

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Canis

**Untersuchungen zur Wanderung  
von Leukozyten und Thrombozyten zu ihrem Bestimmungsort  
sowie zur Anwendung synthetischer Nanomaterialien  
bei Entzündung und Krebs**

**Zusammenfassung des kumulativen Habilitationsprojekts**

zur Erlangung der Venia Legendi  
für das Fach Hals-Nasen-Ohrenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

**vorgelegt von**

Dr. med. Bernd Uhl

**(2023)**

## **Inhaltsverzeichnis**

1. Vorwort
2. Einleitung
3. Zielsetzung
4. Mechanismen der Wanderung von Leukozyten und Thrombozyten zu ihrem Bestimmungsort bei Entzündung
5. Mechanismen der Wanderung von Leukozyten zu ihrem Bestimmungsort in malignen Tumoren
6. Untersuchungen zur Anwendung synthetischer Nanomaterialien bei Entzündung und Krebs
7. Zusammenfassung und Ausblick
8. Literaturverzeichnis
9. Danksagung

## **1. Vorwort**

Im Rahmen dieser kumulativen Habilitation wurden Mechanismen der Wanderung von Leukozyten und Thrombozyten zu ihrem Bestimmungsort sowie Anwendungen synthetischer Nanomaterialien bei Entzündung und Krebs analysiert und beschrieben. Sämtliche experimentellen Untersuchungen wurden an der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde (Direktor Herr Prof. Dr. Martin Canis) und am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin (Direktorin Prof. Dr. Daphne Merkus) der Ludwig-Maximilians-Universität München in den Arbeitsgruppen von Herrn Prof. Dr. Fritz Krombach und Herrn Prof. Dr. Christoph Reichel sowie in der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführt.

Das gesamte Schriftenverzeichnis umfasst 36 Einträge (kumulierter Impact-Faktor der Originalarbeiten von **274,962**), davon

- **33 Originalarbeiten, davon 08 als Erst- oder Letztautor**
- **01 Kasuistiken**
- **02 Übersichtsarbeiten**

## 2. Einleitung

In der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde stellen Krankheiten des entzündlich-infektiösen Formenkreises sowie bösartige Tumoren zwei der wichtigsten Behandlungsschwerpunkte dar. Zu den entzündlich-infektiösen Pathologien werden beispielsweise Infektionen der Kopf-Hals-Region, das Cholesteatom, die chronische Rhinosinusitis und Autoimmunkrankheiten gezählt. Bei den Malignomen der Kopf-Hals-Region überwiegen Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome (*Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*; HNSCC), welche weltweit die siebthäufigste Tumorentität bilden. Insbesondere in fortgeschrittenen Stadien sind diese Erkrankungen der Kopf-Hals-Region noch immer eine große therapeutische Herausforderung und mit einer ausgeprägten krankheitsassoziierten Belastung sowie einer zum Teil hohen Mortalität assoziiert (Symvoulakis et al. 2006; Jemal et al. 2011; Simard, Torre, and Jemal 2014; Johnson et al. 2020; Medzhitov 2010). Das Immunsystem besitzt eine Schlüsselrolle bei der Abwehr dieser Erkrankungen. Unter bestimmten Bedingungen kann es jedoch entzündliche und onkologische Prozesse auch verstärken, beispielsweise bei überschießenden Entzündungsreaktionen im Rahmen von Infektionen und Autoimmunerkrankungen oder bei der Verstärkung von Tumorwachstum und -metastasierung. Weiße Blutkörperchen (Leukozyten) stehen als Effektorzellen im Mittelpunkt der meisten dieser den Organismus schützenden und schädigenden Funktionen des Immunsystems. Um ihre Aufgaben wahrnehmen zu können, müssen Leukozyten zumeist aus dem Mikrogefäßsystem in das erkrankte Gewebe rekrutiert werden. In der Mikrozirkulation sammeln sich im Rahmen von Immunreaktionen neben Leukozyten aber auch Blutplättchen. Interessanterweise deuten neuere Forschungsergebnisse darauf hin, dass Blutplättchen und Leukozyten in der Mikrozirkulation interagieren und sich für eine effektive Immunantwort gegenseitig beeinflussen. Die spezifische Modulation der Rekrutierung von Leukozyten und/oder von Thrombozyten in der Mikrozirkulation des erkrankten Gewebes könnte deshalb einen neuen, vielversprechenden Ansatzpunkt für die Therapie dieser schweren Krankheitsbilder darstellen (Greten and Grivennikov 2019; Grivennikov, Greten, and Karin 2010; Medzhitov 2010).

Für das Fachgebiet der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde besitzt das Immunsystem aufgrund der engen Verknüpfung mit verschiedensten physiologischen und pathophysiologischen Prozessen der Kopf-Hals-Region eine besondere Bedeutung. Aufgrund des anatomischen Aufbaus spielt die Kopf-Hals-Region mit dem dort vorhandenen lymphoepithelialen Tonsillengewebe als dem Ort des Erstkontaktes von körpereigenen Immunzellen mit Antigenen von Fremdkörpern aus der Umgebung eine Schlüsselrolle für die Prägung des Immunsystems (Hellings, Jorissen, and Ceuppens 2000). Gleichzeitig jedoch führt die dauerhafte Exposition der Kopf-Hals-Region gegenüber Krankheitserregern zum häufigen Auftreten von Infektionen in den Unterregionen, welche sich beispielsweise als Otitis externa, Otitis media, (Rhino-)Sinusitis, Tonsillitis oder Laryngitis manifestieren. Bis heute lassen sich diese Infektionen einschließlich der überwiegenden Mehrheit ihrer assoziierten Komplikationen durch eine antibiotische Behandlung, teilweise kombiniert mit chirurgischen Eingriffen, erfolgreich behandeln. Dennoch treten selten sehr schwerwiegende und tödliche Verläufe auf, bei welchen gegenwärtige Therapiekonzepte unwirksam sind. Zudem finden sich zunehmend antibiotikaresistente Erreger als Auslöser der Infektionen, welche deren Behandlung in der Zukunft deutlich erschweren könnten (Russell and Russell 2018; Yadav and Kapley 2021). Neben Pathogenen ist der Kopf-Hals-Bereich fortwährend Allergenen ausgesetzt, weshalb sich auch allergische Reaktionen regelmäßig im Kopf-Hals-Bereich präsentieren. Trotz Verbesserungen in den Behandlungskonzepten können die für dieses Krankheitsbild bestehenden Therapieansätze, wie die spezifische Immuntherapie oder nebenwirkungsärmere Medikamente zur Symptomkontrolle, die auftretenden Allergiebeschwerden häufig lediglich reduzieren (Papadopoulos 2020). Darüber hinaus können sich in der Kopf-Hals-Region verschiedene chronisch-entzündliche Erkrankungen, wie das Cholesteatom, die chronische Rhinosinusitis mit Nasenpolypen, die Granulomatose mit Polyangiitis (Morbus Wegener) oder das Sjögren-Syndrom manifestieren, welche medikamentös bzw. chirurgisch nicht immer zufriedenstellend behandelbar sind (Knopf et al. 2011; Xu et al. 2021). Auch die Wundheilung stellt einen entzündlich assoziierten Prozess dar, welcher maßgeblich durch Leukozyten als Effektorzellen des Immunsystems gesteuert wird.

In der Kopf-Hals-Chirurgie ist eine regelrecht ablaufende Wundheilung nach traumatischen Verletzungen oder nach chirurgischen Eingriffen entscheidend für den Behandlungserfolg. Störungen dieses Prozesses, wie sie typischerweise nach Revisionseingriffen in vernarbtem Gewebe oder in bestrahltem Gewebe nach Radiotherapie auftreten, sind oft mit einer abnormen lokalen Immunreaktion verbunden und können aufgrund der anatomischen Nähe zu Gehirn und Mediastinum zu einer vitalen Gefahr für Patienten werden (Kwon et al. 2018). Bisher sind wirkungsvolle Konzepte zur Therapie oder Optimierung einer gestörten Wundheilung, welche relevante sekundäre Komplikationen effektiv verhindern, rar.

Insgesamt ist das zelluläre Immunsystem wesentlich für den Verlauf dieser unterschiedlichen entzündlichen, allergischen oder infektiösen Erkrankungen sowie für eine regelrechte Wundheilung. Aktuell angewandte immunmodulatorische Behandlungen für diese Krankheitsbilder beeinflussen die Immunantwort jedoch oft eher unspezifisch. Dadurch ergeben sich für die eingesetzten Therapeutika (z. B. Kortikosteroide) bei limitierter Wirksamkeit oft ein schwergradiges Nebenwirkungsprofil, weshalb ihre Anwendungsmöglichkeiten bisher stark begrenzt sind (Bascones-Martinez et al. 2014; Kroschinsky et al. 2017).

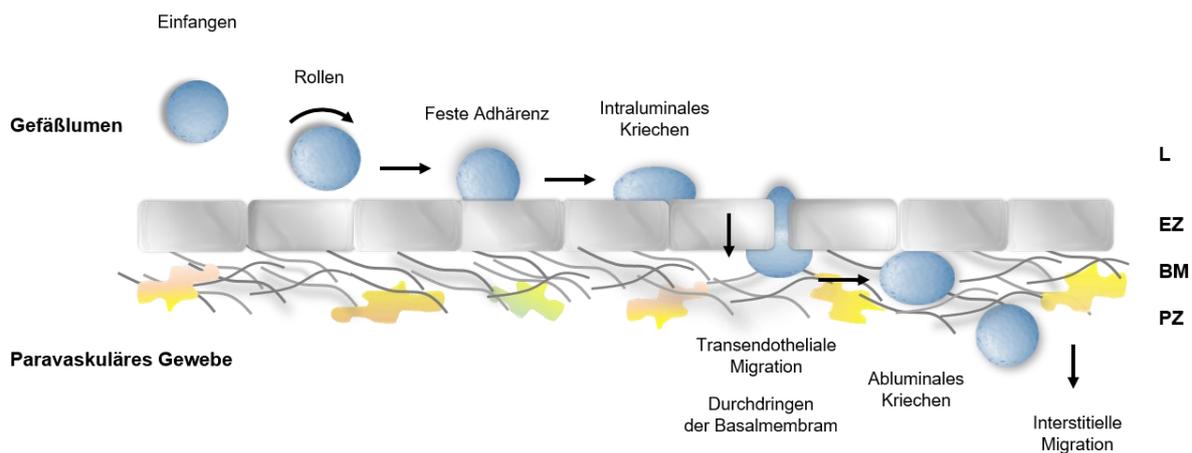
Krebserkrankungen weisen weltweit eine zunehmende Inzidenz auf und sind inzwischen die zweithäufigste Todesursache. Bösartige Tumore der Kopf-Hals-Region stellen als weltweit siebthäufigste Untergruppe mit jährlich knapp 900.000 Neuerkrankungen eine hochrelevante Krebsentität dar, wobei es sich in der Mehrzahl um Plattenepithelkarzinome (englisch: head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) handelt. Das Gesamtüberleben von Patienten mit HNSCC hat sich in den letzten Jahrzehnten trotz großer Bemühungen nur leicht verbessert und liegt im Langzeitverlauf noch immer bei ungefähr 66 %. Insbesondere Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung weisen sogar eine deutlich schlechtere Überlebenschance auf (Jemal et al. 2011; Simard, Torre, and Jemal 2014; Johnson et al. 2020). Pathophysiologisch spielen das Immunsystem und die mikrovaskuläre Rekrutierung von Leukozyten eine herausragende Rolle für Entstehung, Wachstum und Metastasierung von malignen Tumoren (Kroschinsky et al. 2017). Beim fernmetastasierten

HNSCC und anderen Krebserkrankungen stellen immunonkologische Strategien deshalb bereits eine Ergänzung zu etablierten systemischen Therapien, wie beispielsweise der Anwendung von Zytostatika oder Anti-Hormon-Therapien, dar. Ihre klinische Anwendung ist jedoch bisher noch überwiegend durch eine oft unzureichende Wirksamkeit bei teilweise gravierenden Nebenwirkungen eingeschränkt (Kroschinsky et al. 2017).

Für die Weiterentwicklung der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde und Kopf-Halschirurgie und die Identifikation verbesserter Behandlungskonzepte ist es deshalb entscheidend, die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen dieser entzündlichen und onkologischen Krankheitsbilder im Kopf-Hals-Bereich mechanistisch im Detail aufzuschlüsseln. Wie bereits erwähnt, stellen die mikrovaskuläre Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten zentrale pathophysiologische Prozesse dieser Krankheitsbilder dar. Neue spezifische Strategien zur Modulation dieser Prozesse könnten deshalb die Basis für die Entwicklung von Therapeutika mit einer erhöhten Effektivität bei gleichzeitig reduziertem Auftreten unerwünschter Nebenwirkungen darstellen.

