicht. Neutrophile nutzen in ihren Abwehrstrategien neben weiteren Mechanismen die Exozytose. Es ist bekannt, dass der Vesikeltransport in Neutrophilen hauptsächlich durch Rab27a GTPasen und deren Effektorproteine reguliert wird. Das in den Transport involvierte Protein Rab27a wird im Vorgang der Exozytose von sekretorischen Vesikeln und azurophilen Granula durch seine Partner Synaptotagmin-like Protein 1 (JFC1/Slp1) und Munc13-4 (Unc13d) vermittelt^{130,131}. Unsere Arbeitsgruppe konnte nun in weiteren Versuchen zeigen, dass SFK die Rab27a-abhängige Vesikel Translokation reguliert. Während nach Stimulation im Wildtyp (WT) 60% der Neutrophile eine Rab27a Translokation zeigten, waren es im SFK-Knockout nur 40,1%. Ähnliche Ergebnisse zeigten die immunhistochemischen Färbungen für JFC1 und Munc13-4⁴⁶. Ein entscheidender Prozess in der Rekrutierung der Leukozyten im Durchdringen der Basalmembran, ist die Mobilisation und Freisetzung von VLA3 und VLA6 (Very late Antigen 3 und 6) und NE (Neutrophilen Elastase) aus Vesikeln^{132,133}. Weitere Experimente unserer Arbeitsgruppen zeigten, dass dieser Vesikeltransport durch Abwesenheit von SFK im Vergleich zum Wildtyp sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beeinträchtigt ist⁴⁶. Somit konnten wir als Erste zeigen, dass SFK den Rab27a-abhängigen Vesikeltransport reguliert. Unter *in vitro* Bedingungen zeigt sich im SFK-Knockout außerdem die NE-abhängige Lamininzerstörung der Basalmembran gestört⁴⁶. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnten weitere Versuche zeigen, dass sich Wildtyp Neutrophile einen Weg durch die Basalmembran schaffen, den SFK-Neutrophilen nutzen, um auch ins entzündete Gewebe zu gelangen⁴⁶.

3. Diskussion der off-target Effekte

Aus den vorliegenden Daten wurde geschlossen, dass Dasatinib Behandlung eine erfolgreiche Inhibition von Src-Tyrosinkinasen darstellt.

Es konnten darüber hinaus keine off-target Effekte durch Dasatinib auf die Neutrophilenrekrutierung in den *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Mäusen beobachtet werden und somit größere unspezifische Effekte in diesem Prozess ausgeschlossen werden.

4. Diskussion der *in vitro* Flusskammern

In vitro zeigten wir, dass *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Neutrophile nach Aktivierung verminderte LFA-1 Cluster bilden und somit unfähig sind, höheren Blutflußgeschwindigkeiten zu widerstehen, und dadurch in die Blutströmung zurückgespült werden und folglich nicht auswandern können. In weiteren Untersuchungen zeigte sich eine Wandschubspannungs-abhängige Beeinträchtigung der festen Neutrophilenadhäsion in *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Neutrophilen (Detachment-Assay). Ab einer Wandschubspannung von 100 dyn/cm² zeigt sich eine dramatische Ablösung der SFK-Knockout Leukozyten von der Flusskammer, während die Wildtyp Leukozyten noch überwiegend adhären waren. Post-Arrest Ereignisse bei Neutrophilen, Adhäsionsfestigkeit, Kriechen sowie schlussendlich die Auswanderung, die ständig in der Mikrozirkulation stattfinden, sind von Integrin-Signalen und Zytoskelett-Veränderungen abhängig^{45,134}. Über die letzten Jahre wurden eine Reihe von Proteinen (Coronin1A, Syk) identifiziert, die die Adhäsionsfestigkeit von Zellen unter Wandschubspannung (Shearstress) regulieren^{114,127}. Wir beobachteten in weiteren Experimenten unserer Arbeitsgruppe verminderte Phosphorylierung von Paxillin, Cortactin und Syk in SFK defiziente Neutrophilen, was somit die gestörte Adhäsion der Neutrophilen erklären könnte⁴⁶.

In der vorliegenden Arbeit konnte ich somit zeigen, dass SFK während einer akuten Entzündungsreaktion in unterschiedlichen Schritten der Rekrutierungskaskade eine wichtige Rolle spielen. Während der beobachtete Effekt der SFK auf die Adhäsionsfestigkeit eng mit der Funktion von β_2 -Integrinen verbunden ist, zeigen nachfolgende Arbeiten unserer Arbeitsgruppe auch eine essenzielle Rolle von SFK für den Vesikeltransport in Neutrophilen, der den Auswanderungsprozess durch die endotheliale Basalmembran reguliert.