Der Prozess der Rekrutierung von Leukozyten aus der Mikrozirkulation in das geschädigte Gewebe wird im Regelfall durch eine initiale Aktivierung des mikrovaskulären Gefäßendothels und einer damit einhergehenden Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen eingeleitet, welche lose Interaktionen mit Leukozyten aus dem Blutstrom initiieren. Diese leukozytär-endothelialen Wechselwirkungen werden über endotheliale Selektine (z.B. P-Selektin) und leukozytäre Integrine (z.B. LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b oder VLA-4/CD49d) in niedriger Affinitätskonformation vermittelt und als ‚Einfangen‘ und ‚Rollen‘ bezeichnet. Im nächsten Schritt interagieren langsamer auf dem Endothel rollende Leukozyten über Chemokinrezeptoren auf ihrer Oberfläche mit auf dem Endothel präsentierten Chemokinen, welche über intrazelluläre Signalwege (z.B. PI3-Kinasen oder die Tyrosinkinase Syk) eine Aktivierung und damit einhergehend Konformationsänderungen von leukozytären Integrinen (z.B. LFA-1/CD11a, Mac-1/CD11b oder VLA-4/CD49d) induzieren. Die Immunzellen interagieren nun über Integrine im aktivierten Konformationszustand mit endothelialen Adhäsionsmolekülen (z.B. Mitgliedern der Immunglobulin-Superfamilie (z.B. ICAM-1/CD54

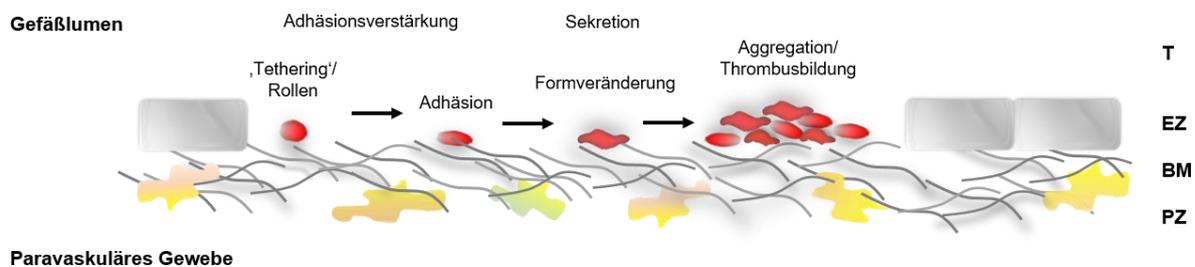
oder VCAM-1/CD106)) und können dadurch die sogenannte ‚feste Adhärenz‘ am Gefäßendothel vermitteln. Im nächsten Schritt verstärken und verbreitern Leukozyten ihren Kontakt mit dem Endothel („*Spreading*“), bevor sie intraluminal zu geeigneten Orten für eine Emigration aus der Mikrozirkulation kriechen („*Intraluminales Kriechen*“). Anschließend überwinden Leukozyten die Endothelzellbarriere durch weitere Interaktionen zwischen leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen (z. B. ICAM-2/CD102, PECAM-1/CD31, JAM-A, JAM-C, ESAM, CD99, CD99L2), durchdringen die perivaskuläre Basalmembran und kriechen abluminal auf der Perizytenzschicht der Gefäßwand weiter, bevor sie schließlich das perivaskuläre Gewebe erreichen und interstitiell zum Ort der Schädigung wandern können (Vestweber 2012; Nourshargh and Alon 2014).



**Abbildung 1: Leukozytenrekrutierung.** Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Leukozyten (L) und Endothelzellen (EZ), Basalmembran (BM) oder Perizyten (PZ) bei den einzelnen Schritten des leukozytären Extravasationsprozesses (modifiziert nach (Reichel, Kanse, and Krombach 2012; Zuchtriegel et al. 2016)).

Beim Prozess der Thrombozytenrekrutierung in der Mikrozirkulation beginnen die Blutplättchen im Bereich einer geschädigten oder aktivierten Gefäßwand, z.B. nach Freilegung von extrazellulären Matrixkomponenten und/oder der Freisetzung von von-Willebrand-Faktor (vWF), auf dieser zu rollen, indem sie gering-affine Interaktionen (z.B. zwischen vWF und dem thombozytären GPIIb-V-IX-Komplex) nutzen. Diese gering-affinen Bindungen der Thrombozyten mit dem Endothel wiederum führen über intrazelluläre Signalwege zur Aktivierung von Integrinen auf ihrer Oberfläche, welches sich in einer Konformationsänderung

dieser Oberflächenmoleküle widerspiegelt. Sekundär werden dadurch stärkere Interaktionen mit der Gefäßwand (Adhäsion), beispielsweise über die Interaktion zwischen dem Glykoprotein IIb/IIIa und Fibrinogen, etabliert. Anschließend werden einerseits prokoagulatorische Faktoren freigesetzt und andererseits erhöht die zunehmende Ausbildung eines intravaskulären Thrombus die Scherkräfte lokal im Gefäß, wodurch die Rekrutierung von zusätzlichen Thrombozyten, die Aggregation und damit das weitere Thrombuswachstum unterstützt wird. Zusätzlich beeinflussen rekrutierte Thrombozyten die mikrovaskuläre Rekrutierung von Leukozyten und damit direkt und indirekt die entzündliche Immunreaktion (Sorrentino et al. 2015; Gaertner and Massberg 2019; Furie and Furie 2008).



**Abbildung 2: Thrombozytenrekruitierung.** Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen Thrombozyten (T) und der aktivierten bzw. geschädigten Gefäßwand (Endothelzellen (EZ); Basalmembran (BM); Perizyten (PZ) bei den einzelnen Schritten des thrombozytären Adhäsionsprozesses (modifiziert nach (Zuchtriegel et al. 2016; Golebiewska and Poole 2015)).

Die allgemeinen Mechanismen der Rekrutierung von Leukozyten aus der Mikrozirkulation zu ihrem Bestimmungsort wurden in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht. Dennoch sind viele Mechanismen im Detail noch unzureichend verstanden. Insbesondere sind die spezifischen Mechanismen der Leukozytenrekruitierung bezüglich der Erkrankung, dem betroffenen Organ und der Subpopulationen derzeit noch unzulänglich charakterisiert (Vestweber 2012; Nourshargh and Alon 2014). Vergleichbar dazu wurden die Mechanismen der Rekrutierung von Thrombozyten im Rahmen der Thrombusbildung in den letzten Jahrzehnten intensiv untersucht, während die Bedeutung und die Mechanismen der Rekrutierung von Thrombozyten bei Entzündung oder bei malignen Tumoren in unterschiedlichen Geweben noch unzureichend verstanden ist (Sorrentino et al. 2015; Gaertner and Massberg 2019; Furie and Furie 2008). Das tiefgreifende Verständnis dieser

Prozesse könnte jedoch die Grundlage für die Identifikation neuer Zielmoleküle für eine wirkungsvollere und nebenwirkungsärmere Therapie entzündlicher oder onkologischer Erkrankungen darstellen.

In der klinischen Routine werden zur Behandlung immunologisch assoziierter Erkrankungen bisher überwiegend ‚klassische Arzneimittel‘ mit immunmodulatorischen Eigenschaften, wie beispielsweise nichtsteroidale Antirheumatika, Glukokortikoide oder Methotrexat, eingesetzt. Diese Arzneimittel beeinflussen zum Beispiel intrazelluläre Signalwege, welche pathophysiologisch mit der assoziierten Immunreaktion verknüpft und zugleich für den Krankheitsprogress relevant sind. In den letzten Jahrzehnten wurden bereits verschiedene neue Strategien entwickelt, die das Immunsystem wirksamer und nebenwirkungsärmer beeinflussen sollen. Dazu zählt beispielsweise die Anwendung von monoklonalen Antikörpern oder niedermolekularen Inhibitoren, welche auf für die Immunreaktion relevante Moleküle zielen (Li, Zheng, and Chen 2017; Osipov et al. 2019). Eine besonders vielversprechende Möglichkeit zur Verbesserung von Diagnostik und Therapie immunologisch assoziierter Erkrankungen könnte darüber hinaus die Anwendung synthetisch hergestellter Nanomaterialien darstellen. Aufgrund ihrer außergewöhnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften können sie einerseits direkt als Diagnostika oder Therapeutika eingesetzt werden. Bekannte Beispiele sind die Anwendung als visuelle (intraoperative) oder radiologische Kontrastmittel sowie als Effektoren einer regionalen, magnetischen Hyperthermie beziehungsweise Thermoablation bei malignen Tumoren. Andererseits können synthetisch hergestellte Nanomaterialien auch zur Optimierung bereits existierender Behandlungsmethoden genutzt werden, beispielsweise um die Biokompatibilität von Medikamenten zu erhöhen, ihren Abbau durch das retikuloendotheliale System zu vermindern oder um Arzneimittel gerichtet zu Zielorganen oder -zellen zu transportieren. Die Anwendung synthetisch hergestellter Nanomaterialien könnte somit vielversprechende Möglichkeiten eröffnen, um den Prozess der Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten beispielsweise für eine effektivere und nebenwirkungsärmere Therapie entzündlich-infektiöser oder maligner

Erkrankungen zu modifizieren (Gupta 2011; 'Nano-enabled immunomodulation' 2021; Shi and Lammers 2019).

### **3. Zielsetzung**

Die Ziele des vorliegenden Habilitationsprojektes sind daher

- i) Mechanismen der Wanderung von Leukozyten und Thrombozyten zu ihrem Bestimmungsort bei Entzündung zu charakterisieren,
- ii) Mechanismen der Wanderung von Leukozyten zu ihrem Bestimmungsort in malignen Tumoren zu erforschen
- iii) und die Anwendung synthetischer Nanomaterialien bei Entzündung und Krebs zu untersuchen.

#### 4. Mechanismen der Wanderung von Leukozyten und Thrombozyten zu ihrem Bestimmungsort bei Entzündung

##### 4.1 Allgemeine Mechanismen der Wanderung von Leukozyten und Thrombozyten zu ihrem Bestimmungsort bei Entzündung

###### Zugeordnete Publikationen

Immler, R., Lange-Sperandio, B., Steffen, T., Beck, H., Rohwedder, I., Roth, J., Napoli, M., Hupel, G., Pfister, F., Popper, B., **Uhl, B.**, Mannell, H., Reichel, C.A., Vielhauer, V., Scherberich, J., Sperandio, M., and Pruenster, M., Extratubular Polymerized Uromodulin Induces Leukocyte Recruitment and Inflammation In Vivo. *Front Immunol*, 2020. 11: p. 588245.

Zuchtriegel, G., **Uhl, B.**, Pick, R., Ramsauer, M., Dominik, J., Mittmann, L.A., Canis, M., Kanse, S., Sperandio, M., Krombach, F., and Reichel, C.A., Vitronectin stabilizes intravascular adhesion of neutrophils by coordinating beta2 integrin clustering. *Haematologica*, 2020

Zuchtriegel, G., **Uhl, B.**, Puhr-Westerheide, D., Pornbacher, M., Lauber, K., Krombach, F., and Reichel, C.A., Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biol*, 2016. 14(5): p. e1002459.

Zuchtriegel, G., **Uhl, B.**, Hessenauer, M.E., Kurz, A.R., Rehberg, M., Lauber, K., Krombach, F., and Reichel, C.A., Spatiotemporal expression dynamics of selectins govern the sequential extravasation of neutrophils and monocytes in the acute inflammatory response. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015. 35(4): p. 899-910.

Reichel, C.A., Puhr-Westerheide, D., Zuchtriegel, G., **Uhl, B.**, Berberich, N., Zahler, S., Wymann, M.P., Luckow, B., and Krombach, F., C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms. *Blood*, 2012. 120(4): p. 880-90.

Berberich, N., **Uhl, B.**, Joore, J., Schmerwitz, U.K., Mayer, B.A., Reichel, C.A., Krombach, F., Zahler, S., Vollmar, A.M., and Furst, R., Roscovitine blocks leukocyte extravasation by inhibition of cyclin-dependent kinases 5 and 9. *Br J Pharmacol*, 2011. 163(5): p. 1086-98.

Wie bereits in der Einleitung dargelegt, zählen entzündlich-infektiöse Erkrankungen, wie beispielsweise Infektionen der Kopf-Hals-Region, das Cholesteatom, die chronische Rhinosinusitis und Autoimmunkrankheiten, zu den relevanten Krankheitsentitäten der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. Die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten aus der

Mikrozirkulation in das erkrankte Gewebe ist ein zentraler Prozess für die Entstehung und das Fortschreiten dieser Erkrankungen. Die Grundprinzipien dieses Prozesses wurden in den letzten Jahrzehnten in verschiedenen *In-vitro*- und *In-vivo*-Ansätzen intensiv erforscht. Wie eingangs beschrieben, ermöglichten diese Untersuchungen die Charakterisierung der funktionellen Bedeutung verschiedener Signal- und Adhäsionsmoleküle für den Rekrutierungsprozess von Leukozyten aus den Mikrogefäßen in das perivaskuläre Gewebe (Vestweber 2012; Nourshargh and Alon 2014; Medzhitov 2010). Dennoch sind die Mechanismen der Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in der Mikrozirkulation und ihre Bedeutung für entzündliche Erkrankungen noch immer nur unzureichend verstanden.

Neutrophile Granulozyten werden im Rahmen einer akuten Entzündungsreaktion klassischerweise als erste Immunzellpopulation an den Ort der Schädigung rekrutiert. In einer zweiten Welle wandern nachfolgend Monozyten in das perivaskuläre Gewebe aus, wobei sie die Entzündungsantwort weiter verstärken (Prame Kumar, Nicholls, and Wong 2018; Soehnlein, Lindbom, and Weber 2009). Unsere Arbeitsgruppe konnte in diesem Kontext erstmals spezifische Expressionsmuster von Selektinen (Signal- und Adhäsionsmoleküle) und ihren Interaktionspartnern auf neutrophilen Granulozyten, klassischen und nicht-klassischen Monozyten sowie Endothelzellen nachweisen, welche das intraluminale, sequenzielle Transmigrieren von neutrophilen Granulozyten und klassischen Monozyten in das perivaskuläre Gewebe koordinieren (Zuchtriegel et al. 2015). In einem weiteren Projekt konnten wir die Mechanismen der Thrombozyten-gesteuerten Rekrutierung von Leukozyten weiter aufschlüsseln. Unsere Versuche ergaben, dass im Blutkreislauf zirkulierende Thrombozyten zu Beginn einer Entzündungsreaktion an speziellen Orten in venulären Mikrogefäßen anheften. Dort können diese zellulären Blutkomponenten neutrophile Granulozyten und nachfolgend klassische Monozyten über CD40-CD40L-abhängige Interaktionen ‚einfangen‘. Über zelluläre Interaktionen zwischen PSGL-1 und CD62P/P-Selektin kommt es zu einer ERK1/2 MAPK-abhängigen Konformationsänderung von leukozytären Integrinen, welche die aufeinanderfolgende Extravasation von neutrophilen

Granulozyten und Monozyten in das perivaskuläre Gewebe fördert (Zuchtriegel et al. 2016). Diese Signal- und Adhäsionsmoleküle sowie ihre Interaktionspartner könnten interessante Ansatzpunkte für neue immun-modulierende Behandlungskonzepte darstellen, welche gezielt die zeitlich koordinierte Rekrutierung von Thrombozyten und myeloiden Leukozyten in der Immunantwort und damit den Verlauf von entzündlichen Erkrankungen modulieren.

Neben zellulär exprimierten Adhäsions- und Signalmolekülen spielen auch inflammatorische Zytokine als sezernierte Botenstoffe eine wichtige Rolle bei Entzündungskrankheiten. Eine wichtige Untergruppe stellen chemotaktische Zytokine, sogenannte Chemokine mit einem Molekulargewicht von 8 – 14 kDa dar, welche entsprechend ihrer N-terminalen Zysteinreste in C motif-, C-C motif-, C-X-C motif- und C-X<sub>3</sub>-C motif-Chemokine unterteilt werden (Turner et al. 2014). Wir konnten in einem Projekt unserer Arbeitsgruppe das Verständnis um die Mechanismen der C-C motif-Chemokin-vermittelten Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten weiter vertiefen. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen deuten darauf hin, dass leukozytär- und nicht-leukozytär exprimierte C-C motif-Chemokinrezeptoren gemeinsam die C-C motif-Chemokin-vermittelte Extravasation von neutrophilen Granulozyten fördern (Reichel et al. 2012). Neben klassischen inflammatorischen Signalmolekülen besitzen auch weitere sezernierte Proteine eine große Bedeutung für das mikrovaskuläre Trafficking von Leukozyten. Wir konnten beispielsweise eine neue Funktion des multifunktionalen Makromoleküls Vitronektin, welches in großen Mengen im Blut und Extrazellulärraum vorhanden ist, im Rekrutierungsprozess von neutrophilen Granulozyten aufdecken. Unsere Ergebnisse zeigen, dass dieses Protein für die Interaktionen zwischen diesen Immunzellen und mikrovaskulären Endothelzellen die Transition von dynamischen zu statischen Wechselwirkungen und damit die Verstärkung dieses Prozesses vermittelt (Zuchtriegel et al. 2020). In Kooperationsprojekten mit anderen Arbeitsgruppen konnten wir darüber hinaus weitere Mechanismen der Leukozytenrekrutierung in entzündetes Gewebe aufschlüsseln. In Zusammenarbeit mit Prof. Fürst (Institut für Pharmazeutische Biologie der Goethe-Universität Frankfurt) konnten wir zeigen, dass die intrazellulären Cyclin-abhängige Kinasen 5 und 9,

welche klassischerweise mit der Kontrolle des Zellzyklus assoziiert werden, zusätzlich bei steriler Entzündung die Extravasation von Leukozyten aus der Mikrozirkulation in das perivaskuläre Gewebe verstärken (Berberich et al. 2011). In einem Kooperationsprojekt mit Prof. Sperandio (Biomedizinische Centrum (BMC) der Ludwig-Maximilians-Universität München) konnten wir nachweisen, dass das Protein Uromodulin, welches bei entzündlichen Prozessen von tubulären Epithelzellen in der Niere verstärkt sezerniert wird und grundsätzlich am zellulären Salztransport sowie an der Abwehr von Bakterien beteiligt ist, in der Entzündungsreaktion als sogenanntes *damage associated molecular pattern* (DAMP)-Molekül agiert, welches die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in der Mikrozirkulation des erkrankten Organs fördert (Immler et al. 2020). Diese Proteine könnten somit ebenfalls vielversprechende Zielmoleküle für innovative immun-modulatorische Therapiestrategien von Entzündungserkrankungen darstellen.

#### **4.2 Stimulus-, organ- und subpopulationsspezifische Mechanismen der Wanderung von Leukozyten und Thrombozyten zu ihrem Bestimmungsort bei Entzündung**

Neuere Untersuchungen zum Leukozytentracking deuten auf eine große mechanistische Spezifität hinsichtlich des betroffenen Gewebes bzw. Organs, des inflammatorischen Stimulus und der Leukozytensubpopulation hin. Während Leukozyten beispielsweise in vielen Geweben zunächst am Gefäßendothel ‚rollen‘ müssen, um daran adhären zu können, adhären Leukozyten in Lebersinusoiden, in Nierenglomeruli oder Mikrogefäßen des zentralen Nervensystems direkt an der Gefäßwand ohne auf derartige lose Endothelzellinteraktion angewiesen zu sein (Maas, Soehnlein, and Viola 2018; Doring et al. 2007; Vajkoczy, Laschinger, and Engelhardt 2001; Devi et al. 2013; Berlin et al. 1993). Hinsichtlich der molekularen Mechanismen können solche Unterschiede beim Leukozytentracking zumindest teilweise durch den differentiellen Einsatz bestimmter Adhäsions- und Signalmoleküle oder Proteasen (z.B. CD62P/P-Selektin, CD62E/E-Selektin, CD31/PECAM-1, JAM-A, JAM-C, Neutrophileneelastase oder MMP-9) erklärt werden. Interessanterweise

scheinen auch für Thrombozyten spezifische Rekrutierungsmechanismen zu bestehen (Beaulieu et al. 2015). Das detaillierte Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen der Rekrutierung von Leukozyten(subpopulationen) und Thrombozyten unter unterschiedlichen Bedingungen ist jedoch die Voraussetzung, um diese komplexen Prozesse für neuartige Therapien von Entzündungserkrankungen gezielt – und damit effektiv – modulieren zu können.

#### **4.2.1 Mechanismen der Wanderung von Leukozyten zu ihrem Bestimmungsort beim Ischämie-Reperfusionsschaden**

##### Zugeordnete Publikationen

Praetner, M., Zuchtriegel, G., Holzer, M., **Uhl, B.**, Schaubacher, J., Mittmann, L., Fabritius, M., Furst, R., Zahler, S., Funken, D., Lerchenberger, M., Khandoga, A., Kanse, S., Lauber, K., Krombach, F., and Reichel, C.A., Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Neutrophil Infiltration and Tissue Injury on Ischemia-Reperfusion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018. 38(4): p. 829-842.

Funken, D., Ishikawa-Ankerhold, H., **Uhl, B.**, Lerchenberger, M., Rentsch, M., Mayr, D., Massberg, S., Werner, J., and Khandoga, A., In situ targeting of dendritic cells sets tolerogenic environment and ameliorates CD4(+) T-cell response in the postischemic liver. *FASEB J*, 2017. 31(11): p. 4796-4808.

**Uhl, B.**, Zuchtriegel, G., Pühr-Westerheide, D., Praetner, M., Rehberg, M., Fabritius, M., Hessenauer, M., Holzer, M., Khandoga, A., Furst, R., Zahler, S., Krombach, F., and Reichel, C.A., Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. 34(7): p. 1495-504.

Lerchenberger, M., **Uhl, B.**, Stark, K., Zuchtriegel, G., Eckart, A., Miller, M., Pühr-Westerheide, D., Praetner, M., Rehberg, M., Khandoga, A.G., Lauber, K., Massberg, S., Krombach, F., and Reichel, C.A., Matrix metalloproteinases modulate ameboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue. *Blood*, 2013. 122(5): p. 770-80.

Lech, M., Rommele, C., Grobmayr, R., Eka Susanti, H., Kulkarni, O.P., Wang, S., Grone, H.J., **Uhl, B.**, Reichel, C., Krombach, F., Garlanda, C., Mantovani, A., and Anders, H.J., Endogenous and exogenous pentraxin-3 limits postischemic acute and chronic kidney injury. *Kidney Int*, 2013. 83(4): p. 647-61.

Allam, R., Scherbaum, C.R., Darisipudi, M.N., Mulay, S.R., Hagele, H., Lichtnekert, J., Hagemann, J.H., Rupanagudi, K.V., Ryu, M., Schwarzenberger, C., Hohenstein, B., Hugo, C., **Uhl, B.**, Reichel, C.A., Krombach, F., Monestier, M., Liapis, H., Moreth, K., Schaefer, L., and Anders, H.J., Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4. *J Am Soc Nephrol*, 2012. 23(8): p. 1375-88.

Reichel, C.A., **Uhl, B.**, Lerchenberger, M., Pühr-Westerheide, D., Rehberg, M., Liebl, J., Khandoga, A., Schmalix, W., Zahler, S., Deindl, E., Lorenzl, S., Declerck, P.J., Kanse, S., and Krombach, F., Urokinase-type plasminogen activator promotes paracellular transmigration of neutrophils via Mac-1, but independently of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Circulation*, 2011. 124(17): p. 1848-59.

Reichel, C.A., Lerchenberger, M., **Uhl, B.**, Rehberg, M., Berberich, N., Zahler, S., Wymann, M.P., and Krombach, F., Plasmin inhibitors prevent leukocyte accumulation and remodeling events in the postischemic microvasculature. *PLoS One*, 2011. 6(2): p. e17229.

Eine Sonderform der sterilen Entzündungsreaktion stellt der Ischämie-Reperfusionsschaden (IRS) dar, welcher durch eine passager unterbrochene (Ischämie) und nachfolgend wiederhergestellte Blutversorgung (Reperfusion) eines Gewebes beziehungsweise Organs charakterisiert ist. In der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde spielt diese Form der Entzündungsreaktion insbesondere bei freien Gewebetransplantaten der rekonstruktiven Kopf-Hals-Chirurgie eine wesentliche Rolle. Darüber sind verschiedene weitere Erkrankungen wie beispielsweise Herzinfarkt, Schlaganfall oder hämorrhagischer Schock mit einem IRS verknüpft. Pathophysiologisch ergibt sich im betroffenen Gewebe während der Ischämiephase ein im Vergleich zum Bedarf relevant vermindertes Angebot an Sauerstoff und Nährstoffen, welches wiederum zu einem Gewebeschaden und einer ausgeprägten mikrovaskulären Entzündungsreaktion führt. Die nachfolgende Reperfusion des Gewebes verstärkt paradoxerweise die bereits initiierte Entzündungsreaktion und sekundär den ischämischen Gewebeschaden (Eltzschig and Eckle 2011). Während die Relevanz der mikrovaskulären Rekrutierung von Leukozyten – und insbesondere von neutrophilen Granulozyten – in das geschädigte Gewebe für die Entzündungsreaktion beim IRS gut belegt ist, sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch unzureichend verstanden.

Als Proteasen werden Enzyme bezeichnet, die Proteine oder Peptide spalten können. Im Organismus von Säugetieren finden sie sich intra- und extrazellulär. Dort sind sie beispielsweise an der proteolytischen Aktivierung oder Inaktivierung von Zytokinen, Rezeptoren und anderen Enzymen, dem Abbau von Peptiden oder an der posttranslationalen Regulation des Proteingehalts der Zelle beteiligt. Im Hinblick auf die Leukozytenrekrutierung

finden sich zunehmend Hinweise, dass Proteasen auch diesen Prozess entscheidend beeinflussen. Neuere Untersuchungen deuten an, dass insbesondere Matrix-Metalloproteasen (MMPs), welche unter anderem Strukturmoleküle der extrazellulären Matrix und der Basalmembran von Gefäßen degradieren können, und Serinproteasen, eine der größten Proteasenklassen mit vielfältigen physiologischen Funktionen, in diesem Kontext eine wesentliche Bedeutung besitzen könnten. Ihre Rolle für das mikrovaskuläre Leukozytenextravasation ist jedoch bisher nicht ausreichend verstanden (Gidday et al. 2005; Briasoulis et al. 2012; Das, Pluskota, and Plow 2010).

In einer Kooperation mit Prof. Massberg (Medizinische Klinik I der Ludwig-Maximilians-Universität München) und Prof. Lauber (Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie der Ludwig-Maximilians-Universität München) konnten wir nachweisen, dass MMPs essentiell für den Extravasationsprozess und die interstitielle Migration von neutrophilen Granulozyten sind. Im Gegensatz dazu zeigten unsere Untersuchungen, dass Serinproteasen zwar an der Extravasation, nicht aber an der interstitiellen Migration von neutrophilen Granulozyten beteiligt sind. Unsere Ergebnisse deuten in diesem Zusammenhang darauf hin, dass MMPs die interstitielle Migration neutrophiler Granulozyten über die Regulation der Oberflächenexpression leukozytärer Integrine sowie über die Modifikation der Aktivität von Chemokinen und deren Interaktionen mit Chemokinrezeptoren beeinflussen. Interessanterweise konnten wir in diesem Projekt zudem zeigen, dass sich interstitiell migrierende neutrophile Granulozyten mit einem amöboiden Migrationsverhalten auf dem Weg des geringsten Widerstandes durch das interstitielle Gewebe bewegen, ohne das Kollagenetzwerk des Interstitiums zu degradieren. (Lerchenberger et al. 2013).