All diese Erkenntnisse unterstützen daher den klinischen Ansatz, SKF-Inhibitoren bei Erkrankungen mit einer unerwünschten Auswanderung Neutrophiler Granulozyten in inflammatorisch-verändertes Gewebe therapeutisch zu nutzen.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Leukozytenrekrutierung aus dem Gefäßsystem ins entzündete Gewebe setzt einen wohlabgestimmten Kaskadenablauf voraus, der schließlich zur Auswanderung der Zellen aus dem Gefäß in entzündlich verändertes Gewebe führt ¹.

Mitglieder der Src-Tyrosinkinasefamilie (SFK) sind nachweislich an Autoimmunprozessen und Entzündungsreaktionen beteiligt ^{58,62,72,87,90,125,129}. Hck, Fgr und Lyn sind die Src-Tyrosinkinasen, die in Neutrophilen Granulozyten exprimiert sind ^{54,56}. Allerdings ist deren Rolle in diesem Prozess noch nicht vollständig aufgeklärt.

Diese Arbeit untersucht daher die Effekte des Tyrosinkinaseinhibitors Dasatinib auf die Leukozytenrekrutierungskaskade. In Vorversuchen in Zellkulturen zeigte sich diese Substanz als besonders effektiv in ihrer Inhibition immunvermittelter Reaktionen in Dosierungen, die bereits in der Onkologie im klinischen Einsatz sind ⁷⁸⁻⁸⁰. Zu weiteren Untersuchung und Differenzierung der Effekte wurde außerdem eine SFK-Knockout (*Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}*) Maus in die Versuchsreihe eingeschlossen ^{87,90}.

Die *in vivo* Experimente basieren auf einem gut etablierten Entzündungsmodell im murinen M. cremaster ⁹⁴. Durch mikrochirurgische Technik und unter inflammatorischen Bedingungen wurden am intravitalmikroskopischen *in vivo* Modell die Effekte von Dasatinib bzw. der SFKs Hck, Fgr und Lyn auf die Neutrophilenrekrutierungskaskade untersucht.

Zusammenfassend konnte ich in dieser Arbeit eine bedeutende Rolle von SFKs in den verschiedenen Einzelschritten der Leukozytenrekrutierungskaskade *in vivo* und *in vitro* während einer akuten Entzündungsreaktion zeigen.

Ich konnte in meinen Experimenten die Notwendigkeit von SFKs für das langsame Neutrophilenrollen *in vivo* zeigen, während ich keinen Einfluss der SKF auf das Rollen per se nachgewiesen habe. Der Tyrosinkinaseinhibitor Dasatinib hemmt dosisabhängig die Src-Kinasen vermittelte Aktivierung von β_2 -Integrinen. Somit wird ein entscheidender Vorgang, der die Rollgeschwindigkeit im Entzündungsprozess moduliert, durch Dasatinib inhibiert.

Interessanterweise zeigten sich sowohl die Adhäsion der Neutrophilen als auch deren Extravasation ins perivaskuläre Gewebe signifikant durch die Inhibition von SKF und die Defizienz von Hck, Fgr und Lyn gestört.

Nach der Adhäsion an das Endothel beginnen Leukozyten am Gefäßlumen zu kriechen, um den passenden Ort für Ihre Auswanderung zu finden. *In vitro* zeigte ich, dass *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Zellen weniger LFA-1 Cluster bilden und unfähig sind, hoher Wandschubspannung zu widerstehen. Somit werden sie während des Kriechprozesses weggeschwemmt und können folglich nicht auswandern. In weiteren Experimenten der Arbeitsgruppe beobachteten wir verminderte Phosphorylierung von Paxillin, Cortactin und Syk, was die gestörte Adhäsion der Neutrophilen erklären könnte ⁴⁶.

Außerdem konnte unsere Arbeitsgruppe als Erste zeigen, dass SFKs nicht nur für die post-arrest Modifikation, sondern auch für die Durchbrechung der Basalmembran beim Auswanderungsvorgang durch Transport von VLA3, VLA6 und NE enthaltenen Vesikeln an die Neutrophilenoberfläche wichtig sind ⁴⁶.

Meine Ergebnisse zeigten zudem, dass die Inhibition der SFK durch Dasatinib den Ergebnissen der *Hck^{-/-}Fgr^{-/-}Lyn^{-/-}* Maus ähneln, was unspezifischen off-target Effekte ausschließen lässt.

Unsere Grundlagenforschung bestätigt, dass SFKs unverzichtbar für die Rekrutierung von Neutrophilen ins entzündete Gewebe sind. Diese Erkenntnisse helfen die Wirkungsprozesse von SFK-Inhibitoren besser zu verstehen und dadurch weitere therapeutische Anwendungsmöglichkeiten bei Entzündungsprozessen aber auch Autoimmunerkrankungen zu erschließen.

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an, interessant zu werden, wo sie aufhört.

Justus von Liebig

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nature reviews Immunology* 2007;7:678-89.
2. Medzhitov R, Janeway C, Jr. Innate immunity. *The New England journal of medicine* 2000;343:338-44.
3. Schmidt S, Moser M, Sperandio M. The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies. *Molecular immunology* 2013;55:49-58.
4. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 1991;67:1033-6.
5. Futosi K, Fodor S, Mócsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol* 2013;17:638-50.
6. Suratt BT, Young SK, Lieber J, Nick JA, Henson PM, Worthen GS. Neutrophil maturation and activation determine anatomic site of clearance from circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;281:L913-21.
7. Ballesteros I, Rubio-Ponce A, Genua M, et al. Co-option of Neutrophil Fates by Tissue Environments. *Cell* 2020;183:1282-97.e18.
8. Mestas J, Hughes CC. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2004;172:2731-8.
9. Wardlaw AJ. The role of adhesion in eosinophil function. *Chem Immunol* 2000;78:93-111.

10. Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology* 2013;13:159-75.
11. Sperandio M, Gleissner CA, Ley K. Glycosylation in immune cell trafficking. *Immunological reviews* 2009;230:97-113.
12. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14.
13. Kunkel EJ, Dunne JL, Ley K. Leukocyte arrest during cytokine-dependent inflammation in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2000;164:3301-8.
14. Kubes P. The complexities of leukocyte recruitment. *Seminars in immunology* 2002;14:65-72.
15. Munn LL, Melder RJ, Jain RK. Role of erythrocytes in leukocyte-endothelial interactions: mathematical model and experimental validation. *Biophysical journal* 1996;71:466-78.
16. Vestweber D, Blanks JE. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiological reviews* 1999;79:181-213.
17. Sperandio M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte rolling in vivo. *Febs j* 2006;273:4377-89.
18. von Andrian UH, Hasslen SR, Nelson RD, Erlandsen SL, Butcher EC. A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow. *Cell* 1995;82:989-99.
19. Gallatin WM, Weissman IL, Butcher EC. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature* 1983;304:30-4.

20. Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, Jr., Seed B. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science* 1989;243:1160-5.
21. Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA, Jr. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84:9238-42.
22. Stenberg PE, McEver RP, Shuman MA, Jacques YV, Bainton DF. A platelet alpha-granule membrane protein (GMP-140) is expressed on the plasma membrane after activation. *The Journal of cell biology* 1985;101:880-6.
23. Hsu-Lin S, Berman CL, Furie BC, August D, Furie B. A platelet membrane protein expressed during platelet activation and secretion. Studies using a monoclonal antibody specific for thrombin-activated platelets. *J Biol Chem* 1984;259:9121-6.
24. Johnston GI, Cook RG, McEver RP. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell* 1989;56:1033-44.
25. McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *The Journal of clinical investigation* 1989;84:92-9.
26. Sperandio M, Smith ML, Forlow SB, et al. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *The Journal of experimental medicine* 2003;197:1355-63.
27. Gotsch U, Jäger U, Dominis M, Vestweber D. Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun* 1994;2:7-14.

28. Arbonés ML, Ord DC, Ley K, et al. Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice. *Immunity* 1994;1:247-60.
29. Khan AI, Kubes P. L-selectin: an emerging player in chemokine function. *Microcirculation* 2003;10:351-8.
30. Simon SI, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng* 2005;7:151-85.
31. Ivetic A, Hoskins Green HL, Hart SJ. L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling. *Front Immunol* 2019;10:1068.
32. Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 1996;88:3259-87.
33. Smith ML, Olson TS, Ley K. CXCR2- and E-selectin-induced neutrophil arrest during inflammation in vivo. *The Journal of experimental medicine* 2004;200:935-9.
34. Kunkel EJ, Ley K. Distinct phenotype of E-selectin-deficient mice. E-selectin is required for slow leukocyte rolling in vivo. *Circ Res* 1996;79:1196-204.
35. Hidalgo A, Peired AJ, Wild M, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* 2007;26:477-89.
36. Thomas W. Catch bonds in adhesion. *Annu Rev Biomed Eng* 2008;10:39-57.
37. Stadtmann A, Brinkhaus L, Mueller H, et al. Rap1a activation by CalDAG-GEFI and p38 MAPK is involved in E-selectin-dependent slow leukocyte rolling. *Eur J Immunol* 2011;41:2074-85.