In einem weiteren Projekt unserer Arbeitsgruppe analysierten wir die Rolle der Serinproteasen des fibrinolytischen Systems für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe. Die Fibrinolyse ist ein grundlegender biologischer Prozess, welcher die Durchblutung im Gewebe aufrechterhält, indem er eine überschießende Thrombusbildung in

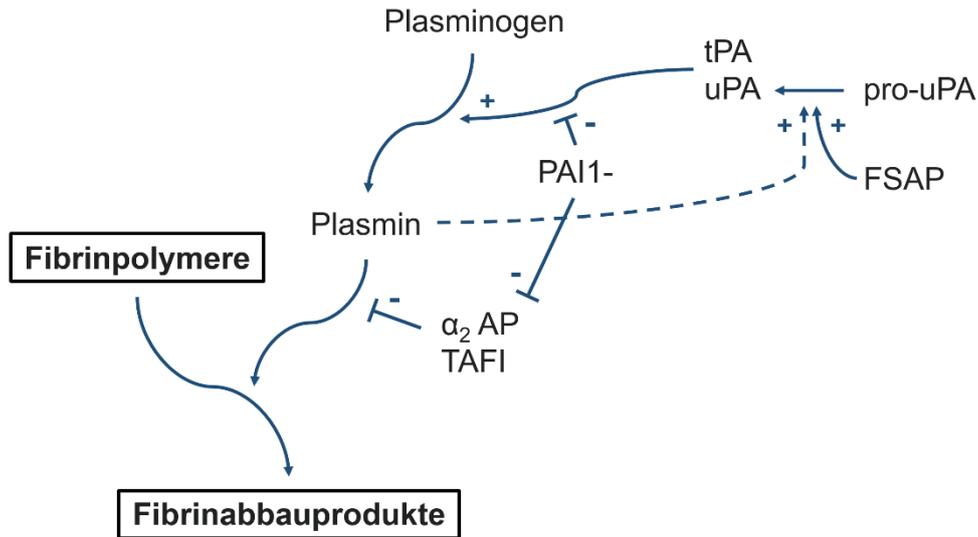
Blutgefäßen verhindert. Die Serinprotease Plasmin steht als Enzym, welches die Auflösung von Fibrinpolymeren vermittelt, im Zentrum des fibrinolytischen Systems. Die Serinproteasen *urokinase-type plasminogen activator* (uPA) und *tissue-plasminogen activator* (tPA) fördern die proteolytische Aktivierung des enzymatisch inaktiven Zymogens Plasminogen zur Effektorprotease Plasmin. Die proteolytische Aktivität der beiden Plasminogenaktivatoren uPA und tPA wiederum wird durch die Heteromerisierung mit ihrem wichtigsten Inhibitor *plasminogen activator inhibitor 1* (PAI-1) kontrolliert. Im Gegensatz dazu fungieren  $\alpha_2$ -*Antiplasmin* (A2AP) und *thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor* (TAFI) als direkte Inhibitoren der Plasmin-vermittelten Fibrinolyse. In den letzten Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Bestandteile des fibrinolytischen Systems, neben ihrer bekannten Rolle in der Fibrinolyse, auch weitere wichtige biologische Vorgänge wie die Adhäsion, Migration und Proliferation von Zellen regulieren. In der Literatur finden sich darüber hinaus vermehrt Hinweise, dass die Serinproteasen Plasmin, uPA, tPA und PAI-1 auch für das Trafficking von Leukozyten in der sterilen Entzündungsreaktion relevant sind. Die zugrundeliegenden Mechanismen blieben jedoch weitgehend ungeklärt (Reichel, Kanse, and Krombach 2012; Das, Pluskota, and Plow 2010; Del Rosso et al. 2008; Del Rosso et al. 2011; Smith and Marshall 2010; Syrovets, Lunov, and Simmet 2012).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen haben wir die Bedeutung der einzelnen Faktoren des fibrinolytischen Systems die Rekrutierung von Leukozyten in das geschädigte Gewebe beim Ischämie-Reperfusionsschaden untersucht. In einem ersten Teilprojekt charakterisierten wir zunächst die Rolle von Plasmin. Unsere Untersuchungen ergaben, dass im Blutkreislauf zirkulierendes Plasmin(ogen) während der initialen Reperfusionsphase aus den Gefäßen in das postischämische Gewebe austritt und perivaskuläre Mastzellen aktiviert. Dieser Vorgang führt zur Freisetzung von Lipidmediatoren wie Leukotrien-B4 (LTB4) oder Plättchenaktivierendem Faktor (PAF), welche sekundär die mikrovaskuläre Adhärenz und Transmigration von neutrophilen Granulozyten im postischämisch geschädigten Gewebe induzieren. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Plasmin zudem auch über die Aktivierung von

MMP-2 und MMP-9 die Transmigration neutrophiler Granulozyten in das postischämische Gewebe fördert. Entsprechend führte der Einsatz der Plasmininhibitoren  $\epsilon$ -Aminocapronsäure (EACA) oder Tranexamsäure (TXA) zu einer Verminderung der Extravasation von neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe und zu einer Abschwächung des postischämischen Umbaus der perivenulären Basalmembran (Reichel, Lerchenberger, et al. 2011). Im fibrinolytischen System wird Plasmin, welches als Effektorprotease die Auflösung von Fibrinpolymeren vermittelt, von den Plasminogenaktivatoren tPA und uPA aktiviert (Reichel, Kanse, and Krombach 2012). Deshalb untersuchten wir in einem weiterführenden Projekt die Rolle des Plasminogenaktivators tPA für die Leukozytenrekrutierung in entzündetes Gewebe nach Ischämie und Reperfusion. Wir konnten zeigen, dass tPA – analog zum fibrinolytischen System – Plasmin sowie sekundär MMP-2 und MMP-9 proteolytisch aktiviert und darüber die Extravasation neutrophiler Granulozyten in das postischämische Gewebe verstärkt. Im Blutkreislauf zirkulierendes tPA tritt zudem – ähnlich wie Plasmin – bei erhöhter mikrovaskulärer Permeabilität in das postischämische Gewebe aus und aktiviert dort perivaskuläre Mastzellen, welche daraufhin Lipidmediatoren freisetzen und die intravaskuläre Adhärenz und Transmigration neutrophiler Granulozyten im postischämischen Gewebe zusätzlich unterstützen. In weiteren Experimenten konnten wir außerdem nachweisen, dass sowohl leukozytär als auch nicht-leukozytär exprimiertes tPA die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das perivaskuläre Gewebe nach Ischämie und Reperfusion unterstützt (Uhl et al. 2014). In Zusammenarbeit mit Prof. Kanse (Universität Oslo, Norwegen) und Prof. Declerck (Universität Leiden, Belgien) konnten wir in einem anderen Teilprojekt nachweisen, dass neben tPA auch uPA die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in das entzündete Gewebe nach Ischämie und Reperfusion fördert. Interessanterweise scheint uPA – im Gegensatz zu tPA – diese Prozesse jedoch über nicht-proteolytische Eigenschaften zu vermitteln. Mechanistisch induziert endothelial präsentiertes uPA die intravaskuläre Adhärenz und (nachfolgende) Transmigration von neutrophilen Granulozyten, indem uPA dafür interessanterweise nicht mit dem uPA-Rezeptor uPAR, sondern mit dem als alternativen uPA-Rezeptor fungierende  $\beta$ 2-Integrin CD11b/Mac-1 interagiert (Reichel, Uhl, et al. 2011).

Innerhalb des fibrinolytischen Systems verhindert der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) eine überschießende Fibrinolyse durch die Bindung und funktionelle Inhibition von tPA und uPA (Reichel, Kanse, and Krombach 2012). Folglich analysierten wir in einer weiteren Studie dessen Bedeutung für die mikrovaskuläre Leukozytenrekrutierung. Interessanterweise ergaben unsere Ergebnisse, dass PAI-1 das mikrovaskuläre Leukozytentracking in der postischämischen Mikrozirkulation ebenfalls verstärkt und damit die Wirkung von Plasmin, tPA und uPA bei diesem Prozess nicht – wie in der Fibrinolyse – antagonisiert. Die detaillierte Analyse ergab, dass PAI-1 nach Ischämie und Reperfusion auf Endothelzellen akkumuliert und dort intravaskulär rollende neutrophile Granulozyten über eine Affinitätserhöhung der  $\beta$ 2-Integrine auf ihrer Oberfläche aktiviert. Zusätzlich verstärkt PAI-1 die mikrovaskuläre Hyperpermeabilität im postischämischen Gewebe. Über diese Prozesse wird die Extravasation dieser Immunzellen in das postischämische perivaskuläre Gewebe schließlich verstärkt (Praetner et al. 2018).

Zusammengefasst gewähren unsere Untersuchungen neue Einblicke in die Mechanismen der Leukozytenrekrutierung in das geschädigte Gewebe nach Ischämie und Reperfusion. Wir konnten zeigen, dass die Hauptbestandteile des fibrinolytischen Systems neben den klassischen Funktionen in der Blutgerinnung eine grundlegende Bedeutung für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das postischämische perivaskuläre Gewebe besitzen. Unsere Ergebnisse deuten zudem darauf hin, dass diese Faktoren des fibrinolytischen Systems einen interessanten Ansatzpunkt für immunmodulatorische Behandlungsregime bei Entzündungserkrankungen darstellen könnte.



**Abbildung 3: Das fibrinolytische System.** Schematische Darstellung der Interaktionen der einzelnen Faktoren des fibrinolytischen Systems (Aktivierung (+) bzw. Inhibition (-) der Protease oder des Prozesses (Reichel, Kanse, and Krombach 2012)).

	Plasmin	tPA	uPA	PAI-1
<b>Fibrinolyse</b>	+ proteolytisch	+ proteolytisch	+ proteolytisch	- nicht-proteolytisch (Komplexbildung)
<b>Leukozyten- trafficking</b>	+ proteolytisch  nicht-leukozytär	+ proteolytisch nicht-proteolytisch  leukozytär nicht-leukozytär	+ nicht-proteolytisch  leukozytär nicht-leukozytär	+ nicht-proteolytisch (Ohne Komplexbildung)  leukozytär nicht-leukozytär

**Abbildung 4: Fibrinolytische und nicht-fibrinolytische Eigenschaften von Plasmin, uPA, tPA und PAI-1.** Schematische Darstellung der Effekte (Förderung (+) oder Inhibition (-) des Prozesses) von Plasmin, uPA, tPA und PAI-1 auf Fibrinolyse und Leukozytentrafficking sowie der zugrundeliegenden Mechanismen einschließlich der verantwortlichen Eigenschaft (proteolytisch vs. nicht-proteolytisch) bzw. der Quelle (leukozytär vs. nicht-leukozytär) der entsprechenden Protease oder des Proteaseninhibitors.

In Kooperationsprojekten mit anderen Arbeitsgruppen konnten wir darüber hinaus die Mechanismen der Leukozytenextravasation nach Ischämie und Reperfusion in unterschiedlichen Organen weiter aufschlüsseln. In Zusammenarbeit mit Prof. Khandoga (Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Gefäß- und Transplantationschirurgie der Ludwig-Maximilians-Universität München) konnten wir nachweisen, dass dendritische Zellen in der postischämischen Leber mit CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten interagieren und den assoziierten

Gewebescheiden intensivieren. (Funken et al. 2017) Kooperationsprojekte mit Prof. Anders (Medizinische Klinik IV der Ludwig-Maximilians-Universität München) ergaben, dass in der postischämischen Niere die Freisetzung von Histonen durch absterbende Zellen über die Toll-like-Rezeptoren-2 und -4 eine proinflammatorische Reaktion einschließlich der Rekrutierung von Leukozyten in das entzündete Gewebe vermittelt und den postischämischen Nierenschaden verstärkt. (Allam et al. 2012) Darüber hinaus weisen unsere Daten einer nachfolgenden Kooperationsstudie darauf hin, dass Pentraxin-3, ein löslicher Rezeptor, in der postischämischen Niere durch monozytäre Phagozyten freigesetzt wird. Wir konnten zeigen, dass dieses Molekül die postischämische Entzündungsreaktion einschließlich der Leukozytenextravasation aus dem Mikrogefäßsystem limitiert. Interessanterweise konnte eine systemische Gabe dieses Rezeptors im Sinne einer pharmakologischen Therapie die postischämische Entzündungsreaktion und damit einhergehend die Leukozytenrekrutierung in das entzündete Gewebe und den Nierenschaden ebenfalls verringern. (Lech et al. 2013) Diese neuen Erkenntnisse zu den Mechanismen der Leukozytenrekrutierung im postischämischen Gewebe könnten die Identifikation vielversprechender neuer Ansatzpunkte für eine immunmodulatorische Therapien dieses Krankheitsbildes ermöglichen.

#### **4.2.2 Mechanismen der Wanderung von Leukozyten und Thrombozyten zu ihrem Bestimmungsort bei viralen und bakteriellen Infektionen**

##### Zugeordnete Publikationen

**Uhl, B.**, Haring, F., Slotta-Huspenina, J., Luft, J., Schneewind, V., Hildinger, J., Wu, Z., Steiger, K., Smiljanov, B., Batcha, A.M.N., Keppler, O.T., Hellmuth, J.C., Lahmer, T., Stock, K., Weiß, B., Canis, M., Stark, K., Bromberger, T., Moser, M., Schulz, C., Weichert, W., Zuchtriegel, G.\* and Reichel, C.A.\*. Vitronectin promotes immunothrombotic dysregulation in the venular microvasculature. *Front Immunol*, 2023. (\*geteilte Letztautorenschaft)

Nicolai, L., Schiefelbein, K., Lipsky, S., Leunig, A., Hoffknecht, M., Pekayvaz, K., Raude, B., Marx, C., Ehrlich, A., Pircher, J., Zhang, Z., Saleh, I., Marel, A.K., Lof, A., Petzold, T., Lorenz, M., Stark, K., Pick, R., Rosenberger, G., Weckbach, L., **Uhl, B.**, Xia, S., Reichel, C.A., Walzog, B., Schulz, C., Zheden, V., Bender, M., Li, R., Massberg, S., and Gaertner, F., *Vascular*

surveillance by haptotactic blood platelets in inflammation and infection. *Nat Commun*, 2020. 11(1): p. 5778.

Puhr-Westerheide, D., Schink, S.J., Fabritius, M., Mittmann, L., Hessenauer, M.E.T., Pircher, J., Zuchtriegel, G., **Uhl, B.**, Holzer, M., Massberg, S., Krombach, F., and Reichel, C.A., Neutrophils promote venular thrombosis by shaping the rheological environment for platelet aggregation. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 15932.

**Uhl, B.**, Vadlau, Y., Zuchtriegel, G., Nekolla, K., Sharaf, K., Gaertner, F., Massberg, S., Krombach, F., and Reichel, C.A., Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood*, 2016. 128(19): p. 2327-2337.

In der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde stellen virale und bakterielle Infektionen der Kopf-Hals-Region häufige Erkrankungen dar, welche sich mit konservativen und chirurgischen Methoden meistens erfolgreich behandeln lassen. In seltenen Fällen entwickeln sich jedoch trotz entsprechender Therapie schwer kontrollierbare Verläufe, wie beispielsweise das lebensbedrohliche Krankheitsbild einer Sepsis, welches mit einer überschießenden systemischen Entzündungsreaktion, einer (Multi-)Organdysfunktion und einer hohen Mortalität assoziiert ist. Zudem bilden sich zunehmend Antibiotikaresistenzen, welche die Behandlung bakterieller Infektionen in Zukunft deutlich erschweren dürften. Diese medizinischen Herausforderungen können wahrscheinlich nur durch die Entwicklung neuer Therapiestrategien gelöst werden. Die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus der Mikrozirkulation in das perivaskuläre Gewebe ist ein pathogenetisches Schlüsselereignis infektiöser Erkrankungen. So können diese Immunzellen einerseits wesentlich zur Elimination eingedrungener Pathogene, zur Geweberegeneration und zur Wundheilung beitragen, aber andererseits auch die Entzündungsreaktion und einen assoziierten Gewebeschaden verstärken (Russell and Russell 2018; Yadav and Kapley 2021; Symvoulakis et al. 2006; Medzhitov 2010; Nourshargh and Alon 2014; Pons et al. 2020). In den letzten Jahren kristallisierte sich zunehmend heraus, dass neutrophile Granulozyten – im Gegensatz zum Verständnis vor Jahrzehnten – keine einheitliche, schlichte Immunzellpopulation darstellen. Ganz im Gegenteil konnte gezeigt werden, dass verschiedene Phänotypen und Subpopulationen mit deutlich unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften existieren (Silvestre-Roig, Hidalgo, and Soehnlein 2016). Einen besonders bedeutsamen Phänotyp

entwickeln reife neutrophile Granulozyten unter homöostatischen Bedingungen nach Eintritt in den Blutkreislauf. Danach verändern sie während des Aufenthaltes im Gefäßsystem ihren molekularen und funktionellen Phänotyp, bevor sie als chronologisch und biologisch ‚gealterte‘ neutrophile Granulozyten aus der Blutzirkulation rekrutiert und abgebaut werden (Zhang et al. 2015). Wir konnten erstmalig zeigen, dass diese in der Blutzirkulation gealterten Immunzellen einen spezifischen, hoch-reaktiven Phänotyp entwickeln, welcher dadurch die „erste Verteidigungslinie“ der zellulären Immunantwort in einer bakteriellen septischen Infektion bildet (Uhl et al. 2016). Die pharmakologische Modulation dieses Alterungsprozesses von neutrophilen Granulozyten wiederum, könnte – insbesondere auch hinsichtlich der zunehmenden Anzahl der Antibiotikaresistenzen – ein vielversprechender Ansatzpunkt für neuartige Therapien dieses gefährlichen Krankheitsbildes sein.

In einem weiteren Projekt haben wir die Rolle des multifunktionalen adhäsiven Glykoproteins Vitronektin für die Thrombozytenrekrutierung und mikrovaskuläre Thrombusbildung während der akuten Entzündungsreaktion untersucht. Es wurde bereits beschrieben, dass Vitronektin essentiell für Zellmigration, -adhäsion und proliferation ist und über diese Mechanismen pathophysiologisch eine wichtige Rolle bei Entzündungskrankheiten, bei der Thrombusbildung oder bei bösartigen Tumoren spielt (Preissner and Reuning 2011). Wir konnten in unserem Projekt nun nachweisen, dass Vitronektin unter entzündlichen Bedingungen auf dem Endothel von Venolen akkumuliert dort die Thrombusbildung fördert. Dies vermittelt VTN jedoch nicht über eine direkte Aktivierung von Thrombozyten, sondern vielmehr bildet es auf dem Endothel eine adhäsive Matrix für die Rekrutierung von Thrombozyten (Uhl et al. 2023). Die Modulation dieses Prozesses könnte einen neuen Ansatz darstellen, um die entzündlich induzierte mikrovaskuläre Thrombusbildung bei systemischen Infektionen wie beispielsweise bei COVID-19 oder einer bakteriellen Sepsis, welche mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert ist, zu reduzieren.

### 4.2.3 Mechanismen der Wanderung von Leukozyten zu ihrem Bestimmungsort in den Kopf-Hals-Speicheldrüsen

#### Zugeordnete Publikationen

**Uhl, B.**, Braun C., Dominik J., Luft J., Canis M., Reichel C.A., A Novel Experimental Approach for In Vivo Analyses of the Salivary Gland Microvasculature. *Front Immunol*, 2021. 11:604470.

Erkrankungen der Kopf-Hals-Speicheldrüsen können beispielsweise durch Infektionen, Tumorerkrankungen oder nach einer Strahlentherapie auftreten. Gemeinsam ist diesen Krankheiten eine Schädigung der Mikrozirkulation (Iizuka et al. 2015; Mizrachi et al. 2016; Cavanaugh et al. 2003; Fukumura et al. 2010; Zanatta et al. 2019). Die zugrundeliegenden Mechanismen von mikrovaskulären Funktionsstörungen sind in den Kopfspeicheldrüsen jedoch noch größtenteils ungeklärt. Diese Verständnislücke beruht unter anderem auch auf dem Mangel eines adäquaten *In-vivo*-Modells zur Analyse mikrovaskulärer Prozesse in diesem Organ.

Wir haben nun einen neuen experimentellen Ansatz etabliert, welcher Untersuchungen der Mikrozirkulation in Kopf-Hals-Speicheldrüsen der Maus *in vivo* in Echtzeit ermöglicht. Unter Anwendung von unterschiedlichen intravitalmikroskopischen Techniken wie der Multiphotonenmikroskopie konnten wir mit diesem Modell erstmalig intravaskuläre Interaktionen von verschiedenen Immunzellsubpopulationen sowie die Gefäßpermeabilität in der Mikrozirkulation der entzündeten Unterkieferspeicheldrüse visualisieren und quantitativ analysieren. Im Rahmen dieses Projektes konnten wir wichtige Adhäsions- und Signalmoleküle identifizieren, welche das subpopulationsspezifische, mikrovaskuläre Trafficking von Leukozyten und die assoziierte mikrovaskuläre Permeabilität in der entzündeten Speicheldrüse kontrollieren (Uhl et al. 2020). Dieses neu etablierte Modell ermöglicht somit eine detaillierte mechanistische Charakterisierung mikrovaskulärer Immunreaktionen, welche die Grundlage für neue immuntherapeutische Strategien für Erkrankungen der Kopf-Hals-Speicheldrüsen bilden könnte.

## 5. Mechanismen der Wanderung von Leukozyten zu ihrem Bestimmungsort in malignen Tumoren

### Zugeordnete Publikationen

Mittmann, L., Haring, F., Schaubaecher, J., Hennel, R., Smiljanov, B., Zuchtriegel, G., Canis, M., Gires, O., Krombach, F., Holdt, L., Brandau, S., Vogl, T., Lauber, K., **Uhl, B\***, and Reichel, C.A.\*, Uncoupled biological and chronological ageing of neutrophils in cancer promotes tumor progression. *J Immunother Cancer*, 2021. (\*geteilte Letztautorenschaft)

**Uhl, B.**, Mittmann, L., Dominik, J., Hennel, R., Smiljanov, B., Haring, F., Schaubächer, J., Braun, C., Padovan, L., Pick, R., Canis, M., Schulz, C., Mack, M., Gutjahr, E., Sinn, P., Heil, J., Steiger, K., Kanse, S.M., Weichert, W., Sperandio, M., Lauber, K., Krombach, F., Reichel, C.A., uPA-PAI-1 heteromerization promotes breast cancer progression by attracting tumorigenic neutrophils. *EMBO Mol Med*, 2021. 16:e13110.

Weltweit sind Krebserkrankungen inzwischen die zweithäufigste Todesursache, wobei ihre Anzahl in der Tendenz weiterhin stetig zunimmt. Maligne Tumoren der Kopf-Hals-Region stellen mit jährlich knapp 900.000 Neuerkrankungen die weltweit siebthäufigste Krebsart dar. Die Mehrzahl sind Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (> 90 %; HNSCC). Diese Krebsart zeichnet sich wegen der betroffenen oberen Luft- und Speisewege durch eine hohe krankheits- und therapieassoziierte Belastung aus. Zudem hat sich das Gesamtüberleben von Patienten mit HNSCC in den letzten Jahrzehnten trotz großer Bemühungen nur leicht verbessert und liegt über alle Stadien betrachtet noch immer bei nur ungefähr 66 %. Patienten mit fortgeschrittener Krebserkrankung weisen eine noch schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit auf (Jemal et al. 2011; Simard, Torre, and Jemal 2014; Johnson et al. 2020). Zur Verbesserung der Therapieergebnisse dieser Malignome sind deshalb effizientere und nebenwirkungsärmere Behandlungsstrategien dringend erforderlich.

Das Immunsystem ist neben der Abwehr von Pathogenen auch essentiell für den Schutz des Organismus vor der Entstehung, Progression und Metastasierung maligner Tumoren (Nicolas-Avila, Adrover, and Hidalgo 2017). Diese Aufgabe gewährleistet das Immunsystem unter anderem durch spezialisierte Leukozytenpopulationen des adaptiven Immunsystems. Wesentlich sind hierfür die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs), welche entartete

Zellen erkennen und direkt eliminieren können. Th1-polarisierte CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Lymphozyten unterstützen CTLs bei der zytotoxischen Elimination von Tumorzellen, fördern die anti-tumorigene Aktivität von peritumoralen Makrophagen und steigern die Antigenpräsentation von neoplastischen Zellen. Im Gegensatz dazu werden diese anti-tumorigenen T-lymphozytären Prozesse durch Th2-polarisierte CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Lymphozyten und regulatorische T-Lymphozyten (T<sub>regs</sub>) gehemmt. Die Leukozytenpopulation der B-Lymphozyten scheinen eine pro-tumorigene Immunantwort dagegen unter vielen pathologischen Bedingungen eher zu fördern. In klinischen Studien hat sich die Verstärkung einer anti-tumorigenen, CTL-vermittelten Immunzellantwort (z. B. über Immun-Checkpoint-Inhibitoren) oder der Transfer von genetisch veränderten CTLs (z. B. CAR T-Zellen) bereits als effektive Strategie für die Therapie maligner Tumoren erwiesen (Martins et al. 2019; Brown and Mackall 2019; Ruffell et al. 2010; Chraa et al. 2019).

In den letzten Jahren rückte die Bedeutung myeloider Leukozyten des angeborenen Immunsystems (z. B. neutrophile Granulozyten oder Monozyten) für Entstehung, Wachstum und Metastasierung maligner Tumoren weiter in den Vordergrund. Myeloide Leukozyten können sowohl pro-tumorigene als auch anti-tumorigene Eigenschaften aufweisen, wobei zumeist die pro-tumorigenen Effekte dieser Immunzellen überwiegen – beispielsweise über die Sekretion pro-proliferativer, pro-angiogenetischer oder immunsuppressiver Faktoren (Coffelt, Wellenstein, and de Visser 2016; Young, Ardestani, and Li 2010). Während sich das Verständnis um diese individuellen anti- und pro-tumorigenen Funktionen verschiedener myeloider Leukozytensubpopulationen in den letzten Jahren vergrößert hat, sind die Mechanismen der mikrovaskulären Rekrutierung von Leukozyten zu malignen Läsionen weiterhin unzureichend verstanden.

In einem translationalen Ansatz nutzten wir das aus unseren Vorarbeiten zu den Mechanismen der Leukozytenrekrutierung in entzündetes Gewebe erworbene Vorwissen für die Erforschung der Bedeutung des mikrovaskulären Traffickings von myeloiden Blutzellen zu malignen

Tumoren. Wir konnten hierbei zeigen, dass sowohl niedrig immunogene solide Tumore (HNSCC) wie auch stark immunogene Malignome (Mammakarzinom) schon in frühen Krankheitsstadien einen exzessiven biologischen Alterungsprozess in zirkulierenden neutrophilen Granulozyten induzieren, welcher diesen Immunzellen des angeborenen Immunsystems einen pro-tumorigenen Phänotyp verleiht. Die gezielte Unterbrechung dieser tumorinduzierten Alterung hingegen führte zu einer deutlichen Abschwächung des Tumorwachstums und ist bereits heute pharmakologisch gezielt zu beeinflussen (Mittmann et al. 2021). Darüber hinaus konnten wir nachweisen, dass die Heteromerisierung von uPA und PAI-1, deren intratumorale Expression beispielsweise beim Mammakarzinom unabhängig von der histologischen Entität mit einer besonders schlechten Prognose korreliert, die Rekrutierung pro-tumorigener neutrophiler Granulozyten in maligne Läsionen fördert. Die pharmakologische Blockade der Komplexbildung von uPA und PAI-1 mit Hilfe eines neuartigen *small-molecule*-Inhibitors führte beim Mammakarzinom sogar zu einer deutlichen Regredienz von Tumorwachstum und -metastasierung (Uhl et al. 2021).