38. Schymeinsky J, Mócsai A, Walzog B. Neutrophil activation via beta2 integrins (CD11/CD18): molecular mechanisms and clinical implications. *Thromb Haemost* 2007;98:262-73.
39. Zarbock A, Ley K, McEver RP, Hidalgo A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood* 2011;118:6743-51.
40. David BA, Kubes P. Exploring the complex role of chemokines and chemoattractants in vivo on leukocyte dynamics. *Immunological reviews* 2019;289:9-30.
41. Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol* 2007;8:215.
42. Ley K. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment in the inflammatory process. *Cardiovascular research* 1996;32:733-42.
43. Rose DM, Alon R, Ginsberg MH. Integrin modulation and signaling in leukocyte adhesion and migration. *Immunological reviews* 2007;218:126-34.
44. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
45. Abram CL, Lowell CA. The ins and outs of leukocyte integrin signaling. *Annu Rev Immunol* 2009;27:339-62.
46. Rohwedder I, Kurz ARM, Pruenster M, et al. Src family kinase-mediated vesicle trafficking is critical for neutrophil basement membrane penetration. *Haematologica* 2020;105:1845-56.
47. Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *The Journal of experimental*

medicine 2006;203:2569-75.

48. Woodfin A, Voisin MB, Beyrau M, et al. The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo. *Nat Immunol* 2011;12:761-9.

49. Voisin MB, Nourshargh S. Neutrophil transmigration: emergence of an adhesive cascade within venular walls. *J Innate Immun* 2013;5:336-47.

50. Lämmermann T, Bader BL, Monkley SJ, et al. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature* 2008;453:51-5.

51. Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *Journal of leukocyte biology* 1996;59:229-40.

52. Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood* 2019;133:2178-85.

53. Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol* 2011;12:1035-44.

54. Robinson DR, Wu Y-M, Lin S-F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000;19:5548-57.

55. Larsen CJ. [The Nobel Prize in physiology and medicine 1989. J. Michael Bishop and Harold E. Varmus]. *Pathol Biol (Paris)* 1989;37:1077-8.

56. Thomas SM, Brugge JS. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annual review of cell and developmental biology* 1997;13:513-609.

57. Resh MD. Myristylation and palmitoylation of Src family members: the fats of the matter. *Cell* 1994;76:411-3.
58. Schwartzberg PL. The many faces of Src: multiple functions of a prototypical tyrosine kinase. *Oncogene* 1998;17:1463-8.
59. Varadi M, Anyango S, Deshpande M, et al. AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research* 2021;50:D439-D44.
60. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 2021;596:583-9.
61. Tunyasuvunakool K, Adler J, Wu Z, et al. Highly accurate protein structure prediction for the human proteome. *Nature* 2021;596:590-6.
62. Lowell CA, Fumagalli L, Berton G. Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *The Journal of cell biology* 1996;133:895-910.
63. Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1999;162:1120-6.
64. Meng F, Lowell CA. A beta 1 integrin signaling pathway involving Src-family kinases, Cbl and PI-3 kinase is required for macrophage spreading and migration. *Embo j* 1998;17:4391-403.
65. Friedrich G, Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 1991;5:1513-23.
66. Soriano P, Montgomery C, Geske R, Bradley A. Targeted disruption of the

- c-src proto-oncogene leads to osteopetrosis in mice. *Cell* 1991;64:693-702.
67. Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* 1988;336:348-52.
68. Lock P, Ralph S, Stanley E, Boulet I, Ramsay R, Dunn AR. Two isoforms of murine *hck*, generated by utilization of alternative translational initiation codons, exhibit different patterns of subcellular localization. *Mol Cell Biol* 1991;11:4363-70.
69. Baruzzi A, Cavegion E, Berton G. Regulation of phagocyte migration and recruitment by Src-family kinases. *Cell Mol Life Sci* 2008;65:2175-90.
70. Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2002;16:547-58.
71. Evangelista V, Pamuklar Z, Piccoli A, et al. Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets. *Blood* 2007;109:2461-9.
72. Kovács M, Németh T, Jakus Z, et al. The Src family kinases Hck, Fgr, and Lyn are critical for the generation of the in vivo inflammatory environment without a direct role in leukocyte recruitment. *The Journal of experimental medicine* 2014;211:1993-2011.
73. Nelson MP, Metz AE, Li S, Lowell CA, Steele C. The absence of Hck, Fgr, and Lyn tyrosine kinases augments lung innate immune responses to *Pneumocystis murina*. *Infect Immun* 2009;77:1790-7.
74. Faust N, Varas F, Kelly LM, Heck S, Graf T. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 2000;96:719-26.