Anhand unserer Untersuchungen konnten wir somit neue und hochrelevante immunnellozierte Mechanismen des Tumorwachstums und der Tumormetastasierung aufdecken. Darüber hinaus konnten wir bereits zeigen, dass diese Prozesse für eine effektive anti-tumorale Therapie pharmakologisch adressiert werden können.

## 6. Untersuchungen zur Anwendung synthetischer Nanomaterialien bei Entzündung und Krebs

### Zugeordnete Publikationen

**Uhl, B.**, Hirn, S., Mildner, K., Coletti, R., Massberg, S., Reichel, C.A., Rehberg, M., Zeuschner, D., and Krombach, F., The surface chemistry determines the spatio-temporal interaction dynamics of quantum dots in atherosclerotic lesions. *Nanomedicine (Lond)*, 2018. 13(6): p. 623-638.

**Uhl, B.**, Hirn, S., Immler, R., Mildner, K., Mockl, L., Sperandio, M., Brauchle, C., Reichel, C.A., Zeuschner, D., and Krombach, F., The Endothelial Glycocalyx Controls Interactions of Quantum Dots with the Endothelium and Their Translocation across the Blood-Tissue Border. *ACS Nano*, 2017. 11(2): p. 1498-1508.

Möckl, L., Hirn, S., Torrano, A.A., **Uhl, B.**, Brauchle, C., and Krombach, F., The glycocalyx regulates the uptake of nanoparticles by human endothelial cells in vitro. *Nanomedicine (Lond)*, 2017. 12(3): p. 207-217.

Praetner, M., Rehberg, M., Bihari, P., Lerchenberger, M., **Uhl, B.**, Holzer, M., Eichhorn, M.E., Furst, R., Perisic, T., Reichel, C.A., Welsch, U., and Krombach, F., The contribution of the capillary endothelium to blood clearance and tissue deposition of anionic quantum dots in vivo. *Biomaterials*, 2010. 31(26): p. 6692-700.

Für die Therapie von entzündlichen und malignen Tumorerkrankungen stehen verschiedene Behandlungsmodalitäten zur Verfügung. Synthetisch hergestellte Nanomaterialien stellen aufgrund ihrer außergewöhnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften eine vielversprechende Option für neuartige Diagnostika und Therapeutika dar. Beispielsweise können Nanomaterialien direkt als Effektoren einer regionalen, magnetischen Hyperthermie und Thermoablation bei malignen Tumoren oder als neue radiologische Kontrastmittel bei Entzündungserkrankungen eingesetzt werden. Darüber hinaus können sie zur Optimierung bereits existierender Behandlungsregime genutzt werden, beispielsweise um die Biokompatibilität von Medikamenten zu erhöhen, deren Abbau durch das retikuloendotheliale System zu vermindern oder um diese gerichtet zu Zielorganen oder -zellen zu transportieren. Die Heterogenität synthetisch hergestellter Nanomaterialien, z. B. hinsichtlich des Grundmaterials (Metalle, Peptide, DNS), der Form (Kugeln, Röhren) oder der Oberflächenbeschaffenheit (z. B. Modifikation der Oberfläche mit funktionellen Carboxyl-,

Amin- oder Polyethylenglycolgruppen), erfordert für dieses relativ neue Forschungsfeld eine gründliche Analyse der unterschiedlichen Nanomaterialien unter anderem hinsichtlich Toxizität, Biokompatibilität, Biodistribution und Interaktivität im spezifischen pathologisch veränderten Gewebe beziehungsweise Organismus als Grundlage für mögliche klinische Anwendungen (Gupta 2011; 'Nano-enabled immunomodulation' 2021; Shi and Lammers 2019).

Das Gefäßendothel besitzt eine herausragende Bedeutung für die Regulation der Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten, ein Prozess, welche wiederum hochrelevant für die Entstehung und Progression entzündlicher und maligner Erkrankungen ist. Diese mikroanatomische Struktur stellt somit einen vielversprechenden Ansatzpunkt für nanomedizinische Therapien dar (Vestweber 2012; Nourshargh and Alon 2014; Sorrentino et al. 2015; Gaertner and Massberg 2019; Furie and Furie 2008). Der gerichtete Transport von synthetischen Nanomaterialien zu bestimmten Zielzellen ist jedoch wesentlich für viele therapeutische Anwendungen. Das Verständnis um die Mechanismen der Interaktionen von Nanopartikeln mit vaskulärem Endothel und Blutzellen stellen dafür jedoch die Grundlage dar.

In Kooperation mit Prof. Welsch (Anatomische Anstalt der Ludwig-Maximilians-Universität München) und Prof. Fürst (Institut für Pharmazeutische Biologie der Goethe Universität Frankfurt) untersuchten wir daher den Einfluss dreier unterschiedlicher Oberflächenbeschichtungen (Carboxyl-, Amin- oder Polyethylenglycolfunktionalisierung) von Modelnanopartikeln ('Quantum Dots') auf die Biodistribution und die Interaktivität mit dem Gefäßendothel in verschiedenen Abschnitten der Mikrozirkulation im lebenden Organismus. Interessanterweise veränderte die Oberflächenmodifikation die Halbwertszeit der Partikel im Blut, die Interaktivität der Partikel mit dem mikrovaskulären Endothel sowie den Abbau der Partikel durch das retikuloendotheliale System und das mononukleäre Phagozytensystem (Praetner et al. 2010). In einem weiterführenden Projekt konnten wir zudem belegen, dass die Oberflächenmodifikation von Nanopartikeln mit Carboxyl-, Amin- oder Polyethylenglycolfunktionalisierung auch die Akkumulation in chronisch-entzündlichen atherosklerotischem Gefäßen beeinflusst (Uhl et al. 2018). Diese Modifikationen bieten somit

interessante Möglichkeiten zur Modulation der biologischen Eigenschaften von synthetisch hergestellten Nanomaterialien in der Mikro- und Makrozirkulation. In weiteren Projekten konnten wir nachweisen, dass die sogenannte endotheliale Glykokalix (eGCX), eine kohlenhydratreiche extrazelluläre Schicht auf dem Gefäßendothel, die Interaktionen von unterschiedlichen Nanopartikeln mit Endothelzellen *in vitro* und *in vivo* kontrolliert. Insbesondere konnten wir zeigen, dass die eGCX im entzündeten Gewebe nach Ischämie und Reperfusion abgebaut wird und dies die Akkumulation von Nanopartikeln auf und im Endothel des erkrankten Gewebes fördert (Uhl et al. 2017; Mockl et al. 2017).

Zusammenfassend konnten wir in unseren Untersuchungen das Verständnis der Bedeutung von Nanomaterialoberflächenmodifikationen für deren Biodistribution und deren Interaktionsverhalten mit dem intakten und pathologisch veränderten Gefäßendothel erweitern. Darüber konnten wir erstmalig die besondere regulatorische Funktion der eGCX für die Interaktionen von systemisch verabreichten Nanopartikeln mit dem Endothel in der intakten und entzündeten Mikrozirkulation *in vivo* nachweisen. Unsere Ergebnisse könnten dazu beitragen, die Gestaltung von Nanomaterialien für spezielle diagnostische oder therapeutische Anwendungen, beispielsweise zur nanomedizinischen Modulation der mikrovaskulären Thrombozyten- und Leukozytenrekrutierung bei Entzündungskrankheiten oder malignen Tumoren, zu optimieren.

## 7. Zusammenfassung und Ausblick

Erkrankungen des entzündlich-infektiösen Formenkreises und maligne Tumorerkrankungen zählen zu den bedeutendsten Pathologien der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde. Aktuelle Therapiestrategien vor allem bei fortgeschrittenen Stadien sind oftmals durch eine begrenzte Effektivität und ein ausgeprägtes Nebenwirkungsprofil limitiert. Leukozyten und Thrombozyten als Effektorzellen des Immunsystems besitzen eine pathogenetische Schlüsselrolle für diese Erkrankungen. Insbesondere die Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten in der Mikrozirkulation des geschädigten Organs könnte als grundlegender pathogenetischer Prozess einen vielversprechenden Ansatzpunkt für neuartige Therapiestrategien darstellen. Im Rahmen dieses Habilitationsprojektes wurden deshalb die mikrovaskuläre Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten sowie die Anwendung synthetischer Nanomaterialien bei Entzündung und Krebs analysiert und neu entdeckte Mechanismen und Zusammenhänge beschrieben. Ein Schwerpunkt der Arbeit lag auf der Identifikation von Prozessen, welche in einem translationalen Ansatz für Diagnostik und Therapie von Entzündungserkrankungen und malignen Tumoren angewandt werden könnten.

Hierbei untersuchten wir in einem Teilprojekt neue grundlegende Mechanismen der Wanderung von Leukozyten und Thrombozyten zu ihrem Bestimmungsort in der akuten Entzündungsreaktion. Erstmals wiesen wir in diesem Zusammenhang spezifische Expressionsmuster von verschiedenen Signal- und Adhäsionsmolekülen, wie beispielsweise Selektinen und Integrinen und ihren Interaktionspartnern, auf Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, klassischen/nicht-klassischen Monozyten und Endothelzellen nach, welche das intraluminale, sequenzielle Trafficking verschiedener Immunzellpopulationen zu Orten der Extravasation in das perivaskuläre Gewebe koordinieren. Darüber hinaus konnten wir die Bedeutung und Mechanismen von verschiedenen in der akuten Entzündungsreaktion sezernierten Molekülen wie dem Chemokin CCL3, dem multifunktionalen Makromolekül Vitronektin oder dem Protein Uromodulin sowie den intrazellulären Cyclin-abhängige Kinasen 5 und 9 für die mikrovaskuläre Leukozytenrekrutierung in das entzündete Gewebe genauer

charakterisieren. Diese Prozesse stellen damit vielversprechende neue Zielmoleküle für die Behandlung entzündlicher Erkrankungen dar.

In den letzten Jahren zeigte sich, dass insbesondere das Verständnis der stimulus-, organ- und subpopulationsspezifischen Mechanismen der mikrovaskulären Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten über das allgemeine Verständnis hinaus wesentlich für effektivere und nebenwirkungsarme Modulationen dieser pathophysiologischen Prozesse sind. Wir konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass Matrix-Metalloproteasen und die zentralen Serinproteasen des fibrinolytischen Systems Plasmin, uPA und tPA sowie des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors PAI-1 wesentlich für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das postischämische Gewebe und den assoziierten Gewebeschaden sind. Darüber hinaus konnten wir die diesen Prozessen zugrundeliegenden Mechanismen genauer aufschlüsseln. In Kooperationen mit weiteren Arbeitsgruppen konnten wir zudem die Mechanismen des stimulus- beziehungsweise organspezifischen Leukozytentrackings, beispielsweise in der postischämischen Leber oder Niere, weiter charakterisieren. Ein weiterer Fokus dieses Habilitationsprojektes lag auf der subpopulationsspezifischen Rekrutierung von Immunzellen in das paravaskuläre Gewebe und der Relevanz von Interaktionen zwischen verschiedenen Immunzellen und auch Thrombozyten bei viralen und bakteriellen Erkrankungen. Wir konnten beispielsweise erstmalig zeigen, dass in der Blutzirkulation gealterte neutrophile Granulozyten einen spezifischen, hoch-reaktiven Phänotyp entwickeln und dadurch die „erste zelluläre Verteidigungslinie“ der Immunantwort auf eine bakterielle Infektion bilden. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass das multifunktionale adhäsive Glykoprotein Vitronektin die inflammatorische mikrovaskuläre Rekrutierung von Thrombozyten und darüber die Thrombose bei der infektiösen systemischen Entzündungsreaktion fördert. Zur organspezifischen Untersuchung der mikrovaskulären Prozesse in der Kopf-Hals-Speicheldrüse haben wir zusätzlich ein neues Modell etabliert, in welchem wir die Mechanismen der sterilen Entzündungsreaktion erstmalig in vivo genauer analysieren konnten. Die im Rahmen dieses Projektes neu aufgedeckten stimulus-, organ- und subpopulationsspezifischen Mechanismen des mikrovaskulären Traffickings von Leukozyten

und Thrombozyten eröffnen vielversprechende Ansatzpunkte für potentiell effektivere und nebenwirkungsärmere Therapiestrategien.

Die mikrovaskuläre Rekrutierung von Leukozyten in das geschädigte Gewebe spielt pathogenetisch nicht nur bei entzündlich-infektiösen Erkrankungen, sondern auch für Entstehung, Progression und Metastasierung maligner Tumoren eine Schlüsselrolle. In einem weiteren Teilprojekt konnten wir zeigen, dass gealterte neutrophile Granulozyten, welche physiologischerweise primär eine entscheidende Rolle für die Infektionsabwehr spielen könnten, in malignen Läsionen akkumulieren und dort eine pro-tumorigene Wirkung entfalten. Weiterhin konnten wir, aufbauend auf unseren Untersuchungen zur Bedeutung des fibrinolytischen Systems für die entzündliche Leukozytenrekrutierung, nachweisen, dass die Heteromerisierung von uPA und PAI-1 die Extravasation pro-tumorigener neutrophiler Granulozyten in maligne Läsionen beim Mammakarzinom fördert. Insbesondere konnten wir bereits zeigen, dass diese neu charakterisierten Prozesse pharmakologisch für eine effektive anti-tumorale Behandlung adressiert werden können. Sie könnten somit die Basis für neue, potentiell effektivere und nebenwirkungsärmere Therapiestrategien gegen maligne Tumore darstellen.

Für die Therapie von entzündlichen und malignen Tumorerkrankungen stehen verschiedene Behandlungsmodalitäten zur Verfügung. Synthetische Nanomaterialien könnten aufgrund ihrer außergewöhnlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften eine vielversprechende Option für neuartige Diagnostika und Therapeutika darstellen. Im Rahmen dieses Habilitationsprojektes haben wir deshalb die Auswirkungen unterschiedlicher Oberflächenfunktionalisierungen von synthetischen Nanomaterialien auf die Interaktivität im Organismus analysiert. In diesen Untersuchungen konnten wir die Relevanz der Oberflächenmodifikationen für die Biodistribution und das Interaktionsverhalten von synthetischen Nanomaterialien mit dem intakten und pathologisch veränderten vaskulären Endothel nachweisen. Zudem konnten wir die spezielle regulatorische Funktion der

endothelialen Glykokalix für Interaktionen von systemisch verabreichten Nanomaterialien mit dem Gefäßendothel in der intakten und entzündeten Mikrozirkulation *in vitro* und *in vivo* charakterisieren. Basierend auf unseren Ergebnissen könnte die Gestaltung von Nanomaterialien für spezielle diagnostische oder therapeutische Anwendungen bei Entzündungserkrankungen und malignen Tumoren potentiell verbessert werden.

Die im Rahmen dieses Habilitationsprojektes durchgeführten Untersuchung ermöglichten die Charakterisierung neuer Schlüsselprozesse für die mikrovaskuläre Rekrutierung von Leukozyten und Thrombozyten sowie die Untersuchung von möglichen Anwendungen synthetischer Nanomaterialien bei Entzündung und Krebs. Diese Erkenntnisse könnten das Fundament für die Entwicklung vielversprechender neuer Strategien für effektivere und nebenwirkungsärmere Therapien entzündlich-infektiöser Erkrankungen und maligner Tumore darstellen.

## 8. Literaturverzeichnis

- Allam, R., C. R. Scherbaum, M. N. Darisipudi, S. R. Mulay, H. Hagele, J. Lichtnekert, J. H. Hagemann, K. V. Rupanagudi, M. Ryu, C. Schwarzenberger, B. Hohenstein, C. Hugo, B. Uhl, C. A. Reichel, F. Krombach, M. Monestier, H. Liapis, K. Moreth, L. Schaefer, and H. J. Anders. 2012. 'Histones from dying renal cells aggravate kidney injury via TLR2 and TLR4', *J Am Soc Nephrol*, 23: 1375-88.
- Bascones-Martinez, A., R. Mattila, R. Gomez-Font, and J. H. Meurman. 2014. 'Immunomodulatory drugs: oral and systemic adverse effects', *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 19: e24-31.
- Beaulieu, L. M., L. Clancy, K. Tanriverdi, E. J. Benjamin, C. D. Kramer, E. O. Weinberg, X. He, S. Mekasha, E. Mick, R. R. Ingalls, C. A. Genco, and J. E. Freedman. 2015. 'Specific Inflammatory Stimuli Lead to Distinct Platelet Responses in Mice and Humans', *PLoS One*, 10: e0131688.
- Berberich, N., B. Uhl, J. Joore, U. K. Schmerwitz, B. A. Mayer, C. A. Reichel, F. Krombach, S. Zahler, A. M. Vollmar, and R. Furst. 2011. 'Roscovitine blocks leukocyte extravasation by inhibition of cyclin-dependent kinases 5 and 9', *Br J Pharmacol*, 163: 1086-98.
- Berlin, C., E. L. Berg, M. J. Briskin, D. P. Andrew, P. J. Kilshaw, B. Holzmann, I. L. Weissman, A. Hamann, and E. C. Butcher. 1993. 'Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1', *Cell*, 74: 185-95.
- Briasoulis, A., D. Tousoulis, N. Papageorgiou, A. M. Kampoli, E. Androulakis, C. Antoniadis, E. Tsiamis, G. Latsios, and C. Stefanadis. 2012. 'Novel therapeutic approaches targeting matrix metalloproteinases in cardiovascular disease', *Curr Top Med Chem*, 12: 1214-21.
- Brown, C. E., and C. L. Mackall. 2019. 'CAR T cell therapy: inroads to response and resistance', *Nat Rev Immunol*, 19: 73-74.
- Cavanaugh, V. J., Y. Deng, M. P. Birkenbach, J. S. Slater, and A. E. Campbell. 2003. 'Vigorous innate and virus-specific cytotoxic T-lymphocyte responses to murine cytomegalovirus in the submaxillary salivary gland', *J Virol*, 77: 1703-17.
- Chraa, D., A. Naim, D. Olive, and A. Badou. 2019. 'T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes', *J Leukoc Biol*, 105: 243-55.
- Coffelt, S. B., M. D. Wellenstein, and K. E. de Visser. 2016. 'Neutrophils in cancer: neutral no more', *Nat Rev Cancer*, 16: 431-46.
- Das, R., E. Pluskota, and E. F. Plow. 2010. 'Plasminogen and its receptors as regulators of cardiovascular inflammatory responses', *Trends Cardiovasc Med*, 20: 120-4.
- Del Rosso, M., G. Fibbi, M. Pucci, F. Margheri, and S. Serrati. 2008. 'The plasminogen activation system in inflammation', *Front Biosci*, 13: 4667-86.
- Del Rosso, M., F. Margheri, S. Serrati, A. Chilla, A. Laurenzana, and G. Fibbi. 2011. 'The urokinase receptor system, a key regulator at the intersection between inflammation, immunity, and coagulation', *Curr Pharm Des*, 17: 1924-43.
- Devi, S., A. Li, C. L. Westhorpe, C. Y. Lo, L. D. Abeynaike, S. L. Snelgrove, P. Hall, J. D. Ooi, C. G. Sobey, A. R. Kitching, and M. J. Hickey. 2013. 'Multiphoton imaging reveals a new leukocyte recruitment paradigm in the glomerulus', *Nat Med*, 19: 107-12.
- Doring, A., M. Wild, D. Vestweber, U. Deutsch, and B. Engelhardt. 2007. 'E- and P-selectin are not required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 and SJL mice', *J Immunol*, 179: 8470-9.
- Eltzschig, H. K., and T. Eckle. 2011. 'Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation', *Nat Med*, 17: 1391-401.
- Fukumura, D., D. G. Duda, L. L. Munn, and R. K. Jain. 2010. 'Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models', *Microcirculation*, 17: 206-25.
- Funken, D., H. Ishikawa-Ankerhold, B. Uhl, M. Lerchenberger, M. Rentsch, D. Mayr, S. Massberg, J. Werner, and A. Khandoga. 2017. 'In situ targeting of dendritic cells sets

- tolerogenic environment and ameliorates CD4(+) T-cell response in the postischemic liver', *FASEB J*, 31: 4796-808.
- Furie, B., and B. C. Furie. 2008. 'Mechanisms of thrombus formation', *N Engl J Med*, 359: 938-49.
- Gaertner, F., and S. Massberg. 2019. 'Patrolling the vascular borders: platelets in immunity to infection and cancer', *Nat Rev Immunol*, 19: 747-60.
- Gidday, J. M., Y. G. Gasche, J. C. Copin, A. R. Shah, R. S. Perez, S. D. Shapiro, P. H. Chan, and T. S. Park. 2005. 'Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia', *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 289: H558-68.
- Golebiewska, E. M., and A. W. Poole. 2015. 'Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond', *Blood Rev*, 29: 153-62.
- Greten, F. R., and S. I. Grivnenikov. 2019. 'Inflammation and Cancer: Triggers, Mechanisms, and Consequences', *Immunity*, 51: 27-41.
- Grivnenikov, S. I., F. R. Greten, and M. Karin. 2010. 'Immunity, inflammation, and cancer', *Cell*, 140: 883-99.
- Gupta, A. S. 2011. 'Nanomedicine approaches in vascular disease: a review', *Nanomedicine*, 7: 763-79.
- Hellings, P., M. Jorissen, and J. L. Ceuppens. 2000. 'The Waldeyer's ring', *Acta Otorhinolaryngol Belg*, 54: 237-41.
- Iizuka, M., H. Tsuboi, N. Matsuo, H. Asashima, T. Hirota, Y. Kondo, Y. Iwakura, S. Takahashi, I. Matsumoto, and T. Sumida. 2015. 'A crucial role of ROR $\gamma$  in the development of spontaneous Sialadenitis-like Sjogren's syndrome', *J Immunol*, 194: 56-67.
- Immler, R., B. Lange-Sperandio, T. Steffen, H. Beck, I. Rohwedder, J. Roth, M. Napoli, G. Hupel, F. Pfister, B. Popper, B. Uhl, H. Mannell, C. A. Reichel, V. Vielhauer, J. Scherberich, M. Sperandio, and M. Pruenster. 2020. 'Extratubular Polymerized Uromodulin Induces Leukocyte Recruitment and Inflammation In Vivo', *Front Immunol*, 11: 588245.
- Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. 2011. 'Global cancer statistics', *CA Cancer J Clin*, 61: 69-90.
- Johnson, D. E., B. Burtness, C. R. Leemans, V. W. Y. Lui, J. E. Bauman, and J. R. Grandis. 2020. 'Head and neck squamous cell carcinoma', *Nat Rev Dis Primers*, 6: 92.
- Knopf, A., M. Bas, A. Chaker, U. Strassen, A. Pickhard, T. Stark, T. Lahmer, and K. Thurmel. 2011. 'Rheumatic disorders affecting the head and neck: underestimated diseases', *Rheumatology (Oxford)*, 50: 2029-34.
- Kroschinsky, F., F. Stolz, S. von Bonin, G. Beutel, M. Kochanek, M. Kiehl, P. Schellongowski, Hematological Intensive Care in, and Group Oncological Patients Collaborative. 2017. 'New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management', *Crit Care*, 21: 89.
- Kwon, D., E. M. Genden, R. de Bree, J. P. Rodrigo, A. Rinaldo, A. Sanabria, A. D. Rapidis, R. P. Takes, and A. Ferlito. 2018. 'Overcoming wound complications in head and neck salvage surgery', *Auris Nasus Larynx*, 45: 1135-42.
- Lech, M., C. Rommele, R. Grobmayr, H. Eka Susanti, O. P. Kulkarni, S. Wang, H. J. Grone, B. Uhl, C. Reichel, F. Krombach, C. Garlanda, A. Mantovani, and H. J. Anders. 2013. 'Endogenous and exogenous pentraxin-3 limits postischemic acute and chronic kidney injury', *Kidney Int*, 83: 647-61.
- Lerchenberger, M., B. Uhl, K. Stark, G. Zuchtriegel, A. Eckart, M. Miller, D. Pühr-Westerheide, M. Praetner, M. Rehberg, A. G. Khandoga, K. Lauber, S. Massberg, F. Krombach, and C. A. Reichel. 2013. 'Matrix metalloproteinases modulate amoeboid-like migration of neutrophils through inflamed interstitial tissue', *Blood*, 122: 770-80.
- Li, P., Y. Zheng, and X. Chen. 2017. 'Drugs for Autoimmune Inflammatory Diseases: From Small Molecule Compounds to Anti-TNF Biologics', *Front Pharmacol*, 8: 460.
- Maas, S. L., O. Soehnlein, and J. R. Viola. 2018. 'Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta', *Front Immunol*, 9: 2739.