75. Shimomura O. Discovery of green fluorescent protein (GFP) (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48:5590-602.
76. Chalfie M. GFP: lighting up life (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48:5603-11.
77. Tsien RY. Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl* 2009;48:5612-26.
78. Futosi K, Németh T, Pick R, Vántus T, Walzog B, Mócsai A. Dasatinib inhibits proinflammatory functions of mature human neutrophils. *Blood* 2012;119:4981-91.
79. Boulos N, Mulder HL, Calabrese CR, et al. Chemotherapeutic agents circumvent emergence of dasatinib-resistant BCR-ABL kinase mutations in a precise mouse model of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2011;117:3585-95.
80. Lombardo LJ, Lee FY, Chen P, et al. Discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. *J Med Chem* 2004;47:6658-61.
81. (Accessed 10.03.2021, at https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/sprycel-epar-product-information_de.pdf.)
82. Talpaz M, Shah NP, Kantarjian H, et al. Dasatinib in imatinib-resistant Philadelphia chromosome-positive leukemias. *The New England journal of medicine* 2006;354:2531-41.
83. Das J, Chen P, Norris D, et al. 2-aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. Structure-activity relationship studies toward the discovery of N-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]]-2-methyl-4-

pyrimidinyl]amino)]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, BMS-354825) as a potent pan-Src kinase inhibitor. *J Med Chem* 2006;49:6819-32.

84. Gore L, Kearns PR, de Martino ML, et al. Dasatinib in Pediatric Patients With Chronic Myeloid Leukemia in Chronic Phase: Results From a Phase II Trial. *J Clin Oncol* 2018;36:1330-8.

85. Steinberg M. Dasatinib: a tyrosine kinase inhibitor for the treatment of chronic myelogenous leukemia and philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Clin Ther* 2007;29:2289-308.

86. Michael Freissmuth SO, Stefan Böhm. *Pharmakologie und Toxikologie*. Springer Verlag 2016;2. Auflage:Seite: 830.

87. Lowell CA, Soriano P, Varmus HE. Functional overlap in the src gene family: inactivation of hck and fgr impairs natural immunity. *Genes Dev* 1994;8:387-98.

88. Chan VW, Meng F, Soriano P, DeFranco AL, Lowell CA. Characterization of the B lymphocyte populations in Lyn-deficient mice and the role of Lyn in signal initiation and down-regulation. *Immunity* 1997;7:69-81.

89. Netzker R. In: Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R, eds. *Biochemie Stuttgart*: Georg Thieme Verlag KG; 2008:492.

90. Meng F, Lowell CA. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *The Journal of experimental medicine* 1997;185:1661-70.

91. Guillen J. FELASA guidelines and recommendations. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS* 2012;51:311-21.

92. Shakarami M. *Interne Institutsrichtlinien zur Tierhaltung 2014/2015 des*

Walter-Brendel-Zentrums für experimentelle Medizin. München 2015.

93. Richtlinie 2010/63/EU des europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere. Amtsblatt der Europäischen Union 2010.

94. Baez S. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* 1973;5:384-94.

95. Sperandio M, J. Pickard S., Unnikrishnan S., Aceton T., Ley K. Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro. *Methods Enzymol* 2006;416.

96. Ley K, Pries A. R., Gaehtgens P. A versatile intravital microscope design. *The Journal of experimental medicine* 1987;181.

97. Klitzman B, Duling BR. Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *Am J Physiol* 1979;237:H481-90.

98. Zelová H, Hošek J. TNF- α signalling and inflammation: interactions between old acquaintances. *Inflamm Res* 2013;62:641-51.

99. Jung U, Norman KE, Scharffetter-Kochanek K, Beaudet AL, Ley K. Transit time of leukocytes rolling through venules controls cytokine-induced inflammatory cell recruitment in vivo. *The Journal of clinical investigation* 1998;102:1526-33.

100. Doubek M. [Discovery of blood cells in the 17th century]. *Vnitr Lek* 2001;47:496-9.

101. Pries AR. A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp* 1988;7:327-45.

102. Zarbock A, Ley K. New insights into leukocyte recruitment by intravital microscopy. *Curr Top Microbiol Immunol* 2009;334:129-52.

103. Lipowsky HH, Zweifach BW. Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc Res* 1978;15:93-101.
104. Dietzel S, Pircher J, Nekolla AK, et al. Label-free determination of hemodynamic parameters in the microcirculation with third harmonic generation microscopy. *PLoS One* 2014;9:e99615.
105. Yang WH, Nussbaum C, Grewal PK, Marth JD, Sperandio M. Coordinated roles of ST3Gal-VI and ST3Gal-IV sialyltransferases in the synthesis of selectin ligands. *Blood* 2012;120:1015-26.
106. Kim MB, Sarelius IH. Regulation of leukocyte recruitment by local wall shear rate and leukocyte delivery. *Microcirculation* 2004;11:55-67.
107. Atherton A, Born GV. Relationship between the velocity of rolling granulocytes and that of the blood flow in venules. *J Physiol* 1973;233:157-65.
108. Kim MB, Sarelius IH. Role of shear forces and adhesion molecule distribution on P-selectin-mediated leukocyte rolling in postcapillary venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H2705-11.
109. Smith ML, Long DS, Damiano ER, Ley K. Near-wall micro-PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo. *Biophysical journal* 2003;85:637-45.
110. Long DS, Smith ML, Pries AR, Ley K, Damiano ER. Microviscometry reveals reduced blood viscosity and altered shear rate and shear stress profiles in microvessels after hemodilution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004;101:10060-5.
111. Sundd P, Pospieszalska MK, Cheung LS, Konstantopoulos K, Ley K. Biomechanics of leukocyte rolling. *Biorheology* 2011;48:1-35.

112. Sundd P, Pospieszalska MK, Ley K. Neutrophil rolling at high shear: flattening, catch bond behavior, tethers and slings. *Molecular immunology* 2013;55:59-69.
113. Frommhold D, Kamphues A, Hepper I, et al. RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood* 2010;116:841-9.
114. Frommhold D, Mannigel I, Schymeinsky J, et al. Spleen tyrosine kinase Syk is critical for sustained leukocyte adhesion during inflammation in vivo. *BMC Immunol* 2007;8:31.
115. Ley K, Zarbock A. Hold on to your endothelium: postarrest steps of the leukocyte adhesion cascade. *Immunity* 2006;25:185-7.
116. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood* 2003;102:2660-9.
117. Jung U, Ramos CL, Bullard DC, Ley K. Gene-targeted mice reveal importance of L-selectin-dependent rolling for neutrophil adhesion. *Am J Physiol* 1998;274:H1785-91.
118. Liu Z, Yago T, Zhang N, et al. L-selectin mechanochemistry restricts neutrophil priming in vivo. *Nat Commun* 2017;8:15196.
119. Zuchtriegel G, Uhl B, Pühr-Westerheide D, et al. Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biol* 2016;14:e1002459.
120. Soehnlein O, Zernecke A, Eriksson EE, et al. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood* 2008;112:1461-71.
121. Sperandio M, Forlow SB, Thatte J, Ellies LG, Marth JD, Ley K. Differential requirements for core2 glucosaminyltransferase for endothelial L-selectin ligand

function in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2001;167:2268-74.

122. Ley K, Allietta M, Bullard DC, Morgan S. Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circ Res* 1998;83:287-94.

123. Milstone DS, Fukumura D, Padgett RC, et al. Mice lacking E-selectin show normal numbers of rolling leukocytes but reduced leukocyte stable arrest on cytokine-activated microvascular endothelium. *Microcirculation* 1998;5:153-71.

124. Dunne JL, Ballantyne CM, Beaudet AL, Ley K. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood* 2002;99:336-41.

125. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Rohwedder I, Silva AR, et al. The Yin and Yang of Tyrosine Kinase Inhibition During Experimental Polymicrobial Sepsis. *Front Immunol* 2018;9:901.

126. Zarbock A, Abram CL, Hundt M, Altman A, Lowell CA, Ley K. PSGL-1 engagement by E-selectin signals through Src kinase Fgr and ITAM adapters DAP12 and FcR gamma to induce slow leukocyte rolling. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:2339-47.

127. Pick R, Begandt D, Stocker TJ, et al. Coronin 1A, a novel player in integrin biology, controls neutrophil trafficking in innate immunity. *Blood* 2017;130:847-58.