- Martins, F., L. Sofiya, G. P. Sykiotis, F. Lamine, M. Maillard, M. Fraga, K. Shabafrouz, C. Ribi, A. Cairoli, Y. Guex-Crosier, T. Kuntzer, O. Michielin, S. Peters, G. Coukos, F. Spertini, J. A. Thompson, and M. Obeid. 2019. 'Adverse effects of immune-checkpoint inhibitors: epidemiology, management and surveillance', *Nat Rev Clin Oncol*, 16: 563-80.
- Medzhitov, R. 2010. 'Inflammation 2010: new adventures of an old flame', *Cell*, 140: 771-6.
- Mittmann, L. A., F. Haring, J. B. Schaubacher, R. Hennel, B. Smiljanov, G. Zuchtriegel, M. Canis, O. Gires, F. Krombach, L. Holdt, S. Brandau, T. Vogl, K. Lauber, B. Uhl, and C. A. Reichel. 2021. 'Uncoupled biological and chronological aging of neutrophils in cancer promotes tumor progression', *J Immunother Cancer*, 9.
- Mizrachi, A., A. P. Cotrim, N. Katabi, J. B. Mitchell, M. Verheij, and A. Haimovitz-Friedman. 2016. 'Radiation-Induced Microvascular Injury as a Mechanism of Salivary Gland Hypofunction and Potential Target for Radioprotectors', *Radiat Res*, 186: 189-95.
- Mockl, L., S. Hirn, A. A. Torrano, B. Uhl, C. Brauchle, and F. Krombach. 2017. 'The glycocalyx regulates the uptake of nanoparticles by human endothelial cells in vitro', *Nanomedicine (Lond)*, 12: 207-17.
- 'Nano-enabled immunomodulation'. 2021. *Nat Nanotechnol*, 16: 1.
- Nicolas-Avila, J. A., J. M. Adrover, and A. Hidalgo. 2017. 'Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer', *Immunity*, 46: 15-28.
- Nourshargh, S., and R. Alon. 2014. 'Leukocyte migration into inflamed tissues', *Immunity*, 41: 694-707.
- Osipov, A., M. T. Saung, L. Zheng, and A. G. Murphy. 2019. 'Small molecule immunomodulation: the tumor microenvironment and overcoming immune escape', *J Immunother Cancer*, 7: 224.
- Papadopoulos, Nikolaos G. 2020. 'Current Grand Challenges in Allergy', *Frontiers in Allergy*, 1.
- Pons, S., M. Arnaud, M. Loisel, E. Arrii, E. Azoulay, and L. Zafrani. 2020. 'Immune Consequences of Endothelial Cells' Activation and Dysfunction During Sepsis', *Crit Care Clin*, 36: 401-13.
- Praetner, M., M. Rehberg, P. Bihari, M. Lerchenberger, B. Uhl, M. Holzer, M. E. Eichhorn, R. Furst, T. Perisic, C. A. Reichel, U. Welsch, and F. Krombach. 2010. 'The contribution of the capillary endothelium to blood clearance and tissue deposition of anionic quantum dots in vivo', *Biomaterials*, 31: 6692-700.
- Praetner, M., G. Zuchtriegel, M. Holzer, B. Uhl, J. Schaubacher, L. Mittmann, M. Fabritius, R. Furst, S. Zahler, D. Funken, M. Lerchenberger, A. Khandoga, S. Kanse, K. Lauber, F. Krombach, and C. A. Reichel. 2018. 'Plasminogen Activator Inhibitor-1 Promotes Neutrophil Infiltration and Tissue Injury on Ischemia-Reperfusion', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 38: 829-42.
- Prame Kumar, K., A. J. Nicholls, and C. H. Y. Wong. 2018. 'Partners in crime: neutrophils and monocytes/macrophages in inflammation and disease', *Cell Tissue Res*, 371: 551-65.
- Preissner, K. T., and U. Reuning. 2011. 'Vitronectin in vascular context: facets of a multitasking matricellular protein', *Semin Thromb Hemost*, 37: 408-24.
- Reichel, C. A., S. M. Kanse, and F. Krombach. 2012. 'At the interface of fibrinolysis and inflammation: the role of urokinase-type plasminogen activator in the leukocyte extravasation cascade', *Trends Cardiovasc Med*, 22: 192-6.
- Reichel, C. A., M. Lerchenberger, B. Uhl, M. Rehberg, N. Berberich, S. Zahler, M. P. Wymann, and F. Krombach. 2011. 'Plasmin inhibitors prevent leukocyte accumulation and remodeling events in the postischemic microvasculature', *PLoS One*, 6: e17229.
- Reichel, C. A., D. Puhr-Westerheide, G. Zuchtriegel, B. Uhl, N. Berberich, S. Zahler, M. P. Wymann, B. Luckow, and F. Krombach. 2012. 'C-C motif chemokine CCL3 and canonical neutrophil attractants promote neutrophil extravasation through common and distinct mechanisms', *Blood*, 120: 880-90.
- Reichel, C. A., B. Uhl, M. Lerchenberger, D. Puhr-Westerheide, M. Rehberg, J. Liebl, A. Khandoga, W. Schmalix, S. Zahler, E. Deindl, S. Lorenzl, P. J. Declerck, S. Kanse, and F. Krombach. 2011. 'Urokinase-type plasminogen activator promotes paracellular

- transmigration of neutrophils via Mac-1, but independently of urokinase-type plasminogen activator receptor', *Circulation*, 124: 1848-59.
- Ruffell, B., D. G. DeNardo, N. I. Affara, and L. M. Coussens. 2010. 'Lymphocytes in cancer development: polarization towards pro-tumor immunity', *Cytokine Growth Factor Rev*, 21: 3-10.
- Russell, M. D., and M. S. Russell. 2018. 'Urgent Infections of the Head and Neck', *Med Clin North Am*, 102: 1109-20.
- Shi, Y., and T. Lammers. 2019. 'Combining Nanomedicine and Immunotherapy', *Acc Chem Res*, 52: 1543-54.
- Silvestre-Roig, C., A. Hidalgo, and O. Soehnlein. 2016. 'Neutrophil heterogeneity: implications for homeostasis and pathogenesis', *Blood*, 127: 2173-81.
- Simard, E. P., L. A. Torre, and A. Jemal. 2014. 'International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site', *Oral Oncol*, 50: 387-403.
- Smith, H. W., and C. J. Marshall. 2010. 'Regulation of cell signalling by uPAR', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11: 23-36.
- Soehnlein, O., L. Lindbom, and C. Weber. 2009. 'Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment', *Blood*, 114: 4613-23.
- Sorrentino, S., J. D. Studt, O. Medalia, and K. Tanuj Sapra. 2015. 'Roll, adhere, spread and contract: structural mechanics of platelet function', *Eur J Cell Biol*, 94: 129-38.
- Symvoulakis, E. K., S. Klinis, A. Alegakis, D. E. Kyrmizakis, E. I. Drivas, G. Rachiotis, A. Philalithis, and G. A. Velegrakis. 2006. 'Epidemiologic profile of otorhinolaryngological, head and neck disorders in a tertiary hospital unit in Greece: a challenge for general practitioners?', *BMC Ear Nose Throat Disord*, 6: 12.
- Syrovets, T., O. Lunov, and T. Simmet. 2012. 'Plasmin as a proinflammatory cell activator', *J Leukoc Biol*, 92: 509-19.
- Turner, M. D., B. Nedjai, T. Hurst, and D. J. Pennington. 2014. 'Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease', *Biochim Biophys Acta*, 1843: 2563-82.
- Uhl, B., C. Braun, J. Dominik, J. Luft, M. Canis, and C. A. Reichel. 2020. 'A Novel Experimental Approach for In Vivo Analyses of the Salivary Gland Microvasculature', *Front Immunol*, 11: 604470.
- Uhl, B., F. Haring, J. Slotta-Huspenina, J. Luft, V. Schneewind, J. Hildinger, Z. Wu, K. Steiger, B. Smiljanov, A. M. N. Batcha, O. T. Keppler, J. C. Hellmuth, T. Lahmer, K. Stock, B. Weiß, M. Canis, K. Stark, T. Bromberger, M. Moser, C. Schulz, W. Weichert, G. Zuchtriegel, and C. A. Reichel. 2023. 'Vitronectin promotes immunothrombotic dysregulation in the venular microvasculature', *Front Immunol*.
- Uhl, B., S. Hirn, R. Immler, K. Mildner, L. Mockl, M. Sperandio, C. Brauchle, C. A. Reichel, D. Zeuschner, and F. Krombach. 2017. 'The Endothelial Glycocalyx Controls Interactions of Quantum Dots with the Endothelium and Their Translocation across the Blood-Tissue Border', *ACS Nano*, 11: 1498-508.
- Uhl, B., S. Hirn, K. Mildner, R. Coletti, S. Massberg, C. A. Reichel, M. Rehberg, D. Zeuschner, and F. Krombach. 2018. 'The surface chemistry determines the spatio-temporal interaction dynamics of quantum dots in atherosclerotic lesions', *Nanomedicine (Lond)*, 13: 623-38.
- Uhl, B., A. Mittmann L, J. Dominik, R. Hannel, B. Smiljanov, F. Haring, B. Schaubacher J, C. Braun, L. Padovan, R. Pick, M. Canis, C. Schulz, M. Mack, E. Gutjahr, P. Sinn, J. Heil, K. Steiger, S. M. Kanse, W. Weichert, M. Sperandio, K. Lauber, F. Krombach, and C. A. Reichel. 2021. 'uPA-PAI-1 heteromerization promotes breast cancer progression by attracting tumorigenic neutrophils', *EMBO Mol Med*: e13110.
- Uhl, B., Y. Vadlau, G. Zuchtriegel, K. Nekolla, K. Sharaf, F. Gaertner, S. Massberg, F. Krombach, and C. A. Reichel. 2016. 'Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response', *Blood*, 128: 2327-37.
- Uhl, B., G. Zuchtriegel, D. Pühr-Westerheide, M. Praetner, M. Rehberg, M. Fabritius, M. Hessenauer, M. Holzer, A. Khandoga, R. Furst, S. Zahler, F. Krombach, and C. A. Reichel. 2014. 'Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil

- recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 34: 1495-504.
- Vajkoczy, P., M. Laschinger, and B. Engelhardt. 2001. 'Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels', *J Clin Invest*, 108: 557-65.
- Vestweber, D. 2012. 'Novel insights into leukocyte extravasation', *Curr Opin Hematol*, 19: 212-7.
- Xu, X., S. Reitsma, Y. Wang, and W. J. Fokkens. 2021. 'Highlights in the advances of chronic rhinosinusitis', *Allergy*.
- Yadav, S., and A. Kapley. 2021. 'Antibiotic resistance: Global health crisis and metagenomics', *Biotechnol Rep (Amst)*, 29: e00604.
- Young, P. P., S. Ardestani, and B. Li. 2010. 'Myeloid cells in cancer progression: unique subtypes and their roles in tumor growth, vascularity, and host immune suppression', *Cancer Microenviron*, 4: 1-11.
- Zanatta, E., C. Colombo, G. D'Amico, T. d'Humieres, C. Dal Lin, and F. Tona. 2019. 'Inflammation and Coronary Microvascular Dysfunction in Autoimmune Rheumatic Diseases', *Int J Mol Sci*, 20.
- Zhang, D., G. Chen, D. Manwani, A. Mortha, C. Xu, J. J. Faith, R. D. Burk, Y. Kunisaki, J. E. Jang, C. Scheiermann, M. Merad, and P. S. Frenette. 2015. 'Neutrophil ageing is regulated by the microbiome', *Nature*, 525: 528-32.
- Zuchtriegel, G., B. Uhl, M. E. Hessenauer, A. R. Kurz, M. Rehberg, K. Lauber, F. Krombach, and C. A. Reichel. 2015. 'Spatiotemporal expression dynamics of selectins govern the sequential extravasation of neutrophils and monocytes in the acute inflammatory response', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 35: 899-910.
- Zuchtriegel, G., B. Uhl, R. Pick, M. Ramsauer, J. Dominik, L. A. Mittmann, M. Canis, S. Kanse, M. Sperandio, F. Krombach, and C. A. Reichel. 2020. 'Vitronectin stabilizes intravascular adhesion of neutrophils by coordinating beta2 integrin clustering', *Haematologica*.
- Zuchtriegel, G., B. Uhl, D. Pühr-Westerheide, M. Pornbacher, K. Lauber, F. Krombach, and C. A. Reichel. 2016. 'Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation', *PLoS Biol*, 14: e1002459.

## 9 Danksagung

Mein ausdrücklicher und großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Martin Canis für die außergewöhnliche Möglichkeit, unter seiner Führung meinen beruflichen Traum eines klinisch und wissenschaftlich tätigen, akademischen Kopf-Hals-Chirurgen verfolgen zu dürfen. Seine gelebte Begeisterung für die Wissenschaft und die akademische Weiterentwicklung der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde waren für mich stets ein leuchtendes Vorbild. Gerne möchte ich im Speziellen dafür danken, dass er als Klinikdirektor meine Forschung an den wissenschaftlichen Projekten der Habilitation stets sehr unterstützt und mich in gemeinsamen Gesprächen inspiriert und motiviert hat.

Mein tief empfundener Dank gilt zudem Herrn Prof. Dr. Christoph Reichel, welcher meinen klinischen und wissenschaftlichen Werdegang zunächst als Mentor und inzwischen als Freund von Beginn an begleitet und gefördert hat. Ohne die unermüdliche Unterstützung, die unzähligen und wertvollen Ratschläge, die geteilte Faszination für die Wissenschaft sowie die Zeit, welche er trotz der hohen Arbeitsbelastung auch zu ungewöhnlichen Zeiten immer für mich fand, wären meine Forschungsprojekte in dieser Form nicht möglich gewesen.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Fritz Krombach, welcher mir als Doktorvater die Grundlagen des wissenschaftlichen Arbeitens gelehrt und die Begeisterung für die Forschung in mir gestärkt hat.

Den von mir mitbetreuten Doktorandinnen und Doktoranden, den Kolleginnen und Kollegen unserer Arbeitsgruppe sowie unseren Kooperationspartnern danke ich für das geteilte wissenschaftliche Interesse, das große Engagement für unsere gemeinsamen Projekte und die vielen fruchtbaren Diskussionen, welche mir die große Freude am wissenschaftlichen Arbeiten erhalten.

Darüber hinaus danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der HNO-Klinik, welche durch das kollegiale und oft freundschaftliche Zusammenarbeiten meine Freunde an der gemeinsamen Arbeit erhalten. Im Besonderen möchte ich mich bei Dr. Florian Schrözlmaier, Prof. Dr. Philipp Baumeister und Dr. Martin Patscheider für die Förderung meiner klinischen und wissenschaftlichen Interessen sowie die freundschaftliche Verbundenheit bedanken.

Von ganzem Herzen danke ich Katja Schwarz und unserer Tochter Romi für ihr Verständnis für meine berufliche Leidenschaft, welcher ich nur durch ihre stetige und umfangreiche Unterstützung in diesem Umfang nachgehen kann. Mein unermesslich großer Dank gilt zudem meinen Eltern, Charlotte und Dr. Herbert Uhl, welche durch ihre Erziehung und ihre Begeisterung für die Medizin und die Naturwissenschaften das Fundament für meinen akademischen Weg gelegt haben.