128. Germena G, Volmering S, Sohlbach C, Zarbock A. Mutation in the CD45 Inhibitory Wedge Modulates Integrin Activation and Leukocyte Recruitment during Inflammation. *The Journal of Immunology* 2015;194:728-38.

129. Lowell CA, Berton G. Resistance to endotoxic shock and reduced neutrophil migration in mice deficient for the Src-family kinases Hck and Fgr. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America 1998;95:7580-4.

130. Brzezinska AA, Johnson JL, Munafo DB, et al. The Rab27a effectors JFC1/Slp1 and Munc13-4 regulate exocytosis of neutrophil granules. *Traffic* (Copenhagen, Denmark) 2008;9:2151-64.

131. Munafó DB, Johnson JL, Ellis BA, Rutschmann S, Beutler B, Catz SD. Rab27a is a key component of the secretory machinery of azurophilic granules in granulocytes. *Biochem J* 2007;402:229-39.

132. Hyun YM, Sumagin R, Sarangi PP, et al. Uropod elongation is a common final step in leukocyte extravasation through inflamed vessels. *The Journal of experimental medicine* 2012;209:1349-62.

133. Kurz AR, Pruenster M, Rohwedder I, et al. MST1-dependent vesicle trafficking regulates neutrophil transmigration through the vascular basement membrane. *The Journal of clinical investigation* 2016;126:4125-39.

134. Ding ZM, Babensee JE, Simon SI, et al. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950) 1999;163:5029-38.

VII. ANHANG

1. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Die Leukozytenrekrutierungskaskade</i>	3
<i>Abbildung 2: Struktureller Aufbau von L-, E-, und P- Selektin</i>	5
<i>Abbildung 3: Selektinabhängige intrazelluläre Signalwege in Neutrophilen</i>	6
<i>Abbildung 4: Darstellung der zwei Transmigrationsrouten von Neutrophilen</i>	9
<i>Abbildung 5: Familie der Tyrosinkinasen</i>	12
<i>Abbildung 6: 3D-Proteinstrukturen der Src-Tyrosinkinasen Hck, Fgr und Lyn</i> ... 14	
<i>Abbildung 7: Struktur-, Summenformel und Gewicht des Wirkstoffes Dasatinib</i> .. 17	
<i>Abbildung 8: Genotypisierung von Wildtyp und SFK-Knockout</i>	27
<i>Abbildung 9: Chirurgisches Instrumentarium zur Tierpräparation</i>	31
<i>Abbildung 10: Chirurgische Operationstechnik in Einzelschritten</i>	33
<i>Abbildung 11: Versuchsaufbau im rmTNF-α Entzündungsmodell I</i>	34
<i>Abbildung 12: Aufbau des Intravitalmikroskops</i>	37
<i>Abbildung 13: In vivo Experimentaufbau</i>	37
<i>Abbildung 14: Aufnahme des M. cremaster einer Lyz2^{EGFP} Maus</i>	38
<i>Abbildung 15: Versuchsaufbau im rmTNF-α Entzündungsmodell II</i>	41
<i>Abbildung 16: Giemsa-gefärbter M. cremaster der Wildtyp-Kontrolle</i>	45
<i>Abbildung 17: Leukozytenrollen und Rollgeschwindigkeit</i>	49
<i>Abbildung 18: Leukozytenadhäsion und Adhäsionseffizienz</i>	51
<i>Abbildung 19: Kriech Eigenschaften der Neutrophilen</i>	53
<i>Abbildung 20: Darstellung der Extravasation und Extravasationseffizienz</i>	55
<i>Abbildung 21: Keine Off-Target Effekte durch Dasatinib im SFK-Knockout</i>	57
<i>Abbildung 22: Detachment-Assay und LFA-1 Clustering</i>	59

2. Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Zellpopulationsabhängige Expression der Src-Tyrosinkinasen</i>	12
<i>Tabelle 2: Spezifische Primer der SFK-Knockouts</i>	26
<i>Tabelle 3: Polymerasekettenreaktion zur Genotypisierung</i>	27
<i>Tabelle 4: Definition der analysierten Parameter mit Einheiten</i>	42
<i>Tabelle 5: Vergleich hämodynamischer Parameter</i>	47

VIII. PUBLIKATIONSVERZEICHNIS

1. Publikationen im Rahmen des Promotionsstudiums

Src family kinase-mediated vesicle trafficking is critical for neutrophil basement membrane penetration. Rohwedder I, Kurz ARM, Pruenster M, Immler R, Pick R, **Eggersmann T**, Klapproth S, Johnson JL, Alsina SM, Lowell CA, Mócsai A, Catz SD, Sperandio M. *Haematologica*. 2020 Jul;105(7):1845-1856. doi: 10.3324/haematol.2019.225722. Epub 2019 Nov 7. PMID: 31699792

The Yin and Yang of Tyrosine Kinase Inhibition During Experimental Polymicrobial Sepsis. Gonçalves-de-Albuquerque CF, Rohwedder I, Silva AR, Ferreira AS, Kurz ARM, Cougoule C, Klapproth S, **Eggersmann T**, Silva JD, de Oliveira GP, Capelozzi VL, Schlesinger GG, Costa ER, Estrela Marins RCE, Mócsai A, Maridonneau-Parini I, Walzog B, Macedo Rocco PR, Sperandio M, de Castro-Faria-Neto HC. *Front Immunol*. 2018 Apr 30;9:901. doi: 10.3389/fimmu.2018.00901. eCollection 2018

Extracellular MRP8/14 is a regulator of $\beta 2$ integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion

Pruenster M, Kurz AR, Chung KJ, Cao-Ehlker X, Bieber S, Nussbaum CF, Bierschenk S, **Eggersmann TK**, Rohwedder I, Heinig K, Immler R, Moser M, Koedel U, Gran S, McEver RP, Vestweber D, Verschoor A, Leanderson T, Chavakis T, Roth J, Vogl T, Sperandio M. *Nat Commun*. 2015 Apr 20;6:6915. doi: 10.1038/ncomms7915

Aus dem Promotionsstudium hervorgegangene Vorträge/Poster:

1. Vortrag, FöFoLe-Methodenvortrag (München, 14.08.2012)
2. Vortrag, FöFoLe-Statusseminar (Herrsching, 24.05.2013)
3. DoktaMed Posterpreis (München, 29.07.2013)
4. Poster, 2nd Joint Meeting German Society for Microcirculation and Vascular Biology and Swiss Society for Microcirculation and Vascular Research (Dresden, 26.09.2013)
5. Vortrag, IRTG Meeting (München, 03.02.2014)
6. Vortrag, Symposium des SFB 914 (Villa Vigoni, Italien, 01.10.2016)

IX. DANKSAGUNG

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei Herrn Professor Dr. med. Markus Sperandio für die herzliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Vergabe meines Dissertationsthemas und die stets konstruktive und fortwährende Zusammenarbeit.

Seiner motivierenden Inspiration, sehr persönlichen Betreuung und gewissenhaften Einarbeitung in das wissenschaftliche Arbeiten, verdanke ich meinen heutigen Werdegang.

Frau Dr. rer. nat. Ina Rohwedder möchte ich für Ihre persönliche Betreuung und Ihr Engagement im Rahmen meiner Promotionsarbeit und Publikation ebenso herzlich danken.

Für seine Begeisterungsfähigkeit und nicht zuletzt die umfassende Einführung in die vaskuläre Bildgebung mittels 2-Photonenmikroskopie möchte ich mich bei Herrn Privatdozent Dr. rer. nat. Steffen Dietzel bedanken.

Herrn Professor Dr. Dr. Jürgen Heesemann verdanke ich die wertvolle wissenschaftliche Erfahrung und den „wissenschaftlichen Werkzeugkasten“ im Rahmen des Promotionsstudienganges „Molekulare und Systembiologische Medizin“ des Förderprogramms für Forschung und Lehre der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität. Als Sprecherin des 11. Promotionsstudienganges konnte ich wertvolle Einblicke in die medizinische Forschung und deren Förderungen erhalten, die mich bis heute begleiten.

Weiterhin bin ich sehr dankbar für die inspirierende Zusammenarbeit mit Dr. rer. nat. Monika Prünster, Dr. med. Andreas Margraf, Angela Kurz, PhD, Roland Immler, PhD und den medizinisch-technischen Assistentinnen Susanne Bierschenk und Nadine Schmidt ohne deren fortlaufende Unterstützung diese Forschungsarbeit nicht möglich gewesen wäre.

Schließlich danke ich in besonderer Weise meinen beiden lieben Eltern Julia und Dr. rer. nat. Rolf Eggersmann, die mich während meines gesamten Medizinstudiums und im Verlauf der Promotion fortwährend unterstützt haben.

X. AFFIDAVIT**Eidesstattliche Versicherung**

Eggersmann, Tanja Kristina

Name, Vorname

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

**Src-Tyrosinkinasen und deren Rolle bei der
Leukozytenrekrutierung *in vitro* und *in vivo***

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

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

München, 30.11.2022

Eggersmann, Tanja Kristina

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand