

Aus dem  
Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie  
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin  
Institut der Universität München  
Direktor: Prof. Dr. Christian Wahl-Schott

**Die funktionelle Bedeutung von LRP1 für die Rekrutierung von  
neutrophilen Granulozyten im Rahmen der akuten  
Entzündungsreaktion**

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

vorgelegt von  
Sebastian Geß  
aus Kelheim  
2023

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

Berichterstatter: Prof. Dr. Barbara Walzog

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Christoph Reichel  
PD Dr. Stefanie Steiger  
Prof. Dr. Jürgen Bernhagen

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Ludwig Weckbach

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 30.11.2023

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die akute Entzündungsreaktion .....	1
1.2	Die physiologische Rekrutierungskaskade der Leukozyten .....	2
1.2.1	Die Schritte der Leukozytenrekrutierung .....	2
1.2.1.1	Bedeutung der Selektine und Entzündungsmediatoren .....	3
1.2.1.2	Bedeutung der Integrine .....	4
1.2.1.2.1	<i>Inside-out Signaling</i> .....	5
1.2.1.2.2	<i>Outside-in Signaling</i> .....	6
1.2.1.3	Transmigration aus dem Blutgefäß an den Ort der Entzündung .....	7
1.2.2	Abweichungen von der „klassischen“ Rekrutierungskaskade .....	8
1.2.3	Leukozyten-Adhäsions-Defekte und ihre klinische Bedeutung .....	9
1.2.4	Effektorfunktionen der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) .....	9
1.2.4.1	Phagozytose .....	10
1.2.4.2	<i>Reactive Oxygen Species (ROS)</i> .....	10
1.2.4.3	Degranulation .....	10
1.2.4.4	<i>Neutrophil Extracellular Traps (NETs)</i> .....	11
1.3	Das Zytokin Midkine (MK) .....	13
1.3.1	Struktur von MK .....	13
1.3.2	Rezeptoren von MK .....	14
1.3.3	MK als Modulator der Entzündungsreaktion .....	15
1.4	Der Transmembranrezeptor LRP1 .....	16
1.4.1	Struktur von LRP1 .....	16
1.4.2	Funktionen von LRP1 .....	18
1.4.2.1	Endozytose .....	19
1.4.2.2	Proteolytische Prozessierung .....	19
1.4.2.3	Bindung von Adaptermolekülen .....	20
1.4.3	LRP1 und Integrine .....	20
1.5	Fragestellung .....	22
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1	Material .....	23
2.1.1	Chemikalien .....	23
2.1.2	Rekombinante Proteine .....	24

2.1.3	Puffer, Lösungen und Medien .....	25
2.1.4	Kits.....	26
2.1.5	Antikörper.....	27
2.1.6	Zelllinien.....	28
2.1.7	Versuchstiere .....	28
2.1.8	Geräte.....	29
2.1.9	Software.....	29
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.2.1	Isolation von murinen PMN .....	30
2.2.2	Isolation von humanen PMN .....	30
2.2.3	Isolation von murinen Monozyten .....	30
2.2.4	Isolation von humanen Monozyten .....	31
2.2.5	Bestimmung der Zellzahl .....	31
2.2.6	Isolation von genomischer DNA .....	31
2.2.7	Isolation von mRNA.....	31
2.2.8	Reverse Transkription .....	32
2.2.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	32
2.2.10	DNA-Gelelektrophorese .....	35
2.2.11	Zellyse.....	35
2.2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	36
2.2.13	Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembran und immunologischer Nachweis (Western-Blot) .....	36
2.2.14	Generierung und Differenzierung von Hoxb8-SCF- und Hoxb8-FL-Zellen .....	37
2.2.15	Zellkultur .....	38
2.2.15.1	Kultur von HEK-293T-, CHO- und B16-Zellen .....	38
2.2.15.2	Kryokonservierung und Reaktivierung .....	38
2.2.16	CRISPR/Cas9 .....	39
2.2.16.1	<i>Guide</i> -RNA-Design und Vektor-Klonierung .....	40
2.2.16.2	Transfektion und Virusproduktion in HEK293T-Zellen .....	41
2.2.16.3	Transduktion von Hoxb8-FL-Zellen .....	41
2.2.16.4	Analyse der Subklone .....	41
2.2.17	Durchflusszytometrie.....	42
2.2.17.1	Expression von LRP1 auf PMN .....	42
2.2.17.2	$\beta_2$ -Integrin-Expression auf PMN nach LRP1-Blockade mit LRPAP .....	43
2.2.17.3	$\beta_2$ -Integrin-Expression auf PMN in Abwesenheit von LRP1 .....	43
2.2.17.4	ICAM-1- und Fibrinogen-Bindevverhalten .....	44
2.2.18	Mikroskopische Fluoreszenzanalysen .....	44

2.2.18.1	<i>Confocal Spinning Disc-(CSD)-Mikroskopie</i> .....	44
2.2.18.2	<i>Stimulated Emission Depletion-(STED)-Mikroskopie</i> .....	45
2.2.18.3	<i>Confocal Laser Scanning-(CLS)-Mikroskopie</i> .....	46
2.2.19	Funktionelle Analyse in Mikroflussskammern .....	46
2.2.19.1	Induktion der Adhäsion .....	47
2.2.19.2	Verstärkung der Adhäsion .....	47
2.2.19.3	Abflachung der Zelle .....	47
2.2.19.4	Mechanotaktische Migration .....	47
<b>2.3</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>48</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Charakterisierung eines LRP1-defizienten Maus- und Zellmodells</b> .....	<b>49</b>
3.1.1	Genotypische und phänotypische Untersuchung von LysM-Cre/LRP1 <sup>fl/fl</sup> - und Vav-iCre/LRP1 <sup>fl/fl</sup> -Mäusen .....	49
3.1.2	Generierung von LRP1-defizienten Hoxb8-SCF-Zellen aus Vav-iCre/LRP1 <sup>fl/fl</sup> -Mäusen .....	50
3.1.3	Generierung von LRP1-defizienten Hoxb8-FL-Zellen mittels CRISPR/Cas9 .....	51
<b>3.2</b>	<b>Molekulare Charakterisierung von LRP1 und <math>\beta_2</math>-Integrinen auf PMN</b> .....	<b>53</b>
3.2.1	Expression und Regulation von LRP1 auf PMN .....	53
3.2.2	Die Rolle von LRP1 für die Expression von $\beta_2$ -Integrinen auf PMN .....	54
3.2.2.1	$\beta_2$ -Integrin-Expression auf PMN nach LRP1-Blockade mit LRPAP .....	54
3.2.2.2	$\beta_2$ -Integrin-Expression auf PMN in Abwesenheit von LRP1 .....	56
<b>3.3</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung von LRP1</b> .....	<b>57</b>
3.3.1	Kolokalisation von LRP1 mit dem $\beta_2$ -Integrin LFA-1 .....	57
3.3.2	Einfluss von LRP1 auf die hoch-affine Konformation von $\beta_2$ -Integrinen .....	60
3.3.3	Die Bedeutung von LRP1 für die $\beta_2$ -Integrin-abhängige Rekrutierungskaskade .....	61
3.3.3.1	Induktion der Adhäsion .....	62
3.3.3.2	Verstärkung der Adhäsion .....	64
3.3.3.3	Abflachung der Zelle .....	65
3.3.3.4	Mechanotaktische Migration .....	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>69</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung eines LRP1-defizienten Maus- und Zellmodells</b> .....	<b>69</b>
<b>4.2</b>	<b>Die Rolle von LRP1 für die Rekrutierung von PMN an den Ort der Entzündung</b> .....	<b>71</b>

4.3	Der molekulare Mechanismus der MK-LRP1-Achse in PMN .....	75
4.4	Die biologische Relevanz der MK-LRP1-Achse für die akute Entzündungsreaktion.....	76
5	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>78</b>
6	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>80</b>
7	<b>Anhang .....</b>	<b>98</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	98
7.2	Danksagung.....	100
7.3	Publikationen.....	101
7.4	Eidesstattliche Versicherung .....	102

# 1 Einleitung

## 1.1 Die akute Entzündungsreaktion

Die akute Entzündungsreaktion bezeichnet eine adaptive Gewebeantwort, welche durch pathogene Erreger oder Gewebeschäden ausgelöst wird [1]. Die klinischen Kardinalsymptome der Entzündung wurden erstmals von C. Celsus im 1. Jahrhundert n. Chr. beschrieben: *rubor et tumor cum calore et dolore* (Rötung und Schwellung mit Überwärmung und Schmerz) [2]. Diese wurden später von R. Virchow um die funktionelle Einschränkung (*functio laesa*) ergänzt [3, 4]. J. Hunter prägte im 18. Jahrhundert die moderne Sichtweise der Entzündung, indem er sie nicht mehr als Krankheit *per se*, sondern als Reaktion auf eine Gewebeverletzung bezeichnete [5, 6]. Die technischen Errungenschaften des 20. Jahrhunderts erlaubten die spezifische Untersuchung der zellulären und molekularen Mechanismen sowie Identifikation der Hauptkomponenten der akuten Entzündungsreaktion: Erhöhter lokaler Blutfluss, gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität sowie die Rekrutierung von Leukozyten [1, 6, 7].

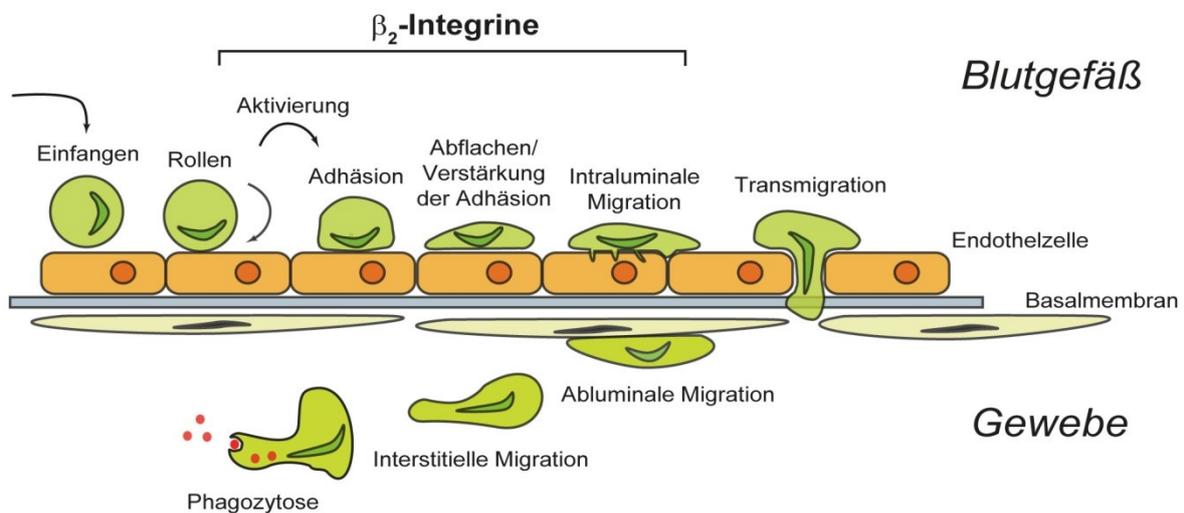
Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) werden im Knochenmark mit einer täglichen Rate von bis zu  $2 \times 10^{11}$  Zellen vor allem unter Kontrolle des *Granulocyte-colony Stimulating Factor* (G-CSF) produziert und mit einer Lebensdauer von wenigen Stunden bis Tagen in den Kreislauf freigesetzt [8-12]. Reife PMN sind durch einen segmentierten Kern, einen Durchmesser von 7–10  $\mu\text{m}$  sowie Granula und sekretorische Vesikel im Zytoplasma charakterisiert [10, 12, 13]. Sie sind im humanen Kreislauf mit 50–70% die vorherrschende Leukozytensubpopulation, während sie im murinen System nur 10–25% der Leukozyten darstellen [12, 14-16]. Die absolute Anzahl im Kreislauf fluktuiert zudem im Rahmen einer zirkadianen Rhythmik [17].

Während der akuten Entzündungsreaktion wandern PMN innerhalb einer fein abgestimmten Kaskade aus dem Blutstrom an den Ort der Entzündung. Dort angekommen können sie Infektionen mit einem breiten Arsenal an Mechanismen, welche u.a. Phagozytose, Produktion von *Reactive Oxygen Species* (ROS), Freisetzung von antimikrobiellen Peptiden sowie die Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) umfassen, bekämpfen [18-21]. Die besondere Bedeutung der PMN zeigt sich durch eine schwere Immundefizienz bei einem kritischen Abfall ihrer Anzahl im menschlichen Organismus [12, 22, 23]. Die erfolgreiche Beseitigung des schädlichen Agens leitet die Auflösung der Entzündung und Reparatur des Gewebes ein [24]. Darüber hinaus spielen PMN auch eine Rolle bei anti-inflammatorischen Prozessen, Wundheilung, Autoimmunerkrankungen, Atherosklerose, Angiogenese, Hämostase, bei der Steuerung des erworbenen Immunsystems sowie bei Tumorwachstum und Metastasierung [21, 25-31].

## 1.2 Die physiologische Rekrutierungskaskade der Leukozyten

### 1.2.1 Die Schritte der Leukozytenrekrutierung

Ein zentraler Bestandteil der Entzündungsreaktion ist die orchestrierte Rekrutierung von PMN an den Entzündungsort. Die drei Schritte der Auswanderung von Leukozyten, Rollen, Adhäsion sowie Transmigration, wurden bereits im 19. Jahrhundert beschrieben, jedoch konnte erst mit Entdeckung der Selektine, Integrine und Chemokine ein vollständiges Konzept auf molekularer Ebene entwickelt werden [13]. Dieses umfasst in den meisten Geweben eine konsekutive Abfolge der Schritte, Einfangen, Rollen, Induktion der Adhäsion, Abflachen und Verstärkung der Adhäsion, intraluminale Migration, Transmigration, abluminale Migration sowie interstitielle Migration (Abbildung 1) [12, 13, 32]. Die Auswanderung der PMN findet vor allem in den postkapillären Venolen der Mikrozirkulation statt, jedoch konnte im Fall der Atherosklerose auch eine Rekrutierung im arteriellen System beobachtet werden [33, 34]. Ein genaues Verständnis der Auswanderung von Leukozyten mit den beteiligten Adhäsionsmolekülen und Signalkaskaden ist für die Entwicklung von therapeutischen Interventionen bedeutsam [13]. So verhindern z.B. monoklonale Antikörper spezifisch die Auswanderung von Leukozyten und ermöglichen dadurch die Behandlung von chronischen Entzündungszuständen [13].



**Abbildung 1: Die Rekrutierungskaskade von PMN** modifiziert nach Schymeinsky et al., 2011 [35]. Die Darstellung zeigt die aufeinanderfolgenden Schritte der Rekrutierung von PMN, welche als Rollen, Adhäsion, Abflachen/Verstärkung der Adhäsion, intraluminale Migration, Transmigration, abluminale Migration sowie interstitielle Migration bezeichnet werden. Am Ort der Entzündung beseitigen die PMN Pathogene mit verschiedenen Mechanismen z.B. Phagozytose.

### 1.2.1.1 Bedeutung der Selektine und Entzündungsmediatoren

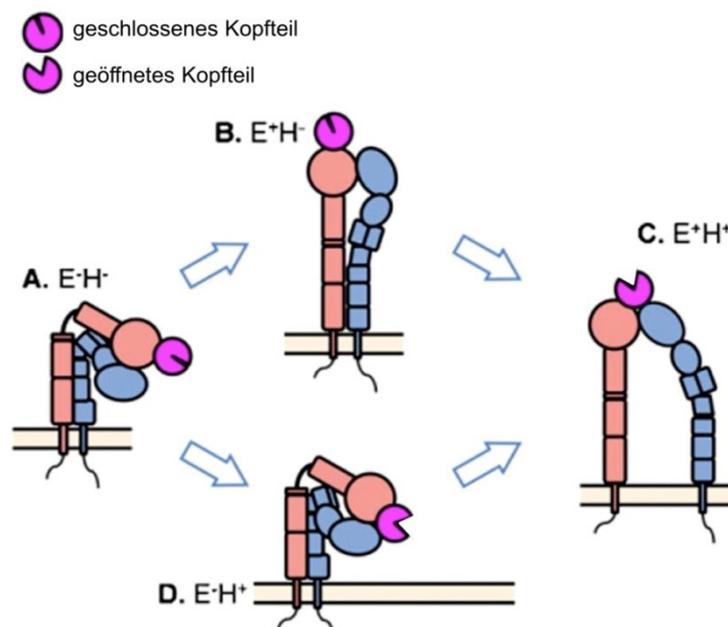
Die Initiierung der „klassischen“ Rekrutierungskaskade erfolgt durch eine Reihe von Signalen, welche von geschädigten Zellen (*Damage-associated Molecular Patterns*, DAMPs) oder pathogenen Erregern (*Pathogen-associated Molecular Patterns*, PAMPs) stammen [36, 37]. Gewebeständige Leukozyten wie Mastzellen, Makrophagen und Dendritische Zellen erkennen diese anhand spezifischer Muster und setzen inflammatorische Mediatoren frei [32, 37, 38]. Eine Folge ist die Aktivierung von Endothelzellen, die mit einer erhöhten Expression von P- und E-Selektinen auf der intraluminalen Zelloberfläche einhergeht [37, 39]. Selektine sind eine Familie aus Calcium-abhängigen, Typ 1-transmembranären Glykoproteinen und werden entsprechend ihrem Expressionsort als E-Selektin (Endothel), P-Selektin (Plättchen, Endothel) sowie L-Selektin (Leukozyten) bezeichnet [13, 40-42]. P-Selektin wird in sekretorischen Granula, den Weibel-Palade-Körperchen (Endothel) oder  $\alpha$ -Granula (Plättchen) gespeichert und kann durch Fusion mit der Plasmamembran innerhalb von Minuten auf die Zelloberfläche transportiert werden, während E-Selektin innerhalb von 90 min *de novo* synthetisiert werden muss [32, 43-45]. Die hämodynamischen Veränderungen mit reduziertem Fluss in den entzündeten postkapillären Venolen erhöhen die Chance der PMN mit dem Endothel in Kontakt zu gelangen [6, 46]. Durch Bindung an den Liganden *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1* (PSGL-1) auf den PMN vermitteln P- und E-Selektin das Einfangen sowie den nachfolgenden Schritt des Rollens auf dem Endothel [32, 47]. Trotz verzögerter Expression überlappen die Funktionen der beiden Adhäsionsmoleküle, wobei E-Selektin spezifisch zu einem langsamen Rollen der PMN führt [13, 42, 48]. Im Gegensatz zu P- und E-Selektin, welche zum direkten Einfangen der PMN beitragen, vermittelt L-Selektin das sekundäre Einfangen von PMN im Blutstrom über bereits rollende Leukozyten [12, 13, 49]. Während des Rollens ist sowohl eine schnelle Bildung als auch Lösung der Bindungen zwischen PMN und Endothelzellen notwendig, da sie einer Schubspannung von 1-10 dyne/cm<sup>2</sup> ausgesetzt sind [12, 50]. Zur Verlangsamung und Stabilisierung des Rollprozesses tragen lange Membranausstülpungen bei, welche sich am hinteren Zellabschnitt ausbilden (*Tethers*) [12]. Während des Rollens können sie über die Zelle hinweg nach vorne schwingen und anschließend wieder am Endothel adhären (*Slings*) [12, 32, 51-53]. Das Rollen ermöglicht PMN den Kontakt mit Chemokinen, welche als positiv geladene Moleküle an dem negativ geladenen Heparansulfat der Endothelzellen immobilisiert sind und einen intraluminalen Gradienten ausbilden [12, 54]. Das Heparansulfat bildet dabei einen Teil der Glykokalyx und schützt die Moleküle vor einem Abwaschen durch den Blutstrom [12]. Die Bindung der Chemokine an spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) z.B. *C-X-C Chemokine Receptor Type 2* (CXCR2) führt innerhalb von Millisekunden zu einer Voraktivierung der Zelle [13, 37, 55]. Dabei wird eine Vielzahl an Mechanismen, wie Hochregulation der Integrinexpression, zytoskelettale Reorganisation, metabolische Aktivität sowie Expression von Rezeptoren und

weiteren Molekülen induziert [37, 56-58]. Die vollständige Zellaktivierung erfolgt nach Kontakt mit weiteren inflammatorischen Stimuli z.B. N-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) und umfasst die Abwehrmechanismen, welche im Kapitel 1.2.4 beschrieben werden [37, 56, 59].

### 1.2.1.2 Bedeutung der Integrine

Der entscheidende Schritt für die Induktion der Adhäsion von rollenden PMN ist die Aktivierung der  $\beta_2$ -Integrine. Dies sind nichtkovalent verbundene  $\alpha\beta$ -Heterodimere, welche jeweils aus einer großen extrazellulären Ektodomäne sowie einer transmembranären und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne bestehen [60, 61]. PMN exprimieren neben einer kleinen Menge an  $\beta_1$ - und  $\beta_3$ -Integrinen vor allem  $\beta_2$ -Integrine [61, 62]. Die Familie der  $\beta_2$ -Integrine hat eine herausragende Bedeutung für zahlreiche Rekrutierungsschritte der PMN und umfasst vier verschiedene  $\alpha\beta$ -Heterodimere:  $\alpha_L\beta_2$  (CD11a/CD18; *Lymphocyte Function associated Antigen 1*, LFA-1),  $\alpha_M\beta_2$  (CD11b/CD18; *Macrophage-1 Antigen*, Mac-1),  $\alpha_X\beta_2$  (CD11c/CD18; p150-95) und  $\alpha_D\beta_2$  (CD11d/CD18) [63-66]. An der kurzen intrazellulären Domäne erfolgt die Bindung von Signalmolekülen oder Adapterproteinen des Zytoskelettes, während das extrazelluläre N-terminale Ende der  $\alpha$ -Kette die Liganden-bindende I-Domäne enthält [60, 61]. Dies erlaubt Integrinen eine bidirektionale Kommunikation zwischen Zytoplasma und extrazellulären Liganden [66, 67]. Die Ligandenbindung benötigt dabei Metallionen wie  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$  als Cofaktoren, weshalb die entsprechende Domäne der  $\alpha$ -Kette auch als *Metal Ion-Dependent Adhesion Site* (MIDAS) bezeichnet wird [60, 61]. Die beiden für Adhäsion und Migration essenziellen  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 und Mac-1 binden verschiedene Liganden, zeigen jedoch mit *Intercellular Adhesion Molecule* (ICAM) 1, 2 und 4 sowie Kollagen auch gemeinsame Bindungspartner [42, 68, 69]. Nach Kontakt mit einem Stimulus, z.B. Chemokinen, ermöglichen Signalwege aus der Zelle an die Zelloberfläche die Aktivierung der  $\beta_2$ -Integrine (*Inside-out Signaling*) [66]. Dies erlaubt eine Konformationsänderung der Integrine, führt jedoch nicht direkt zu deren Umverteilung in der Plasmamembran (*Clustering*) [66]. Durch die Bindung von Liganden an  $\beta_2$ -Integrine kommt es wiederum zu einer Signaltransduktion in die Zelle mit zahlreichen Effekten auf die Zellfunktionen (*Outside-in Signaling*) [66, 70]. In diesem Zusammenhang bezeichnet die Affinität die Stärke einer einzelnen Rezeptor-Liganden-Bindung, während Avidität die Gesamtheit der Affinitäten beschreibt [61]. Es sind vier relevante Konformationszustände der  $\beta_2$ -Integrine bekannt: abgewinkelte Ektodomäne mit geschlossenem Kopfteil (E-H-; Ruhezustand mit niedriger Affinität), extendierte Ektodomäne mit geschlossenem Kopfteil (E+H-; intermediäre Affinität), extendierte Ektodomäne mit offenem Kopfteil (E+H+, hohe Affinität) sowie eine Struktur mit abgewinkelter Ektodomäne und offenem Kopfteil (E-H+) [66, 68, 71-74]. Die Abfolge der Konformationszustände während der Aktivierung wird durch das konventionelle

„Schnappmesser“- sowie das alternative „Schlossriegel“-Modell beschrieben (Abbildung 2) [68]. Bei dem konventionellen Modell ist die Ektodomänen-Extension mit nachfolgender Umordnung der MIDAS-Domäne für eine Kopfteilöffnung notwendig und geht der hoch-affinen Ligandenbindung voraus [60, 73, 75]. Im Gegensatz dazu erklärt das alternative Modell, dass Interaktionen zwischen Kopfteil und Schaft  $\beta_2$ -Integrine in der abgewinkelten Konformation arretieren [68, 76]. Eine Extension der Ektodomäne ist demzufolge nur nach Öffnung des Kopfteils möglich [68]. Die Hypothese unterstützen Ergebnisse, die auf rollenden humanen PMN Cluster an  $\beta_2$ -Integrinen in der abgewinkelten hoch-affinen Konformation (E-H+) zeigen [73, 77]. Diese interagieren mit ICAM-1 auf der gleichen Zelle, wodurch die Bindung des gegenüberliegenden, endothelialen ICAM-1 und damit die Adhäsion der PMN verhindert werden kann [73, 77]. Somit kann die abgewinkelte hoch-affine Konformation (E-H+) die Entzündungsreaktion durch einen endogenen anti-inflammatorischen Mechanismus abschwächen [73, 77].



**Abbildung 2: Die vier Konformationszustände der  $\beta_2$ -Integrine** modifiziert nach Fan et al., 2015 [68]. Das konventionelle „Schnappmesser“-Modell führt von der niedrig-affinen Konformation mit abgewinkelter Ektodomäne und geschlossenem Kopfteil (A) über die intermediär-affine Konformation mit extendierter Ektodomäne und geschlossenem Kopfteil (B) zur hoch-affinen Konformation mit extendierter Ektodomäne und offenem Kopfteil (C). Die hoch-affine  $\beta_2$ -Integrin-Konformation wird im alternativen „Schlossriegel“-Modell über eine Konformation mit abgewinkelter Ektodomäne und offenem Kopfteil (D) erreicht.

#### 1.2.1.2.1 *Inside-out Signaling*

Wie bereits erwähnt aktivieren auf dem Endothel immobilisierte Chemokine über GPCR auf rollenden PMN eine *Inside-out*-Signalkaskade, die zur Konformationsänderung der

$\beta_2$ -Integrine führt und im Folgenden nach dem konventionellen Modell beschrieben wird [13, 37, 60, 66]. Das  $\beta_2$ -Integrin LFA-1 kann bei niedrigen Chemokinkonzentrationen von der niedrig-affinen (E-H-) in die intermediär-affine (E+H-) Konformation wechseln und durch Interaktion mit ICAM-1 der Endothelzellen ein langsames Rollen vermitteln [37, 74]. Hohe Chemokinkonzentrationen ermöglichen die hoch-affine (E+H+) Konformation und damit Adhäsion der PMN an ICAM-1 [78]. Bei niedrigen Chemokinkonzentrationen verstärken zudem Interaktionen von endotheliale P- oder E-Selektin mit neutrophilem PSGL-1 die LFA-1-Aktivierung in die intermediär-affine (E+H-) Konformation, während diese bei hohen Konzentrationen Selektin-unabhängig erfolgt [68, 78]. Sowohl Selektine als auch Chemokine bewirken den Wechsel der niedrig-affinen (E-H-) Konformation in die intermediär-affine (E+H-) LFA-1-Konformation durch Rekrutierung des Adapterproteins Talin-1 an den zytoplasmatischen Teil der  $\beta$ -Untereinheit [12, 37, 78-80]. Dies führt zu einer räumlichen Veränderung des  $\beta_2$ -Integrins mit Separation der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit sowie Extension der Ektodomäne, wodurch das langsame Rollen der PMN ermöglicht wird [37, 60, 81]. Die Öffnung des Kopfteils und damit das Erreichen der hoch-affinen (E+H+) LFA-1-Konformation erfordert neben Talin-1 auch die Bindung des Adapterproteins Kindlin-3 an die  $\beta$ -Untereinheit [37, 80]. Eine weitere Voraussetzung für den Wechsel in die hoch-affine (E+H+) Konformation und damit die Adhäsion ist zudem die zytoskelettale Verankerung der  $\beta_2$ -Integrine mit dem kontraktilen Aktin-Myosin Apparat [66, 82]. Zytoskelettale Veränderungen führen durch laterale Zugkräfte nach Bindung von immobilisierten Liganden zu einem „Ausschwingen“ der  $\beta$ -Untereinheit, das die Konformationsänderung des Kopfteiles einleitet [66, 72, 83]. Spezifisch für humane PMN konnte eine Aktivierung der hoch-affinen (E+H+) LFA-1-Konformation nach Clustering von E-Selektin/L-Selektin-Bindungen beschrieben und damit ein Chemokin-unabhängiger Weg der Induktion der Adhäsion an ICAM-1 aufgezeigt werden [84, 85].

#### **1.2.1.2.2 *Outside-in Signaling***

Durch die Integrin-Ligandenbindung kommt es während der Adhäsion zur Umverteilung und zum Clustering der  $\beta_2$ -Integrine sowie zur Signaltransduktion nach intrazellulär (*Outside-in Signaling*) [60, 66]. Diese steuert verschiedene Zellfunktionen und trägt zur Verstärkung der Adhäsion sowie den nachfolgenden Schritten der Rekrutierung bei [13, 86]. Ein wichtiger Effekt ist die Änderung der Zellmorphologie durch Umordnung des Zytoskeletts, welche zur Abflachung und Polarisierung führt [12, 87]. Das Abflachen reduziert die dem Blutstrom und damit Scherkräften ausgesetzte Zelloberfläche [37]. Polarisierung bedeutet dabei die Ausbildung von Lamellipodien und Polymerisation von Aktin an der Zellfront, während es am Hinterende der Zelle (Uropod) zu Aktin-Myosin-Kontraktionen und einer Retraktion der Membran kommt [12, 88, 89]. Diese Polarisierung stellt die Voraussetzung für die sich anschließende Zellmigration dar [12]. PMN migrieren im Blutgefäß auf der Suche nach einem

passenden Ort der Transmigration zum Teil senkrecht zum Blutstrom entlang eines Gradienten an Chemokinen und Adhäsionsmolekülen [12, 90]. Dadurch können sie Endothelzellen auf kürzestem Weg überqueren, da diese längs dem Blutstrom ausgerichtet sind [12, 90, 91]. Die Interaktion von Mac-1 mit endothelialelem ICAM-1 ist für die Migration essenziell und Mac-1 wird dafür aus intrazellulären Speichern auf die Zelloberfläche umverteilt [12, 37, 90, 92]. Um die Adhäsion während des Migrationsprozesses aufrechtzuerhalten, müssen an der Zellfront neue Mac-1/ICAM-1-Verbindungen gebildet sowie am Uropod vorbestehende gelöst werden [12]. Dafür ist die Interaktion der  $\beta_2$ -Integrine mit dem Zytoskelett über Signalfaktoren wie dem Vav-1-Protein oder Aktin-bindenden Proteinen wie dem *Mammalian Actin-binding Protein 1* notwendig [12, 93-95].

### 1.2.1.3 Transmigration aus dem Blutgefäß an den Ort der Entzündung

Die Transmigration stellt den finalen Schritt der Auswanderung aus postkapillären Venolen dar [13]. Leukozyten transmigrieren bevorzugt an trizellulären Berührungspunkten der Endothelzellen, da die Verbindungsmoleküle z.B. Cadherine dort diskontinuierlich angeordnet vorliegen [12, 32, 96]. Emigrierende Leukozyten müssen drei Barrieren überwinden: Endothelzellen, Basalmembran sowie Perizyten [13]. Das Überwinden der Endothelzellbarriere erfolgt zu 90% über die parazelluläre Route innerhalb von 2-5 min, während 10% transzellulär migrieren [12, 13, 37, 97]. Das Durchdringen der Basalmembran, welche von Endothelzellen und Perizyten gebildet wird, erfordert 5-15 min [12, 32, 90]. Die parazelluläre Transmigration wird durch eine ansteigende Konzentration der intrazellulären Calciumionen in Endothelzellen erleichtert, indem durch die ausgelöste Zellkontraktion Endothelzellkontakte geöffnet werden [13, 37, 98]. Zudem wird durch schnelles Lösen und Wiederaufbauen der interendothelialen Verbindungen eine rasche Diapedese gewährleistet sowie eine erhöhte Permeabilität verhindert [12, 99]. An der erfolgreichen Transmigration ist eine Vielzahl an molekularen Interaktionen beteiligt. Neben der Bindung von Integrinen an ICAM-1, ICAM-2 sowie *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* spielen die Adhäsionsproteine *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1* sowie CD99 eine wichtige Rolle [12, 100]. Schlüsselstrukturen sind auch Adhäsionskontakte mit dem *Vascular Endothelial*-(VE)-Cadherin sowie Barrierekontakte mit den *Junctional Adhesion Molecules A-C* [37, 69, 100]. Obwohl der Großteil der Leukozyten den parazellulären Migrationsweg von luminal nach abluminal durchläuft, wurde auch eine reverse Migration nach intraluminal nachgewiesen [37, 101]. Die beteiligten Membranproteine der transzellulären Migrationsroute bestehen mit Ausnahme des VE-Cadherins aus den beschriebenen Molekülen der parazellulären Route [13, 102, 103]. Die Formation von vesikulo-vakuolären Organellen in Endothelzellen bildet zusammen mit dem Aktin-Zytoskelett „Kanäle“, welche die leukozytäre transzelluläre Emigration erlauben [13, 104]. Die PMN zeigen dabei eine hohe Flexibilität und passen sich durch eine lang gezogene Form an den Migrationskanal an [12, 105]. Endothelzellen bilden zur para- und

transzellulären Migration spezifische Mikrovilli-ähnliche Strukturen, welche PMN nahezu vollständig mit einer Kuppel (*Dome*) umhüllen können [12, 32, 106, 107]. PMN werden dabei jedoch nicht in das intrazelluläre Kompartiment aufgenommen. Somit ermöglicht diese endotheliale Struktur eine Transmigration bei intakter vaskulärer Barriere [12, 108]. Nach Penetration der Endothelzellbarriere müssen PMN die Basalmembran- als auch Perizytenbarriere überwinden [13]. Die Basalmembran besteht im Wesentlichen aus einem Netzwerk aus Laminin und Kollagen Typ IV, welches u.a. durch Heparansulfat-Proteoglykane verbunden wird [13, 109]. Innerhalb der Basalmembran gibt es Regionen mit niedriger Expression bestimmter Matrixproteine [13]. In Kombination mit größeren Abständen benachbarter Perizyten erleichtert dies die Emigration von PMN [13, 37, 110]. Perizyten können in entzündetem Gewebe nach Kontakt mit DAMPs oder PAMPs *Macrophage Migration-inhibitory Factor* freisetzen und dadurch die Interaktion von ICAM-1 auf Perizyten mit leukozytärem LFA-1 und Mac-1 fördern [13, 111, 112]. PMN migrieren entlang eines chemotaktischen Gradienten an den Ort der Infektion oder Verletzung und müssen dafür endotheliale von interstitiellen Chemokingradienten unterscheiden können [12, 54]. Dies erfolgt durch eine hierarchische Einteilung, wodurch PMN „intermediäre“ Chemokine wie *Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 8* (CXCL8) oder Leukotrien B4 von „Endziel-Signalen“ wie fMLP oder der Komplementkomponente C5a unterscheiden [12, 37, 113, 114]. PMN untersuchen zudem die extrazelluläre Matrix nach dem Weg des geringsten Widerstandes und nutzen dafür den Zellkern als größtes Zellkompartiment zur Unterscheidung der Porengrößen [115]. Am Ort der Entzündung beseitigen sie eindringende Organismen oder Gewebeschäden mit einem Arsenal an hocheffektiven Abwehrmechanismen (siehe Kapitel 1.2.4).

### **1.2.2 Abweichungen von der „klassischen“ Rekrutierungskaskade**

Die meisten Studien zur Erforschung der Rekrutierungskaskade wurden intravitalmikroskopisch an Geweben des *Musculus cremaster* (*M. cremaster*) oder des Mesenteriums im Mausmodell durchgeführt [12, 42]. Mit verbesserten Methoden und Untersuchungen verschiedener Organe konnte eine von der „klassischen“ Kaskade abweichende Rekrutierung beobachtet werden [12, 32]. In der Leber erfolgt die Rekrutierung von Leukozyten primär Selektin-unabhängig und ohne Rollen in sinusoidalen Kapillaren [12, 116, 117]. In der Lunge hängt der Einfluss der Selektine und Integrine auf die Auswanderung in den Kapillaren vom anwesenden Stimulus sowie dem verwendeten Entzündungsmodell ab [34]. Für die Rekrutierung in der Niere ist eine kritische Rolle für Plättchen beschrieben, wobei in der Nierenrinde PMN vor der Adhäsion rollen, während diese in den Glomeruli ohne vorhergehendes Rollen erfolgt [118, 119].

### 1.2.3 Leukozyten-Adhäsions-Defekte und ihre klinische Bedeutung

Die Relevanz der Adhäsionsmoleküle für eine effiziente Leukozytenrekrutierung zeigt sich besonders bei Adhäsionsdefiziten [120]. So sind die Syndrome des Leukozyten-Adhäsions-Defektes (LAD) durch einen Defekt der Adhäsions-abhängigen Funktionen von PMN und Monozyten gekennzeichnet [120]. Der Mangel oder Defekt an bedeutenden Molekülen durch genetische Mutationen führt dabei zu schweren Komplikationen im humanen Organismus wie eingeschränkter Wundheilung oder schweren wiederkehrenden Infektionen [120, 121]. Das LAD-I Syndrom ist durch Mutationen im Gen der  $\beta$ -Untereinheit der  $\beta_2$ -Integrine gekennzeichnet. Dies führt zu einer verminderten Anzahl oder gänzlich fehlenden  $\beta_2$ -Integrinen auf der leukozytären Zellmembran mit den klinischen Symptomen der Leukozytose, Infektionen, Parodontitis und verzögerter Ablösung des Nabelschnurstumpfes [121, 122]. Unbehandelt können diese Patienten an für den immunkompetenten Organismus harmlosen bakteriellen Infektionen versterben [121, 122]. Mutationen des GDP-Fukose-Transporters (SLC35C1) resultieren in einem Mangel an Fukose, das für die Synthese von Selektinliganden von Bedeutung ist [120]. Dieses LAD-II Syndrom zeigt ein Fehlen des P-, E- und L-Selektin-abhängigen Rollens der Leukozyten sowie eine Leukozytose, Infektionen, Parodontitis und durch die Abwesenheit von Fukose auf allen Glykoproteinen weitere Effekte wie mentale Retardierung [123-125]. Das LAD-III Syndrom wird durch eine funktionelle Nullmutation im für Kindlin-3 kodierenden Genom (FERMT3) beschrieben und verhindert die Aktivierung der hoch-affinen Konformation von  $\beta_2$ -Integrinen [120, 126, 127]. Dies führt bei unbeeinträchtigtem Rollen zu einem Defekt der Integrin-vermittelten PMN-Adhäsion und -Migration [21]. Klinisch zeigen sich – wie bei LAD I und II – eine deutliche Leukozytose sowie rezidivierende Infektionen [21]. Da die Defekte auch die Integrinaktivierung in Plättchen umfassen, ist eine erhöhte Blutungsneigung feststellbar [21]. Spezifisch für Monozyten konnte ein LAD-IV gezeigt werden, das bei Patienten mit zystischer Fibrose und damit Mutationen im *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* auftritt [128]. Neben den Symptomen der zystischen Fibrose zeigte sich eine defekte Aktivierung der Integrine  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_M\beta_2$  sowie  $\alpha_4\beta_1$  [128].

### 1.2.4 Effektorfunktionen der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN)

Ende des 19. Jahrhunderts wurde von E. Metchnikoff erstmals die Bedeutung der Phagozytose für die Immunreaktion demonstriert und die beteiligten Zellen entsprechend dem Erscheinungsbild des Kernes als polymorphonukleäre Leukozyten bezeichnet [129, 130]. PMN beseitigen Pathogene sowohl durch intra- als auch extrazelluläre Prozesse, welche neben der Rezeptor-vermittelten Phagozytose folgende drei weitere Mechanismen umfassen: Produktion von hochtoxischen ROS, Degranulation von Proteasen und antimikrobieller

Peptide sowie Auswerfen der mit antimikrobiellen Peptiden und Enzymen dekorierten DNA (NETs) [21, 130].

#### **1.2.4.1 Phagozytose**

Die Phagozytose ist der Hauptmechanismus der PMN zur Beseitigung von Pathogenen oder Zelldebris [130]. Es ist ein aktiver, Rezeptor-vermittelter Prozess, der Partikel in einer Vakuole – dem Phagosom –, einschließt [130, 131]. Die Interaktion mit dem Pathogen beginnt entweder direkt über die Erkennung von PAMPs oder indirekt Opsonin-vermittelt [130]. Opsonierung bezeichnet dabei die Bindung von IgG oder Komplementfaktoren an Pathogene und erlaubt die Interaktion mit spezifischen PMN-Rezeptoren [132, 133]. Nach Aufnahme in die PMN werden durch Fusion mit Granula zwei Hauptmechanismen des Phagosoms aktiviert: Produktion von ROS sowie Transport von antimikrobiellen Peptiden und Enzymen in die Vakuole [130, 134]. Das somit ausgereifte Phagosom der PMN besitzt einen neutralen pH-Wert, der sich im Vergleich zu den sauren Phagosomen der Makrophagen durch einen massiven oxidativen Burst durch Bildung von ROS erklären lässt und ein optimales Milieu für Proteasen schafft [21, 135]. Einige Pathogene haben Strategien gegen das toxische Milieu entwickelt, so stört z.B. *Helicobacter pylori* die Bildung der Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-(NADPH)-Oxidase am Phagosom [130, 136]. Phagozytose ist ein effektiver Mechanismus zur Bekämpfung von Infektionen, jedoch kann die Fusion von Granula mit Phagosomen vor dem vollständigen Membranverschluss zu Schäden im umliegenden Gewebe führen [21, 137].

#### **1.2.4.2 Reactive Oxygen Species (ROS)**

Nach Zellaktivierung werden am Phagosom die Bestandteile der NADPH-Oxidase zusammengeführt und der Sauerstoffverbrauch der PMN steigt mit Beginn der ROS-Bildung um den 50- bis 100-fachen Wert an (oxidativer Burst) [21, 138]. ROS, z.B.  $O_2^-$ ,  $HO\cdot$  oder  $H_2O_2$ , werden in die Vakuole gepumpt und bekämpfen sowohl durch direkte (Decarboxylierung, Deaminierung oder Peroxidierung) als auch indirekte Interaktion (Modulation der Proteaseaktivität) die Pathogene [12, 21, 139]. Ein weiteres Oxidantien-produzierendes Enzym ist die Myeloperoxidase (MPO), welche aus Hypochlorsäure (HOCl)  $H_2O_2$  produziert [12, 21, 140]. Für die Bekämpfung bestimmter Erreger z.B. *Aspergillus species* ist die NADPH-Oxidase-Aktivität unabhängig von antimikrobiellen Peptiden oder Proteasen notwendig und Patienten mit einem Mangel leiden an persistierenden Entzündungen mit Granulombildung (*Chronic Granulomatous Disease*) [12, 21, 141].

#### **1.2.4.3 Degranulation**

PMN speichern Proteasen und antimikrobielle Peptide in Granula, welche in das Phagosom oder nach extrazellulär freigesetzt werden können [21]. Generell werden vier Arten an

Granula unterschieden. Primäre oder azurophile Granula werden als Erste während der PMN-Reifung produziert und enthalten mit MPO ein wichtiges Enzym des oxidativen Burst [12, 130, 142]. Zudem sind sie mit Defensin, Lysozym sowie zahlreichen Serinproteasen wie Elastase, Protease 3 und Cathepsin beladen [130, 143]. Die sekundären oder spezifischen Granula sind durch den Eisenchelator Laktoferrin charakterisiert [130]. Sie werden während der PMN-Reifung zeitlich nach den azurophilen Granula gebildet und enthalten neben Lysozymen eine große Bandbreite an antimikrobiellen Substanzen [130, 143]. Tertiäre oder Gelatinase-Granula dienen vor allem als Speicherort für Matrix-Metalloproteasen (MMP) wie Gelatinase oder Leukolysin und werden wie die sekretorischen Vesikel gegen Ende der Zellreifung produziert [10, 130]. Die sekretorischen Vesikel unterscheiden sich von den „klassischen“ Granula durch ihre Bildung. Sie werden nicht wie primäre, sekundäre und tertiäre Granula aus dem Golgi-Apparat gebildet, sondern entstehen durch Endozytose und enthalten dadurch Plasma-assoziierte Proteine wie Albumin oder membrangebundene Adhäsionsmoleküle [130, 144]. Die Mobilisierung und Freisetzung der Granula folgt in Abhängigkeit vom Status der Zellaktivierung und -Rekrutierung einer bestimmten Reihenfolge [12, 130, 145]. Nach Kontakt mit dem Endothel stimulieren Selektine und Chemokine die Freisetzung von sekretorischen Vesikeln, deren Faktoren die Induktion der Adhäsion unterstützen [10, 130]. Während der Transmigration aus dem Blutgefäß werden tertiäre Granula freigesetzt und ermöglichen mit MMP die lokale Zersetzung der Basalmembran [130, 146]. Am Ort der Entzündung kommt es nach vollständiger Zellaktivierung zum oxidativen Burst und Freisetzung der primären und sekundären Granula [130]. Eine überschießende Degranulierung besonders der primären Granula kann zu einer systemischen Entzündungsreaktion führen, welche durch einen Anstieg des Markers MPO im Plasma gekennzeichnet ist [120, 147].

#### **1.2.4.4 *Neutrophil Extracellular Traps (NETs)***

Die Bildung von NETs bezeichnet einen evolutionär hochkonservierten Prozess der extrazellulären Pathogenabwehr, bei welchem PMN nach Anheftung von zytoplasmatischen und granulären Proteinen aktiv ein Netzwerk an Chromatin auswerfen (NETose) [20, 120]. Dabei lassen sich mit der sogenannten „suizidalen NETose“ und der „vitalen NETose“ Stimulusabhängig zwei unterschiedliche Mechanismen unterscheiden [148]. Die Aktivierung der „suizidalen NETose“ beginnt mit einer Zellstimulation durch z.B. Zytokine oder Bindung von PAMPs an Toll-like Rezeptoren. Die anschließende Produktion von Oxidantien führt zusammen mit den Enzymen Elastase und MPO zum Abbau der nukleären Hülle sowie der DNA-Dekondensation und Freisetzung in die Zelle [149]. Eine zentrale Rolle spielt das Enzym *Peptidyl Arginine Deiminase Type IV*, welches durch Citrullinierung von Histonen die Dekondensation ermöglicht [150]. Die negativ geladene DNA bildet schließlich das Gerüst für die Anlagerung der weiteren NET-Komponenten. Nach ihrer Bildung werden die NETs durch die lysierte Zellmembran ausgestoßen und der Zellrest abgebaut. Im Vergleich zur

ROS-Produktion oder Degranulation ist die „suizidale NETose“ ein langsamer Prozess und kann bis zu 2 h dauern [21, 151].

Die „vitale NETose“ kann durch bakterielle Erreger, z.B. *Staphylococcus aureus*, aber auch Lipopolysaccharide (LPS) induziert und innerhalb von 30 min abgeschlossen sein [151]. Dabei bleibt die Integrität der Plasmamembran bestehen, da die NETs in Vesikeln vom Nukleus abgeschnürt und ohne lytische Zersetzung der Membran nach extrazellulär transportiert werden [148, 152]. Funktionell sind diese anukleären PMN weiterhin zur Chemotaxis und Phagozytose von Bakterien fähig, jedoch zeigen sie abnormale Migrationsmuster und Zellmorphologien, was auf das Fehlen des Kernes und damit der zytoskelettalen Verankerung zurückgeführt werden könnte [12, 153].

Die antimikrobielle Funktion der NETs beruht sowohl auf der Lokalisation und dem Einfangen von Pathogenen mithilfe des Chromatinnetzwerkes, als auch der Freisetzung der angehefteten hochkonzentrierten Peptide und Enzyme [21]. Neben MPO und Elastase zählt hierzu insbesondere auch der Chelator Laktoferrin [21, 154]. Einige Bakterien besitzen Abwehrmechanismen und können durch Expression von DNAsen NETs abbauen oder durch Modifikation ihrer Kapsel deren Bindung reduzieren [21, 155, 156]. Exzessive NET-Produktion ist mit einer Vielzahl an klinischen Pathologien verknüpft, welche u.a. Sepsis, Thrombose und Myokarditis umfassen [21, 151, 157, 158]. Für Patienten mit einer Pneumonie durch *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2* (SARS-CoV-2) konnte gezeigt werden, dass aktivierte PMN und NETs in mikrovaskulären Thromben enthalten sind und an der systemischen Hyperkoagulabilität dieser Patienten beteiligt sein könnten [159, 160].

### 1.3 Das Zytokin Midkine (MK)

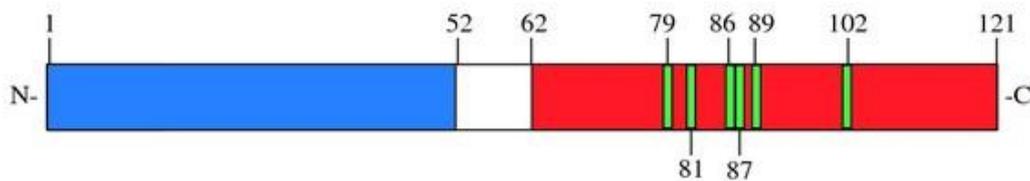
Die Entdeckung des Zytokins MK erfolgte im Jahr 1988 in embryonalen Karzinomzellen der Maus [161]. Eine Zugabe von Retinsäure ermöglichte in diesem Modell die Untersuchung der frühen embryonalen Stadien der Zelldifferenzierung [162, 163]. Die MK-Expression war dabei ausschließlich während der *Midgestation*-Periode der murinen Embryogenese erhöht [161, 164]. Dieser Nachweis führte zusammen mit der vorherrschenden Expression von MK in den Nieren des gesunden adulten Organismus zur Proteinbezeichnung Mid-kine (*Mid-gestation, Ki-dney*) [161, 164].

Auch funktionell ist MK nicht auf die embryonale Entwicklung begrenzt. In zahlreichen Studien war eine hohe MK-Expression in Tumorzellen mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert [161, 165-168]. Eine MK-Überexpression verstärkte Wachstum und Invasion sowie Angiogenese von Tumorgewebe [161, 169-171]. In septischen Patienten waren besonders bei Infektionen mit gram-positiven Bakterien MK-Serumkonzentrationen signifikant erhöht [161, 172]. Verschiedene Mechanismen erlauben MK zudem eine Verstärkung von akuten und chronischen Entzündungszuständen, welche nach einem Überblick über Struktur und Rezeptoren von MK dargestellt werden [163].

#### 1.3.1 Struktur von MK

Das humane MK-Protein ist ein Heparin-bindender Wachstumsfaktor mit einem Molekulargewicht von 13 kDa und besteht aus einer N-terminalen (Aminosäuren 1-52) sowie einer C-terminalen Domäne (Aminosäuren 62-121) [161, 173]. Diese sind durch eine Interdomäne (Aminosäuren 53-61) verbunden und enthalten jeweils drei antiparallele  $\beta$ -Stränge (Abbildung 3) [163, 173]. Zehn hochkonservierte Cysteinreste bilden fünf Disulfidbrücken (zwei in der C-terminalen sowie drei in der N-terminalen Domäne) und stabilisieren die Tertiärstruktur der Domänen [161, 173]. MK ist ein positiv geladenes Protein und enthält am C-Terminus zwei Heparin-bindende Cluster mit den basischen Aminosäuren Arginin (R) und Lysin (K) (Cluster 1: K79, R81, K102; Cluster 2: K86, K87, R89) [163, 173]. Durch die Interaktion der positiv geladenen Heparin-bindenden Cluster mit Heparin-ähnlichen Glykosaminoglykanen auf Endothelzellen kann MK auf der Gefäßwand immobilisiert werden [161, 174, 175]. Nach Gabe von Heparin waren die MK-Konzentrationen im Plasma im Vergleich zu den niedrigen MK-Konzentrationen bei gesunden Patienten signifikant erhöht [161, 175]. Dies deutet darauf hin, dass MK durch Heparin kompetitiv aus der Endothelbindung verdrängt und in den Kreislauf freigesetzt wird [161, 175]. Für die Vermittlung von einigen Funktionen wie die Verstärkung der Plasminogen Aktivator-Aktivität ist eine MK-Dimerisierung notwendig, bei welcher Heparin durch die Heparin-Bindestellen von zwei MK-Molekülen umschlossen wird [163, 173, 176]. MK bildet zusammen mit Pleiotrophin (PTN) eine eigene Familie an Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren und besitzt keine

strukturellen Ähnlichkeiten mit anderen Proteinfamilien [161, 177]. Die Heparin-bindenden Stellen sind in beiden Proteinen hochkonserviert und unterscheiden sich nur in einer basischen Aminosäure (K84 in MK, R84 in PTN) [161, 178]. Eine phylogenetische Analyse zeigte für humanes MK eine 87% Sequenzidentität mit murinem MK, während bei Vergleich von humanem MK mit PTN 50% der Sequenz identisch waren [161, 179].



**Abbildung 3: Schema der Primärstruktur von Midkine** nach Weckbach et al., 2011 [163]. Das Protein besteht aus einer N-terminalen Domäne (blau) sowie einer C-terminalen Domäne (rot), welche durch eine Interdomäne (weiß) verbunden sind. Die Heparin-bindenden Stellen bestehen aus basischen Aminosäuren und liegen in der C-terminalen Domäne (grün).

### 1.3.2 Rezeptoren von MK

MK vermittelt seine Funktionen über zahlreiche Rezeptoren, welche in Komplexen mit Co-Rezeptoren und weiteren Molekülen organisiert sind [163, 180]. Das transmembranäre Protein *Receptor-like Protein Tyrosine Phosphatase  $\beta$ /Protein Tyrosine Phosphatase  $\zeta$*  (RPTP $\beta$ /PTP $\zeta$ ) stellt einen wichtigen MK-Rezeptor dar und vermittelt die Migration von embryonalen Neuronen [163, 181, 182]. Dabei gibt es Hinweise, dass in die Signaltransduktion *Phosphatidylinositol 3-Kinase*, *Mitogen-activated Protein Kinase*, die Src-Familie sowie die Proteinkinase C involviert sind [161, 183]. Auch Mitglieder der *Low Density Lipoprotein* (LDL)-Rezeptorenfamilie (LRP1, LRP2, LRP6 sowie apoE-Rezeptor 2) wurden als Komponenten eines MK-Rezeptorkomplexes identifiziert [161, 184]. LRP1 verbesserte nach MK-Bindung die Lebensdauer von embryonalen Neuronen und führte auf PMN zu einer Konformationsänderung von  $\beta_2$ -Integrinen [163, 184, 185]. Obwohl keine direkte Bindung an  $\beta_1$ -Integrine nachgewiesen werden konnte, vermittelt MK die Migration von UMR-106 Osteoblasten-ähnlichen Zellen über  $\alpha_4\beta_1$ -Integrine sowie die Aussprossung von Neuriten embryonaler Neurone über  $\alpha_6\beta_1$ -Integrine [161, 186]. Die Tatsache, dass nach Gabe von Heparin MK vermehrt im Plasma nachgewiesen wurde, deutet auf eine Interaktion mit Glykosaminoglykanen hin [163, 175, 187]. Ebenso konnten Mitglieder der Heparansulfat-Proteoglykanfamilie der Syndecane und Glypicane als MK-Rezeptoren während der neuronalen Entwicklung nachgewiesen werden [161, 188, 189]. Die Bindung von MK an das Transmembranprotein Notch2 induziert den NF $\kappa$ B-Signalweg und deutet auf eine Rolle von MK in der Regulation der Entzündungsreaktion hin [161, 163, 190].

### 1.3.3 MK als Modulator der Entzündungsreaktion

Unter physiologischen Bedingungen wird MK im gesunden adulten Organismus restriktiv exprimiert [163]. Dies ändert sich im inflammatorischen Zustand und MK konnte während der Entzündungsreaktion in zahlreichen Organen nachgewiesen werden [163]. In Nierengewebe von Patienten mit diabetischer Nephropathie wurde in den entzündeten Glomeruli, Tubuli sowie dem Interstitium eine signifikant erhöhte MK-Expression im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe gefunden [163, 191]. Zudem war in einem Streptozotocin-induzierten Diabetes-Mausmodell der tubulointerstitielle Schaden in MK-defizienten Mäusen verglichen mit den Kontrolltieren reduziert [163, 191, 192]. Eine erhöhte MK-Expression konnte auch in entzündetem synovialen Gewebe von Patienten mit rheumatoider Arthritis im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe dargestellt werden [163, 193]. Weiterhin zeigte ein murines Arthritis-Modell nach Induktion der Entzündungsreaktion durch Injektion eines anti-Typ II Kollagen Antikörpers sowie LPS eine schwere Arthritis, während diese in MK-defizienten Mäusen nahezu abwesend war [163, 194, 195]. Bei der chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn wurde eine positive Korrelation zwischen hohen MK-Serumkonzentrationen sowie dem klinischen Aktivitätsindex nachgewiesen [163, 196]. MK stellt in diesem Zusammenhang einen sensitiven Biomarker dar, dessen diagnostischer Wert bei Morbus Crohn mit dem Goldstandard C-reaktives Protein vergleichbar ist [163, 196]. In einem Mausmodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), welches sich für das Studium der Multiplen Sklerose eignet, war die MK mRNA im Rückenmark im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant erhöht [161, 197]. Zudem führte eine MK-Defizienz zu einer Expansion von regulatorischen T-Zellen mit nachfolgender Suppression der autoreaktiven T-Helferzellen TH1 und TH17, welche eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Autoimmunreaktion im EAE-Modell spielen [163, 198]. Im Gefäßsystem führen Endothelschäden nach Stentimplantation zu einer Entzündungsreaktion mit Umbildung der Intima, welche zu einer Restenose führen kann [163, 199]. In einem Mausmodell wurde nach Endothelschädigung bei experimenteller Intervention im Vergleich zu Kontrollgefäßen eine erhöhte MK-Expression in der Gefäßwand dargestellt [161, 200]. Zudem konnte in MK-defizienten Mäusen nahezu keine Neointima-Formation nachgewiesen werden [163, 200]. Diese Beispiele zeigen eine erhöhte MK-Expression unter inflammatorischen Bedingungen und deuten auf eine Verstärkung der Entzündungsreaktion durch MK hin [161].

Ein gemeinsames Merkmal der genannten Entzündungsmodelle war bei MK-defizienten Tieren eine reduzierte Leukozyteninfiltration mit Abschwächung der Entzündungsreaktion [161, 195, 198, 200]. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte von Weckbach et al. 2014 aufgezeigt werden [185]. Im *M. cremaster*, einem etablierten Modell zur Untersuchung der Leukozytenrekrutierung *in vivo*, konnte in entzündeten postkapillären Venolen MK-defizienter Tiere eine Reduktion der Adhäsion sowie der nachfolgenden Extravasation

von PMN im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden [161, 185]. *In vitro* verstärkte immobilisiertes MK die Adhäsion von PMN durch Induktion der hoch-affinen Konformation der  $\beta_2$ -Integrine [185]. Hinweise auf den verantwortlichen Rezeptor ergaben sich, nachdem eine Blockade des LDL-Rezeptors LRP1 mit *Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-associated Protein* (LRPAP) die MK-vermittelte Induktion der hoch-affinen  $\beta_2$ -Integrin-Konformation verhinderte [158, 161, 185].

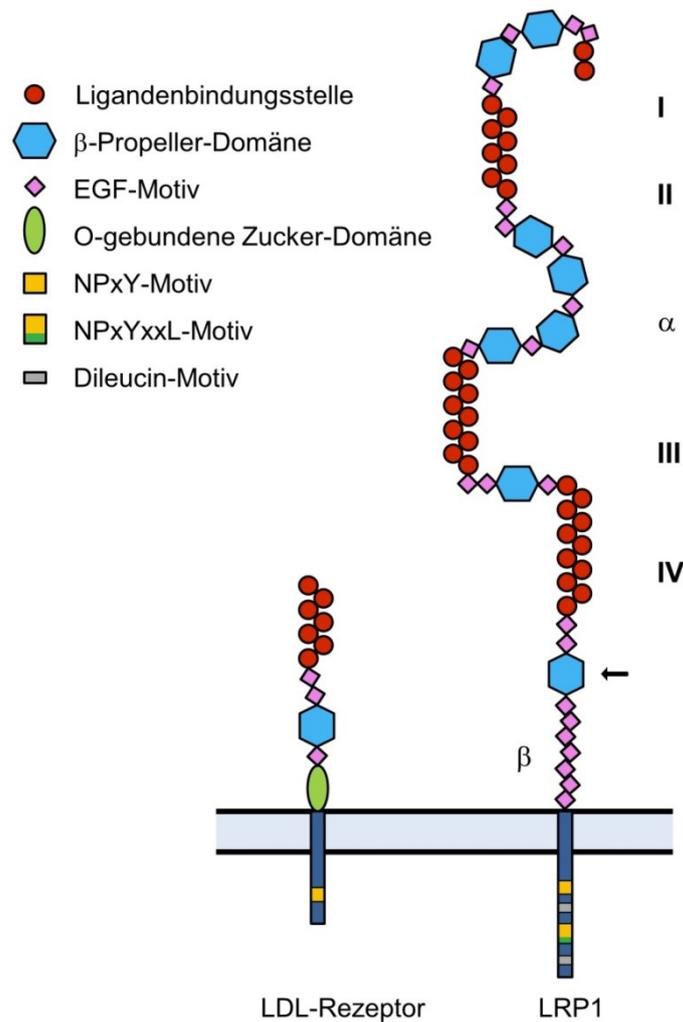
## 1.4 Der Transmembranrezeptor LRP1

Im Jahr 1988 wurde von J. Herz erstmals ein hepatischer Rezeptor mit großer Ähnlichkeit zu dem bereits bekannten LDL-Rezeptor identifiziert und als *LDL Receptor-related Protein* (LRP) bezeichnet [201, 202]. Für diesen Rezeptor, später auch LRP1 oder CD91 genannt, konnte zudem eine Bindung an Apolipoprotein E (ApoE) gezeigt und damit eine Rolle im Lipoproteinmetabolismus nachgewiesen werden [202, 203]. Parallel hierzu wurde in der Leber ein Rezeptor für die Aufnahme des  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Proteasekomplexes isoliert [202, 204, 205]. Eine Sequenzierung zeigte 1990 für beide Rezeptoren identische DNA-Sequenzen [202, 206, 207]. Während LRP1 ursprünglich als Endozytoserezeptor identifiziert wurde, konnten mit verschiedenen Mechanismen der Signaltransduktion weitere Funktionen aufgezeigt werden [202]. Inzwischen wurden über 100 Liganden mit hoch-affiner Bindung identifiziert und der Einfluss auf zahlreiche biologische Prozesse nachgewiesen [202, 208].

### 1.4.1 Struktur von LRP1

LRP1 ist Teil der LDL-Rezeptorenfamilie, welche strukturell hochkonservierte Rezeptoren mit modularem Aufbau umfasst [202]. Diese sind neben LRP1 der LDL- sowie *Very-low-density Lipoprotein*-Rezeptor, ApoE Rezeptor 2 (LRP8), *Multiple Epidermal Growth Factor-like Domains 7*, Glykoprotein 330 (LPR2, Megalin) sowie LRP1B [202]. Nach Synthese des glykosylierten transmembranären LRP1-Proteins mit 600 kDa im Endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgt die weitere Prozessierung im *trans*-Golgi Apparat [209]. Durch Bindung des 39 kDa Chaperons LRPAP wird im ER eine korrekte Proteinfaltung ermöglicht und eine vorzeitige Ligandenbindung während des Transports aus dem ER zum Golgi-Apparat verhindert [202, 210-212]. Dort dissoziiert LRPAP als Folge eines niedrigen pH-Wertes durch Protonierung von Histidinseitenketten [202, 213, 214]. LRP1 wird im *trans*-Golgi-Netzwerk durch eine Furin-Protease in die 515 kDa  $\alpha$ -Kette sowie die 85 kDa schwere  $\beta$ -Kette gespalten, welche nicht-kovalent assoziieren und eine funktionelle Einheit bilden [215]. Der reife Rezeptor setzt sich somit aus der extrazellulären  $\alpha$ -Kette und der  $\beta$ -Kette zusammen, welche aus einem kurzen extrazellulären Teil, einer transmembranären Domäne sowie der 100 Aminosäuren langen intrazytoplasmatischen Domäne (ICD) besteht (Abbildung 4) [202, 208]. Die Interaktion mit löslichen oder membrangebundenen Liganden wird über *Cysteine-rich*

*Complement-type Repeats* (CR) in der  $\alpha$ -Kette vermittelt [202]. Diese Ligandenbindungsstellen sind in vier Cluster angeordnet und werden von N-terminal als Domänen I – IV bezeichnet [202]. Die Cluster unterscheiden sich in ihrer Ladungsdichte sowie den hydrophoben Bereichen und ermöglichen dadurch eine Cluster-spezifische Ligandenbindung [202, 216]. Durch Bindeexperimente konnten die Cluster II und IV als bevorzugte Interaktionsstellen identifiziert werden [202, 217]. Die Liganden umfassen neben Wachstumsfaktoren (Midkine; *Platelet-derived Growth Factor*, PDGF) und Zytokinen (*Transforming Growth Factor*  $\beta$ ), Matrixproteine (Thrombospondin-1, Fibronectin) und Proteinkomplexe (*Tissue Plasminogen Activator/Plasminogen Activator Inhibitor-1*, tPA/PAI-1; Faktor VIII/Von-Willebrand-Faktor) [202]. An der hoch-affinen Ligandenbindung an die CR-Domänen sind besonders Lysine in der Struktur der Liganden beteiligt [202, 218, 219]. Die Bindung von LRPAP an die CR-Domänen blockiert die Interaktion aller LDL-Rezeptoren mit potenziellen Liganden [202, 212]. Neben den CR-Domänen besitzt die  $\alpha$ -Kette  $\beta$ -Propeller-Domänen welche an der pH-Wert gesteuerten Ligandenablösung in Endosomen beteiligt sind und von EGF-Motiven umgeben werden [202, 213, 220]. Dadurch wird eine individuelle Sortierung von Rezeptoren und Liganden in den frühen Endosomen ermöglicht. Die  $\beta$ -Kette enthält an der C-terminalen ICD Motive für die intrazelluläre Ligandenbindung, die Steuerung der Rezeptorinternalisierung sowie der Signaltransduktion und schließt ein YxxL-, zwei Dileucin- sowie zwei NPxY-Domänen ein [202]. Die proximale NPxY-Domäne ist an frühen Schritten der LRP1-Biosynthese beteiligt, während das distale NPxY-Motiv mit einem YxxL-Motiv überlappt und das primäre Endozytosesignal vermittelt [221-224]. Weiterhin sind am C-terminalen Ende zwei Dileucin-Motive angeordnet, wovon das distale Motiv unabhängig von der YxxL-Domäne ebenso an der Rezeptorendozytose beteiligt ist [221, 224]. *Sorting Nexin 17* (Snx17) ist ein wichtiger Regulator intrazellulärer Sortierungsprozesse und konnte als Ligand des proximalen NPxY-Motives nachgewiesen werden [224-227]. Nach Bindung steuert es über Recycling-Endosome die effiziente Rückführung von LRP1 an die Zelloberfläche [228]. Die NPxY-Motive stellen neben der Beteiligung am Endozytose-Recycling-Kreislauf einen wichtigen Interaktionspartner intrazellulärer Adapterproteine z.B. Fe65 oder *Disabled-1* (Dab1) dar [224, 229-231]. Die Steuerung der intrazellulären Ligandenbindung erfolgt dabei über spezifische Phosphorylierungen an den NPxY-Motiven [224, 232]. Die Vielzahl der intrazellulären Liganden sowie der Phosphorylierungsstatus der ICD ermöglichen eine effiziente Steuerung von Signaltransduktionsprozessen und der Endozytose [224].



**Abbildung 4: Struktur des LDL-Rezeptors und von LRP1** modifiziert nach Lillis et al., 2008 [202]. LRP1 besteht aus einer 515 kDa  $\alpha$ -Kette, welche mit der 85 kDa  $\beta$ -Kette nicht-kovalent verbunden ist. Vor dem Transport an die Zelloberfläche spaltet eine Furin-Protease (Pfeil) das LRP1-Vorläuferprotein im *trans*-Golgi-Netzwerk. Die  $\alpha$ -Kette enthält vier Liganden-bindende Cluster (I-IV) sowie  $\beta$ -Propeller-Domänen und EGF-Motive. Die  $\beta$ -Kette beinhaltet ein NPxY-Motiv, ein NPxYxxL-Motiv sowie zwei Dileucin-Motive und spielt in der Regulation der Endozytose sowie von Signaltransduktionsprozessen eine wichtige Rolle.

#### 1.4.2 Funktionen von LRP1

LRP1 interagiert mit zahlreichen extra- sowie intrazellulären Liganden und ist in verschiedene pathologische Prozesse wie Atherosklerose, Morbus Alzheimer, *Acute Respiratory Distress Syndrom* (ARDS) und Myokarditis involviert [158, 202, 233]. Es wird ubiquitär exprimiert und konnte in Leber, Gehirn, Niere, Lunge, Gefäßsystem, Herz und Immunzellen nachgewiesen werden [202, 234]. Eine systemische Deletion in der Maus führt zu einem frühembryonalen Tod der Tiere aufgrund massiver Blutungen um den Tag 13,5 der embryonalen Entwicklung und deutet auf eine kritische Rolle von LRP1 für die Entwicklung eines stabilen Gefäßsystems hin [202, 235, 236]. LRP1 vermittelt seine Funktionen über die drei molekularen Mechanismen Endozytose, proteolytische Prozessierung sowie Aktivierung von Adaptermolekülen, welche nachfolgend mit Beispielen erläutert werden.

### 1.4.2.1 Endozytose

Nach Ligandenbindung an reifes LRP1 in der Plasmamembran wird unter Beteiligung des YxxL- sowie distalen Dileucin-Motives die Clathrin-abhängige Endozytose eingeleitet [221, 237]. In der Leber können auf diese Weise zahlreiche extrazelluläre Moleküle aufgenommen werden, welche  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Proteasekomplexe, Faktor VIII und Lipoproteine wie Chylomikronen aus dem Plasma umfassen [238-241]. Hepatisches LRP1 ist somit an wichtigen Stoffwechselwegen beteiligt und für die Aufrechterhaltung der Homöostase notwendig [202]. LRP1 wird in Neuronen exprimiert und interagiert mit dem Transmembranprotein *Beta-amyloid Precursor Protein* (APP) [202]. Das Adapterprotein Fe65 verbindet dabei APP mit LRP1 am Membran-distalen NPXY-Motiv der ICD [202, 242]. Nach Endozytose ermöglichen im Endosom ansässige Proteasen eine vermehrte APP-Proteolyse und damit Produktion von *Beta-amyloid* (A $\beta$ ) [202, 243]. LRP1 und die A $\beta$ -Peptide werden an die Zelloberfläche zurückgeführt und freigesetzt [202]. Da die extrazelluläre Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der Morbus Alzheimer spielt, ist LRP1 durch Regulation der A $\beta$ -Peptidkonzentration an der Entstehung beteiligt [202, 244-246].

### 1.4.2.2 Proteolytische Prozessierung

Sobald das reife LRP1 in der Plasmamembran verankert ist, kann durch Proteasen wie *Beta-site APP Cleaving Enzyme 1* (BACE1) oder *A Disintegrin And Metalloproteinase* (ADAM) eine lösliche extrazelluläre Domäne (*soluble*, sLRP1) abgespalten werden [237, 247, 248]. Das sLRP1 besteht aus der  $\alpha$ -Kette, welche mit einem 55 kDa Fragment der  $\beta$ -Kette verbunden ist und im Plasma sowie *Liquor cerebrospinalis* nachweisbar ist [237, 249-251]. In geschädigtem peripherem Nervengewebe konnte sLRP1 nach Abspaltung von Schwann-Zellen neuropathischen Schmerz durch Blockade der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )-Reaktion abschwächen [241, 252]. Bei entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis oder systemischen Lupus erythematoses trug sLRP1 durch Induktion der Expression inflammatorischer Zytokine von Makrophagen zum Krankheitsfortschritt bei [241, 253]. In bronchoalveolärer Lavage von Patienten mit ARDS war die Konzentration von sLRP1 erhöht und führte durch Blockade der Endozytose von Matrix-Metalloproteasen zu einer weiteren Lungengewebsschädigung [233, 241, 254].

Die nach extrazellulärer Proteolyse in der Membran verbleibende  $\beta$ -Kette kann mittels Presenilin-abhängiger  $\gamma$ -Sekretase abgespalten und nach Translokation in den Zellkern die Transkription regulieren [202, 255, 256]. Im Gegensatz zu den pro-inflammatorischen Effekten des extrazellulären sLRP1 transloziert die ICD an den Interferon- $\gamma$ -Promotor, unterdrückt die Expression des Zytokins und damit auch die Entzündungsreaktion [241, 253, 256, 257]. Durch Okklusion der *Arteria cerebri media* konnte im Mausmodell eine erhöhte

$\gamma$ -Sekretase-Aktivität festgestellt und die nukleäre Translokation der ICD mit apoptotischem Zelltod der Neurone korreliert werden [241, 258].

#### **1.4.2.3 Bindung von Adaptermolekülen**

Nach extrazellulärer Ligandenbindung dienen die NPxY-Motive der ICD als Bindestellen für Adaptermoleküle und ermöglichen die intrazelluläre Signaltransduktion [237]. So kann z.B. Dab1 direkt an das distale NPxY-Motiv binden und Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen wie Src oder Abl aktivieren [237]. Es konnte als wichtiger Signalgeber für die Positionierung migrierender Neurone während der Gehirnentwicklung nachgewiesen werden [208, 231].

LRP1 kann über Adaptermoleküle andere Membranproteine binden oder deren Aktivität modulieren [234]. Dies erlaubt LRP1 die Signalwege anderer Rezeptoren für die Vermittlung von Effekten zu nutzen [237]. Neben *Tropomyosin Receptor Kinase A* wurden APP, *Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*, *N-methyl-D-aspartate*, Integrine (siehe 1.4.3) sowie *Platelet-derived Growth Factor Receptor*  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ) als Corezeptoren identifiziert [202, 237, 242, 259-262]. Wachstumsfaktoren der PDGF-Familie stellen ein potentes Mitogen für glatte Muskelzellen (SMC) und Fibroblasten dar [263, 264]. In atherosklerotischen Läsionen stimuliert PDGF die Migration von SMC aus der Media in die Intima und regt diese zur Proliferation sowie Produktion von Matrixmolekülen an [199, 202, 265]. LRP1 stellt einen physiologischen Modulator des PDGF-Signalweges dar [202, 260]. Nach Phosphorylierung des distalen NPxY-Motives der ICD über den PDGF-Rezeptor vermittelt nach Lillis et al. das Adaptermolekül Shc die Signaltransduktion über die Aktivierung von Ras und *Mitogen-activated Protein*-Kinase [266]. Eine gewebespezifische Deletion von LRP1 in SMC führte in Mäusen mit LDL-Rezeptor-Defizienz zu SMC-Proliferation, Aneurysmabildung sowie Anfälligkeit für Cholesterol-induzierte Atherosklerose [202, 266, 267]. Diese Effekte konnten mit dem Inhibitor der PDGF-Signalkaskade Gleevec verhindert werden [202, 266, 267]. LRP1 hat somit eine wichtige Rolle in der Regulation der PDGF-Rezeptoraktivität und wirkt atheroprotektiv [202, 266].

#### **1.4.3 LRP1 und Integrine**

Integrine spielen für die Zelladhäsion- und Migration eine herausragende Rolle und interagieren mit LRP1 [202]. LRP1 kann die Integrin-Funktion durch direkte Interaktion oder über Kooperation mit anderen Molekülen z.B. Thrombospondin (TSP) modulieren [202]. In einer Fibrosarkom-Zelllinie konnte LRP1 die Zellmigration durch Vermittlung von Endozytose und Recycling der Integrine beeinflussen [266, 268]. Dies erfolgte nach Formation eines Komplexes aus PAI-1 und *Urokinase Plasminogen Activator* (uPA)/uPA-Rezeptor an Integrine [202, 266]. Nach Komplexbildung steuerte LRP1 die Internalisierung, welche durch Akkumulation von  $\beta_3$ - und  $\beta_5$ -Integrinen in Endosomen nachgewiesen wurde [202]. Die Aufhebung der Akkumulation durch anti-LRP1-IgG oder LRPAP zeigte, dass LRP1 für die PAI-1-/uPA-

induzierte Endozytose von Integrinen verantwortlich war [202, 266, 268]. TSP ist ein Protein der extrazellulären Matrix und fördert die Zellmigration durch Bildung eines Komplexes mit LRP1 und Calreticulin [202, 266]. Dies führt zum Abbau von fokalen Adhäsionskontakten aus Integrin-Clustern mit Ablösung der Zelle von der Matrix [266, 269, 270]. Die Abhängigkeit der TSP-vermittelten Zellmigration von LRP1 und Calreticulin wurde durch Blockade der TSP-vermittelten Migration durch LRPAP sowie mit Calreticulin- und LRP1-defizienten Fibroblasten gezeigt [202, 266, 271].

In murinen embryonalen Fibroblasten (MEF) konnte bei Abwesenheit von LRP1 eine reduzierte  $\beta_1$ -Integrin Oberflächenexpression gezeigt werden [202, 272]. Im Gegensatz dazu war der zelluläre Gesamtgehalt unverändert und  $\beta_1$ -Integrine wurden vermehrt im ER nachgewiesen [202, 272]. Dies deutet auf eine Rolle von LRP1 in der posttranslationalen Prozessierung sowie dem Transport von  $\beta_1$ -Integrinen an die Zelloberfläche hin [202, 272]. LRP1 vermittelt auch die Endozytose von  $\beta_1$ -Integrinen [224]. Dies konnte durch Akkumulation von LRP1 und  $\beta_1$ -Integrin auf der Oberfläche von MEF mit einer *knock-in* (ki) Mutation am distalen LRP1-NPXYxxL-Motiv gezeigt werden, welches zugleich als Interaktionsdomäne identifiziert wurde [224]. Funktionell führte die vermehrte  $\beta_1$ -Integrin-Oberflächenexpression zu gesteigerter Zelladhäsion sowie reduzierter Migration. Dies kann durch vermehrte fokale Adhäsionspunkte, eine gesteigerte Phosphorylierung der fokalen Adhäsionskinase sowie reduzierte MMP-Aktivität erklärt werden [224, 273].

Auf Leukozyten wurde eine direkte Interaktion von LRP1 mit den  $\beta_2$ -Integrinen LFA-1 und Mac-1 beobachtet [202, 274-276]. LRP1 interagiert mit den I-Domänen der  $\beta_2$ -Integrine und ist in der monozytären Zelllinie U937 am LFA-1 Clustering sowie der Zelladhäsion beteiligt [202, 274]. Weckbach et al. konnten 2014 das Zytokin Midkine als potenziellen Vermittler zwischen LRP1 und  $\beta_2$ -Integrinen identifizieren [185]. Durch LRP1-Blockade konnte die Stabilisierung der hoch-affinen Konformation von  $\beta_2$ -Integrinen über immobilisiertes Midkine verhindert werden [185, 277]. Trotz dieser Hinweise ist der genaue molekulare Mechanismus, wie MK in Abhängigkeit von LRP1  $\beta_2$ -Integrine und davon abhängige Schritte der Rekrutierung beeinflusst, unklar [185].

## 1.5 Fragestellung

Der Transmembranrezeptor LRP1 ist Teil der LDL-Rezeptorenfamilie und vermittelt neben der Endozytose zahlreiche Signaltransduktionsprozesse. Durch Interaktion mit extra- sowie intrazellulären Liganden und die Fähigkeit andere Transmembranrezeptoren wie Integrine regulieren zu können, ist LRP1 an einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Prozesse beteiligt. In Vorarbeiten konnte eine pharmakologische Blockade von LRP1 die MK-vermittelte Induktion der hoch-affinen  $\beta_2$ -Integrin-Konformation auf PMN *in vitro* verhindern. Dies führte zu der Hypothese, dass LRP1 als funktionell relevanter Rezeptor der MK-vermittelten und  $\beta_2$ -Integrin-abhängigen Rekrutierung von PMN im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion agiert [185]. Um die exakte Rolle von LRP1 zu untersuchen, sollte im ersten Schritt dieser Arbeit die Etablierung eines LRP1-defizienten Maus- und Zellmodells erfolgen. Hierzu sollten LysM-Cre/LRP1<sup>fl/fl</sup>- sowie Vav-iCre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse genotypisch und phänotypisch charakterisiert werden. Darüber hinaus sollte die LRP1-Expression in Hoxb8-SCF-Zellen nach Generation aus Vav-iCre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen sowie in Hoxb8-FL-Zellen nach Ausschaltung des LRP1-Gens mittels CRISPR/Cas9 untersucht werden. In einem zweiten Schritt sollten LRP1 und  $\beta_2$ -Integrine auf PMN molekular charakterisiert werden. Hierzu sollte mittels Durchflusszytometrie die LRP1-Expression und Regulation analysiert sowie die Rolle von LRP1 für die Expression von  $\beta_2$ -Integrinen aufgeklärt werden. In dem dritten Schritt sollten die generierten LRP1-defizienten Zellen einer funktionellen Charakterisierung zugeführt werden. Hierzu sollte die exakte Lokalisation von LRP1 und  $\beta_2$ -Integrinen während der Induktion der Adhäsion konfokalmikroskopisch dargestellt werden. Schließlich sollte die Regulation der hoch-affinen Konformation der  $\beta_2$ -Integrine durch das Bindeverhalten von ICAM-1 und Fibrinogen durchflusszytometrisch analysiert werden. Abschließend sollte der Einfluss von LRP1 auf die einzelnen Schritte der Rekrutierungskaskade in Mikrofluskkammern in Abhängigkeit verschiedener Stimuli untersucht werden.

Zusammenfassend soll diese Studie zu einem besseren Verständnis der funktionellen Bedeutung von LRP1 für die MK-vermittelte Rekrutierung von PMN im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion beitragen und dadurch die Entwicklung neuer Strategien für die Behandlung von akuten und chronischen Entzündungszuständen ermöglichen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Produkt	Hersteller
2-Estradiol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Acrylamid (30%)/Bis-Lösung	Applichem, Darmstadt, DEU
Agarose	Genaxxon bioscience, Ulm, DEU
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
BD FACS Lysing Solution (10 x Konzentrat)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Bromphenolblau	Applichem, Darmstadt, DEU
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth, Karlsruhe, DEU
Diisopropylfluorophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimethylsulfoxid	Applichem, Darmstadt, DEU
Dithiothreitol	Applichem, Darmstadt, DEU
dNTP Mix (je 10 mM)	New England Biolabs, Ipswich, USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin, DEU
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, DEU
Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Fettfreies Trockenmilchpulver	Töpfer, Dietmannsried, DEU
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, Chicago, USA
GeneRuler 1 kbp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Glukose	Roth, Karlsruhe, DEU
Glycerol	Applichem, Darmstadt, DEU
Glycin	Applichem, Darmstadt, DEU
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom, Berlin, DEU
Heparin-Natrium 25.000	Ratiopharm, Ulm, DEU
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth, Karlsruhe, DEU
KAPA2G Fast HotStart ReadyMix	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ketamin	Inresa, Freiburg, DEU
Lipofektamin 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	AppliChem, Darmstadt, DEU
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	AppliChem, Darmstadt, DEU
Methanol	Th.Geyer, Renningen, DEU
Midori Green	Nippon, Tokyo, Japan
Natriumacetat	Applichem, Darmstadt, DEU
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt, DEU
Natriumdesoxycholat	Applichem, Darmstadt, DEU
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Applichem, Darmstadt, DEU
Natriumfluorid	Applichem, Darmstadt, DEU
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Opti-MEM I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin	Biochrom, Berlin, DEU
Percoll	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PermaFluor Eindeckmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Phosphate Buffered Saline (PBS)	Biochrom, Berlin, DEU
Ponceau S Lösung	Appllichem, Darmstadt, DEU
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Puromycin Dihydrochlorid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Random Hexamer Primer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNaseOUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RPMI 1640 (mit NaHCO <sub>3</sub> Phenolrot und Glutamin)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Streptomycin	Biochrom, Berlin, DEU
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Appllichem, Darmstadt, DEU
Tris-HCl	Appllichem, Darmstadt, DEU
TritonX-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Trizma base (Tris)	ApplChem, Darmstadt, DEU
Trypsin/EDTA	Biochrom, Berlin, DEU
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xylazin	Bayer, Leverkusen, DEU

### 2.1.2 Rekombinante Proteine

Produkt	Hersteller
Alexa Fluor 647-konjugiertes humanes Fibrinogen	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Interleukin-8 (IL8)	R&D Systems, Minneapolis, USA
Murines (m)G-CSF	PeproTech, Rocky Hill, USA
mIL-3	PeproTech, Rocky Hill, USA
mIL-6	PeproTech, Rocky Hill, USA
fMLP	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Rekombinantes (r) humanes (h)TNF $\alpha$	R&D Systems, Minneapolis, USA
rmTNF $\alpha$	R&D Systems, Minneapolis, USA
rhLRPAP	Antibodies-online, Aachen, DEU
Rekombinantes (r) humanes (h) MK	PeproTech, Rocky Hill, USA
rmCXCL1	R&D Systems, Minneapolis, USA
rmGM-CSF	PeproTech, Rocky Hill, USA
rmICAM-1 ohne Fc	Stemcell, Vancouver, Kanada
rmICAM-1/Fc	R&D Systems, Minneapolis, USA
rmLRPAP	R&D Systems, Minneapolis, USA
Rekombinantes (r) murines (m) MK	PeproTech, Rocky Hill, USA
rmP-Selektin/FC	R&D Systems, Minneapolis, USA

### 2.1.3 Puffer, Lösungen und Medien

Produkt	Additive
10 % Trenngel	33 % (v/v) Acrylamid /Bis Lösung 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8 0,1 % (w/v) SDS 0,05 % Ammoniumpersulfat (APS) 0,05 % Tetramethylethylendiamin (TEMED) in H <sub>2</sub> O
5 % Sammelgel	16,5 % (v/v) Acrylamid /Bis Lösung 62.5 mM Tris-HCl, pH 6,8 0,1 % (w/v) SDS 0,05 % Ammoniumpersulfat (APS) 0,05 % Tetramethylethylendiamin (TEMED) in H <sub>2</sub> O
Adhäsionsmedium I	20 mM HEPES 0,25 % BSA 0,1 % Glukose in HBSS
Adhäsionsmedium II	20 mM HEPES 0,25 % BSA 0,1 % Glukose 1,2 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> in HBSS
Agarosegel	1,5 % Agarose 1 µg/ml Midori Green in 1 x TAE Puffer
BD FACS Lysing Solution (1 x)	1:10 Verdünnung mit H <sub>2</sub> O des 10 x Konzentrates
FACS Puffer	1 mM CaCl <sub>2</sub> 1 mM MgCl <sub>2</sub> 1% BSA in HBSS
FL-Proliferationsmedium	1 µM 2-Estradiol 30 µM 2-Mercaptoethanol 5 % FLT3L Überstand (B16-Zellen) in RPMI 1640
Laufpuffer	2 M Glycin 250 mM Tris 1% (w/v) SDS in H <sub>2</sub> O
Lysepuffer	25 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 1 % TritonX-100 1 % Natriumdesoxycholat 1 mM Dithiothreitol 1 x Protease Inhibitor Cocktail 1 mM Diisopropylfluorophosphat 100 µM Natriumfluorid 200 µM Natriumorthovanadat in H <sub>2</sub> O
Monozyten-Isolationspuffer	0,5 % BSA 2 mM EDTA in PBS

RPMI 1640+	10 % (v/v) FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin in RPMI 1640
SCF-Proliferationsmedium	1 µM 2-Estradiol 30 µM 2-Mercaptoethanol 2 % SCF Überstand (CHO-Zellen) in RPMI 1640
SDS Probenpuffer (2 x)	200 mM Tris-HCl 400 mM Dithiothreitol 8 % (w/v) SDS 0,4 % (w/v) Bromphenolblau 40 % (v/v) Glycerol 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol in H <sub>2</sub> O, pH 6,8
Transferpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris 20% (v/v) Methanol in H <sub>2</sub> O
Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20 (TBST)	25 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0.02% (v/v) Tween 20 in H <sub>2</sub> O
Tris-Acetat-EDTA- (TAE) Puffer (50 x Konzentrat)	2 M Tris 1 M Natriumacetat 62.5 mM EDTA bei pH 8.5 in H <sub>2</sub> O
SCF-Differenzierungsmedium	10 % FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 20 ng/ml murines G-CSF 30 µM 2-Mercaptoethanol 2 % SCF Überstand (CHO-Zellen) in RPMI 1640
FL-Differenzierungsmedium	10 % FKS 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin 10 ng/ml rmGM-CSF in RPMI 1640

#### 2.1.4 Kits

Produkt	Hersteller
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden, DEU
Monocyte Isolation Kit (BM) mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DEU
Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, DEU
PCRBIO Rapid Extract PCR Kit	PCRBiosystems, London, GBR
Pierce ECL Western Blotting Substrate Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, DEU
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, DEU
SuperScript II RT Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

## 2.1.5 Antikörper

Antigen	Spezies	Konjugat	Isotyp	Klon	Hersteller
β-Aktin	Ziege anti-human/Maus		Polyklonal IgG		Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
CD11a	Ratte anti-Maus	APC	IgG2a, κ	2D7	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD11a	Ratte anti-Maus		IgG2a, κ	2D7	eBioscience, San Diego, USA
CD11a	Maus anti-human	Alexa Fluor 594	IgG1κ	HI111	Biolegend, San Diego, USA
CD11b	Ratte anti-Maus	PE	IgG2b, κ	M1/70	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD11b	Ratte anti-Maus		IgG2b, κ	M1/70	eBioscience, San Diego, USA
CD11b	Maus anti-human	PE	IgG1κ	ICRF44	eBioscience, San Diego, USA
CD18	Ratte anti-Maus	FITC	IgG2a	C71/16	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CD18	Maus anti-human	PE	IgG1κ	6.7	eBioscience, San Diego, USA
CD31 (PE-CAM-1)	Hase anti-Maus		IgG1	EPR17 259	Abcam, Cambridge, GBR
Gr-1	Ratte anti-Maus	APC	IgG2b, κ	RB6-8C5	Biolegend, San Diego, USA
IgG (Fc-spezifisch)	Maus anti-human	PE	IgG2b, κ	H2	Southern Biotech, Birmingham, USA
Isotyp-Kontrolle	Maus	FITC	IgG1	PPV-06	Immunotools, Friesoythe, DEU
Isotyp-Kontrolle	Ratte	APC	IgG2a	RTK27 58	Biolegend, San Diego, USA
Isotyp-Kontrolle	Ratte	PE	IgG2b	PLRV2 19	Immunotools, Friesoythe, DEU
Isotyp-Kontrolle	Ratte	FITC	IgG2a	R35-95	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Isotyp-Kontrolle	Maus	Alexa Fluor 594	IgG1κ	MOPC-21	Biolegend, San Diego, USA
Isotyp-Kontrolle	Maus	PE	IgG1κ	P3.6.2.8.1	eBioscience, San Diego, USA
Kaninchen IgG	Ziege anti-Kaninchen	Peroxidase	Polyklonal IgG		Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
LRP1	Maus anti-human	FITC	IgG1	I4C2	Biomac, Leipzig, DEU
LRP1	Kaninchen anti-human/Maus		IgG	EPR37 24	Abcam, Cambridge, GBR
Sekundärantikörper	Esel anti-Ratte	Alexa Fluor 594	Polyklonal IgG	A-21209	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sekundärantikörper	Ziege anti-Kaninchen	STAR 635	Polyklonal IgG	2-0012-002-7	Abberior, Göttingen, DEU
Sekundärantikörper	Ziege anti-Ratte	Alexa Fluor 647	Polyklonal IgG		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sekundärantikörper	Ziege anti-Kaninchen	Alexa Fluor 568	Polyklonal IgG		Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Ziege IgG	Kaninchen anti-Ziege	Peroxi-dase	Polyklonal IgG		Calbiochem, Darmstadt, DEU
-----------	----------------------	-------------	----------------	--	----------------------------

### 2.1.6 Zelllinien

Produkt	Beschreibung	Herkunft
B16	Murine Melanomzelllinie	Ralph Steinman, Rockefeller University, New York, USA
<i>Chinese Hamster Ovary</i> (CHO)	Stammzellfaktor (SCF) produzierende chinesische Zwerghamster Ovarzelllinie	Hans Häcker, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA
<i>Human Embryonic Kidney</i> (HEK)-293T	Humane embryonale Nierenzelllinie	American Type Culture Collection (CRL-11268), Manassas, USA
WEHI 3-B	mIL-3 produzierende murine myelomonozytäre Leukämiezelllinie	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (ACC 26), Braunschweig, DEU

### 2.1.7 Versuchstiere

LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse aus dem 129S7/SvEvBrd-Stamm wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen. Diese wurden mit Vav-iCre-Mäusen mit einem (CBA/Ca x C57BL/10)F2 Hintergrund von Jackson Laboratory gekreuzt, um Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Tiere zu züchten. Um LysM-Cre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und LysM-Cre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Versuchstiere zu erhalten wurden LysM-Cre-Mäuse mit einem 129P2/OlaHsd Hintergrund von Jackson Laboratory bezogen und mit LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen gekreuzt. Für Kontrollexperimente wurden nur Wurfgeschwister der genannten Mauslinien verwendet. C57Bl/6N Wildtyp-(WT)-Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Wilmington, USA) bezogen. Dr. Anton Roebroek stellte Knochenmark von LRP1 NPxYxxL *knock-in*-(LRP1-NPxYxxL<sup>ki</sup>)-Mäusen sowie Kontrolltieren (LRP1-NPxYxxL<sup>ctrl</sup>) zur Verfügung. Die Maushaltung erfolgte in Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Genehmigung für die Tierversuche dieser Arbeit wurde von der Regierung von Oberbayern erteilt (AZ: 55.2-1-54-2532-68-15).

Linie	Genetischer Hintergrund	Referenz
Wildtyp (WT)	C57Bl/6N	
LRP1 <sup>fl/fl</sup>	129S7/SvEvBrd	Rohlmann et al., 1996 [278]
LysM-Cre	129P2/OlaHsd	Clausen et al., 1999 [279]
Vav-iCre	(CBA/Ca x C57BL/10)F2	De Boer et al., 2003 [280]
LysM-Cre/LRP1 <sup>fl/fl</sup>		
Vav-iCre/LRP1 <sup>fl/fl</sup>		
LRP1 NPxYxxL	C57Bl/6J x 129	Roebroek et al., 2006 [281]

## 2.1.8 Geräte

Produkt	Hersteller
100 x /1,4 NA Öl-Immersionsobjektiv	Leica, Wetzlar, DEU
1394 ORCA-ERA Kamera	Hamamatsu Photonics, Herrsching, DEU
20 x /0,75 NA Plan-Apochromat Objektiv	Zeiss, Göttingen, DEU
20 x /1,0 NA Plan Apochromat Wasser-Immersionsobjektiv	Zeiss, Göttingen, DEU
63 x /1,4 NA Öl-Immersionsobjektiv	Leica, Wetzlar, DEU
Aequoria MDS Dunkelkammer	Hamamatsu Photonics, Herrsching, DEU
Axio vert 200M Mikroskop	Zeiss, Göttingen, DEU
AxioCam HR Digitalkamera	Zeiss, Göttingen, DEU
BD Canto II Durchflusszytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD LSRFortessa Durchflusszytometer	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
CCD Kamera Evolve	Teledyne Photometrics, Tucson, USA
Hochpräzisions-spritzenpumpe KDS-232	KD Scientific, Holliston, USA
Konfokaler Scanner CSU-X1	Yokogawa Electric Corporation, Musashino, JPN
Konfokalmikroskop TCS SP5	Leica, Wetzlar, DEU
Mini-PROTEAN Tetra vertikale Gelelektrophoreseapparatur	Biorad, Hercules, USA
Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Operationsmikroskop Stemi 2000-C	Zeiss, Göttingen, DEU
Peqlab horizontale Gelelektrophoreseapparatur	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, DEU
Spinning-Disc Konfokalmikroskop Examiner	Zeiss, Göttingen, DEU
STED Weißlichtlaser Konfokalmikroskop TCS SP8X	Leica, Wetzlar, DEU
Thermocycler UNO II	Biometra, Göttingen, DEU
Trans-Blot Turbo Transfersystem	Biorad, Hercules, USA
Wasseraufbereitungssystem	Millipore, Burlington, USA
Zentrifuge EBA 12R	Hettich, Bäch, CHE
Zentrifuge Multifuge 3 L-R	Heraeus, Hanau, DEU

## 2.1.9 Software

Produkt	Hersteller
Affinity Designer und Affinity Photo	Serif, Nottingham, GBR
AxioVision 4	Zeiss, Göttingen, DEU
BD FACS Diva	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Chemotaxis und Migrations Tool V2.0	IBIDI, Planegg, DEU
Endnote X8	Clarivate Analytics, Philadelphia, USA
FlowJo 10	Tree Star, Ashland, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Bethesda, USA
LAS AF Software	Leica, Wetzlar, DEU
LAS X Software	Leica, Wetzlar, DEU
SigmaPlot 12.5	Systat Software, Erkrath, DEU
Slidebook 6.0.8	Intelligent Imaging Innovations, Denver, USA
Wasabi Software	Hamamatsu Photonics, Herrsching, DEU

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolation von murinen PMN

Murine (m)PMN aus dem Knochenmark von C57Bl/6-Wildtypmäusen sowie LysM-Cre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-, LysM-Cre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-, Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen wurden mithilfe eines diskontinuierlichen Percoll-Dichtegradienten isoliert [282]. Dieser wurde durch Verdünnung der Percoll-Lösung mit PBS auf 52%, 62% und 72% sowie nachfolgendem vorsichtigem Aufschichten hergestellt. Nach Präparation und Spülen von Humerus, Femur und Tibia mit PBS erfolgte das Filtern (0,2 µm) der Zellsuspension und Pipettieren auf den dreischichtigen Percoll-Gradienten (52%/62%/72%). Nach Zentrifugation (1000 x g, 30 min, 4°C) ohne Bremse wurden die PMN an der 64%/72% Percoll-Trennschicht entnommen und nach Aufnahme in PBS erneut zentrifugiert (300 x g, 10 min, 4°C). Anschließend wurden die PMN in RPMI 1640+ Medium, welches zu 20% mit WEHI 3-B-Überstand versetzt war, resuspendiert. Der WEHI 3-B-Überstand enthält u.a. den Wachstumsfaktor IL-3, welcher die Zelldifferenzierung stimuliert. Es folgte eine Inkubation bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub>. Eine Trypanblau-Färbung zeigte einen Lebendzellanteil von >95%.

### 2.2.2 Isolation von humanen PMN

Humane PMN wurden aus dem mit Citrat (0,3%) antikoagulierten Vollblut gesunder Spender unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki und der Richtlinien der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München isoliert [283]. Die Sedimentierung der Erythrozyten erfolgte in Anwesenheit von 40% (v/v) autologem Plasma für 1 h. Anschließend wurde die leukozytenreiche Plasmaphase auf einen diskontinuierlichen isotonen Percoll-Gradienten (55%/74%) aufgetragen. Dieser wurde durch Verdünnung von isotonem Percoll (0,9% NaCl) mit PBS auf 55% und 74% mit anschließendem Aufschichten hergestellt. Nach Zentrifugation mit 600 x g für 20 min ohne Bremse wurde die Leukozyten enthaltende Schicht gesammelt, mit PBS gewaschen und nach Aufnahme in Adhäsionsmedium II den Versuchen zugeführt. Eine Trypanblau-Färbung zeigte einen Lebendzellanteil von >99%.

### 2.2.3 Isolation von murinen Monozyten

Die Isolation von murinen Monozyten erfolgte aus dem Knochenmark von C57Bl/6-Wildtypmäusen mithilfe der *Magnetic-activated Cell Sorting*-(MACS)-Technik. Das Prinzip der MACS-Separation beruht dabei auf negativer Selektion durch primäre Markierung der nicht gewünschten Population mittels Biotin-konjugierter Antikörper. Eine sekundäre Markierung mit anti-Biotin Antikörper gekoppelten paramagnetischen Mikropartikeln erlaubt die Separation mithilfe eines Magneten. Nach Präparation und Spülen von Humerus, Femur und Tibia mit Monozyten-Isolationspuffer, wurde die Zellsuspension gefiltert (0,2 µm) und gewaschen (300 x g, 10 min, 4°C). Es wurde die Zellzahl bestimmt und die Isolation der

Monozyten gemäß dem Protokoll des Monocyte Isolation Kit (BM) mouse der Firma Miltenyi Biotech durchgeführt.

#### **2.2.4 Isolation von humanen Monozyten**

Humane Monozyten wurden aus dem mit Citrat (0,3%) antikoaguliertem Vollblut gesunder Spender mithilfe der MACS-Technik unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki und der Richtlinien der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München isoliert. Nach Verdünnung von 25 ml antikoaguliertem Vollblut mit 10 ml PBS erfolgte eine Isolation der Monozyten mittels Dichtegradientenzentrifugation. Nach dem Schichten auf 10 ml Ficoll-Paque Plus wurde die Probe mit 400 x g für 20 min ohne Bremse bei RT zentrifugiert. Die Monozyten wurden aus der Interphase abgenommen, mit PBS gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Nach Aufreinigung mithilfe der MACS Technik entsprechend dem Protokoll des Monocyte Isolation Kit II der Firma Miltenyi Biotech wurden die Zellen den Versuchen zugeführt.

#### **2.2.5 Bestimmung der Zellzahl**

Um die Zellzahl zu bestimmen wurden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und mithilfe einer Neubauer Zählkammer lichtmikroskopisch quantifiziert. Dafür wurde die Zellsuspension zuerst 1:10 mit Trypanblau verdünnt und anschließend in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Nach Auszählen von 4 Großquadraten von je 1 mm<sup>2</sup> Fläche und 0,1 mm Tiefe konnte mit einer Division der Zellzahl durch 4 sowie einer Multiplikation mit 10<sup>5</sup> die durchschnittliche Zellzahl pro ml Zellsuspension berechnet werden.

#### **2.2.6 Isolation von genomischer DNA**

Für die Genotypisierung der Versuchstiere wurde die genomische DNA aus Ohr- oder Schwanzbiopsien von LysM-Cre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-, LysM-Cre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-, Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen isoliert und nach Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese analysiert. Die DNA-Isolation wurde gemäß dem Protokoll des PCR-BIO Rapid Extract PCR Kit der Firma PCR-Biosystems durchgeführt. Die genomische DNA wurde anschließend der PCR zugeführt oder bei -20°C gelagert.

#### **2.2.7 Isolation von mRNA**

Um RNA aus murinen und humanen PMN sowie humanen Monozyten nach reverser Transkription und Gelelektrophorese analysieren zu können, wurde die RNA aus den eukaryotischen Zellen isoliert. Es wurden 2 x 10<sup>6</sup> Zellen je Versuchsansatz eingesetzt und entsprechend dem Protokoll des RNeasy Micro Kit der Firma Qiagen bearbeitet. Die mRNA-Konzentration wurde mit einem Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt und die RNA der reversen Transkription zugeführt.

### 2.2.8 Reverse Transkription

Die reverse Transkription ermöglicht die Herstellung der zur mRNA komplementären DNA (cDNA) durch eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Diese reverse Transkriptase benötigt zur Initiation der cDNA Synthese ein DNA Stück mit freiem 3'-Hydroxyende, den Primer, welcher zugegeben wird. Zusätzlich werden freie Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) und Puffer für die Synthese des zur eukaryotischen mRNA komplementären DNA Stranges hinzugefügt. Entsprechend dem Protokoll des SuperScript II RT Kits der Firma Thermo Fisher Scientific wurden initial zur Primerhybridisierung 1 µl Random Hexamer Primer, 100 ng mRNA, 1 µl dNTP Mix (je 10 mM) in ein Tube pipettiert und nach Auffüllen mit RNase-freiem H<sub>2</sub>O auf 12 µl für 5 min bei 65°C inkubiert. Auf Eis wurden anschließend 4 µl 5x First-Strand Puffer, 2 µl Dithiothreitol (0,1 M) sowie 1 µl RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor zugegeben und für 2 min bei 25°C inkubiert. Die DNA-Polymerisation erfolgte nach Zugabe von 1 µl SuperScript II Reverser Transkriptase für 10 min bei 25°C sowie für 50 min bei 42°C. Um die Enzyme zu deaktivieren, wurden die Reaktionsgefäße für 15 min auf 70°C erhitzt. Mithilfe der Reversen Transkriptase wurde somit aus der einzelsträngigen mRNA eine cDNA synthetisiert und im nachfolgenden Schritt der Amplifikation mittels PCR zugeführt oder bei -20°C gelagert.

### 2.2.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Vervielfältigung der genomischen DNA oder cDNA mittels PCR wurde nach Zugabe spezifischer Primer (Tabelle 1) der Firma Metabion mit dem Thermocycler UNO II der Firma Biometra durchgeführt. Die PCR-Protokolle mit spezifischen Bedingungen für das LRP1-, LysM-Cre- sowie Vav-iCre-Amplifikat beinhalten jeweils einen initialen Denaturierungsschritt, um die doppelsträngige DNA zu trennen. Daran schließt sich ein Zyklus aus Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation zur exponentiellen Vervielfältigung an. Ein finaler Elongationsschritt beendet die PCR. Die PCR-Produkte wurden bei 4°C gekühlt und der Auftrennung mittels Gelelektrophorese zugeführt. Um den Genotyp von LRP1-WT- und LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen zu unterscheiden, wurde ein die loxP-Stelle flankierendes Primerpaar gewählt. PCR-Produkte mit einer Länge von 350 *base pairs* (bp) zeigten dabei loxP-Allele an, während das WT-Allel bei einer Länge von 291 bp detektiert wurde (Abbildung 5). Die Amplifikation der cDNA nach reverser Transkription erfolgte mit Primern welche in Exon 1 und 5 der LRP1 WT-Sequenz binden und ein PCR-Produkt von 510 bp ergeben. Die Lokalisation der Primer in den Exons ist notwendig, da die mRNA und somit auch die cDNA keine Intron-Abschnitte enthält (Abbildung 6). LysM-Cre<sup>-</sup>-Allele wurden bei einer Länge von 350 bp erkannt. LysM-Cre<sup>+</sup>-Mäuse mit einer Primerbindestelle in der Cre-Sequenz in Exon 1 resultierten in der PCR mit einer Länge von 700 bp (Abbildung 7). Die PCR zur Genotypisierung der Vav-iCre-Mäuse erlaubt keine Unterscheidung zwischen homozygoten oder heterozygoten *Improved Cre* (iCre) Allelen. Die iCre-Rekombinase stellt eine genetisch modifizierte

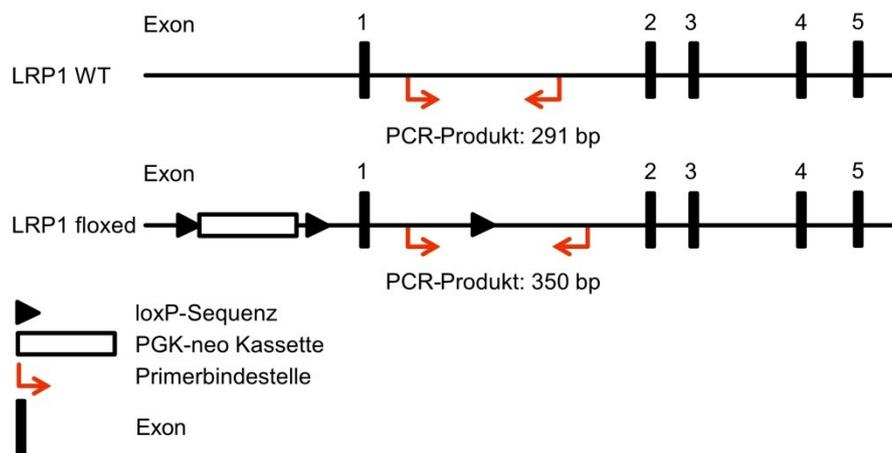
Variante der Cre-Rekombinase mit gesteigerter Expressionsrate dar [284]. Da die Primer im iCre-Locus binden, ist nur bei Vav-iCre<sup>+</sup>-Mäusen ein 800 bp Produkt zu detektieren (Abbildung 8).

**Tabelle 1: Länge der PCR-Amplifikate und Primersequenzen**

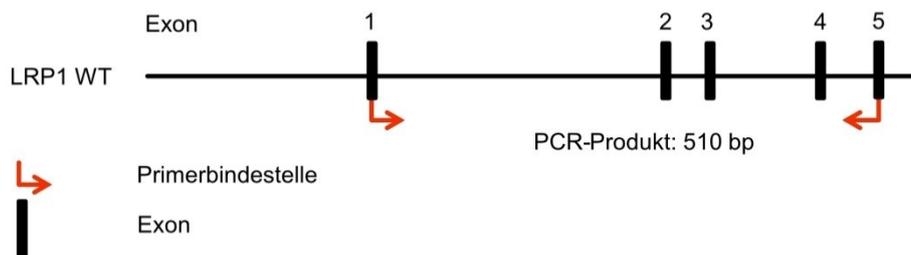
Primer	Amplifikatlänge	5'-3' Sequenz
LRP1	WT: 291 bp Floxed: 350 bp	Fw: CATACCCTCTTCAAACCCCTTCCTG Rv: GCAAGCTCTCCTGCTCAGACCTGG
LRP1	WT: 510 bp	Fw: TGACCCCGCCGTTGCTCCTG Rv: TGAAGGAGCCGTCTGTGTTG
LRP1 (CRISPR)	WT: 417 bp	Fw: CGGGGAGAGGAAGATAAAGG Rv: CTTTTCTACCCAGGCCTCT
LysM-Cre	WT: 350 LysM-Cre: 700 bp	Fw: CTTGGGCTGCCAGAATTTCTC Rv WT: TTACAGTCGGCCAGGCTGAC Rv LysM-Cre: CCCAGAAATGCCAGATTACG
Vav-iCre	Vav-iCre: 800 bp	Fw: GCCTGCCCTCCCTGTGGATGCCACCT Rv: GTGGCAGAAGGGGCAGCCACACCATT

**Tabelle 2: PCR-Komponenten und Bedingungen**

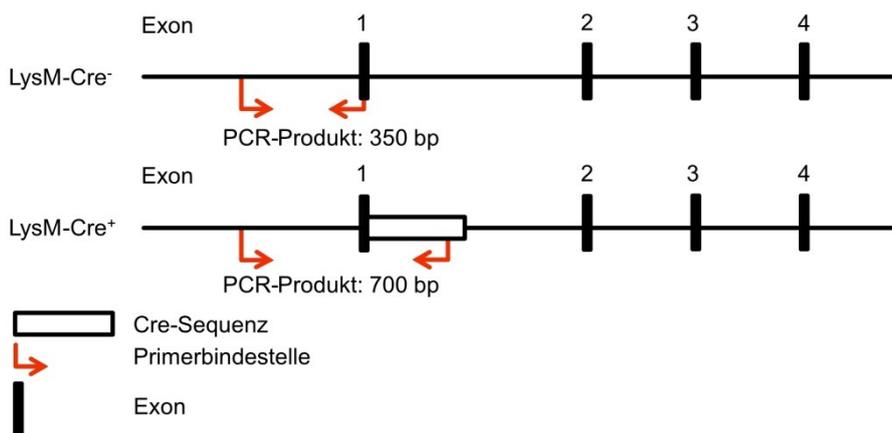
Produkt	Komponenten		Protokoll
LRP1	KAPA2G Fast HotStart ReadyMix (2x) Fw Primer (10 µM) Rv Primer (10 µM) DNA oder cDNA H <sub>2</sub> O (bis finales Volumen erreicht)	1x 0,5 µM 0,5 µM 50 ng N/A	94°C 3 min 94°C 10 s 65°C 15 s 72°C 30 s 72°C 7 min } 30 Zyklen
LysM-Cre	KAPA2G Fast HotStart ReadyMix (2x) Fw Primer (10 µM) Rv Primer (10 µM) DNA H <sub>2</sub> O (bis finales Volumen erreicht)	1x 0,5 µM 0,5 µM 50 ng N/A	94°C 3 min 94°C 20 s 65°C 15 s 72°C 10 s 94°C 15 s 60°C 15 s 72°C 10 s 72°C 2 min } 10 Zyklen } 28 Zyklen
Vav-iCre	KAPA2G Fast HotStart ReadyMix (2x) Fw Primer (10 µM) Rv Primer (10 µM) DNA H <sub>2</sub> O (bis finales Volumen erreicht)	1x 0,5 µM 0,5 µM 50 ng N/A	95°C 3 min 95°C 30 s 65°C 30 s 72°C 1 min 72°C 7 min } 38 Zyklen



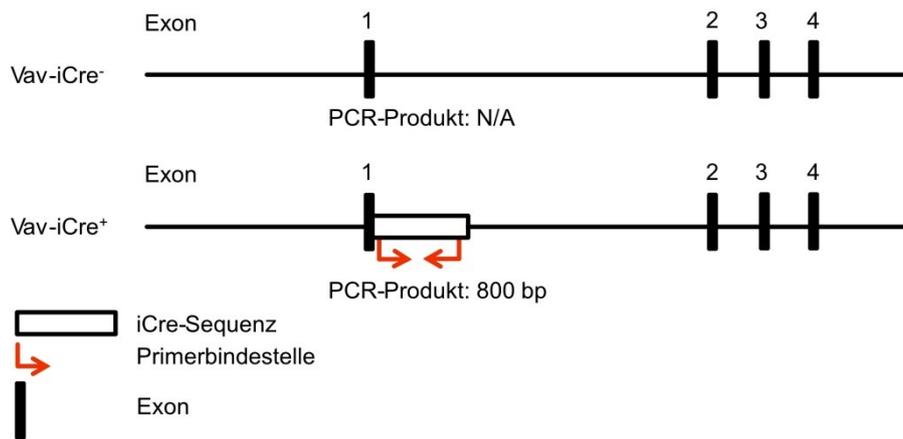
**Abbildung 5: Schematische Darstellung der PCR-Strategie für LRP1-WT- und LRP1-floxed-Allele.** Die roten Pfeile zeigen die Bindestellen spezifischer Primer an. Nach Insertion einer loxP-Sequenz verlängert sich das PCR-Produkt von 291 bp auf 350 bp.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der PCR-Strategie zum Nachweis des LRP1-WT-Allels nach reverser Transkription.** Die spezifischen Primerbindestellen innerhalb von Exon 1 und 5 zeigen bei einer Produktlänge von 510 bp die Anwesenheit des LRP1-WT-Allels.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der PCR-Strategie für LysM-Cre<sup>-</sup>- und LysM-Cre<sup>+</sup>-Allele.** Durch Wahl der Primerbindestellen in Exon 1 oder der eingefügten Cre-Sequenz wird die Unterscheidung von LysM-Cre<sup>-</sup>- und LysM-Cre<sup>+</sup>-Allelen anhand der Länge der PCR-Produkte ermöglicht.



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der PCR-Strategie für Vav-Cre<sup>+</sup>-Allele.** Das Primerpaar bindet innerhalb der iCre-Sequenz und erlaubt bei einer Produktlänge von 800 bp die Identifikation des Vav-iCre<sup>+</sup>-Genotyps, jedoch keine Differenzierung zwischen homozygoten oder heterozygoten Allelen.

### 2.2.10 DNA-Gelelektrophorese

Nach der Amplifikation wurden die DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe mithilfe einer horizontalen Gelelektrophoreseapparatur der Firma Biorad aufgetrennt. Das Gel wurde mit 1,5 % Agarose in 1 x TBE-Laufpuffer unter Zugabe von Midori Green (1 µg/ml) hergestellt und mit den PCR-Produkten sowie einer 100 bp oder 1 kilo (k)bp DNA-Leiter geladen. Nach Anlage einer Spannung von 100 V für 1 bis 1,5 h erfolgte die Analyse unter einer UV-Lampe (260 nm).

### 2.2.11 Zelllyse

Um LRP1 in murinen PMN aus dem Knochenmark von LysM-Cre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-, LysM-Cre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-, Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-, Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen, murinen Monozyten aus dem Knochenmark von C57Bl/6-Mäusen, hPMN und Monozyten sowie Hoxb8-Zellen nachweisen zu können, wurde jeweils eine Zelllyse durchgeführt. Nach Bestimmung der Zellzahl und Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) erfolgte die Aufnahme von je 10 x 10<sup>6</sup> Zellen in 300 µl 4°C kaltem Lysepuffer, welcher mit einem Protease Inhibitor Cocktail der Firma Sigma-Aldrich, 1 mM Diisopropylfluorophosphat, 100 µM Natriumfluorid und 200 µM Natriumorthovanadat, versetzt war. Die Zellen wurden bei 4°C für 30 min auf dem Drehrad lysiert und anschließend mechanischem Stress durch Aspiration mit einer 2 ml Spritze ausgesetzt. Es folgte die Zentrifugation bei 13.000 x g für 5 min bei 4°C, um den Zelldebris von den im Überstand gelösten Gesamtprotein der Zelle abzutrennen. Nach Abnahme des Überstandes wurde 1 µl der Probe mit 199 µl des Qubit-Messpuffers verdünnt und die Proteinkonzentration mit dem Qubit 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) bestimmt. Der Proteinüberstand wurde bei -20°C gelagert oder mit dem anionischen denaturierenden

2x SDS-Probenpuffer für 10 min bei 95°C erhitzt. Dies dient der Auflösung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine. SDS denaturiert dabei durch Umhüllung des Polypeptidrückgrates, während durch Zusatz von 2-Mercaptoethanol stabilisierende Disulfidbrücken reduziert werden. Das anionische SDS führt zudem zu einer stark negativen Ladung der Proteine mit gleicher Ladungsdichte pro Längeneinheit. Dies erlaubt in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli unabhängig von der intrinsischen elektrischen Ladung eine Separation in Abhängigkeit des Molekulargewichtes [285]. Um den Separationsprozess zu überwachen, wird dem SDS-Puffer der anionische Farbstoff Bromphenolblau zugesetzt. Dieser bildet bei der Elektrophorese die Lauffront.

### **2.2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Elektrophorese wurde mit einem Gel auf Polyacrylamidbasis in einer vertikalen Apparatur der Firma Biorad durchgeführt. Die Gellösung setzt sich aus dem Gelbildner Acrylamid (5% Sammelgel, 10% Trenngel), Methylenbisacrylamid als Quervernetzer, einem Trenn- oder Sammelgelpuffer sowie SDS und H<sub>2</sub>O zusammen. APS und der Katalysator TEMED initiieren die Polymerisation. Die Separation der Moleküle wird von der Porengröße des Gels bestimmt, welche von der Menge an Acrylamid und Methylenbisacrylamid abhängt. Nach Aushärten des Gels wurde es in die Elektrophoreseapparatur gehängt und von einem 1x Laufpuffer umgeben. Das Laden der Taschen erfolgte mit maximal 30 µg/Tasche. Die Elektrophorese wurde mit 100 V gestartet und in Abhängigkeit der Lauffront – angezeigt durch den Bromphenolblaufarbstoff – nach ca. 60 min beendet.

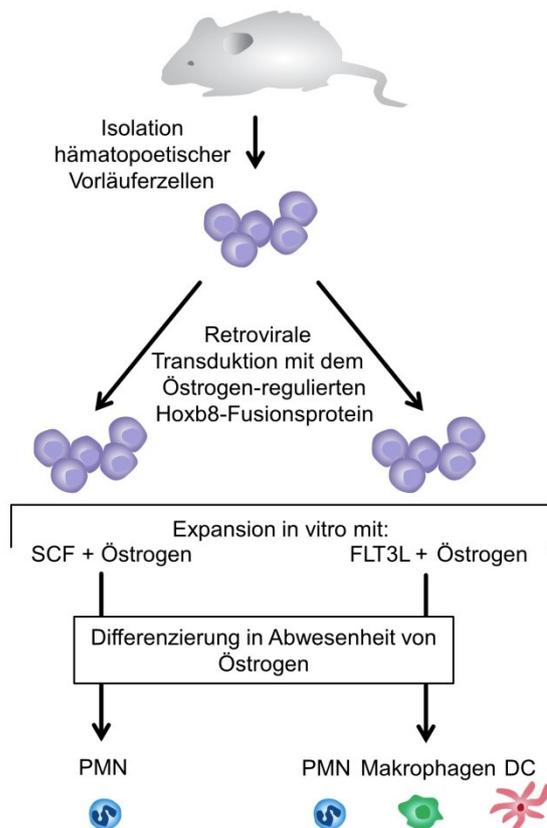
### **2.2.13 Elektrotransfer auf Nitrozellulosemembran und immunologischer Nachweis (Western-Blot)**

Nach Ende der Gelelektrophorese wurde das Gel mit den Proteinen unverzüglich dem Transfer auf Nitrozellulosemembran mittels *Semi-dry*-Verfahren zugeführt. Um einen einheitlichen Pufferfluss durch das Gel zur Membran zu gewährleisten, wurden Whatman-Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran mit Transferpuffer befeuchtet und in der Reihenfolge Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier von der Kathode zur Anode angeordnet. Die Anlage des elektrischen Feldes erfolgte mit einer Stromstärke von 80 mA für 2 h senkrecht zum Gel um das Wandern der negativ geladenen Proteine in Richtung Anode und damit zur Membran zu ermöglichen. Im Anschluss wurde die Membran für 30 s mit Ponceau S Lösung inkubiert und durch Anfärbung der Proteinbanden der erfolgreiche Transfer überprüft. Das Blocken von unspezifischen Antikörperbindestellen auf der Membran erfolgte für 1 h mit 5% fettfreiem Milchpulver in TBST. Nach dem Waschen mit TBST für 5 min wurde die Membran mit dem anti-LRP1-(Klon EPR3724, 1:3000) oder anti-β-Aktin-(polyklonal, 1:1000)-Primärantikörper jeweils in 5% Milchpulver in TBST über Nacht bei 4°C inkubiert. Dem dreimaligen Waschen für 3 x 10 min schloss sich eine Inkubation mit dem

Peroxidase-konjugierten anti-Kaninchen IgG-(polyklonal, 1:1000) oder dem Peroxidase-konjugierten anti-Ziege IgG-(polyklonal, 1:1000)-Sekundärantikörper jeweils in TBST für 60 min bei RT an. Für die Detektion mittels Chemilumineszenz wurde die Membran mit dem Enhanced Chemiluminescence-(ECL)-Substrat aus dem Kit der Firma Pierce inkubiert. Die Analyse erfolgte nach Auftragen der Reagenz mit einer Hamamatsu 1394 ORCA-ERA-Kamera in der Aequoria-Dunkelkammer unter Verwendung der Wasabi-Software.

#### **2.2.14 Generierung und Differenzierung von Hoxb8-SCF- und Hoxb8-FL-Zellen**

Um neben den Primärzellen über ein weiteres Zellsystem zu verfügen, wurden etablierte immortalisierte hämatopoetische Vorläuferzelllinien verwendet [286]. Diese stellen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark dar, in welche durch retrovirale Transduktion ein Fusionsprotein aus der Östrogen-bindenden Domäne des Östrogenrezeptors und dem Hoxb8-Transkriptionsfaktor eingebracht wurde. Die unter Kontrolle des Hoxb8-Transkriptionsfaktors exprimierten Proteine arretieren die Differenzierung der myeloischen Vorläuferzellen und erlauben in Anwesenheit von Östrogen zusammen mit den Zytokinen SCF (Hoxb8-SCF) bzw. FLT3L (Hoxb8-FL) eine Expansion der immortalisierten Zellen in Kultur. Durch Wegnahme von Östrogen und Zugabe spezifischer Zytokine differenzieren Hoxb8-SCF-Zellen in der myeloischen Reihe zu PMN, während die Hoxb8-FL-Zellen in Abhängigkeit des Zytokins neben PMN und Makrophagen auch Dendritische Zellen (DC) ausbilden können (Abbildung 9). Die Hoxb8-SCF-Zellen wurden aus dem Knochenmark von  $Vav-iCre^+/LRP1^{fl/fl}$ -(Hoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>),  $Vav-iCre^-/LRP1^{fl/fl}$ -(Hoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>) sowie  $LRP1-NPXY^{ki}$ -(Hoxb8-SCF-LRP1-NPXYxxL<sup>ki</sup>) und  $LRP1-NPXY^{ctrl}$ -(Hoxb8-SCF-LRP1-NPXYxxL<sup>ctrl</sup>)-Mäusen, die Hoxb8-FL-Zellen aus dem Knochenmark von WT-Mäusen (Hoxb8-FL-WT) – wie in der Literatur beschrieben – generiert [287, 288]. Die Plasmide für die Generierung der Hoxb8-Zellen wurden von Hans Häcker (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN, USA) zur Verfügung gestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden Hoxb8-Zellen verwendet, die bereits in der Arbeitsgruppe generiert worden waren. Zur Ausdifferenzierung wurden  $2,5 \times 10^5$  Hoxb8-Zellen in PBS mit 1% FKS gewaschen und je nach Zelllinie ohne Östrogen für 4 Tage in SCF-Differenzierungsmedium oder 5 Tage in FL-Differenzierungsmedium inkubiert.



**Abbildung 9: Schema der Immortalisierung und Differenzierung von Hoxb8-SCF- und Hoxb8-FL-Zellen** modifiziert nach Liebermann und Hoffman, 2006 [289]. Nach Isolation hämatopoetischer Vorläuferzellen aus dem Knochenmark der Versuchstiere (siehe 2.2.14) erfolgte die retrovirale Transduktion mit dem Fusionsprotein aus Östrogen-Rezeptor und Hoxb8-Transkriptionsfaktor. Die Etablierung der Zelllinie war nach Kultivierung für 4 Wochen in Proliferationsmedium mit Östrogen und SCF- oder FLT3L-Überstand abgeschlossen. Die Ausdifferenzierung wurde durch Wegnahme von Östrogen und Zugabe spezifischer Zytokine in den Differenzierungsmedien eingeleitet. Hoxb8-SCF-Zellen differenzieren durch Zugabe von SCF und G-CSF zu reifen PMN, während die Hoxb8-FL-Zelllinie nach Zugabe von GM-CSF neben PMN auch Makrophagen und Dendritische Zellen (DC) hervorbringen kann. Nach 4 (dHoxb8-SCF) oder 5 (dHoxb8-FL) Tagen wurden die Zellen den Versuchen zugeführt.

## 2.2.15 Zellkultur

### 2.2.15.1 Kultur von HEK-293T-, CHO- und B16-Zellen

Die Zelllinien HEK-293T sowie B16 wurden in DMEM versetzt mit 10% FKS sowie 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Die Proliferation von CHO-Zellen erfolgte in RPMI 1640 Medium mit 10% FKS, 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin sowie 30 µM 2-Mercaptoethanol. Die Monolayer-Kulturen wurden regelmäßig nach Kontrolle im Lichtmikroskop mithilfe einer Trypsin/EDTA-Lösung von den Zellkulturflaschen gelöst und nach einem Waschvorgang (300 x g, 5 min, RT) in dem Medium der jeweiligen Zelllinie resuspendiert.

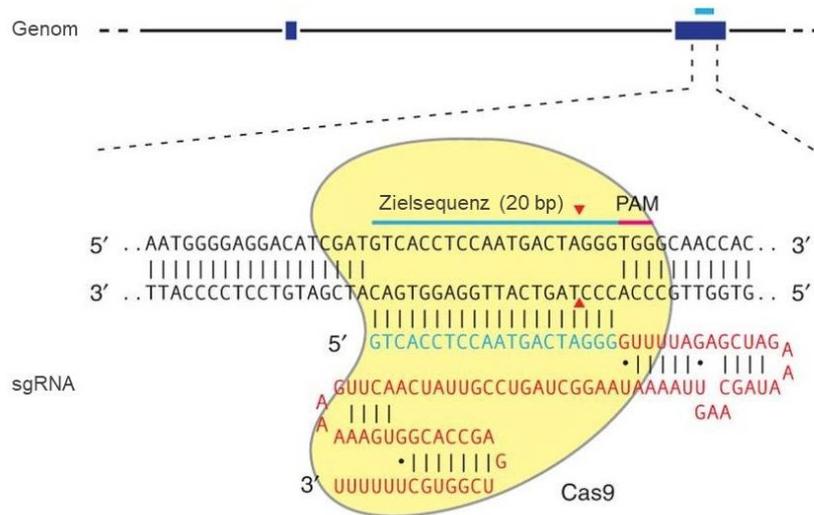
### 2.2.15.2 Kryokonservierung und Reaktivierung

Die Kryokonservierung der Zellen erfolgte nach dem Waschen bei 300 x g für 10 min durch Aufnahme in steril gefiltertes Medium bestehend aus 10% (v/v) Dimethylsulfoxid sowie 90% (v/v) FKS. Nach Aufteilung auf die Kryotubes wurden diese mithilfe eines Gefrierbehälters der Firma Thermo Fisher Scientific mit einer konstanten Rate von -1°C/min gekühlt. Sie wurden bei -80°C für 2 Tage gelagert und anschließend in Flüssigstickstoff überführt. Für die

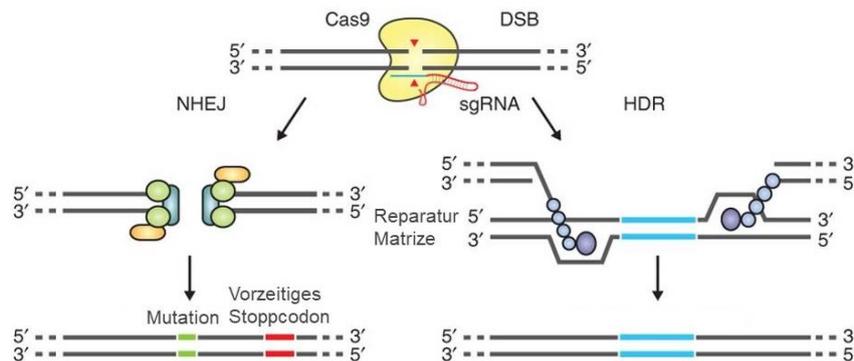
Rekultivierung wurden die Kryptubes bei 37°C im Wasserbad erwärmt und schließlich vor Aufnahme in die Kultur mit 10 ml des jeweiligen Mediums gewaschen.

### 2.2.16 CRISPR/Cas9

Das *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)/CRISPR-associated Protein (Cas)-System bezeichnet einen Teil des Immunsystems, welches in Prokaryoten die Abwehr fremden Erbguts aus Plasmiden oder Phagen ermöglicht. Das Cas-Protein nutzt nach Transkription des Zell-eigenen Genoms RNA-Sequenzen um komplementäre fremde pathogene DNA spezifisch erkennen und schneiden zu können. Zur Editierung des humanen Genoms wurde das Typ II CRISPR-System adaptiert, welches aus der Nuklease Cas9 sowie der single-guide RNA (sgRNA) besteht. Die sgRNA enthält neben einem RNA-Gerüst eine spezifische 20 bp Erkennungssequenz, welche die Cas9-Nuklease über Watson-Crick-Basenpaarung an die 20 bp DNA-Zielsequenz führt. Das in dieser Arbeit genutzte CRISPR/Cas9-System stammt aus *Streptococcus pyogenes* und erfordert für ein effektives Binden der Cas9 eine der Ziel-DNA 3' unmittelbar vorausgehende 5'-NGG *Protospacer Adjacent Motif* (PAM)-Sequenz. Durch gezielte Modifikation der 20 bp Erkennungssequenz kann Cas9 an nahezu jede Stelle der Ziel-DNA gesteuert werden. Die Cas9-Nuklease schneidet die Ziel-DNA spezifisch ca. 3 bp in 5'-Richtung der PAM-Sequenz und erzeugt einen Doppelstrangbruch (DSB). Die Reparatur des DSB kann über zwei zelluläre Hauptmechanismen erfolgen: das fehleranfällige *Non-homologous End-joining* (NHEJ) oder die *Homology Directed Repair* (HDR). In Abwesenheit einer homologen Matrize werden die DSB über den NHEJ-Prozess ligiert, welcher zu Mutationen in Form von Insertionen oder Deletionen führen kann. Eine Verschiebung des Leserahmens ermöglicht daraufhin die Entstehung von vorzeitigen Stoppcodons mit Abbruch der Transkription und *knockout* des Zielgens. Das CRISPR/Cas9-System stellt somit eine effektive Möglichkeit der Sequenz-spezifischen Modifikation des Genoms dar. [290]



**Abbildung 10: Schema der RNA-gesteuerten Cas9-Nuklease** modifiziert nach Ran et al., 2013 [290]. Die Cas9-Nuklease (gelb) wird mithilfe einer sgRNA, welche eine exemplarisch dargestellte 20 bp Zielsequenz (blau) enthält, an das Genom geführt. Cas9 vermittelt einen DSB (roter Pfeil) ca. 3 bp in 5'-Richtung der PAM-Sequenz (rot).



**Abbildung 11: Darstellung der Reparaturmechanismen nach DSB** modifiziert nach Ran et al., 2013 [290]. Durch Cas9 induzierte DSB können mittels zweier Hauptmechanismen repariert werden. Das fehleranfällige NHEJ verbindet die DSB-Enden durch endogene DNA-Reparaturmechanismen, welche zu Mutationen an der Verbindungsstelle führen können. Eine Verschiebung des Leserahmens ermöglicht die Entstehung von vorzeitigen Stoppcodons mit einem *knockout* des Zielgens. Bei Vorliegen einer Reparatur-Matrize kann der DSB alternativ über die präzise HDR beseitigt werden.

### 2.2.16.1 Guide-RNA-Design und Vektor-Klonierung

Bei der Auswahl der 20-nt *guide*-Sequenz ist sowohl auf die 5'-NGG PAM-Sequenz als auch eine Minimierung von *off-target*-Effekten zu achten. Dies wurde durch Verwendung des online CRISPR-Design Tools (<http://tools.genome-engineering.org>) berücksichtigt. Die beiden ausgewählten Oligonukleotid-Paare wurden schließlich nach dem Protokoll von Dr. Zhang in je ein lentiCRISPRv2-Plasmid kloniert [291]. Der Vektor enthält Expressionskassetten für Cas9, die sgRNA sowie eine Puromycin-Resistenz und erlaubt die lentivirale Transduktion in Hoxb8-FL-Zellen.

**Tabelle 3: LRP1 Guide-RNA-Sequenzen**

Zielgen	5'-3' Sequenz
LRP1	guide1+ : CACCGTCTGGTCTCCGGGGCCACTA
	guide1- : AAAC TAGTGGCCCCGGAGACCAGAC
	guide2+ : CACCGGCTGCCGCTGCTTTCAGCTC
	guide2- : AAACGAGCTGAAAGCAGCGGCAGCC

**2.2.16.2 Transfektion und Virusproduktion in HEK293T-Zellen**

Um den Lentivirus zu produzieren, wurde das lentiCRISPRv2-Plasmid zusammen mit dem Verpackungs-Plasmid psPAX2 sowie dem Hüll-Plasmid pVSV-G in HEK293T-Zellen co-transfiziert. Die Plasmide wurden von Addgene, Watertown, USA bezogen. HEK293T-Zellen wurden in RPMI 1640 (25mM HEPES, 10% FKS) resuspendiert und am Tag 1 mit  $1,5 \times 10^6$  Zellen/2 ml/well in 6-well Platten ausgesät. Am Tag 2 erfolgten ein Medienwechsel sowie die Vorbereitung der Transfektion. Es wurden jeweils 250  $\mu$ l Opti-MEM 1 mit 12  $\mu$ l Lipofektamin 2000 sowie 250  $\mu$ l Opti-MEM 1 mit 1  $\mu$ g lentiCRISPRv2, 2  $\mu$ l pVSV-G und 3  $\mu$ l psPAX2 für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und nach einer Inkubationszeit von 20 min bei RT mit 500  $\mu$ l/well auf die 6-well-Platten gegeben. Nach einem Medienwechsel nach 5 h mit RPMI 1640 (25mM HEPES, 10% FKS, 1% P/S) konnte der Virus-enhaltende Überstand am Tag 4 abgenommen durch Filtration mit einem 0,45  $\mu$ m Filter aufgereinigt werden.

**2.2.16.3 Transduktion von Hoxb8-FL-Zellen**

Für die Vorbereitung der Transduktion wurden am Tag 4  $2 \times 10^6$  Hoxb8-FL-Zellen in 5 ml RPMI 1640 (25mM HEPES, 10% FKS, 1% P/S) resuspendiert und mit 200.000 Zellen/500  $\mu$ l/well in 24-well-Platten ausgesät. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l/well Virus-enhaltenden Überstands erfolgte eine Inkubation für 72 h. Nachdem am Tag 5 erneut 500  $\mu$ l/well Virus-enhaltenden Überstands auf die Hoxb8-FL-Zellen gegeben wurden, konnten am Tag 7 die Zellen aller Wells mit 300 g für 5 min bei RT abzentrifugiert werden. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml FL-Proliferationsmedium unter Zusatz von 3  $\mu$ g/ml Puromycin zur Selektion in Zellkulturflaschen inkubiert. Die Proliferation erfolgte ab Tag 11 nach dem Waschen der Zellen und einer Resuspendierung in FL-Proliferationsmedium ohne Puromycin in Zellkulturflaschen. Nach 2 Wochen konnten die Hoxb8-FL-Zellen in 96-well Platten subkloniert werden.

**2.2.16.4 Analyse der Subklone**

Die Analyse der Subklone wurde mittels Sequenzierung sowie Western-Blot durchgeführt. Nach DNA-Isolation entsprechend dem Protokoll des DNeasy Blood and Tissue Kit wurde diese der PCR zugeführt (siehe 2.2.9). Das Primerdesign erfolgte mit dem online CRISPR-Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>) unter Berücksichtigung der Lage

der *guide*-Sequenzen. Nach Aufreinigung mit dem QIAquick PCR Purification Kit wurde die DNA von GATC nach Sanger sequenziert. Zum Nachweis von LRP1 auf Proteinebene wurde ein Western-Blot wie im Kapitel 2.2.11 beschrieben durchgeführt.

### **2.2.17 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine qualitative und quantitative Einzelzellanalyse basierend auf Lichtstreuung sowie Zell-assoziiertes Fluoreszenz [292]. Um die Antigenspezifität eines Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers zu ermitteln, ist eine Isotypenkontrolle notwendig. Diese ist ein unspezifischer Antikörper desselben Isotyps und damit gleicher Affinität zu Fc-Rezeptoren. Die Markierung mit demselben Fluorochrom ermöglicht außerdem unspezifische Fluoreszenzfarbstoff-abhängige Interaktionen auszuschließen. Die Messwerte der Isotyp-Antikörper wurden in der Auswertung von den Fluoreszenzintensitäten der entsprechenden Antikörper subtrahiert.

#### **2.2.17.1 Expression von LRP1 auf PMN**

Die Oberflächenexpression von LRP1 wurde auf isolierten humanen PMN sowie murinen PMN von C57Bl/6 WT-Mäusen analysiert. Murine PMN ( $1,0 \times 10^5$ /Probe) wurden in Adhäsionsmedium II resuspendiert und für 30 min bei 37°C mit rmTNF $\alpha$  (100 ng/ml), rmCXCL1 (100 ng/ml), fMLP (10  $\mu$ M), smMK (1  $\mu$ g/ml), MnCl $_2$  (3 mM) sowie Adhäsionsmedium II zur Kontrolle inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen sofort auf Eis transferiert und für 20 min mit dem FITC-konjugierten anti-LRP1-(Klon 14C2, 1:50), dem zugehörigen Isotyp-Antikörper (1:50) oder Adhäsionsmedium II zur Kontrolle versetzt. Die nachfolgende Fixierung erfolgte mit der BD FACS Lysing Solution (1:10 Vorverdünnung mit H $_2$ O) im Verhältnis 1:10 für 10 min auf Eis. Die Zellen wurden schließlich zweimal mit eisgekühltem PBS gewaschen (Zentrifugation mit 800 x g, 10 min, 4 °C) und unverzüglich der Analyse mittels BD LSRFortessa Gerät und FlowJo Software zugeführt.

Um die LRP1-Oberflächenexpression auf humanen PMN ( $1,5 \times 10^5$ /Probe) zu untersuchen, wurden die Zellen in Adhäsionsmedium II resuspendiert und mit rhTNF $\alpha$  (100 ng/ml), IL8 (100 ng/ml), fMLP (100 nM), shMK (1  $\mu$ g/ml), MnCl $_2$  (3 mM) oder Adhäsionsmedium II zur Kontrolle für 30 min bei 37 °C stimuliert. Die Proben wurden schließlich auf Eis transferiert und für 20 min mit dem FITC-konjugierten anti-LRP1-(Klon 14C2, 1:50), dem zugehörigen Isotyp-Antikörper sowie Adhäsionsmedium II in der Kontrollprobe versetzt. Es folgte die Inkubation in BD FACS Lysing Solution (1:10 Vorverdünnung mit H $_2$ O) im Verhältnis 1:10 für 10 min auf Eis mit anschließender zweimaliger Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4 °C) nach Zugabe von PBS. Die Proben wurden mit dem BD LSRFortessa-Gerät und der FlowJo-Software analysiert.

### 2.2.17.2 $\beta_2$ -Integrin-Expression auf PMN nach LRP1-Blockade mit LRPAP

Die Expression der  $\beta_2$ -Integrine CD11a (LFA1,  $\alpha_L$ ), CD11b (Mac1,  $\alpha_M$ ) und CD18 ( $\beta_2$ ) wurde mittels Durchflusszytometrie nach LRP1-Blockade mit LRPAP untersucht. Murine PMN ( $2,5 \times 10^5$ /Probe) wurden in Adhäsionsmedium I resuspendiert und zur LRP1-Blockade für 20 min bei Raumtemperatur (RT) mit murinem LRPAP (3  $\mu$ M) oder Adhäsionsmedium I zur Kontrolle versetzt. Anschließend erfolgte die Stimulation durch Zugabe der in Adhäsionsmedium II gelösten Stimuli rmCXCL1 (100 ng/ml), fMLP (10  $\mu$ M) oder Adhäsionsmedium II zur Kontrolle für 30 min bei 37°C. Die Proben wurden auf Eis transferiert und für 30 min mit dem APC-konjugierten anti-CD11a-(Klon 2D7; 1:50), dem PE-konjugierten anti-CD11b-(Klon M1/70; 1:50) sowie dem FITC-konjugierten anti-CD18-(Klon C71/16; 1:50) oder den entsprechenden Isotyp-Antikörpern gefärbt. Durch Zugabe der BD FACS Lysing Solution (1:10 Vorverdünnung mit H<sub>2</sub>O) im Verhältnis 1:10 für 10 min erfolgte die Fixierung auf Eis. Nach zweimaligem Waschen (Zentrifugation bei 800 x g, 10 min, 4 °C) wurden die Proben unverzüglich durchflusszytometrisch mittels BD LSRFortessa-Gerät und der FlowJo-Software analysiert.

Humane PMN ( $2,5 \times 10^5$ /Probe) in Adhäsionsmedium I wurden nach Zugabe von humanem LRPAP (3  $\mu$ M) für 20 min bei RT inkubiert. Die Stimulation erfolgte durch Zugabe von IL8 (100 ng/ml) oder fMLP (100 nM) mit Adhäsionsmedium II für 30 min bei 37°C. Danach wurden die Proben unverzüglich auf Eis gestellt und für 30 min mit dem Alexa Fluor 549-konjugierten anti-CD11a-(HI111; 1:50), dem PE-konjugierten anti-CD11b-(ICRF44; 1:50) oder dem PE-konjugierten anti-CD18-(6.7; 1:50) sowie den passenden Isotyp-Antikörpern gefärbt. Anschließend wurde die BD FACS Lysing Solution (1:10 Vorverdünnung mit H<sub>2</sub>O) im Verhältnis 1:10 für 10 min zur Fixierung auf Eis zugegeben, gefolgt von einer zweimaligen Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4 °C) und Analyse mittels BD LSRFortessa-Gerät und der FlowJo-Software.

### 2.2.17.3 $\beta_2$ -Integrin-Expression auf PMN in Abwesenheit von LRP1

Murine PMN wurden aus Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen isoliert und wie beschrieben für 24 h kultiviert (siehe 2.2.1). Es folgte die Aufnahme der Zellen in Adhäsionsmedium II ( $2,5 \times 10^5$ /Probe), welches mit Stimuli und Antikörpern versetzt war. Die Inkubation erfolgte mit rmCXCL1 (100 ng/ml), rmTNF $\alpha$  (100 ng/ml) sowie dem APC-konjugierten anti-CD11a-(Klon 2D7; 1:50), dem PE-konjugierten anti-CD11b-(Klon M1/70; 1:50), dem FITC-konjugierten anti-CD18-(Klon C71/16; 1:50) Antikörper oder den entsprechenden Isotyp-Antikörpern für 30 min bei 37°C. Anschließend wurden die Proben für 10 min mit der BD FACS Lysing Solution (1:10 Vorverdünnung mit H<sub>2</sub>O) im Verhältnis 1:10 auf Eis fixiert und zweimal mit 800 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Analyse erfolgte mit dem BD Canto II-Durchflusszytometer sowie der FlowJo-Software.

#### **2.2.17.4 ICAM-1- und Fibrinogen-Bindeverhalten**

Das LFA-1 spezifische rmlCAM-1/Fc-Bindeverhalten wurde auf mPMN wie beschrieben untersucht [80, 293]. Nach Isolation von mPMN aus Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen und Inkubation für 24 h (siehe 2.2.1) wurden diese in Adhäsionsmedium II aufgenommen (2,0 x 10<sup>5</sup>/Probe). Eine funktionelle Blockade von Mac-1 erfolgte in allen Proben durch Zugabe eines anti-CD11b-(Klon M1/70; 30 µg/ml) Antikörpers für 15 min bei RT. Die Kontrollgruppe wurde zur Analyse der LFA-1 spezifischen ICAM-1-Bindung zusätzlich mit einem anti-CD11a-(Klon M17/4, 30 µg/ml) Antikörper zur funktionellen LFA-1-Blockade inkubiert. Nach Zugabe von rmlCAM-1/Fc (20 µg/ml) und dem PE-konjugierten anti-human IgG<sub>1</sub>-(Fc spezifisch; Klon H2; 10 µg/ml)-Antikörper erfolgte die Stimulation mit rmCXCL1 (100 ng/ml), PMA (100 nM) oder MnCl<sub>2</sub> (3 mM) für 3 min bei 37°C. Die Inkubation mit MnCl<sub>2</sub> diente durch Stabilisierung der hoch-affinen Konformation der β<sub>2</sub>-Integrine als Positivkontrolle. Die Proben wurden mit BD FACS Lysing Solution (1:10 Vorverdünnung mit H<sub>2</sub>O) im Verhältnis 1:10 auf Eis fixiert sowie nach zweimaliger Zentrifugation mit 800 x g für 10 min bei 4°C mit dem BD Canto II-Gerät analysiert. Zur Auswertung der prozentualen LFA-1-spezifischen rmlCAM-1/Fc-Bindung an PMN wurde mit FlowJo-Software ein Grenzwert der Fluoreszenzintensität festgelegt. Dieser ergab sich, indem 95% der PMN in der mit dem anti-CD11a-Antikörper behandelten Kontrollgruppe als negativ definiert wurden.

Die Mac-1-Affinität zu Fibrinogen wurde auf mPMN (2,0 x 10<sup>5</sup>/Probe) aus Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen wie beschrieben untersucht [293]. Nach Aufnahme in Adhäsionsmedium II erfolgte zeitgleich zur Stimulation mit rmCXCL (100 ng/ml) und MnCl<sub>2</sub> (3 mM) die Inkubation mit Alexa Fluor 647-konjugiertem humanem Fibrinogen (150 µg/ml) für 20 min bei 37°C. Die Kontrollproben wurden zur Blockade der Mac-1-vermittelten Bindung von Fibrinogen vor Zugabe der Stimuli und Antikörper mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA; 2mM) für 15 min bei RT inkubiert. Nach zweimaliger Zentrifugation (300 x g, 5 min, 4 °C) mit eiskaltem PBS erfolgte die Fixierung mit BD FACS Lysing Solution (1:10 Vorverdünnung mit H<sub>2</sub>O) im Verhältnis 1:10 auf Eis. Die Proben wurden anschließend zweimal bei 800 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert und der Durchflusszytometrie am BD Canto II-Gerät sowie Analyse mittels FlowJo-Software zugeführt. Um den prozentuellen Anteil der an Fibrinogen bindenden PMN zu ermitteln, wurde – vergleichbar mit dem Grenzwert für das ICAM-1-Bindeverhalten – die Fluoreszenzintensität von 95% der PMN in der EDTA-Kontrolle als negativ gesetzt.

#### **2.2.18 Mikroskopische Fluoreszenzanalysen**

##### **2.2.18.1 Confocal Spinning Disc-(CSD)-Mikroskopie**

Die Expression von LRP1 und CD11a auf der Oberfläche von isolierten mPMN aus C57Bl/6-Mäusen wurde unter Flussbedingungen während der Induktion der Adhäsion

untersucht. Die CSD-Mikroskopie erlaubt durch parallel genutzte Lochblenden auf einer rotierenden Nipkow-Scheibe eine hohe zeitliche Auflösung und eignet sich deshalb für die Echtzeitanalyse einzelner Schritte der Rekrutierungskaskade [294]. Nach Zellisolation und Inkubation über Nacht wurden  $7,5 \times 10^5$  isolierte mPMN gewaschen (300 x g, 5 min, RT) und für 10 min bei RT mit dem APC-konjugierten anti-CD11a-(Klon 2D7; 1:50) oder dem APC-konjugierten anti-Gr-1-(Klon RB6-8C5; 1:50)-Antikörper gefärbt. Der Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) mit PBS schloss sich ein weiterer Färbeschritt für 10 min bei RT mit dem FITC-konjugierten anti-LRP1-(Klon 14C2, 1:50)-Antikörper an. Die Zellen wurden erneut gewaschen und in Adhäsionsmedium II resuspendiert verblindet den Mikrofluskkammern (IBIDI  $\mu$ -slides IV 0,1) zugeführt. Diese wurden zuvor für 12h bei 4°C mit rmlCAM-1 (12,5  $\mu$ g/ml), rmP-Selektin (10  $\mu$ g/ml) und rmCXCL1 (5  $\mu$ g/ml) beschichtet. Die Versuchsdurchführung zur Analyse der Induktion der Adhäsion erfolgte wie unten beschrieben (siehe 2.2.19.1). Die Aufnahmen wurden mit dem Konfokalmikroskop Examiner der Firma Zeiss, welches mit dem Scanner CSU-X1 der Firma Yokogawa Electric Corporation, der CCD Kamera Evolve der Firma Photometrics sowie einem 20 x /1,0 NA Wasser-Immersionsobjektiv Plan Apochromat der Firma Zeiss ausgestattet war, durchgeführt. Es wurden zwei Laser mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm sowie 640 nm verwendet. Die Analyse der Fluoreszenzintensitäten sowie Kolokalisationsparameter (Pearsons's Korrelationskoeffizient) erfolgte mit der Slidebook 6.0.8 Software sowie dem Fiji/ImageJ Plugin coloc2. Die generierten Intensitätswerte wurden nach folgender Gleichung normalisiert:  $[I(t) - I(\min)] / [I(\max) - I(\min)]$ , mit  $I$  = Fluoreszenzintensität,  $t$  = Zeitpunkt,  $\min$  = minimale Fluoreszenzintensität,  $\max$  = maximale Fluoreszenzintensität.

### **2.2.18.2 Stimulated Emission Depletion-(STED)-Mikroskopie**

Die Kolokalisation von LRP1 und CD11a *in vitro* wurde mittels STED-Mikroskopie dargestellt. Durch einen ringförmigen Ausschaltfokus können Fluoreszenzsignale aus einem zentralen Bereich detektiert werden, der kleiner als der Anrefokuss ist. Somit werden Auflösungen in einem Bereich von unter 100 nm möglich, was eine deutliche Verbesserung im Vergleich zu der beugungsbegrenzten Lichtmikroskopie darstellt [295]. Nach Differenzierung in der Zellkultur wurden  $7,5 \times 10^5$  Hoxb8-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Kontrollzellen für 10 min mit dem anti-LRP1-(Klon EPR3724, 1:50) und APC-konjugierten anti-CD11a-(Klon 2D7; 1:50)-Primärantikörper sowie dem Alexa Fluor 594-konjugierten anti-Ratte-(Klon A-21209, 1:100) und dem Abberior STAR 635-konjugierten anti-Kaninchen-(Klon 2-0012-002-7; 1:100)-Sekundärantikörper gefärbt. Nach Zentrifugation (300 x g, 5 min, RT) und Resuspendierung in Adhäsionsmedium II wurden die Zellen Mikrofluskkammern (IBIDI  $\mu$ -slides IV 0,1) zugeführt. Diese wurden über Nacht mit rmlCAM-1, rmP-Selektin sowie rmMK wie im Protokoll zur Induktion der Adhäsion beschrieben (siehe 2.2.19.1) beschichtet. Die Kammern wurden bei 37°C mit einer Schubspannung von 1 dyne/cm<sup>2</sup> perfundiert und im Anschluss

durch 4% Paraformaldehyd (PFA) Infusion fixiert. Die Analyse erfolgte mit einem Leica TCS SP8 X Weißlichtlaser STED-Mikroskop, welches mit einem 100 x /1,4 NA Öl-Immersionsobjektiv der Firma Leica ausgestattet war, in sequentieller Aufnahmetechnik. Die Fluoreszenzsignale der Alexa Fluor 594- sowie Abberior STAR 635-Farbstoffe wurden mit einem Hybridphotonendetektor aufgenommen. Die Auswertung erfolgte mit der LAS X-Software der Firma Leica sowie ImageJ.

### **2.2.18.3 Confocal Laser Scanning-(CLS)-Mikroskopie**

Um eine Kolo-kalisation von LRP1 und CD11a *in vivo* nachzuweisen, wurde das Kremastermodell in C57Bl/6-Mäusen angewandt. Nach Narkotisierung des Versuchstieres mit Ketamin und Xylazin 2% erfolgte die Lagerung auf eine 37°C Wärmeplatte und chirurgische Präparation des *M. cremaster* wie in der Literatur beschrieben [185, 296]. Um die CXCL1-abhängige Adhäsion zu induzieren wurde durch einen in die *Arteria carotis* eingelegten Portex-Katheter (Innendurchmesser 0,28 mm) der Firma Smiths Medical, Grasbrunn 600 ng rmCXCL1 infundiert. Nach 10 min wurde das Versuchstier mittels Entbluten über die *Vena cava* sowie Genickbruch getötet. Der *M. cremaster* wurde abpräpariert und für 10 min in 4% Paraformaldehyd (PFA)- Lösung fixiert. Um unspezifische Antikörperbindestellen zu blocken und den isolierten *M. cremaster* zu permeabilisieren, folgte eine Inkubation in PBS-Lösung (2h, RT), welche zu 10% mit FKS und 0,5% mit TritonX-100 versetzt war. Anschließend wurde der Kremastermuskel über Nacht bei 4°C mit dem anti-CD11a-(Klon 2D7; 1:50) und anti-CD31-(Klon EPR17259; 1:50)-Primärantikörper gefärbt. Nach 4 Waschschriften für 3 h bei 4°C erfolgte eine Inkubation mit dem FITC-konjugierten anti-LRP1-(Klon 14C2, 1:50) sowie dem Alexa Fluor 647-konjugierten anti-Ratte-(polyklonal, 1:100) und Alexa Fluor 568-konjugierten anti-Kaninchen-(polyklonal 1:100)-Antikörper. Nach weiteren 4 Waschschriften wurde der Kremastermuskel mit PermaFluor auf einem Objektträger eingedeckt und die postkapillären Venolen konfokalmikroskopisch untersucht. Dafür wurde ein Leica TCS SP5 Mikroskop mit einem 63 x /1,4 NA Öl-Immersionsobjektiv verwendet. Die Bildanalyse erfolgte mit der Leica LAS AF-Software sowie ImageJ.

### **2.2.19 Funktionelle Analyse in Mikroflussskammern**

Die funktionelle Untersuchung von dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-, dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- sowie dHoxb8-SCF-LRP1-NP<sub>x</sub>YxxL<sup>ki</sup>- und dHoxb8-SCF-LRP1-NP<sub>x</sub>YxxL<sup>ctrl</sup>-Zellen erfolgte in IBIDI-Mikroflussskammern (μ-slides IV 0,1) mit unterschiedlichen Beschichtungen und Schubspannungen. Nach Beschichtung mit den Adhäsionsmolekülen rmP-Selektin/FC (10 μg/ml), rmlCAM-1 (12,5 μg/ml), rmCXCL1 (5 μg/ml) oder rmMK (10 μg/ml) für 12 h bei 4°C wurden die Flussskammern für 2 h bei RT mit 10% Casein geblockt. Anschließend wurden 7,5 x 10<sup>5</sup> Zellen / ml in Adhäsionsmedium II resuspendiert und durch die Hochpräzisions-spritzenpumpe KDS-232 der Firma KD Scientific mit von dem jeweiligen Protokoll

abhängigen Schubspannungen infundiert. Die Zeitraffer-Aufnahmen erfolgten mit einem Zeiss Axio Vert 200M-Mikroskop ausgestattet mit einem Plan-Apochromat 20 x /0,75 NA Objektiv sowie der AxioCam HR-Digitalkamera in einer Wärmekammer bei 37°C. Die Analyse wurde mit der ImageJ und AxioVision 4-Software durchgeführt.

#### **2.2.19.1 Induktion der Adhäsion**

Um die Induktion der Adhäsion zu untersuchen, wurden  $7,5 \times 10^5$  Zellen/ml in Adhäsionsmedium II mit einer konstanten Schubspannung von  $1 \text{ dyne/cm}^2$  für 9 min in die beschichteten Flusskammern infundiert. Mithilfe des Mikroskops wurden auf 18 verschiedenen Positionen je 3 Bilder im Abstand von 1 s zu 5 Zeitpunkten aufgenommen. Die Zahlen der rollenden sowie adhären PMN wurden quantitativ ermittelt. Der prozentuale Anteil der rollenden oder adhären dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen wurde in Abhängigkeit der rollenden oder adhären dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Kontrollzellen (100%) nach 9 min angegeben. Die Bestimmung der Gesamtzahl der adhären dHoxb8-SCF-LRP1-NP<sub>x</sub>YxxL-Zellen erfolgte zu 5 verschiedenen Zeitpunkten.

#### **2.2.19.2 Verstärkung der Adhäsion**

Für die Untersuchung der Verstärkung der Adhäsion unter Flussbedingungen wurden  $7,5 \times 10^5$  Zellen/ml in 50 µl Adhäsionsmedium II resuspendiert und in die Flusskammer infundiert. Der Inkubation bei 37°C für 10 min ohne Fluss folgte die Aktivierung der Pumpe, welche mit einem Programm die Schubspannung alle 90 s von 0,2 bis  $8,0 \text{ dyne/cm}^2$  erhöhte. Die Aufnahme der Videos erfolgte für 9 min und die relative Adhäsion zu 7 Zeitpunkten mit verschiedenen Schubspannungen wurde als Verhältnis der adhären PMN relativ zu den initial adhären PMN bei  $0,2 \text{ dyne/cm}^2$  (100%) angegeben.

#### **2.2.19.3 Abflachung der Zelle**

Die Abflachung der Zelle wurde nach Infusion von  $7,5 \times 10^5$  Zellen/ml, einer Inkubationsphase von 10 min ohne Fluss sowie der Applikation einer Schubspannung von  $1 \text{ dyne/cm}^2$  für 10 min, wie im Kapitel der mechanotaktischen Migration beschrieben (siehe 2.2.19.4), untersucht. Als Parameter der Abflachung der PMN wurde vor und nach konstanter Schubspannung für 10 min die Zellfläche in  $\mu\text{m}^2$  mit der ImageJ-Software ermittelt.

#### **2.2.19.4 Mechanotaktische Migration**

Die Untersuchung der mechanotaktischen Migration erfolgte, nachdem  $7,5 \times 10^5$  Zellen/ml in Adhäsionsmedium II in die Flusskammern infundiert und für 10 min bei 37°C ohne Fluss dort inkubiert wurden. Die Pumpe applizierte anschließend eine Schubspannung von  $1 \text{ dyne/cm}^2$  für 10 min. Die Zeitraffer-Aufnahme erfolgte während der Flussphase durch Aufnahme eines Bildes alle 5 s. Die Migrationsgeschwindigkeit sowie zurückgelegte euklidische Distanz wurde mit der ImageJ-Software und dem manuellen Tracking-Plugin von Fabrice Cordelies

(Institute Curie, Paris, France) gemessen. Die euklidische Distanz bezeichnet dabei die Länge der Strecke, welche den Anfangs- und Endpunkt der migrierenden Zelle gerade verbindet. Die Analysesoftware Migration Tool V2.0 von IBIDI wurde für die Einzelzellanalyse und Darstellung der Migrationspfade genutzt.

### **2.3 Statistische Auswertung**

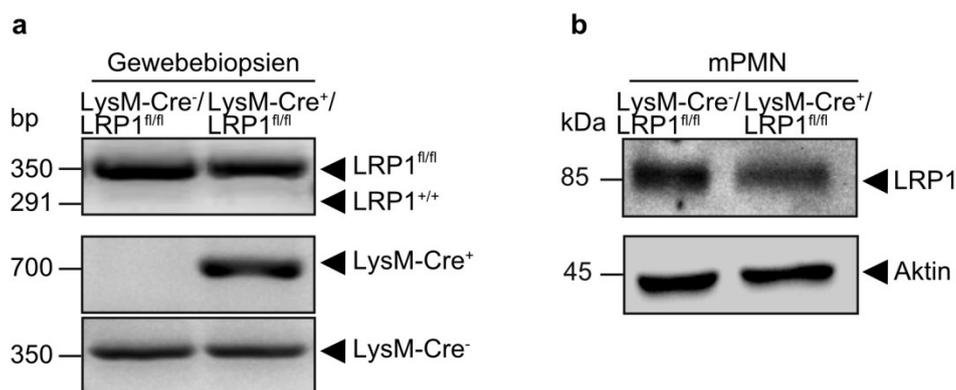
Die Datenauswertung und Darstellung erfolgte mit der Sigma Plot v10.0 Software als *Mean ± Standard Error of Mean* (SEM). Um zwei Gruppen zu vergleichen, wurde der Student's t-Test oder Mann-Whitney rank-sum Test, für den Vergleich von mehreren Gruppen der Kruskal-Wallis ANOVA Test oder one-way ANOVA Test eingesetzt. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0,05 angenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung eines LRP1-defizienten Maus- und Zellmodells

##### 3.1.1 Genotypische und phänotypische Untersuchung von LysM-Cre/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und Vav-iCre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen

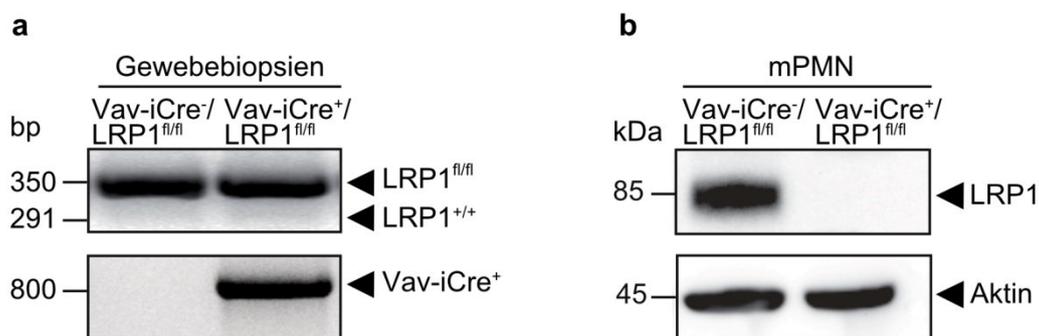
Da eine systemische LRP1-Deletion zum frühen Tod während der embryonalen Entwicklung der Maus führt, wurde das Cre/loxP-System für eine gewebespezifische LRP1-Deletion im Mausmodell gewählt [235, 236]. Nach Verpaarung von LRP1<sup>fl/fl</sup>- mit LysM-Cre-Tieren erfolgte die Kontrolle des Genotyps durch eine genomische PCR nach DNA-Isolation aus Gewebebiopsien. Hier zeigten sich erwartungsgemäß homozygote loxP-Allele im LRP1-Gen durch Nachweis einer 350 bp Bande. Für die Versuchstiere wurde ein heterozygoter LysM-Cre-Genotyp gewählt, da homozygote LysM-defiziente Mäuse eine veränderte Entzündungsreaktion im Vergleich zum WT zeigten [297]. Der heterozygote Genotyp konnte in der LysM-Cre-PCR durch Banden bei 350 bp und 700 bp identifiziert werden (Abbildung 12a). Um die LRP1-Expression auf Proteinebene zu untersuchen, wurden PMN aus dem Knochenmark isoliert und einer Western-Blot-Analyse zugeführt. Diese zeigte nach Inkubation mit einem LRP1-Antikörper gegen die 85 kDa transmembranäre  $\beta$ -Domäne für die PMN aus LysM-Cre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen trotz korrektem Genotyp eine deutliche LRP1-Expression (Abbildung 12b). Durch die insuffiziente Reduktion der LRP1-Expression waren diese Versuchstiere nicht für die weiteren Versuche dieser Studie geeignet.



**Abbildung 12: Charakterisierung der LysM-Cre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse mit PCR und Western-Blot.** (a) Genomische PCR nach DNA-Isolation aus Ohrbiopsien, welche von LysM-Cre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- sowie LysM-Cre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen gewonnen wurden. (b) Der Western-Blot mit Lysaten von mPMN, welche aus dem Knochenmark von LysM-Cre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und LysM-Cre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Tieren isoliert wurden, zeigt die LRP1- und  $\beta$ -Aktin-Expression.  $\beta$ -Aktin wurde dabei als Ladekontrolle gewählt. n = 3 (a und b).

Um in mPMN eine LRP1-Deletion zu erreichen, wurden in einem neuen Ansatz LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse mit Vav-iCre-Mäusen verpaart. Die iCre-Rekombinase stellt dabei eine genetisch

modifizierte Variante der Cre-Rekombinase mit gesteigerter Expressionsrate dar [284]. Da die PCR keine Unterscheidung des homozygoten und heterozygoten Vav-iCre-Genotyps erlaubte, wurde für heterozygote Vav-iCre-Zieltiere eine entsprechende Verpaarungsstrategie gewählt. Da die Primer im iCre-Locus binden, war nur bei Vav-iCre<sup>+</sup>-Mäusen ein 800 bp Produkt zu detektieren. Nach Bestimmung des Genotyps erfolgte die Kontrolle der LRP1-Expression in PMN auf Proteinebene. Im Vergleich zu den PMN aus Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Kontrolltieren zeigte der Western-Blot mit mPMN aus Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Tieren durch Abwesenheit einer Bande bei 85 kDa einen LRP1-Verlust auf Proteinebene an (Abbildung 13b). Diese Mäuse wurden mit den entsprechenden Kontrolltieren in den weiteren Experimenten dieser Studie eingesetzt.

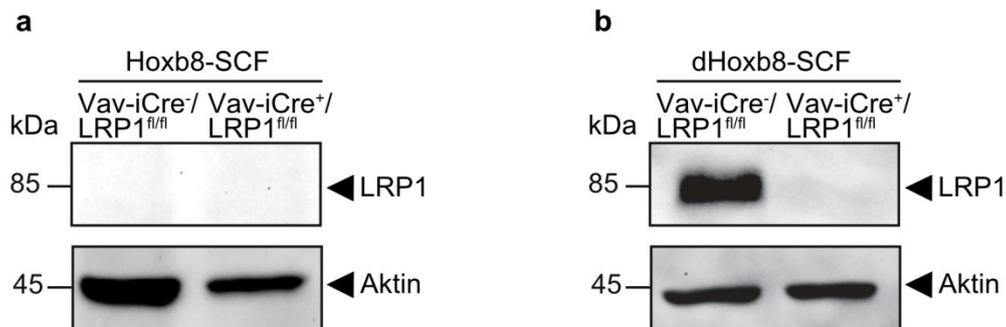


**Abbildung 13: Charakterisierung der Vav-iCre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse mit PCR und Western-Blot** modifiziert nach Weckbach et al., 2019 [158]. (a) Genomische PCR nach DNA-Isolation aus Ohrbiopsien, welche von Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- sowie Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen gewonnen wurden. (b) Der Western-Blot mit Lysaten von mPMN, welche aus dem Knochenmark von Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Tieren isoliert wurden, zeigt die LRP1- und  $\beta$ -Aktin-Expression.  $\beta$ -Aktin wurde dabei als Ladekontrolle gewählt. n = 3 (a und b).

### 3.1.2 Generierung von LRP1-defizienten Hoxb8-SCF-Zellen aus Vav-iCre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen

Um über ein Zellsystem für PMN zu verfügen, das in Kultur eine rasche Expansion ermöglicht und hohe Zellzahlen hervorbringt, wurde auf eine etablierte immortalisierte hämatopoetische Vorläuferzelllinie zurückgegriffen. Die retroviral induzierte Expression des Östrogen-regulierten Hoxb8-Fusionsproteins führt zur Immortalisierung von Vav-iCre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Vorläuferzellen. In Abwesenheit von Östrogen differenzieren die Hoxb8-Zellen in Gegenwart von SCF und G-CSF zu PMN [287, 288]. Ein Western-Blot zeigte nach Lyse der undifferenzierten Vorläuferzellen weder für Zellen aus Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- noch aus Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen eine LRP1-Bande. Das konstitutiv exprimierte Aktin wurde als Positivkontrolle gewählt und zeigte eine Bande bei 45 kDa (Abbildung 14a). Demgegenüber konnte nach Zelldifferenzierung für 4 Tage in Abwesenheit von Östrogen LRP1-Protein in dHoxb8-SCF-Zellen aus Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen nachgewiesen werden, während die Zellen aus

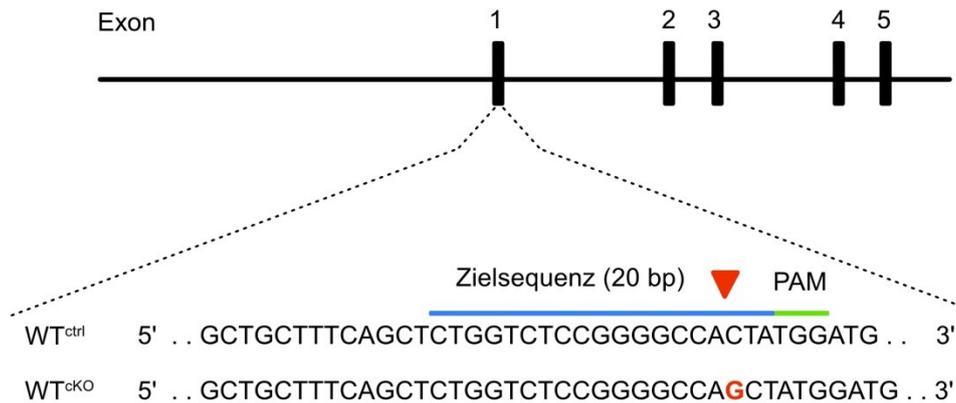
Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Tieren keine LRP1-Bande zeigten (Abbildung 14b). Das Ergebnis legt daher die Induktion der LRP1-Expression nach Einleitung der Zelldifferenzierung nahe und zeigt, dass auch in PMN aus Hoxb8-Zellen von Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen LRP1 auf Proteinebene erfolgreich ausgeschaltet werden konnte.



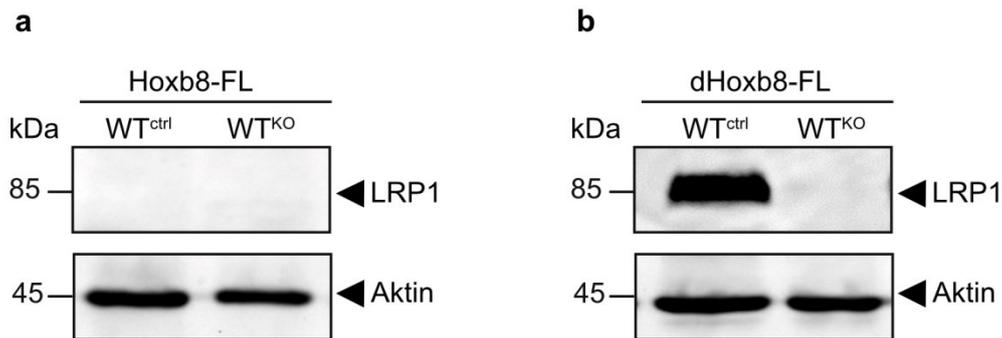
**Abbildung 14: LRP1-Expression in undifferenzierten und dHoxb8-SCF-Zellen.** (a) Western-Blot mit Lysaten aus undifferenzierten Hoxb8-SCF-Zellen. (b) Darstellung der LRP1-Expression in dHoxb8-SCF-Zellen modifiziert nach Weckbach et al., 2019 [158].  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert. n = 3 (a und b).

### 3.1.3 Generierung von LRP1-defizienten Hoxb8-FL-Zellen mittels CRISPR/Cas9

Ähnlich wie Hoxb8-SCF-Zellen stellen Hoxb8-FL-Zellen ein weiteres immortalisiertes Zellsystem dar. Die retroviral induzierte Expression des Östrogen-regulierten Hoxb8-Fusionsproteins führte zur Immortalisierung der Vorläuferzellen aus WT-Mäusen. Durch Wegnahme von Östrogen differenzieren die Hoxb8-FL-Zellen in Gegenwart von GM-CSF zu PMN, Makrophagen sowie DC und unterscheiden sich in diesem Differenzierungsmuster von Hoxb8-SCF-Zellen. Um eine gezielte Mutation in das LRP1-Genom einzuführen und durch Verschiebung des Leserahmens vorzeitige Stoppcodons zu erreichen, wurde das CRISPR/Cas9-System eingesetzt. Die Identifikation von potenziellen LRP1-defizienten Subklonen erfolgte zweistufig mittels Sequenzierung und Western-Blot-Analyse. Bei einem Klon konnte eine Insertion einer Base im Exon 1 des LRP1-Genoms festgestellt werden (Abbildung 15). Nach Ausdifferenzierung der Zellen für 5 Tage wurde eine Zelllyse durchgeführt und die LRP1-Expression mit einem spezifischen Antikörper auf Proteinebene mittels Western-Blot untersucht. Analog zu den undifferenzierten Hoxb8-SCF-Zellen konnte in den undifferenzierten Hoxb8-FL-Zellen keine LRP1-Expression gezeigt werden. Nach Differenzierung wurde im Western-Blot mit Lysaten von Kontrollzellen eine 85 kDa Bande nachgewiesen und somit LRP1 exprimiert (dHoxb8-FL-WT<sup>ctrl</sup>). Der mittels Sequenzierung identifizierte mutierte Klon zeigte nach Ausdifferenzierung keine LRP1-Bande und konnte somit auch auf Proteinebene als LRP1-defizient identifiziert werden (dHoxb8-FL-WT<sup>KO</sup>; Abbildung 16).



**Abbildung 15: Schematische Darstellung der Cas9-Zielstruktur und Insertion einer Base im LRP1-Genom einer Hoxb8-FL-WT-Zelle.** Die spezifische Bindestelle der Cas9-Nuklease im Exon 1 des LRP1-Genoms wird durch die Zielsequenz (blau) in der sgRNA bestimmt. Der Zielsequenz muss eine 5'-NGG PAM-Sequenz (grün) vorausgehen. Nach Watson-Crick-Basenpaarung schneidet die Cas9-Nuklease ca. 3 bp in 5'-Richtung der PAM-Sequenz (roter Pfeil). Die Sequenzierung zeigte in einem Subklon eine Insertion der Base Guanin (rot).

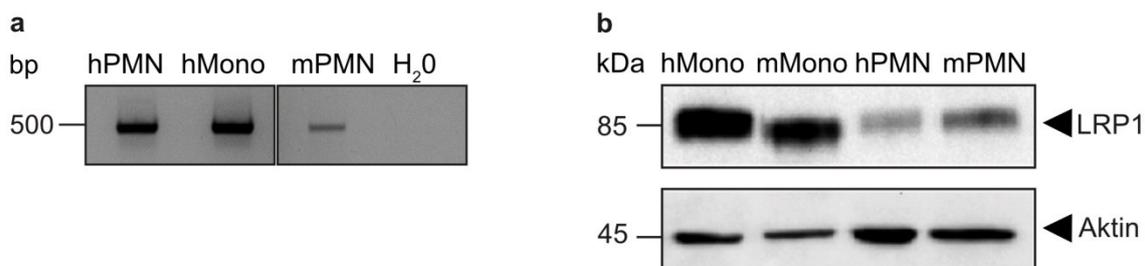


**Abbildung 16: LRP1-Expression in undifferenzierten und dHoxb8-FL-WT-Zellen.** Der Western-Blot des durch Sequenzierung identifizierten potenziellen LRP1-defizienten Klones wurde sowohl mit undifferenzierten (**a**) als auch differenzierten Hoxb8-FL-WT-Zellen (**b**) durchgeführt.  $\beta$ -Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert. n = 3 (a und b).

## 3.2 Molekulare Charakterisierung von LRP1 und $\beta_2$ -Integrinen auf PMN

### 3.2.1 Expression und Regulation von LRP1 auf PMN

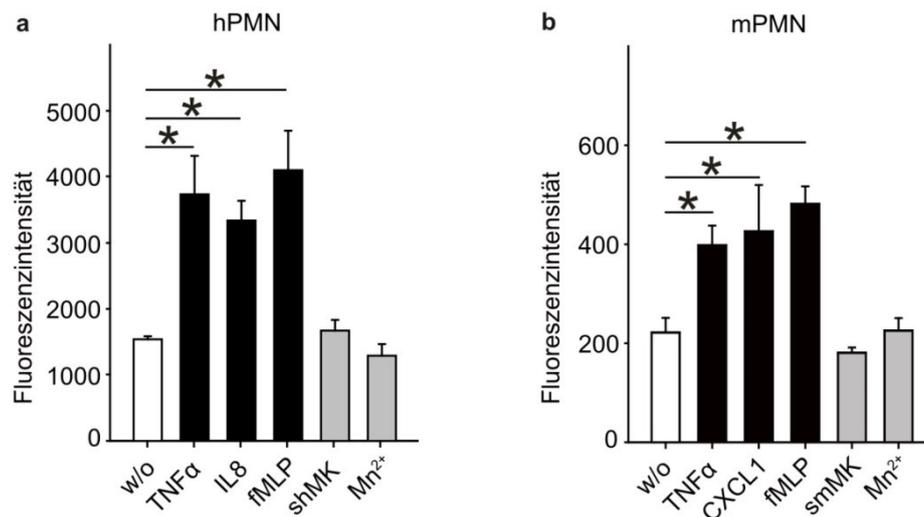
Um das LRP1-Protein molekular zu charakterisieren, wurden zuerst die basalen Expressionslevel auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Als Positivkontrolle wurde jeweils die bekannte LRP1-Expression in Monozyten gewählt [298]. Mittels Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) konnte LRP1-mRNA in humanen und murinen PMN nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle wurde in der PCR  $H_2O$  statt die DNA-Matrize zugegeben (Abbildung 17a). Der LRP1-Nachweis auf Proteinebene erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen die 85 kDa transmembranäre  $\beta$ -Domäne mittels Western-Blot. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin detektiert. Es zeigte sich, dass LRP1 nicht nur in mPMN, sondern auch in hPMN auf mRNA und Proteinebene exprimiert wurde. (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Analyse der LRP1 Expression auf mRNA- und Proteinebene. (a)** Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) nach mRNA-Isolation aus humanen (h)PMN, mPMN sowie humanen Monozyten (hMono). Die Negativkontrolle wurde mit  $H_2O$  durchgeführt. **(b)** Western-Blot mit Zelllysaten von hMono sowie mMono und PMN. Die murinen Zellen wurden aus dem Knochenmark von C57Bl/6-Wildtypmäusen isoliert.  $\beta$ -Aktin wurde zur Ladekontrolle detektiert.  $n = 3$  (a und b).

Die Regulation von LRP1 wurde nach Inkubation mit verschiedenen Stimuli durchflusszytometrisch mit einem FITC-konjugierten Antikörper gegen die 515 kDa extrazelluläre  $\alpha$ -Domäne untersucht. Die LRP1-Oberflächenexpression auf hPMN wurde durch Inkubation mit  $TNF\alpha$  ( $3728 \pm 582$ ), IL8 ( $3332 \pm 297$ ) oder fMLP ( $4094 \pm 597$ ) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ( $1533 \pm 47$ ) signifikant induziert. Eine Inkubation der hPMN mit shMK ( $1666 \pm 160$ ) oder  $MnCl_2$  ( $1282 \pm 177$ ) zeigte keine signifikante Veränderung der Expressionslevel. Die LRP1-Expression auf mPMN war nach Inkubation mit  $TNF\alpha$  ( $398 \pm 39$ ), CXCL1 ( $426 \pm 93$ ) oder fMLP ( $481 \pm 35$ ) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle ( $222 \pm 29$ ) signifikant erhöht, während smMK ( $181 \pm 10$ ) oder  $MnCl_2$  ( $226 \pm 25$ ) wie auf hPMN ebenfalls keinen Effekt zeigten (Abbildung 18). LRP1 wird somit in humanen und murinen PMN

exprimiert und die Oberflächenexpression nach Inkubation mit pro-inflammatorischen Stimuli induziert.

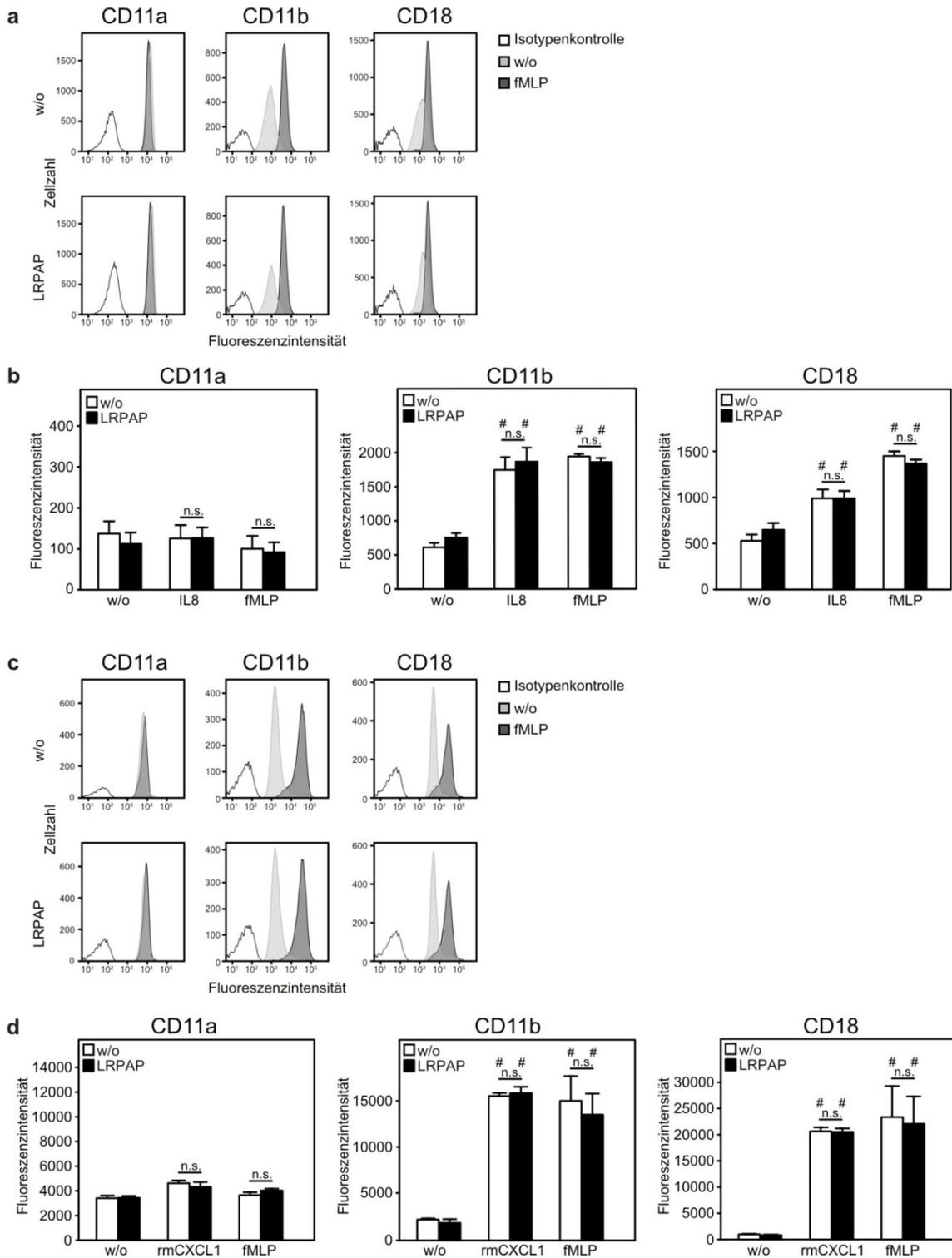


**Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse der LRP1-Expression auf humanen und murinen PMN nach Stimulation.** (a) Die Fluoreszenzintensität zeigt die LRP1-Expression auf hPMN nach Stimulation mit rhTNFα (100 ng/ml), IL8 (100 ng/ml), fMLP (100 nM), shMK (1 µg/ml), MnCl<sub>2</sub> (3 mM) oder der unstimulierten Kontrolle (w/o). (b) Darstellung der LRP1-Expression auf mPMN nach Stimulation mit rmTNFα (100 ng/ml), rmCXCL1 (100 ng/ml), fMLP (10 µM), smMK (1 µg/ml) oder MnCl<sub>2</sub> (3 mM) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (w/o). n = 3. \*, p < 0,05 (a und b).

### 3.2.2 Die Rolle von LRP1 für die Expression von β<sub>2</sub>-Integrinen auf PMN

#### 3.2.2.1 β<sub>2</sub>-Integrin-Expression auf PMN nach LRP1-Blockade mit LRPAP

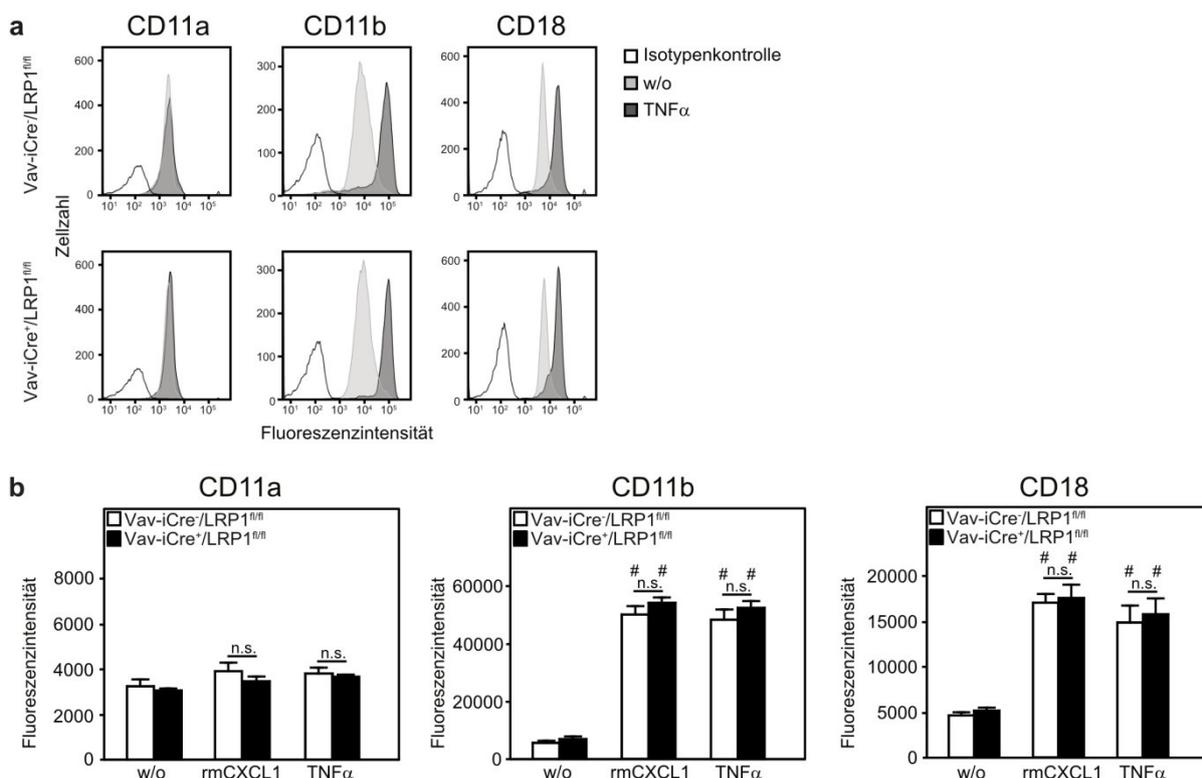
Da bekannt ist, dass LRP1 mit β<sub>2</sub>-Integrinen interagiert und diese Interaktion durch inflammatorische Stimuli verstärkt wird, wurde zunächst die Rolle von LRP1 für die β<sub>2</sub>-Integrin-Expression nach Stimulation und LRP1-Blockade mit LRPAP untersucht [202, 276]. Die Analyse der CD11a-, CD11b- und CD18-Expression erfolgte auf humanen und murinen PMN nach Inkubation mit LRPAP sowie den Stimuli rmCXCL1, fMLP, IL8 oder Adhäsionsmedium zur Kontrolle. LRPAP blockiert dabei alle Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie [299]. Erwartungsgemäß zeigte sich in der Durchflusszytometrie, dass die Expression von CD11a auf humanen und murinen PMN nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle unverändert war. Demgegenüber war die Expression von CD11b und CD18 nach Stimulation mit IL8 und fMLP (hPMN) bzw. rmCXCL1 und fMLP (mPMN) deutlich erhöht. Nach pharmakologischer LRP1-Blockade zeigte sich weder ohne Stimulation noch nach Stimulation mit inflammatorischen Mediatoren ein Effekt auf die β<sub>2</sub>-Integrin-Expression auf hPMN (Abbildung 19a und b) und mPMN (Abbildung 19c und d). Für eine genauere Untersuchung der Rolle von LRP1 für die Oberflächenexpression der β<sub>2</sub>-Integrine wurden nachfolgend LRP1-defiziente mPMN eingesetzt.



**Abbildung 19: Oberflächenexpression von  $\beta_2$ -Integrinen auf humanen (a und b) und murinen (c und d) PMN nach Inkubation mit LRPAP im Vergleich zur Kontrolle.** Repräsentative Histogramme sowie quantitative Darstellung der Oberflächenexpression von CD11a, CD11b sowie CD18 auf hPMN nach Isolation aus dem Vollblut (a und b) sowie isolierten mPMN aus dem Knochenmark von WT-Mäusen (c und d). Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte nach Inkubation mit mLRPAP (3  $\mu$ M), rhLRPAP (3  $\mu$ M) oder Adhäsionsmedium (w/o) zur Kontrolle für 20 min, Stimulation mit rmCXCL1 (100 ng/ml), fMLP (mPMN: 10  $\mu$ M; hPMN: 100 nM), IL8 (100 ng/ml) oder Adhäsionsmedium zur Kontrolle für 20 min sowie Inkubation mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern. n = 3 (a - d). #, p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (b und d). n.s. = nicht signifikant.

### 3.2.2.2 $\beta_2$ -Integrin-Expression auf PMN in Abwesenheit von LRP1

Um die Ergebnisse der  $\beta_2$ -Integrin-Expression nach pharmakologischer LRP1-Blockade zu bestätigen, wurden LRP1-defiziente mPMN sowie entsprechende Kontrollzellen aus Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- sowie Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen isoliert. Nach Stimulation mit CXCL1 oder TNF $\alpha$  sowie Inkubation mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen die Antigene CD11a, CD11b oder CD18 erfolgte die durchflusszytometrische Analyse. Erwartungsgemäß zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Expression von CD11b und CD18 nach Stimulation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Das konstitutiv exprimierte CD11a war demgegenüber nach Stimulation im Vergleich zur Kontrolle unverändert. In Abwesenheit von LRP1 zeigte sich nach Stimulation mit CXCL1 oder TNF $\alpha$  keine Änderung der  $\beta_2$ -Integrin-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 20). Dies deutet darauf hin, dass eine veränderte  $\beta_2$ -Integrin-Expression auf mPMN nicht die Ursache für funktionelle Effekte bei LRP1-Defizienz darstellte.



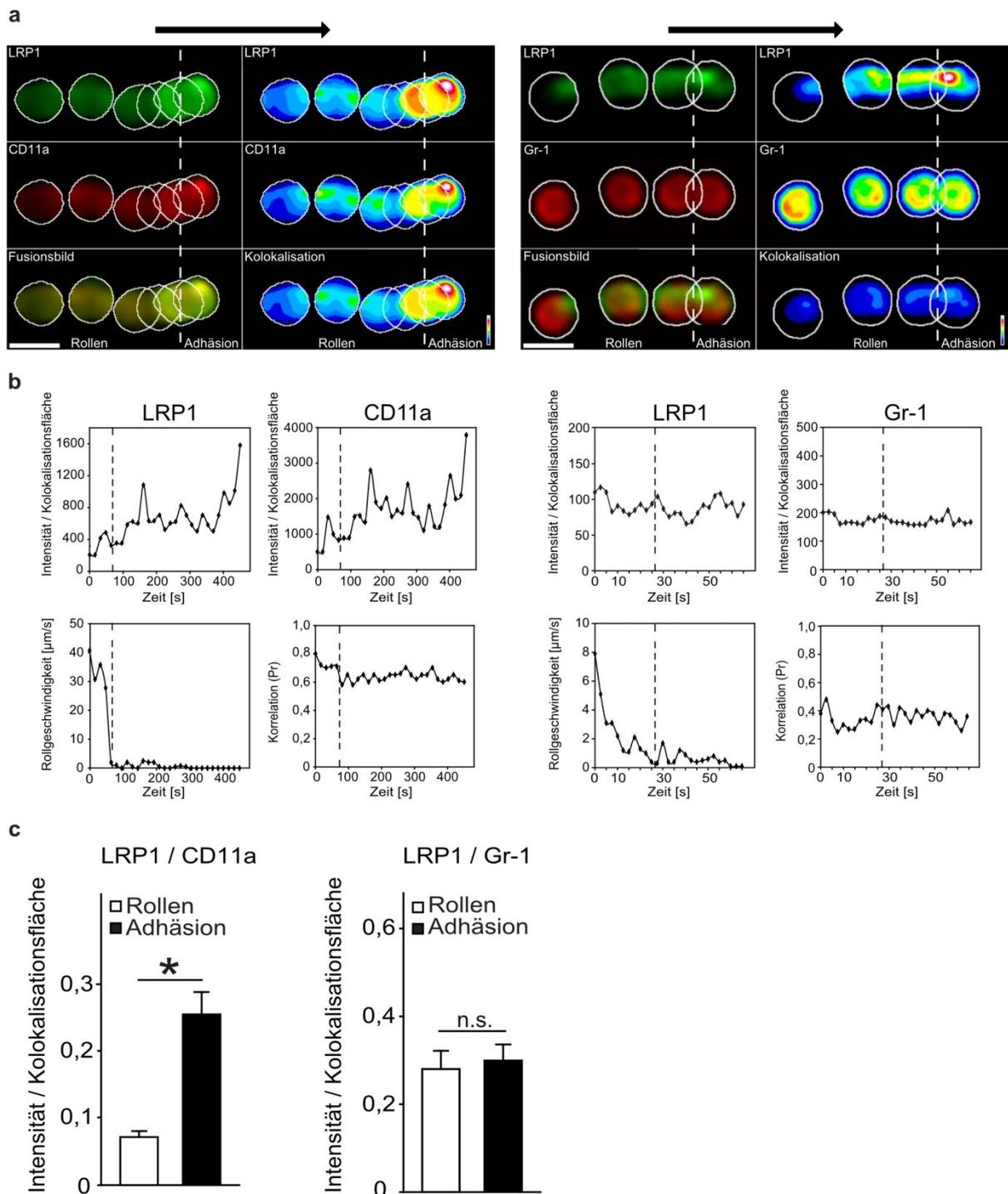
**Abbildung 20: Darstellung der  $\beta_2$ -Integrin-Oberflächenexpression auf mPMN aus Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup> sowie Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen** modifiziert nach Weckbach et al., 2019 [158]. Repräsentative Histogramme (a) sowie quantitative Auswertung (b) nach Stimulation der mPMN mit rmCXCL1 (100 ng/ml), TNF $\alpha$  (100 ng/ml) oder Adhäsionsmedium zur Kontrolle sowie Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen CD11a, CD11b und CD18. n = 3 (a und b). #, p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (b). n.s. = nicht signifikant.

### 3.3 Funktionelle Charakterisierung von LRP1

Um die funktionelle Rolle von LRP1 für die Rekrutierung von PMN zu untersuchen, wurde zunächst die exakte Lokalisation von LRP1 und  $\beta_2$ -Integrinen während der Induktion der Adhäsion konfokalmikroskopisch dargestellt. Die Regulation der hoch-affinen Konformation der  $\beta_2$ -Integrine in Abhängigkeit von LRP1 konnte durch das Bindevverhalten von ICAM-1 und Fibrinogen durchflusszytometrisch analysiert werden. Das reduktionistische System der Mikrofluskkammern erlaubte es, die Bedeutung von LRP1 für die einzelnen Schritte der Rekrutierungskaskade in Abhängigkeit verschiedener Beschichtungen zu untersuchen.

#### 3.3.1 Kolokalisation von LRP1 mit dem $\beta_2$ -Integrin LFA-1

Die exakte Lokalisation von LRP1 und dem  $\beta_2$ -Integrin LFA-1 (CD11a/CD18) während der Induktion der Adhäsion wurde durch Kolokalisationsstudien in Mikrofluskkammern mit rmP-Selektin/FC-, rmICAM-1- und rmCXCL1-Beschichtung untersucht [300]. Die LRP1/CD11a-Kolokalisation wurde nach Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern auf mPMN aus C57Bl/6-Mäusen mittels CSD-Mikroskopie bestimmt. Durch die hohe zeitliche Auflösung war die genaue Bestimmung der LRP1- und CD11a-Verteilung auf der Zelloberfläche während dem Übergang vom Rollen zur Adhäsion möglich. Es zeigte sich nach Adhäsion der Zellen eine gesteigerte Kolokalisation sowie ein *Clustering* von LRP1 und CD11a auf der Zelloberfläche (Abbildung 21a und b). Die quantitative Analyse von 23 Zellen aus 5 unabhängigen Experimenten ergab eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenzintensität pro Kolokalisationsfläche von LRP1 und CD11a nach Adhäsion der Zellen ( $0,255 \pm 0,033$ ) im Vergleich zum Rollen ( $0,071 \pm 0,009$ ) wie in Abbildung 21c dargestellt. Um eine unspezifische Kolokalisation auszuschließen, erfolgte zur Kontrolle die Analyse der Oberflächenexpression von LRP1 und Gr-1 während dem Übergang vom Rollen zur Adhäsion. Während ein *Clustering* von LRP1 nach Adhäsion der Zelle deutlich erkennbar war, zeigte das Gr-1 Molekül eine unveränderte Oberflächenverteilung (Abbildung 21a). Auch in der quantitativen Analyse konnte keine spezifische Kolokalisation zwischen LRP1 und Gr-1 nach Zelladhäsion detektiert werden (Abbildung 21b). Eine Auswertung der Intensität pro Kolokalisationsfläche von LRP1 und Gr-1 auf 11 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten bestätigte diesen Eindruck und zeigte keinen signifikanten Anstieg während des Übergangs vom Rollen zur Adhäsion (Rollen:  $0,280 \pm 0,042$ ; Adhäsion:  $0,299 \pm 0,037$ ), dargestellt in Abbildung 21c. Die Experimente verdeutlichen das spezifische *Clustering* sowie die Kolokalisation von LRP1 und CD11a nach Induktion der Adhäsion in Flusskammern, die mit rmP-Selektin/FC, rmICAM-1 und rmCXCL1 beschichtet waren. [158]

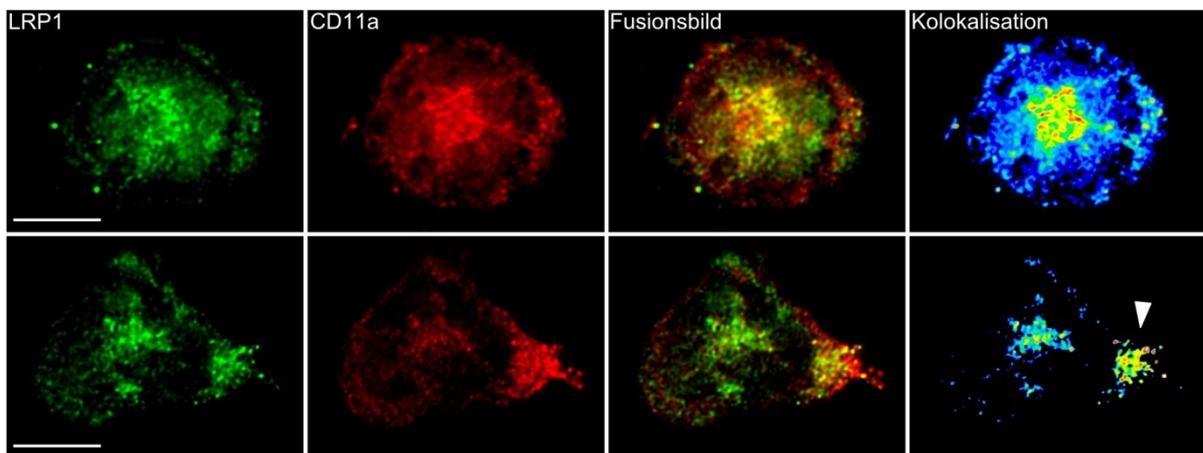


**Abbildung 21: Analyse der Kolokalisation von LRP1 und CD11a während den Rekrutierungsschritten Rollen und Adhäsion *in vitro*** modifiziert nach Weckbach et al., 2019 [158]. Die Flusskammerexperimente wurden nach Färbung von isolierten mPMN aus dem Knochenmark von C57Bl/6-Mäusen nach dem Protokoll „Induktion der Adhäsion“ mit rmP-Selektin/FC-, rmlCAM-1- und rmcXCL1-Beschichtung durchgeführt. Die Aufnahmen erfolgten mit dem CSD-Mikroskop. Die gestrichelte vertikale Linie zeigt den Übergang vom Rollen zur Adhäsion. **(a)** Die Fluoreszenzintensitäten für die LRP1/CD11a oder LRP1/Gr-1 Färbung sind zusammen mit einem Fusionsbild der Kolokalisation durch eine repräsentative Zelle während des Rollens und der Adhäsion dargestellt. Die jeweils rechte Seite zeigt die Fluoreszenzintensitäten kodiert als *heatmap*. Die Flussrichtung wird durch den Pfeil angegeben. Marker = 10 µm **(b)** Darstellung der Intensität/Kolokalisationsfläche von LRP1/CD11a oder LRP1/Gr-1, der Rollgeschwindigkeit (µm/s) sowie der Korrelation der Kolokalisation

(Pearson) während Rollen und Adhäsion einer repräsentativen Zelle. **(c)** Die Intensität/Kolokalisationsfläche wird für LRP1 und CD11a oder LRP1 und Gr-1 als *Mean ± SEM* während des Rollens und der Adhäsion dargestellt. LRP1/CD11a: n = 23 Zellen aus 5 unabhängigen Experimenten; LRP1/Gr-1: n = 11 Zellen aus 3 unabhängigen Experimenten. \*, p < 0,05. n.s. = nicht signifikant.

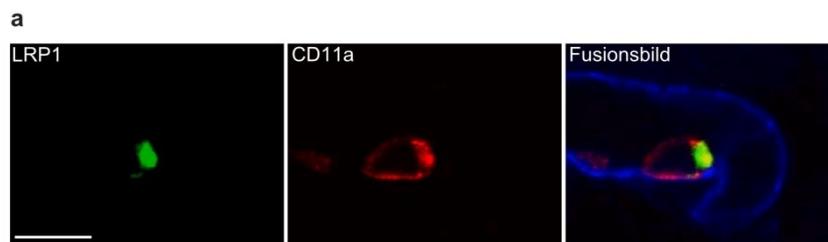
Weitere Lokalisationsstudien wurden mit dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen durchgeführt. In Abwesenheit von Östrogen reifen die Zellen in Gegenwart von SCF zu PMN. Diese differenzierten Hoxb8-Zellen sind dem Verhalten von frisch isolierten mPMN aus dem Knochenmark sehr ähnlich und stellen deshalb nach Zehrer et al. ein geeignetes System zur Analyse der PMN-Rekrutierungskaskade dar [158, 286]. Nach Färbung mit spezifischen anti-LRP1- und anti-CD11a-Antikörpern wurden die Zellen mit einer Schubspannung von 1 dyne/cm<sup>2</sup> in Mikroflussskammern infundiert, welche mit rmP-Selektin/FC, rmlCAM-1 und rmMK beschichtet waren. Der Fixierung mit 4% PFA folgten die Aufnahmen mittels hochauflösender STED-Mikroskopie. Es zeigte sich für die adhärennten sowie migrierenden dHob8-Zellen auf rmMK eine Kolokalisation von LRP1 und CD11a als potenzielle fokale Adhäsionspunkte (Abbildung 22), wie sie auch bei Beschichtung mit rmCXCL1 sichtbar waren (Abbildung 21) [158]. Die Aufnahme der migrierenden Zelle (Abbildung 22, untere Reihe) legt nahe, dass sich das *Clustering* und die Kolokalisation von LRP1 und CD11a dort insbesondere am Hinterende der Zelle (Uropod) konzentrieren. [158]

a



**Abbildung 22: Darstellung der Kolokalisation von LRP1 und CD11a auf einer adhärennten (obere Bildreihe) sowie migrierenden Zelle (untere Bildreihe) *in vitro* modifiziert nach Weckbach et al., 2019 [158].** Repräsentative Aufnahmen von dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen, welche nach Färbung mit spezifischen anti-LRP1- und anti-CD11a-Antikörpern nach dem Protokoll „Induktion der Adhäsion“ mit 1 dyne/cm<sup>2</sup> in Mikroflussskammern mit rmP-Selektin/FC-, rmlCAM-1- und rmMK-Beschichtung infundiert wurden. Nach Fixierung mit 4% PFA erfolgte die Aufnahme mittels STED-Mikroskopie. Die Abbildung zeigt eine adhärennte Zelle in der oberen sowie eine migrierende Zelle in der unteren Reihe mit LRP1 (grün), CD11a (rot), Fusionsbild (gelb) und Kolokalisation von LRP1 und CD11a als *heatmap*. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Aufnahme für 3 unabhängige Experimente. Der weiße Pfeil markiert die Kolokalisation von LRP1 und CD11a am Uropod der Zelle. Marker = 10 µm.

Um die Kolokalisation von LRP1 und CD11a *in vivo* zu untersuchen, wurde das Entzündungsmodell im *M. cremaster* in C57Bl/6-Mäusen angewandt. Nach Vorbereitung und Präparation des *M. cremaster* (siehe 2.2.18.3) erfolgte eine Inkubation mit den FITC-konjugierten anti-LRP1, anti-CD11a sowie anti-CD31 Primärantikörpern über Nacht. CD31 (*Platelet endothelial cell adhesion molecule*, PECAM-1) wird auf der Oberfläche von Endothelzellen in hoher Menge exprimiert und dient als deren Marker. Nach Inkubation mit den Sekundärantikörpern wurden die postkapillären Venolen konfokalmikroskopisch aufgesucht. Es zeigte sich auch *in vivo* eine Kolokalisation von LRP1 und CD11a an potentiellen fokalen Adhäsionspunkten auf dem Endothel (Abbildung 23).



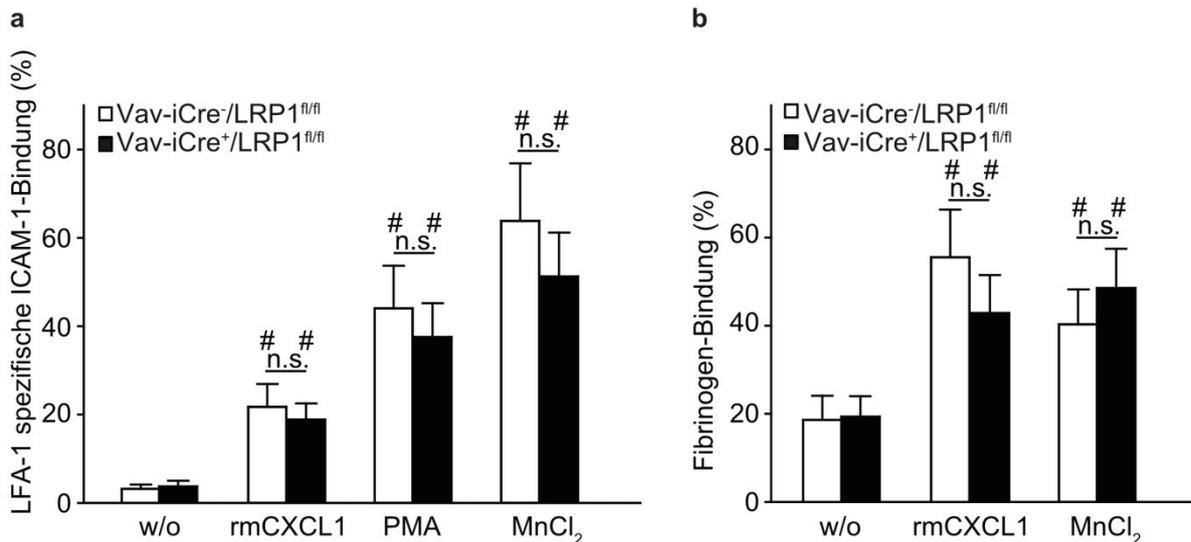
**Abbildung 23: Analyse der Kolokalisation von LRP1 und CD11a im Kremastermuskel *in vivo*.** Darstellung eines repräsentativen intravasalen mPMN. Nach Präparation des *M. cremaster* einer C57Bl/6 Maus wurde dieser über Nacht mit anti-LRP1 (grün), anti-CD11a (rot) sowie anti-CD31 (blau) Antikörpern gefärbt. Die Aufnahmen erfolgten nach Aufsuchen der postkapillären Venolen des *M. cremaster* mit CLS-Mikroskopie. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Aufnahme für 3 unabhängige Experimente. Marker = 15 µm.

### 3.3.2 Einfluss von LRP1 auf die hoch-affine Konformation von $\beta_2$ -Integrinen

Nach Darstellung der Kolokalisation von LRP1 und LFA-1 wurde eine Beteiligung von LRP1 an der Regulation der hoch-affinen Konformation der  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/C18) untersucht. Für die Studie der spezifischen Bindung von ICAM-1-Molekülen an LFA-1 wurden mPMN aus dem Knochenmark von  $Vav-iCre^+/LRP1^{fl/fl}$ - und  $Vav-iCre^-/LRP1^{fl/fl}$ -Mäusen isoliert und mit einem Mac-1-blockierenden Antikörper inkubiert. Es folgte eine Stimulation mit rmCXCL1, PMA sowie  $MnCl_2$  mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse. Die Inkubation mit  $MnCl_2$  diente durch Stabilisierung der hoch-affinen Konformation der  $\beta_2$ -Integrine als Positivkontrolle [60]. Die Negativkontrolle erfolgte durch Zugabe eines LFA-1-blockierenden Antikörpers. Das Ergebnis zeigte einen signifikanten prozentualen Anstieg der ICAM-1-Bindung nach Stimulation, jedoch keinen Unterschied im Vergleich zwischen den Kontrollzellen und LRP1-defizienten Zellen (w/o:  $3,2 \pm 1,0\%$  vs.  $3,7 \pm 1,3\%$ ; rmCXCL1:  $21,7 \pm 5,2\%$  vs.  $18,9 \pm 3,6\%$ ; PMA:  $44,1 \pm 9,6\%$  vs.  $37,5 \pm 7,7\%$ ;  $MnCl_2$ :  $63,8 \pm 13,0\%$  vs.  $51,3 \pm 9,9\%$ ; Abbildung 24a).

Um die spezifische Bindung von Fibrinogen an Mac-1 zu untersuchen, wurden die isolierten murinen PMN unter Zugabe von Alexa Fluor 647-konjugiertem humanem Fibrinogen für

20 min mit rmCXCL1 sowie  $MnCl_2$  zur Positivkontrolle inkubiert. Die Negativkontrolle erfolgte durch Inkubation mit EDTA. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der prozentualen Fibrinogen-Bindung nach Inkubation mit rmCXCL1 und  $MnCl_2$ , jedoch kein signifikanter Unterschied im Vergleich zwischen den Kontrollzellen und LRP1-defizienten mPMN (w/o:  $18,6 \pm 5,5\%$  vs.  $19,3 \pm 4,7\%$ ; rmCXCL1:  $55,5 \pm 10,8\%$  vs.  $42,9 \pm 8,6\%$ ;  $MnCl_2$ :  $40,3 \pm 7,9\%$  vs.  $48,6 \pm 8,9\%$ ; Abbildung 24b). Die Abwesenheit von LRP1 hat somit keinen Einfluss auf die Affinitätsregulation der  $\beta_2$ -Integrine LFA-1 und Mac-1 nach Stimulation mit CXCL1.



**Abbildung 24: Regulation der Affinität von  $\beta_2$ -Integrinen auf isolierten mPMN aus Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- und Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen.** (a) Um die LFA-1-spezifische ICAM-1-Bindung untersuchen zu können, wurden mPMN nach Zugabe eines Mac-1 blockierenden Antikörpers mit rmICAM-1/Fc sowie einem Fc-spezifischen PE-konjugierten anti-human IgG<sub>1</sub> Antikörper inkubiert. Die Stimulation erfolgte für 3 min mit rmCXCL1 (100 ng/ml) PMA (100 nM) oder  $MnCl_2$  (3 mM). Nach der Fixierung wurden die Proben durchflusszytometrisch analysiert und der prozentuale Anteil der ICAM-1-Bindung ermittelt, indem 95% der PMN in der mit einem blockierenden anti-LFA-1-Antikörper inkubierten Kontrollgruppe als negativ definiert wurden. (b) Die Mac-1-Affinität zu Fibrinogen wurde auf mPMN nach Stimulation mit rmCXCL1 (100 ng/ml) und  $MnCl_2$  (3 mM) sowie Zugabe von Alexa Fluor 647-konjugiertem humanem Fibrinogen für 20 min untersucht. In der Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil der positiv an Fibrinogen bindenden PMN ermittelt, indem 95% der PMN in der EDTA-Kontrolle als negativ definiert wurden. n = 5 (a und b). #, p < 0,05 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. n.s. = nicht signifikant.

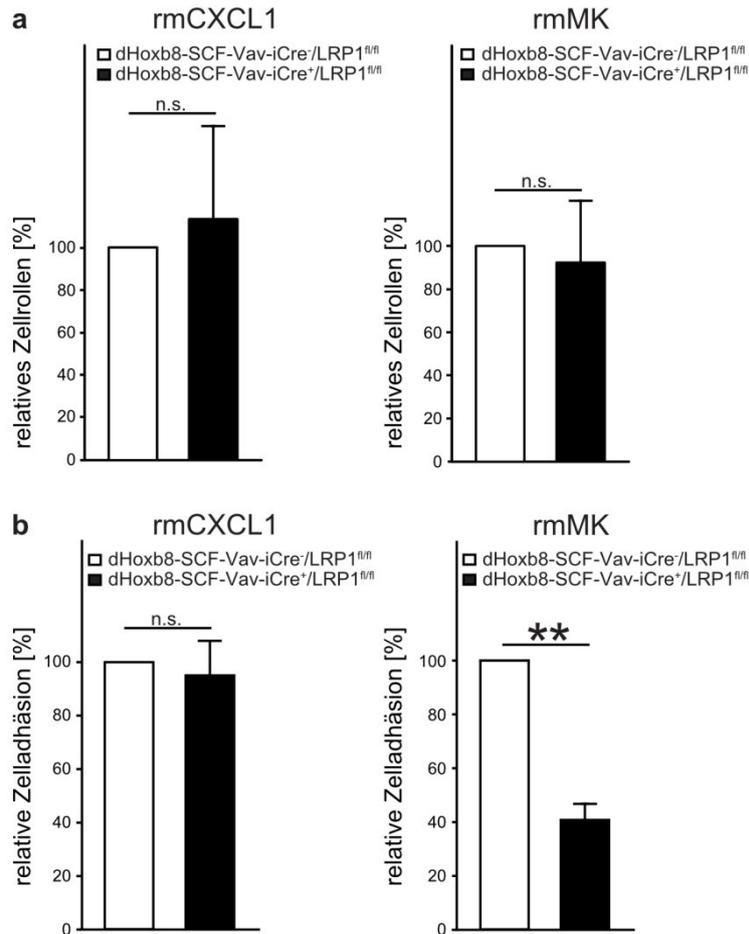
### 3.3.3 Die Bedeutung von LRP1 für die $\beta_2$ -Integrin-abhängige Rekrutierungskaskade

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob einzelne Schritte der Rekrutierungskaskade in Abhängigkeit von LRP1 durch den Stimulus MK beeinflusst werden. Dafür wurden dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- sowie dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen einer funktionellen Analyse in Mikroflussskammern zugeführt. Dieses reduktionistische System erlaubt die Untersuchung der Rekrutierungsschritte „Rollen“, „Adhäsion“, „Verstärkung der Adhäsion“, „Abflachung der Zelle“ sowie „mechanotaktische Migration“ durch verschiedene Beschichtungen und Schubspannungen. Dabei wurden die Stimuli rmCXCL1 oder rmMK

jeweils in Kombination mit rmICAM-1 und rmP-Selektin/FC als Beschichtung für die Mikroflussskammern gewählt und die dHoxb8-Zellen nach definierten Protokollbedingungen infundiert. Entsprechend der physiologischen Kaskade wird zunächst die Induktion der Adhäsion näher betrachtet.

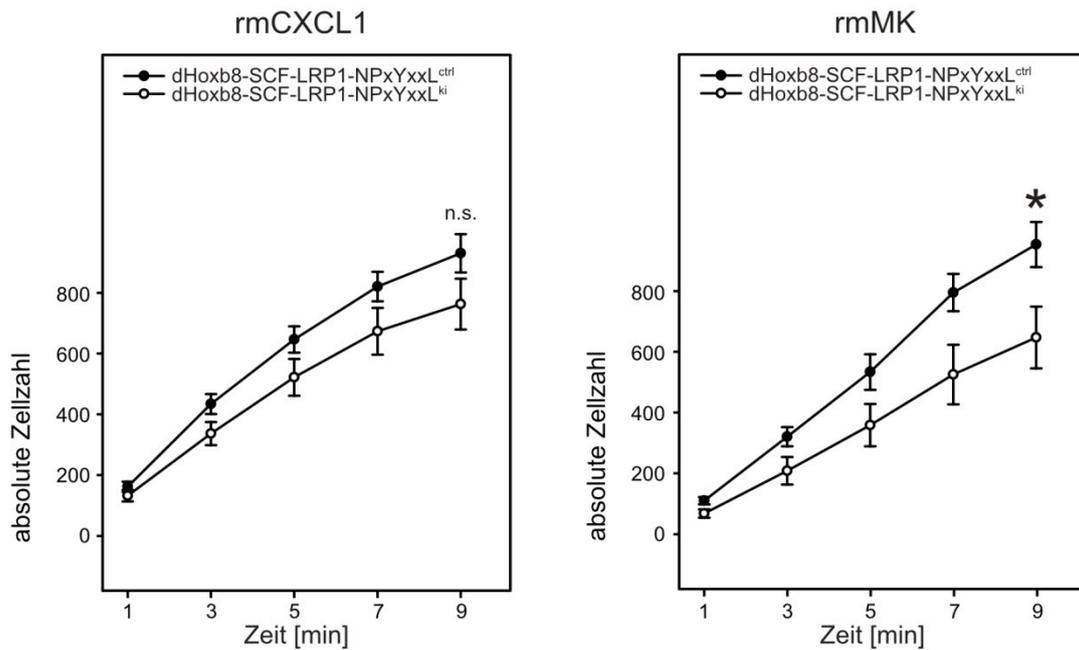
### 3.3.3.1 Induktion der Adhäsion

Die Analyse der Rekrutierungsschritte „Rollen“ und „Adhäsion“ erfolgte nach dem Protokoll „Induktion der Adhäsion“. Dafür wurden dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- oder dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen mit einer physiologischen Schubspannung von 1 dyne/cm<sup>2</sup> in Mikroflussskammern infundiert. Nach Rollen der Zelle und Aktivierung führt das *Inside-out Signaling* zur hoch-affinen  $\beta_2$ -Integrin-Konformation und ermöglicht dadurch die Zelladhäsion. Zur Auswertung wurde nach 9 min Fluss der prozentuale Anteil der rollenden oder adhärenen dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen in Abhängigkeit der rollenden oder adhärenen dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen (100%) ermittelt. Dabei zeigte sich für die rollenden Zellen weder auf rmCXCL1 noch auf rmMK eine signifikante Veränderung in Abwesenheit von LRP1 (CXCL1: 100,0% vs. 115,3 ± 18,5%; MK: 100% vs. 92,3 ± 28,6%; Abbildung 25a). Jedoch war die relative Zelladhäsion von dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen im Vergleich zur Kontrolle auf rmMK signifikant vermindert, während der Ansatz mit rmCXCL1-Beschichtung keinen Unterschied zeigte (CXCL1: 100% vs. 95,1 ± 12,7%; MK: 100% vs. 40,8 ± 6,0%; Abbildung 25b). Dies deutet auf eine bedeutende Rolle der MK-LRP1-Achse für die Adhäsion von PMN hin.



**Abbildung 25: Die MK-vermittelte PMN Adhäsion in Abhängigkeit von LRP1** modifiziert nach Weckbach et al., 2019 [158]. Die Flusskammerexperimente wurden mit dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- oder dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen nach dem Protokoll „Induktion der Adhäsion“ mit einer Schubspannung von 1 dyne/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Die Beschichtung erfolgte mit rmP-Selektin/FC (10 µg/ml), rmlCAM-1 (12,5 µg/ml) und rmCXCL1 (5 µg/ml; linke Spalte) oder rmMK (10 µg/ml; rechte Spalte). Darstellung des relativen Zellrollens (**a**) und der relativen Zelladhäsion (**b**) prozentual in Abhängigkeit der jeweiligen Kontrollzellen. n = 3 (a); n = 5 (b). \*\*, p < 0,01. n.s. = nicht signifikant.

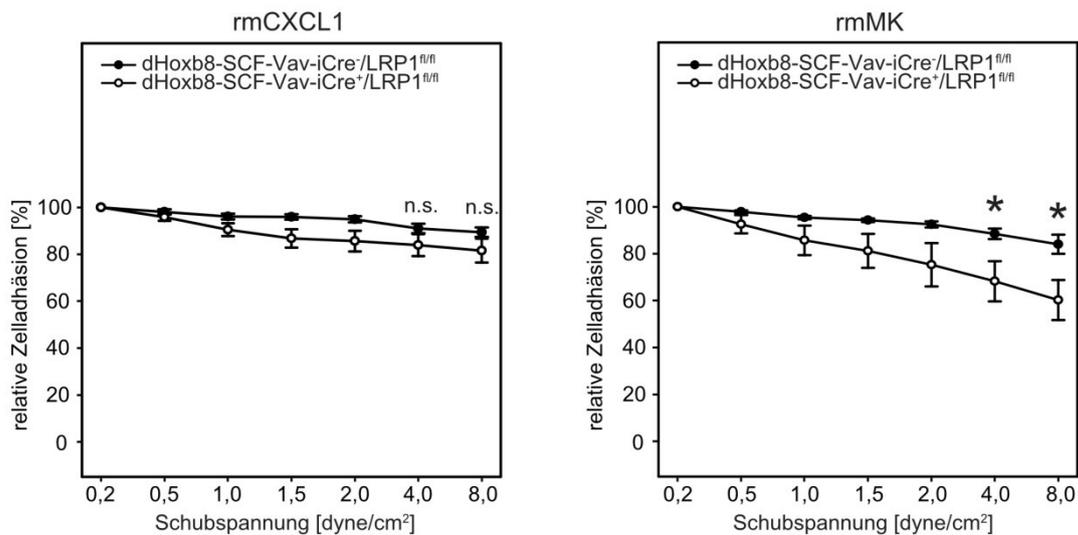
Um den molekularen Mechanismus der MK-vermittelten LRP1-abhängigen Adhäsion näher zu bestimmen, wurden aus dem Knochenmark von LRP1-NPXYxxL<sup>ki</sup>- und LRP1-NPXYxxL<sup>ctrl</sup>-Mäusen Hoxb8-SCF-Zellen generiert. Ein *knock-in* führt in diesen Zellen zu einer dysfunktionalen Membran-distalen intrazellulären LRP1-NPXYxxL-Domäne [281]. Die Analyse der adhären PMN erfolgte zu 5 verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5, 7 und 9 min) durch Ermittlung der absoluten Zellzahlen. Nach 9 min Fluss war die Gesamtzahl der adhären PMN auf rmMK im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant vermindert (953,3 ± 74,2 Zellen vs. 647,3 ± 101,8 Zellen). Die Anzahl der adhären Zellen auf rmCXCL1 zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied (929,9 ± 62,9 Zellen vs. 762,8 ± 83,7 Zellen; Abbildung 26). Diese Ergebnisse weisen auf einen Einfluss der Membran-distalen LRP1-NPXYxxL-Domäne bei der MK-vermittelten Adhäsion hin [158].



**Abbildung 26: Beteiligung der Membran-distalen LRP1-NPxyxxL-Domäne an der MK-vermittelten PMN-Adhäsion** modifiziert nach Weckbach et al., 2019 [158]. Nach Ausdifferenzierung wurden dHoxb8-SCF-LRP1-NPxyxxL<sup>ctrl</sup>- oder dHoxb8-SCF-LRP1-NPxyxxL<sup>ki</sup>-Zellen mit 1 dyne/cm<sup>2</sup> in Mikrofluskkammern beschichtet mit rmP-Selektin/FC (10 µg/ml), rmICAM-1 (12,5 µg/ml) und rmCXCL1 (5 µg/ml; links) oder rmMK (10 µg/ml; rechts) infundiert. Die Ermittlung der adhärenen Zellen erfolgte zu 5 verschiedenen Zeitpunkten (1, 3, 5, 7 und 9 min) jeweils für die NPxyxxL-Mutanten sowie Kontrollzellen. Die y-Achse gibt die adhärenen Zellen in absoluten Werten an. n = 7. \*, p < 0,05. n.s. = nicht signifikant.

### 3.3.3.2 Verstärkung der Adhäsion

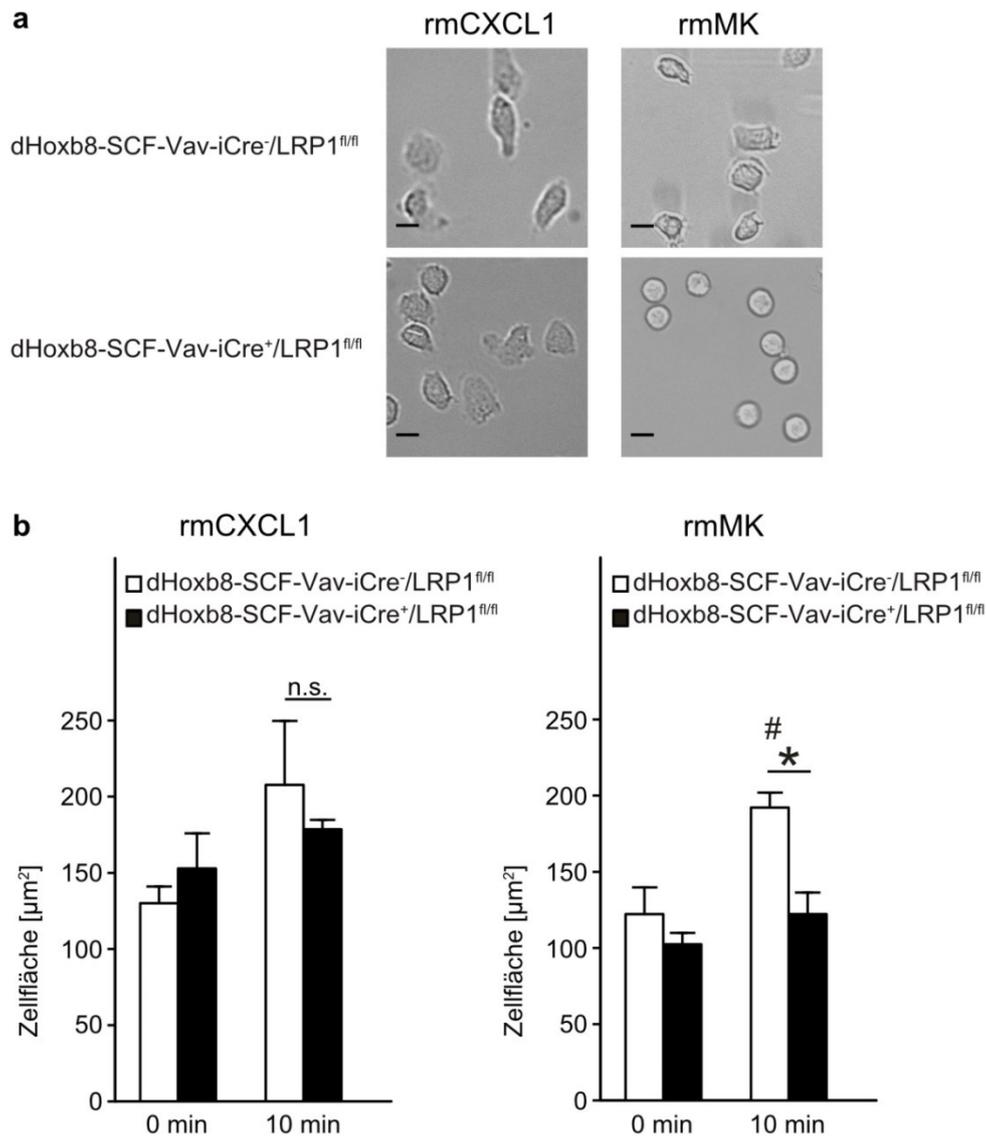
Nach der Zelladhäsion wird die Bindung der hoch-affinen  $\beta_2$ -Integrine an das endotheliale ICAM-1 via *Outside-in Signaling* verstärkt und die Ablösung der Zelle verhindert. Diese Verstärkung der Adhäsion kann in Mikrofluskkammern durch eine kontinuierlich bis auf 8 dyne/cm<sup>2</sup> ansteigende Schubspannung simuliert werden. Nach Beschichtung mit rmP-Selektin/FC, rmICAM-1 und rmCXCL1 oder rmMK als Stimulus wurden dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- oder dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen in die Kammern infundiert und die relative Zelladhäsion in Abhängigkeit der adhärenen Zellen vor Beginn der Schubspannung (100%) ermittelt. Dabei zeigten die LRP1-defizienten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen eine signifikant reduzierte Zelladhäsion auf rmMK bei 4,0 dyne/cm<sup>2</sup> (88,5 ± 2,2% vs. 67,5 ± 8,2%) und 8,0 dyne/cm<sup>2</sup> (84,0 ± 4,1% vs. 60,2 ± 8,5%) Schubspannung, jedoch keine Veränderung auf rmCXCL1-Beschichtung (4,0 dyne/cm<sup>2</sup>: 91,0 ± 2,0% vs. 83,9 ± 4,7%; 8,0 dyne/cm<sup>2</sup>: 89,4 ± 2,1% vs. 81,5 ± 5,1%; Abbildung 27). Dies spricht für eine Beteiligung der MK-LRP1-Achse an der Verstärkung der Adhäsion. [158]



**Abbildung 27: Darstellung der Verstärkung der Adhäsion mit Beteiligung der LRP1-MK-Achse** modifiziert nach Weckbach et al., 2019 [158]. Nach Beschichtung der Mikroflussskammern mit rmP-Selektin/FC (10 µg/ml), rmlCAM-1 (12,5 µg/ml) und rmCXCL1 (5 µg/ml; links) oder rmMK (10 µg/ml; rechts) wurden dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- oder dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen nach dem Protokoll „Verstärkung der Adhäsion“ mit ansteigender Schubspannung (0,2–8,0 dyne/cm<sup>2</sup>) infundiert. Die Verstärkung der Adhäsion wurde als relative Zelladhäsion prozentual in Abhängigkeit der adhärenen Zellen vor Beginn der Schubspannung (100%) zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. n = 4. \*, p < 0,05. n.s. = nicht signifikant.

### 3.3.3.3 Abflachung der Zelle

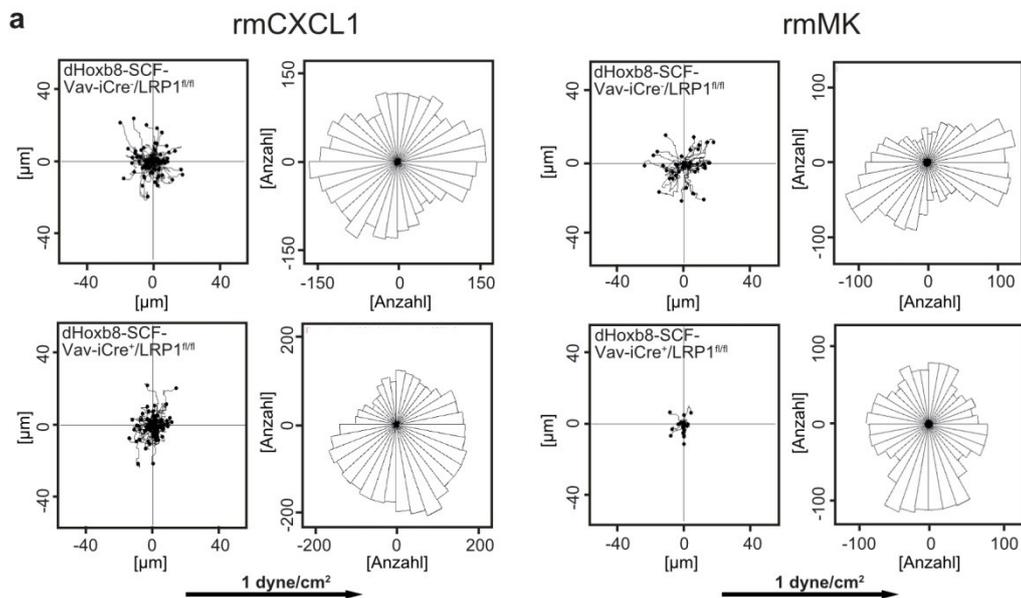
Während der Verstärkung der Adhäsion und der fortschreitenden Zellaktivierung flacht die Zelle ab. Die Abflachung der Zelle ist dabei eine Änderung des Parameters Zellfläche, welcher in µm<sup>2</sup> gemessen wurde. Die Analyse erfolgte nach Infusion von dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- oder dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen in Mikroflussskammern mit rmP-Selektin/FC-, rmlCAM-1- und rmCXCL1- oder rmMK-Beschichtung vor Beginn (0 min) oder nach Applikation eines Flusses von 1 dyne/cm<sup>2</sup> für 10 min (10 min). Die Zellfläche zeigte nach 0 min im Vergleich der LRP1-defizienten Zellen mit den entsprechenden Kontrollzellen keine signifikanten Veränderungen, weder für rmCXCL1 (130,0 ± 11,0 µm<sup>2</sup> vs. 152,8 ± 23,2 µm<sup>2</sup>) noch für rmMK (122,2 ± 17,6 µm<sup>2</sup> vs. 102,5 ± 7,4 µm<sup>2</sup>) als Stimulus. Nach 10 min mit rmMK als Stimulus zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zellfläche der dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen im Vergleich zu den statischen Bedingungen nach 0 min. Dieser Effekt war in Abwesenheit von LRP1 gehemmt. Im Vergleich der LRP1-defizienten dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen mit den dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Kontrollzellen war die Zellfläche nach 10 min Fluss auf rmMK signifikant vermindert, während im Gegensatz eine Beschichtung mit rmCXCL1 als Stimulus keinen signifikanten Unterschied zeigte (CXCL1: 207,7 ± 42 µm<sup>2</sup> vs. 178,5 ± 6,2 µm<sup>2</sup>; MK: 192,1 ± 9,9 µm<sup>2</sup> vs. 122,1 ± 14,4 µm<sup>2</sup>; Abbildung 28). Es konnte somit ein MK-vermittelter Effekt auf die Abflachung der Zelle in Abhängigkeit von LRP1 unter Flussbedingungen nachgewiesen werden.

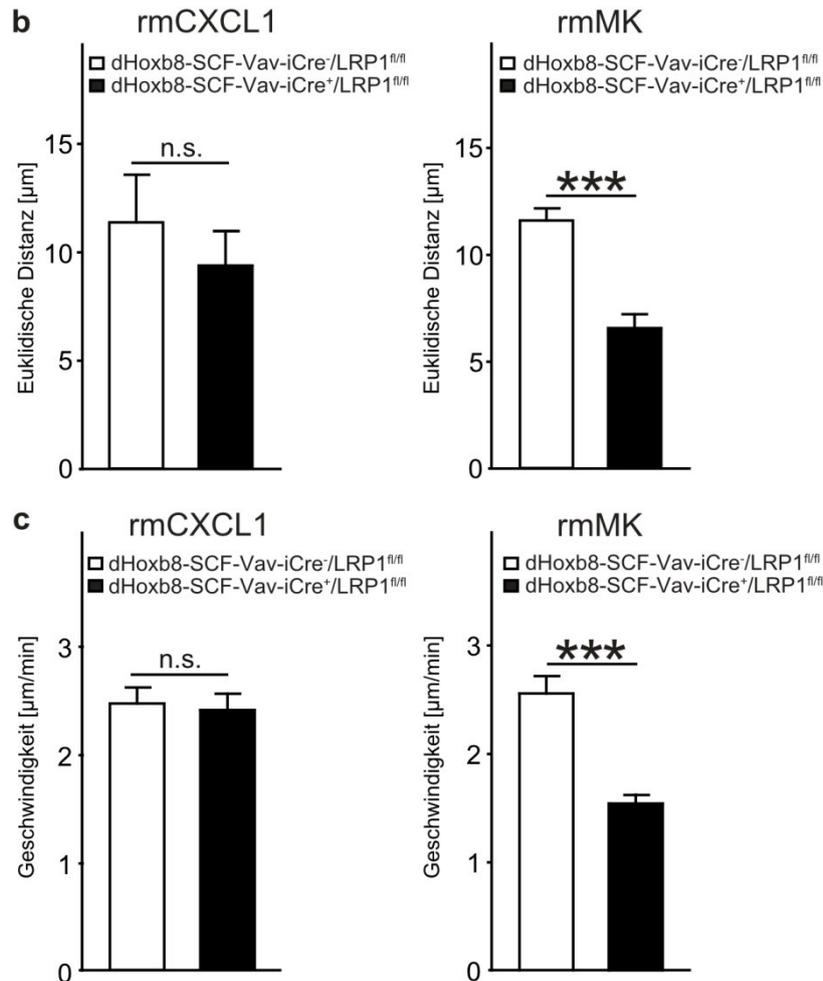


**Abbildung 28: Die Rolle der LRP1-MK Achse bei der Abflachung der Zelle** modifiziert nach Weckbach et al., 2019 [158]. Die Analyse der Zellfläche erfolgte nach Infusion von dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- oder dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen in Mikroflussskammern mit rmP-Selektin/FC (10 µg/ml), rmlCAM-1 (12,5 µg/ml) und rmCXCL1 (5 µg/ml; links) oder rmMK (10 µg/ml; rechts) Beschichtung vor (0 min) oder nach Applikation einer Schubspannung von 1 dyne/cm<sup>2</sup> für 10 min (10 min). **(a)** Repräsentative Darstellung mikroskopischer Aufnahmen aus den beschichteten Flusskammern nach 10 min Fluss. Marker = 10 µm **(b)** Auswertung der Zellfläche in µm<sup>2</sup> als Maß der Abflachung der Zelle nach 0 min und 10 min Fluss. n = 3. \*, p < 0,05 (b). #, p < 0,05 im Vergleich zur Zellfläche der dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen nach 0 min Fluss (b). n.s. = nicht signifikant.

### 3.3.3.4 Mechanotaktische Migration

Nach der Analyse der Abflachung der Zelle wurden Experimente zur Untersuchung der mechanotaktischen Migration durchgeführt. Es erfolgte die Infusion der dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- oder dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen in Mikroflusskammern, die mit rmP-Selektin/FC-, mICAM-1- und mCXCL1- oder rmMK beschichtet waren. Nach Applikation einer Schubspannung von 1 dyne/cm<sup>2</sup> für 10 min wurden die Migrationspfade sowie Migrationswinkel ausgewertet und letztere in sogenannten *rose blots* dargestellt. Die Darstellung der Migrationspfade zeigte phänotypisch im Vergleich der zurückgelegten Strecke der dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- mit dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen bei LRP1-Defizienz auf rmMK-Beschichtung ein Migrationsdefizit, während auf rmCXCL1 kein Unterschied erkennbar war (Abbildung 29a). Dies konnte quantitativ durch Messung der euklidischen Distanz (CXCL1: 11,4 ± 2,2 µm vs. 9,4 ± 1,6 µm; MK: 11,6 ± 0,55 µm vs. 6,56 ± 0,65 µm) sowie Migrationsgeschwindigkeit (CXCL1: 2,47 ± 0,25 µm/min vs. 2,41 ± 0,26 µm/min; MK: 2,56 ± 0,16 µm/min vs. 1,54 ± 0,08 µm/min) signifikant bestätigt werden (Abbildung 29b).





**Abbildung 29: Einfluss der LRP1-MK Achse auf die mechanotaktische Migration** modifiziert nach Weckbach et al., 2019 [158]. Für die Analyse der mechanotaktischen Migration wurden dHoxb8-SCF-Vav-iCre-/LRP1<sup>fl/fl</sup>- oder dHoxb8-SCF-Vav-iCre+/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen mit einer Schubspannung von 1 dyne/cm<sup>2</sup> in Mikroflusskammern mit rmP-Selektin/FC-(10 µg/ml), rmlCAM-1-(12,5 µg/ml) und rmCXCL1-(5 µg/ml; links) oder rmMK-(10 µg/ml; rechts) Beschichtung infundiert. Nach 10 min erfolgte die Auswertung. **(a)** Darstellung der Migrationspfade in µm sowie der Migrationswinkel als *rose blots*, welche durch die x- und y-Koordinaten zu Beginn und Ende der Zellmigration ermittelt wurden. Die Zellen wurden dabei zu Gruppen in 10°-Intervalle zusammengefasst. Pfeile zeigen die Flussrichtung an. **(b)** Quantitative Analyse der dHoxb8-Zellen mit Darstellung der euklidischen Distanz in µm sowie **(c)** Migrationsgeschwindigkeit in µm/min. dHoxb8-SCF-Vav-iCre-/LRP1<sup>fl/fl</sup> (CXCL1: n = 3 mit 214 Zellen; MK: n = 4 mit 280 Zellen); dHoxb8-SCF-Vav-iCre+/LRP1<sup>fl/fl</sup> (CXCL1: n = 3 mit 303 Zellen; MK: n = 4 mit 197 Zellen). \*\*\*, p < 0,001. n.s. = nicht signifikant.

Zusammenfassend zeigte sich somit, dass zahlreiche Schritte der Rekrutierungskaskade in Abhängigkeit von LRP1 durch den Stimulus rmMK beeinflusst werden. Neben den Rekrutierungsschritten „Adhäsion“, „Verstärkung der Adhäsion“ und „Abflachung der Zelle“ war auch die „mechanotaktische Migration“ in Abwesenheit von LRP1 im Vergleich zu den Kontrollzellen mit rmMK als Stimulus signifikant beeinträchtigt.

## 4 Diskussion

### 4.1 Charakterisierung eines LRP1-defizienten Maus- und Zellmodells

Um die exakte Rolle von LRP1 für die MK-vermittelte Rekrutierung von PMN untersuchen zu können, wurde ein LRP1-defizientes Maus- und Zellmodell generiert. Eine systemische LRP1-Deletion führt zum frühembryonalen Tod der Mäuse aufgrund massiver Blutungen um den Tag 13,5 der embryonalen Entwicklung [235, 236]. Der zugrundeliegende Defekt resultiert aus der fehlenden Rekrutierung von glatten Gefäßmuskulzellen sowie Perizyten während der Angiogenese und führt zur Gefäßruptur mit sekundärem Kreislaufversagen [236]. Deshalb wurde das Cre/loxP-System für eine gewebespezifische Deletion genutzt und LRP1<sup>fl/fl</sup>- mit LysM-Cre-Mäusen verpaart [235, 236]. Die Cre-Rekombinase wird in diesen Tieren unter dem LysM-Promotor in der myeloischen Zellreihe aktiviert und schneidet die LRP1-Sequenz an spezifischen, den Genlocus flankierenden loxP-Stellen. Zur Bestimmung des Genotyps wurde nach DNA-Isolation aus Ohrbiopsien eine genomische PCR mit spezifischen Primern durchgeführt. Durch den Nachweis von Banden bei 350 bp und 700 bp konnte der heterozygote Genotyp identifiziert werden. Dieser wurde gewählt, da homozygote LysM-defiziente Mäuse eine veränderte Entzündungsreaktion im Vergleich zum WT zeigten [297]. Um die Expression von LRP1 auf Proteinebene darzustellen, erfolgte die Isolation von mPMN aus dem Knochenmark von LysM-Cre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>- sowie LysM-Cre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen und nach Zelllyse eine Western-Blot-Analyse. Die Detektion eines Antikörpers gegen die 85 kDa  $\beta$ -Domäne von LRP1 zeigte jedoch – trotz korrektem Genotyp – für PMN aus LysM-Cre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen eine deutliche LRP1-Expression. Die Erstbeschreiber der Mauslinie Clausen et al. konnten nach Isolation der Vorläuferzellen aus dem Knochenmark und Inkubation für 7 Tage in Kultur eine Deletionseffizienz der LysM-Cre-Rekombinase für Gr-1-positive Zellen von 75% nachweisen [279]. Gr-1 diene dabei als Marker der PMN. Dies deutet darauf hin, dass für Deletionsstudien nicht das Zellalter *per se*, sondern der Zeitpunkt der Genexpression entscheidend ist. Die Aktivierung des LysM-Promotors im Verlauf der Granulopoese stellt die Expression des Lysozyms als Bestandteil der Granula sicher [143]. Es liegt nahe, dass die Aktivierung des LysM-Promotors während der Zellreifung nach Beginn der Expression des LRP1-Proteins erfolgt und dieses somit auf Proteinebene exprimiert wurde. In zahlreichen Studien wurde die LysM-Cre-Linie erfolgreich als Reporter-Mauslinie der myeloiden Zellreihe eingesetzt. Dies ist möglich, da auch eine späte Expression des LysM-Promotors z.B. den Nachweis und eine Differenzierung der myeloiden Zellen durch spezifische fluoreszierende Proteine erlaubt [301, 302].

Da sich die LysM-Cre-Linie aufgrund der gezeigten LRP1-Expression auf mPMN nicht für die vorliegende Deletionsstudie eignete, wurden in einem neuen Ansatz Vav-iCre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse verwendet. In diesen Tieren wird die Cre-Rekombinase unter dem Vav-Promotor aktiviert

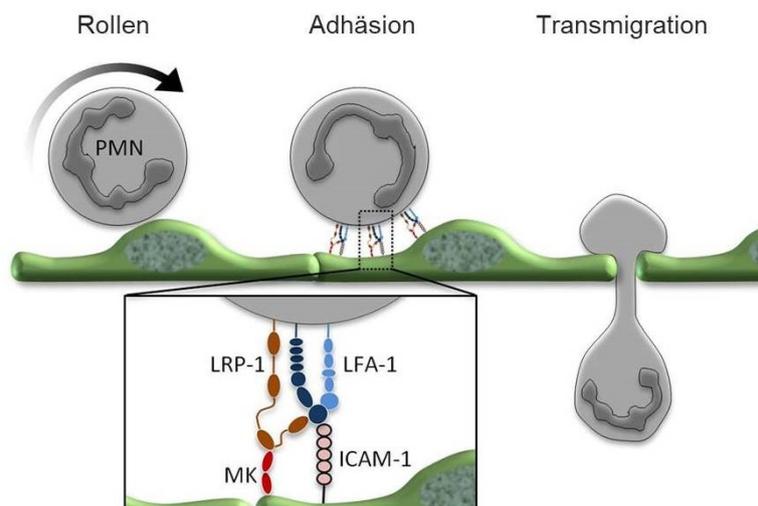
und LRP1 im hämatopoetischen System sowie in Endothelzellen deletiert [280, 303]. Durch eine genomische PCR nach DNA-Isolation aus Ohrbiopsien konnten die heterozygoten Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zieltiere bestätigt werden. Der Western-Blot zeigte für mPMN aus Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen nach Zelllyse eine fehlende Bande bei 85 kDa und damit die erfolgreiche Deletion des LRP1-Proteins. Durch eine frühe Aktivierung des Vav-Promotors in Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen erfolgt die Inaktivierung des LRP1-Gens vor Beginn der Proteinexpression und damit die Ausschaltung des LRP1-Proteins. Im Gegensatz dazu konnte im Western-Blot LRP1 in Zelllysaten von mPMN aus Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Kontrolltieren durch eine Bande bei 85 kDa nachgewiesen werden. Die LRP1-defizienten Mäuse wurden zusammen mit den entsprechenden Kontrolltieren in den Experimenten dieser Arbeit genutzt.

Um neben den Primärzellen aus der Maus über ein Zellsystem zu verfügen, das hohe Zellzahlen verfügbar macht, wurde auf immortalisierte hämatopoetische Hoxb8-Zelllinien zurückgegriffen. Im Vergleich zu den murinen Primärzellen, welche eine kurze Lebensdauer im Kreislauf aufweisen und terminal ausdifferenziert sind, wird so eine Expansion in Kultur ermöglicht. Hoxb8-SCF-Zellen stellen nach Evaluation von Zehrer et al. ein geeignetes System zur Studie der Rekrutierung von PMN dar [286]. Nach Zelllyse von undifferenzierten Hoxb8-SCF-Kontrollzellen aus Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen konnte im Western-Blot keine LRP1-Expression nachgewiesen werden. Diese zeigte sich jedoch nach Ausdifferenzierung der Zellen für 4 Tage durch Nachweis einer 85 kDa-Bande und deutet auf eine Induktion der LRP1-Expression nach Einleitung der Zelldifferenzierung hin. In Hoxb8-SCF-Zellen aus Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen konnte – dem Western-Blot der Primärzellen entsprechend – durch eine fehlende Bande bei 85 kDa kein LRP1 gezeigt werden. Somit wurde das Zellsystem in den Experimenten zur Analyse des leukozytären LRP1 eingesetzt.

Ein weiterer Vorteil von immortalisierten Hoxb8-Zellen gegenüber Primärzellen ist die genetische Modifizierbarkeit. Um die Voraussetzungen für eine potenzielle *in vivo* Applikation von Hoxb8-Zellen zu schaffen, wurden mithilfe des CRISPR/Cas9-Systems LRP1-defiziente Hoxb8-FL-Zellen generiert. Redecke et al. konnten Hoxb8-FL-Zellen aus WT-Mäusen nach Knochenmarkbestrahlung der Zieltiere erfolgreich transferieren und bis zum Tag 38 nach Injektion im Kreislauf nachweisen [288]. Das CRISPR/Cas9-System erlaubte eine spezifische Induktion einer Mutation im Exon 1 des LRP1-Genoms, welche durch Sanger-Sequenzierung identifiziert werden konnte. Mittels Western-Blot-Analyse wurde eine LRP1-Defizienz des entsprechenden Klons auf Proteinebene nachgewiesen. Durch Entzug von Östrogen sowie Zugabe von GM-CSF können die Hoxb8-FL-Zellen *in vitro* zu PMN, Makrophagen und DC ausdifferenziert und weiteren Experimenten zur Studie der Rekrutierungskaskade *in vivo* zugeführt werden.

## 4.2 Die Rolle von LRP1 für die Rekrutierung von PMN an den Ort der Entzündung

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass das hochkonservierte LRP1-Protein als Rezeptor für das Zytokin MK agiert, welches eine wichtige Rolle für die Rekrutierung von PMN während der akuten Entzündungsreaktion spielt [158, 185, 202]. So war *in vivo* die Adhäsion und Extravasation von PMN in postkapillären Venolen des *M. cremaster* in MK<sup>-/-</sup>-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren 2 h nach intraskrotaler Applikation von TNF $\alpha$  signifikant reduziert [185]. Unter Flussbedingungen *in vitro* war immobilisiertes MK jedoch nicht lösliches MK an der Vermittlung der Adhäsion von PMN beteiligt [185]. Dies deutet darauf hin, dass MK *in vivo* – immobilisiert an das Endothel gebunden – die Adhäsion ermöglicht [185]. Es konnte nachgewiesen werden, dass immobilisiertes MK die hoch-affine Konformation von  $\beta_2$ -Integrinen stabilisiert und durch pharmakologische Blockade von LRP1 mit LRPAP sowohl die MK-Bindung an PMN als auch die MK-induzierte hoch-affine  $\beta_2$ -Integrin Konformation reduziert war [185]. Durch blockierende Antikörper gegen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine wurde eine direkte Bindung von MK an diese Rezeptoren ausgeschlossen [185]. Es ist zudem bekannt, dass LRP1 mit den  $\beta_2$ -Integrinen LFA-1 sowie Mac-1 interagiert, welche entscheidend für die Rekrutierungsschritte der Adhäsion, Verstärkung der Adhäsion, dem Abflachen der Zelle sowie die intraluminale Migration von PMN sind [13, 158, 274, 276]. Somit liegt es nahe, dass das Zytokin MK über LRP1 die  $\beta_2$ -Integrin-abhängige Rekrutierung von PMN im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion vermittelt (Abbildung 30) [185, 277]. Die vorliegende Arbeit sollte zu einem besseren Verständnis der MK-vermittelten LRP1-abhängigen Schritte der PMN-Rekrutierung beitragen.



**Abbildung 30: Darstellung von LRP1 und MK während der Rekrutierung von PMN** modifiziert nach Herter und Mayadas, 2014 [277]. Nach dem Rollen folgen die Rekrutierungsschritte der Adhäsion auf entzündetem Endothel sowie die Transmigration. Der Übergang vom Rollen zur Adhäsion wird durch Bindung von MK an LRP1 und der nachfolgenden Konformationsänderung von LFA-1 in den hoch-affinen Zustand reguliert. Dieser ist für die Bindung der Integrine an ICAM-1 auf dem Endothel notwendig.

In einem ersten Schritt wurden LRP1 sowie  $\beta_2$ -Integrine molekular charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass LRP1 auf murinen sowie humanen Monozyten und PMN exprimiert und die Expression in PMN durch verschiedene pro-inflammatorische Stimuli induziert wird. Die LRP1-Expression in Monozyten ist bereits seit langem bekannt und wurde deshalb als Positivkontrolle verwendet [298, 304-306]. Liberale et al. konnten für hPMN eine Induktion der LRP1-Expression nach Inkubation mit dem Stimulus  $\text{TNF}\alpha$  zeigen [307]. Eine Inkubation der PMN mit löslichem MK oder  $\text{MnCl}_2$ , welches die hoch-affine Konformation der  $\beta_2$ -Integrine stabilisiert, hatte in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluss auf die LRP1-Expressionslevel [60]. Weckbach et al. konnten ebenso keinen Effekt von löslichem MK auf die inflammatorische Aktivierung von PMN sowie Endothelzellen nachweisen [185]. Dies deutet darauf hin, dass MK nicht als klassisches pro-inflammatorisches Zytokin agiert. Die Expression des LRP1-Liganden MK konnte von Weckbach et al. in PMN sowie Endothelzellen gezeigt und eine Induktion der Expression unter hypoxischen Bedingungen nachgewiesen werden [308]. Für die Aufklärung des exakten zellulären Ursprungs von MK im vaskulären System sowie die Regulation der MK-Expression sind weitere Studien erforderlich.

Da für  $\beta_1$ -Integrine eine verminderte Reifung und Expression in Abwesenheit von LRP1 gezeigt werden konnte, wurde die Rolle von LRP1 für die Expression von  $\beta_2$ -Integrinen nach Stimulation und LRP1-Blockade mit LRPAP bzw. in Abwesenheit von LRP1 untersucht [272]. Die Oberflächenexpression von CD11a, CD11b und CD18 wurde in unstimulierten PMN sowie nach Stimulation mit CXCL1 bzw. IL8 und fMLP analysiert. Die Expression von LFA-1 als auch Mac-1 an der Zelloberfläche zeigte weder nach LRP1-Blockade mit LRPAP noch in LRP1-defizienten PMN aus  $\text{Vav-iCre}^+/\text{LRP1}^{\text{fl/fl}}$ -Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen einen Unterschied. Somit kann eine veränderte  $\beta_2$ -Integrin-Oberflächenexpression nach Stimulation mit CXCL1 bzw. IL8 und fMLP als Ursache für funktionelle Effekte in Abwesenheit von LRP1 ausgeschlossen werden. In weiterführenden Experimenten wäre die Analyse der  $\beta_2$ -Integrin-Oberflächenexpression nach Stimulation mit immobilisiertem MK von Interesse.

In einem zweiten Schritt wurde LRP1 funktionell charakterisiert. Dafür ist die exakte Lokalisation von LRP1 während dem Rekrutierungsprozess von großem Interesse. Da für die Adhäsion von PMN das  $\beta_2$ -Integrin LFA-1 (CD11a/CD18) essenziell ist, wurde dessen Lokalisation während der Induktion der Adhäsion näher bestimmt [90]. Spijkers et al. konnten zeigen, dass LRP1 durch Beteiligung am *CD11a-Clustering* die Adhäsion der monozytenähnlichen Zelllinie U937 an isolierte Endothelzellen unter Flussbedingungen vermittelt [158, 274]. Diesen Daten entsprechend konnte mit zeitlich und örtlich hochauflösender CSD-Mikroskopie in Mikroflussskammern bei Beschichtung mit CXCL1, ICAM1, P-Selektin eine Kolo-kalisation und ein *Clustering* von LRP1 und CD11a auf mPMN während dem Übergang vom Rollen zur Adhäsion festgestellt werden. Diese konzentrierte LRP1 und

CD11a-Lokalisation könnte potenzielle fokale Adhäsionspunkte als Interaktionsstellen mit dem Endothel darstellen [158]. Bei Beschichtung mit MK, ICAM1, P-Selektin konnte mit hochauflösender STED-Mikroskopie für dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>-</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen ebenso eine Kolokalisation von LRP1 und CD11a nach Zelladhäsion sowie während der Migration nachgewiesen werden. Die Aufnahme der migrierenden Zelle zeigte dabei eine mögliche Kolokalisation von LRP1 und CD11a am Uropod der Zelle. Dies könnte auf eine Funktion von LRP1 bei der Ablösung der  $\beta_2$ -Integrine und damit dem Übergang von der Adhäsion zur Migration hindeuten. Cao et al. konnten in Makrophagen, die auf Fibrinogen migrierten eine Kolokalisation von LRP1 und Mac-1 am Uropod darstellen [275]. Durch ein koordiniertes Zusammenspiel von LRP1, Mac-1, tPA sowie dessen Inhibitor PAI-1 wird durch die Endozytose und anschließendem *Recycling* von  $\beta_2$ -Integrinen an die Zelloberfläche eine effiziente Migration ermöglicht [275]. Ranganathan et al. konnten ebenfalls in Makrophagen eine Interaktion von LRP1 und Mac-1 zeigen, welche durch Stimulation mit LPS verstärkt wurde [276]. Neben der *in vitro* Analyse wurde auch im fixierten *M. cremaster* der Maus *in vivo* eine Kolokalisation von LRP1 und CD11a dargestellt. Da die Avidität der Integrine durch *Clustering* reguliert wird, wäre in weiteren Lokalisationsstudien die exakte Rolle von LRP1 für diesen Prozess von besonderem Interesse [70].

Während die Kolokalisation und das *Clustering* von LRP1 und CD11a Stimulus-unabhängig sowohl mit MK als auch CXCL1 nachgewiesen wurden, war die Adhäsion von dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen nur bei Beschichtung mit MK als Stimulus reduziert [158]. Bei Beschichtung der Mikroflussskammern mit CXCL1, ICAM1 und P-Selektin zeigte sich dieser Effekt nicht. Die Anzahl der rollenden Zellen sowie die Rollgeschwindigkeit zeigten weder mit MK noch CXCL1 als Stimulus einen signifikanten Unterschied. Die PMN wurden mit einer Schubspannung von 1 dyne/cm<sup>2</sup> infundiert, welche den physiologischen Bedingungen in postkapillären Venolen entspricht [309]. Weil die Adhäsion von LRP1-defizienten Zellen auf MK vermindert war und die CXCL1-induzierte Adhäsion unabhängig von LRP1 erfolgte, liegt es nahe, dass der Effekt der MK-LRP1-Achse spezifisch ist. In der Zusammenschau deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Initiierung des LFA-1-*Clusterings* Stimulus-unabhängig sowohl mit CXCL1 als auch MK erfolgt, während die Adhäsion in Abhängigkeit von LRP1 MK-vermittelt ist [158].

Um den molekularen Mechanismus näher zu bestimmen wurden aus dem Knochenmark von LRP1-NPXYxxL<sup>ki</sup>- und LRP1-NPXYxxL<sup>ctrl</sup>-Mäusen Hoxb8-SCF-Zellen generiert. In diesen Zellen führt ein *knock-in* zu einer dysfunktionalen Membran-distalen intrazellulären LRP1-NPXYxxL-Domäne, welche das primäre Endozytosesignal darstellt [221, 281]. Nach Durchführung der Flusskammerexperimente mit dem Protokoll „Induktion der Adhäsion“ zeigte sich, dass die Zahl der adhären Zellen mit einem dysfunktionale LRP1-NPXYxxL-Motif bei Beschichtung mit immobilisiertem MK als Stimulus im Vergleich mit den Kontrollzellen

signifikant vermindert war. Hingegen konnte mit einer CXCL1-Beschichtung kein signifikanter Unterschied gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Membran-distale LRP1-NP<sub>x</sub>YxxL-Domäne eine wichtige Rolle für die Induktion der Zelladhäsion spielt [158]. Neben der Adhäsion waren auch die Verstärkung der Adhäsion, die Abflachung der Zelle sowie die mechanotaktische Migration in dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen im Vergleich mit Kontrollzellen bei Beschichtung mit immobilisiertem MK, nicht jedoch mit CXCL1 signifikant eingeschränkt [158]. Die Analyse der einzelnen Rekrutierungsschritte in Mikroflussskammern deutet auf eine wichtige Bedeutung der MK-LRP1-Achse für die hoch-affine (E+H+) LFA-1- und Mac-1-Konformation hin. Eine Unterscheidung, ob die von der MK-LRP1-Achse vermittelten Effekte in Mikroflussskammern LFA-1 oder Mac-1 abhängig sind, könnte über Experimente mit Fibrinogen-Beschichtung erfolgen. Im Gegensatz zu ICAM-1, welches als Ligand für LFA-1 und Mac-1 fungiert, wird Fibrinogen nur von Mac-1 gebunden [310-313].

Um die Regulation der hoch-affinen (E+H+)  $\beta_2$ -Integrin-Konformation in Abhängigkeit von LRP1 zu untersuchen, wurden Experimente zur Bestimmung der Bindung von ICAM-1 nach Mac-1-Blockade (LFA-1 spezifisch) sowie Fibrinogen (Mac-1 spezifisch) an PMN durchgeführt. Dabei konnte nach Stimulation mit CXCL1 bei Vergleich von PMN aus Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen mit entsprechenden Kontrollen kein Einfluss von LRP1 auf die Affinitätsregulation von  $\beta_2$ -Integrinen festgestellt werden. Dies steht im Einklang mit den Stimulus-spezifischen funktionellen Effekten in der Mikroflussskammer. Um zu untersuchen, ob MK über LRP1 die hoch-affine (E+H+) Konformation von  $\beta_2$ -Integrinen induziert, wäre in den genannten Bindeversuchen die Stimulation der PMN mit immobilisiertem MK bedeutsam. Ebenso wäre es von Interesse die LFA-1-spezifische ICAM-1-Bindung sowie Mac-1-spezifische Fibrinogen-Bindung an dHoxb8-SCF-LRP1-NP<sub>x</sub>YxxL<sup>ki</sup>- sowie den entsprechenden Kontrollzellen nach Stimulation mit immobilisiertem MK durchzuführen, um den Einfluss des distalen LRP1-NP<sub>x</sub>YxxL-Motives auf die hoch-affine (E+H+)  $\beta_2$ -Integrin-Konformation zu bestimmen. Rabiej et al. konnten nachweisen, dass das distale LRP1-NP<sub>x</sub>YxxL-Motiv mit der zytoplasmatischen Domäne von  $\beta_1$ -Integrinen interagiert und über Vermittlung der  $\beta_1$ -Integrin-Endozytose die Adhäsion, Abflachung sowie Migration von MEFs auf Kollagen I sowie Fibronectin beeinflusst [224]. Da LRP1 einen bekannten Endozytoserezeptor darstellt, wäre es von Bedeutung nach Stimulation mit immobilisiertem MK auch den Einfluss von LRP1 auf die  $\beta_2$ -Integrin-Endozytose sowie die Rückführung der Rezeptoren an die Zelloberfläche zu untersuchen. Zusammenfassend deuten die experimentellen Daten dieser Arbeit darauf hin, dass LRP1 als funktioneller Rezeptor für das Zytokin MK agiert und die MK-LRP1-Achse zentrale Schritte der  $\beta_2$ -Integrin-abhängigen Leukozytenrekrutierung vermittelt.

### 4.3 Der molekulare Mechanismus der MK-LRP1-Achse in PMN

Es ist bekannt, dass LRP1 als Rezeptor für MK fungiert und mit den  $\beta_2$ -Integrinen LFA-1 und Mac-1 in Makrophagen interagiert [274, 276]. Der molekulare Mechanismus, wie die MK-LRP1-Achse die  $\beta_2$ -Integrin-Aktivierung sowie davon abhängige Rekrutierungsschritte beeinflusst, ist jedoch gänzlich unklar. Im Gegensatz dazu konnten Wujak et al. einen Ansatz zum Verständnis der LRP1-abhängigen  $\beta_1$ -Integrin-Aktivierung entwickeln [314]. In LRP1-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten waren im Vergleich zu Kontrollzellen die  $\beta_1$ -Integrin-Aktivierung sowie davon abhängige Rekrutierungsschritte der Adhäsion, Abflachung der Zelle sowie Migration auf Fibronectin vermindert [314]. Die  $\beta_1$ -Integrin-Oberflächenexpression war in Abwesenheit des Endozytoserezeptors LRP1 erwartungsgemäß erhöht, allerdings war die Internalisierungsrate im Vergleich mit Kontrollzellen unverändert [314]. Dies könnte laut Wujak et al. auf eine erhöhte Rückführung der  $\beta_1$ -Integrine an die Zelloberfläche bei LRP1-Defizienz hindeuten [314]. Ein möglicherweise vermittelndes Protein ist Snx17, welches sowohl mit LRP1 als auch  $\beta_1$ -Integrinen interagiert [314]. In Abwesenheit von LRP1 könnte es vermehrt  $\beta_1$ -Integrine binden und diese vor dem lysosomalen Abbau an die Oberfläche zurückführen [225, 314, 315]. Die LRP1-abhängige  $\beta_1$ -Integrin-Aktivierung lässt sich nach Wujak et al. über das Adapterprotein Kindlin-2 erklären [314]. LRP1 interagiert mit  $\beta_1$ -Integrinen an der Zelloberfläche und ermöglicht nach Assoziation von Kindlin-2 an die intrazytoplasmatische LRP1-Domäne die Formation eines  $\beta_1$ -Integrin-Kindlin-2-Komplexes, welcher zur Aktivierung der  $\beta_1$ -Integrine führt [314]. Ähnliche LRP1-abhängige Mechanismen könnten sowohl für die Aktivierung als auch intrazellulären Sortierungsprozesse der  $\beta_2$ -Integrine zutreffen. Für die hoch-affine-(E+H+) Konformation des  $\beta_2$ -Integrins LFA-1 ist neben Talin-1 auch die Bindung des Adapterproteins Kindlin-3 an den zytoplasmatischen Teil der  $\beta$ -Untereinheit von LFA-1 notwendig [80]. Da LRP1 und  $\beta_2$ -Integrine auf der Zelloberfläche interagieren, könnte nach Stimulation mit MK die Bindung von Kindlin-3 an den LRP1- $\beta_2$ -Integrin-Komplex erfolgen, welcher die Assoziation von Kindlin-3 an  $\beta_2$ -Integrine mit nachfolgender Aktivierung ermöglicht [80, 274, 276]. Moser et al. konnten *in vivo* unter Flussbedingungen eine essenzielle Rolle von Kindlin-3 für die Regulation der Adhäsion von PMN an Endothelzellen zeigen [316]. Die Frage, ob Kindlin-3 mit LRP1 interagiert ist bisher gänzlich unbekannt und könnte mit einer Ko-Immünpräzipitation untersucht werden. Nach Adhäsion von PMN in Mikroflussskammern mit immobilisiertem MK oder CXCL1 als Stimulus könnte mithilfe von LRP1- und Kindlin-3-Antikörpern eine Interaktion nachgewiesen werden. Da Kindlin-3 mit der Membran-distalen NPxY-Domäne von  $\beta_2$ -Integrinen interagiert, wäre zudem eine Ko-Immünpräzipitation mit dHoxb8-SCF-LRP1-NPxYxxL<sup>ki</sup>-Zellen sowie den entsprechenden Kontrollen bedeutsam [316]. Dies könnte zeigen, ob die Interaktion mit LRP1 ebenfalls über

die Membran-distale NPxYxxL-Domäne erfolgt. Im Zusammenhang mit den bereits in Kapitel 4.2 beschriebenen Experimenten könnte so der molekulare Mechanismus der MK-LRP1-Achse für die Rekrutierung von PMN weiter aufgedeckt werden.

#### **4.4 Die biologische Relevanz der MK-LRP1-Achse für die akute Entzündungsreaktion**

Die experimentellen Daten dieser Arbeit deuten in Zusammenschau mit den Vorarbeiten darauf hin, dass LRP1 während des Rekrutierungsprozesses den funktionellen Rezeptor für MK auf PMN darstellt [158, 185]. Obwohl die dargestellten Experimente *in vitro* einen wertvollen Beitrag zur Klärung des Mechanismus geleistet haben, stellen sie einen stark reduktionistischen Versuchsaufbau dar, der der Komplexität des Organismus nicht gerecht wird. Einflüsse der Scherkräfte im Gefäßsystem *in vivo*, die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle und inflammatorischer Zytokine sowie die Wechselwirkung von Leukozyten, Endothelzellen und Gewebe können *in vitro* nicht adäquat simuliert werden. Um die biologische Relevanz von LRP1 für die akute Entzündungsreaktion *in vivo* zu bestimmen, wurde von Weckbach et al. die Rekrutierung von PMN in Abwesenheit von LRP1 im hämatopoetischen System intravitalmikroskopisch untersucht [158]. In den postkapillären Venolen des *M. cremaster* von Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen konnte 2 h nach intraskrotaler Applikation von TNF $\alpha$  im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren eine signifikant reduzierte Leukozytenadhäsion festgestellt werden, während die Anzahl der rollenden Zellen sowie die Rollgeschwindigkeit keinen Unterschied zeigten [158]. Zudem war die Extravasation von PMN in das entzündete Gewebe des *M. cremaster* bei LRP1-Defizienz nach histologischer Analyse vermindert [158]. Im Gegenzug konnte keine Veränderung der Rekrutierung von Eosinophilen, Basophilen, Lymphozyten oder Monozyten in Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen im Vergleich zur Kontrolle gezeigt und somit in dem genannten Modell ein PMN-spezifischer Effekt nachgewiesen werden [158]. Die genannten Resultate der reduzierten PMN-Adhäsion sowie Extravasation in Abwesenheit von LRP1 *in vivo* entsprechen den Effekten, welche von Weckbach et al. in MK<sup>-/-</sup>-Mäusen erhoben werden konnten [185]. Dies stützt in Zusammenschau mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die Hypothese von LRP1 als einem biologisch relevanten Rezeptor für das Zytokin MK. Die spezifische Funktion von MK für die Rekrutierung von Leukozyten deutet auf MK als einen vielversprechenden therapeutischen Angriffspunkt hin [158, 161, 317].

Eine herausragende klinische Bedeutung der MK-LRP1-Achse wurde für das Krankheitsbild der Myokarditis gezeigt. Weckbach et al. konnten nachweisen, dass nach Applikation eines anti-N-terminalen MK-Antikörpers die Leukozyteninfiltration in dem Mausmodell der *Experimental Autoimmune Myocarditis* (EAM) 21 Tage nach Induktion signifikant reduziert

war [158]. Zudem war am 63. Tag der EAM die kardiale Fibrose sowie systolische Dysfunktion nach MK-Blockade im Vergleich zur Kontrolle vermindert [158]. Um zu untersuchen, ob der MK-Rezeptor LRP1 kritisch für die Leukozyteninfiltration bei EAM ist, wurde der Maus über eine subkutan implantierte Pumpe zur LRP1-Blockade LRPAP mit einer konstanten Rate infundiert [158]. Nach histologischer Analyse zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant verminderte Infiltration von Leukozyten in entzündetes kardiales Gewebe wie sie auch bei MK-Blockade nachgewiesen wurde [158]. Da jedoch LRPAP alle Mitglieder der LDL-Rezeptorenfamilie blockiert, konnte bisher nicht ausgeschlossen werden, ob neben LRP1 andere LDL-Rezeptoren an der EAM beteiligt sind [158]. In weiteren Experimenten ist dabei zu klären, ob MK diese Effekte *in vivo* direkt über LRP1 vermittelt. Darüber hinaus wurden von Weckbach et al. in endomyokardialen Biopsien von Patienten mit Myokarditis erstmals NETs nachgewiesen und *in vitro* ein funktioneller Zusammenhang der NET-Bildung zur MK-LRP1-Achse hergestellt [158]. Die Formation von NETs war in dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen auf immobilisiertem MK im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert [158]. Dies deutet darauf hin, dass MK die NET-Bildung über LRP1 induziert [158]. Somit lässt sich eine biologische Relevanz der MK-LRP1-Achse für die Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe des *M. cremaster* sowie in myokardiales Gewebe im Rahmen der Myokarditis feststellen. Für Patienten mit chronischer inflammatorischer Kardiomyopathie in Folge der Myokarditis gibt es bisher keine spezifische Therapie und eine Blockade der MK-LRP1-Achse könnte einen neuen Ansatz aufzeigen [158].

Zusammenfassend ist eine therapeutische MK-Blockade interessant, weil MK unter physiologischen Bedingungen im adulten Organismus restriktiv exprimiert wird [158, 161]. Dies ändert sich im inflammatorischen Zustand. MK konnte bei zahlreichen entzündlichen Erkrankungen in den beteiligten Organen nachgewiesen werden und ist an der Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion beteiligt [158, 161, 317]. Dies deutet auf einen spezifischen Effekt einer MK-Blockade im adulten Organismus hin und könnte für zahlreiche Krankheitsbilder neue therapeutische Optionen eröffnen.

## 5 Zusammenfassung

Polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) sind Teil des angeborenen Immunsystems und stellen die ersten Leukozyten dar, welche an den Ort der Verletzung oder akuten Entzündung rekrutiert werden. Für die verschiedenen Schritte der PMN-Rekrutierung aus dem Blutstrom in das Gewebe sind Adhäsionsmoleküle der  $\beta_2$ -Integrine essenziell. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass das Zytokin Midkine (MK) – ein Ligand des *Low density Lipoprotein Receptor-related Protein 1* (LRP1) – durch Stabilisierung der hoch-affinen Konformation von  $\beta_2$ -Integrinen an der Rekrutierung von PMN während der akuten Entzündungsreaktion beteiligt ist. LRP1 ist ein multifunktionseller Rezeptor, welcher aus einer großen 515 kDa extrazellulären  $\alpha$ -Domäne sowie einer 85 kDa transmembranären  $\beta$ -Domäne besteht und seine Funktionen durch Endozytose von Proteinen oder Oberflächenrezeptoren sowie Signaltransduktion vermittelt. Verschiedene Arbeiten konnten eine Interaktion von LRP1 mit  $\beta_2$ -Integrinen zeigen, jedoch war die exakte Rolle von LRP1 für die MK-vermittelte Rekrutierung von PMN bisher gänzlich unbekannt. In dieser Arbeit wurde ein LRP1-defizientes Maus- und Zellmodell etabliert, LRP1 und  $\beta_2$ -Integrine auf PMN molekular charakterisiert sowie die funktionelle Bedeutung von LRP1 für die Rekrutierung von PMN untersucht.

Da eine systemische LRP1-Deletion zu einem frühembryonalen Tod führt, wurden Mäuse mit einer gewebespezifischen Deletion gezüchtet. In PMN aus dem Knochenmark von LysM-Cre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen zeigte sich in der Western-Blot-Analyse jedoch eine insuffiziente Reduktion der LRP1-Expression, weshalb Vav-iCre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäuse mit einer LRP1-Deletion im hämatopoetischen System genutzt wurden. Um *in vitro* eine Zellexpansion zu ermöglichen, wurden Hoxb8-SCF Zellen aus Vav-iCre/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Mäusen für die funktionelle Analyse in Mikrofluskkammern genutzt. Außerdem wurden mittels CRISPR/Cas9 LRP1-defiziente Hoxb8-FL-Zellen generiert, welche für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Um LRP1 molekular zu charakterisieren, wurde zunächst die Expression auf RNA- und Proteinebene nachgewiesen. In weiteren Experimenten konnte durchflusszytometrisch eine Induktion der LRP1-Expression nach Inkubation mit pro-inflammatorischen Zytokinen festgestellt werden. Für  $\beta_2$ -Integrine konnte weder nach pharmakologischer LRP1-Blockade mit LRPAP noch in Abwesenheit von LRP1 eine veränderte Oberflächenexpression in ruhenden oder stimulierten PMN gezeigt werden. Zur funktionellen Untersuchung der Affinitätsregulation von  $\beta_2$ -Integrinen wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt und nach Stimulation der PMN mit CXCL1 kein Einfluss von LRP1 auf die hoch-affine  $\beta_2$ -Integrin-Konformation festgestellt. Dies bestätigte die intakte Funktion der  $\beta_2$ -Integrine während der Rekrutierung von LRP1-defizienten PMN in dem reduktionistischen System der Mikrofluskkammer bei Beschichtung mit dem Stimulus CXCL1. Für Lokalisationsstudien wurden die hochauflösende

*Confocal Spinning Disc-* sowie *Stimulated Emission Depletion*-Mikroskopie verwendet und in der Mikroflussskammer die Kolokalisation und das *Clustering* von LRP1 und CD11a während dem Übergang vom Rollen zur Adhäsion dargestellt. Während dieser Effekt sowohl bei Beschichtung mit CXCL1 als auch MK als Stimulus nachgewiesen wurde, war die Adhäsion von dHoxb8-SCF-Vav-iCre<sup>+</sup>/LRP1<sup>fl/fl</sup>-Zellen im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen nur bei Beschichtung der Mikroflussskammern mit MK als Stimulus reduziert. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Membran-distale LRP1-NPXYxxL-Domäne an der MK-vermittelten Adhäsion beteiligt ist. Neben der Adhäsion waren auch die Rekrutierungsschritte der Verstärkung der Adhäsion, Abflachung der Zelle sowie mechanotaktischen Migration in Abwesenheit von LRP1 auf immobilisiertem MK, nicht jedoch auf CXCL1, signifikant eingeschränkt.

Zusammenfassend weisen die schweren MK-vermittelten Defekte der einzelnen Rekrutierungsschritte in Abhängigkeit von LRP1 *in vitro* auf eine herausragende Bedeutung von LRP1 für die MK-vermittelte Rekrutierung von PMN im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion hin.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Medzhitov, R., *Origin and physiological roles of inflammation*. Nature, 2008. 454(7203): p. 428-35.
2. Celsus, C., *De medicina*. liber 3, cap. 10.
3. Virchow, R., *Die Cellularpathologie*. 1858.
4. Rather, L.J., *Disturbance of function (functio laesa): the legendary fifth cardinal sign of inflammation, added by Galen to the four cardinal signs of Celsus*. Bull N Y Acad Med, 1971. 47(3): p. 303-22.
5. Hunter, J., *Treatise on the blood, inflammation, and gunshot wounds*. London: Richardson, 1794.
6. Warren, J.S. and P.A. Ward, *The Inflammatory Response*, in *Williams Hematology, 9e*, K. Kaushansky, M.A. Lichtman, J.T. Prchal, M.M. Levi, O.W. Press, L.J. Burns, and M. Caligiuri, Editors. 2015, McGraw-Hill Education: New York, NY.
7. Robbins, S.L., V. Kumar, and R.S. Cotran, *Robbins and Cotran pathologic basis of disease*. 2005, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
8. Pillay, J., I. den Braber, N. Vrisekoop, L.M. Kwast, R.J. de Boer, J.A.M. Borghans, K. Tesselaar, and L. Koenderman, *In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2010. 116(4): p. 625-627.
9. Tofts, P.S., T. Chevassut, M. Cutajar, N.G. Dowell, and A.M. Peters, *Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days*. Blood, 2011. 117(22): p. 6050-6052.
10. Borregaard, N., *Neutrophils, from Marrow to Microbes*. Immunity, 2010. 33(5): p. 657-670.
11. Lieschke, G., D. Grail, G. Hodgson, D. Metcalf, E. Stanley, C. Cheers, K. Fowler, S. Basu, Y. Zhan, and A. Dunn, *Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization*. Blood, 1994. 84(6): p. 1737-1746.
12. Liew, P.X. and P. Kubes, *The Neutrophil's Role During Health and Disease*. Physiol Rev, 2019. 99(2): p. 1223-1248.
13. Ley, K., C. Laudanna, M.I. Cybulsky, and S. Nourshargh, *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. 7(9): p. 678-89.
14. Mestas, J. and C.C.W. Hughes, *Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology*. The Journal of Immunology, 2004. 172(5): p. 2731-2738.
15. Phillipson, M. and P. Kubes, *The neutrophil in vascular inflammation*. Nat Med, 2011. 17(11): p. 1381-90.
16. Doeing, D.C., J.L. Borowicz, and E.T. Crockett, *Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods*. BMC Clinical Pathology, 2003. 3(1): p. 3.
17. Scheiermann, C., Y. Kunisaki, and P.S. Frenette, *Circadian control of the immune system*. Nature Reviews Immunology, 2013. 13: p. 190.
18. Rada, B.K., M. Geiszt, K. Káldi, C. Timár, and E. Ligeti, *Dual role of phagocytic NADPH oxidase in bacterial killing*. Blood, 2004. 104(9): p. 2947-2953.
19. Belaouaj, A., R. McCarthy, M. Baumann, Z. Gao, T.J. Ley, S.N. Abraham, and S.D. Shapiro, *Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis*. Nature Medicine, 1998. 4(5): p. 615-618.
20. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky, *Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria*. Science, 2004. 303(5663): p. 1532-1535.
21. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The Multifaceted Functions of Neutrophils*. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease, 2014. 9(1): p. 181-218.

22. Dotta, L., L. Tassone, and R. Badolato, *Clinical and Genetic Features of Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis (WHIM) Syndrome*. *Current Molecular Medicine*, 2011. 11(4): p. 317-325.
23. Zeidler, C., M. Germeshausen, C. Klein, and K. Welte, *Clinical implications of ELA2-, HAX1-, and G-CSF-receptor (CSF3R) mutations in severe congenital neutropenia*. *British Journal of Haematology*, 2009. 144(4): p. 459-467.
24. Ortega-Gómez, A., M. Perretti, and O. Soehnlein, *Resolution of inflammation: an integrated view*. *EMBO Molecular Medicine*, 2013. 5(5): p. 661-674.
25. Theilgaard-Mönch, K., S. Knudsen, P. Follin, and N. Borregaard, *The Transcriptional Activation Program of Human Neutrophils in Skin Lesions Supports Their Important Role in Wound Healing*. *The Journal of Immunology*, 2004. 172(12): p. 7684-7693.
26. Seignez, C. and M. Phillipson, *The multitasking neutrophils and their involvement in angiogenesis*. *Current Opinion in Hematology*, 2017. 24(1): p. 3-8.
27. Pillay, J., V.M. Kamp, E. van Hoffen, T. Visser, T. Tak, J.-W. Lammers, L.H. Ulfman, L.P. Leenen, P. Pickkers, and L. Koenderman, *A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2012. 122(1): p. 327-336.
28. Fridlender, Z.G., J. Sun, S. Kim, V. Kapoor, G. Cheng, L. Ling, G.S. Worthen, and S.M. Albelda, *Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN*. *Cancer Cell*, 2009. 16(3): p. 183-194.
29. Camps, M., T. Rückle, H. Ji, V. Ardisson, F. Rintelen, J. Shaw, C. Ferrandi, C. Chabert, C. Gillieron, B. Françon, T. Martin, D. Gretener, D. Perrin, D. Leroy, P.-A. Vitte, E. Hirsch, M.P. Wymann, R. Cirillo, M.K. Schwarz, and C. Rommel, *Blockade of PI3K $\gamma$  suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis*. *Nature Medicine*, 2005. 11(9): p. 936-943.
30. Pisitkun, P., H.-L. Ha, H. Wang, E. Claudio, Caitlyn C. Tivy, H. Zhou, Tanya N. Mayadas, Gabor G. Illei, and U. Siebenlist, *Interleukin-17 Cytokines Are Critical in Development of Fatal Lupus Glomerulonephritis*. *Immunity*, 2012. 37(6): p. 1104-1115.
31. von Bruhl, M.L., K. Stark, A. Steinhart, S. Chandraratne, I. Konrad, M. Lorenz, A. Khandoga, A. Tirniceriu, R. Coletti, M. Kollnberger, R.A. Byrne, I. Laitinen, A. Walch, A. Brill, S. Pfeiler, D. Manukyan, S. Braun, P. Lange, J. Riegger, J. Ware, A. Eckart, S. Haidari, M. Rudelius, C. Schulz, K. Ehtler, V. Brinkmann, M. Schwaiger, K.T. Preissner, D.D. Wagner, N. Mackman, B. Engelmann, and S. Massberg, *Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo*. *J Exp Med*, 2012. 209(4): p. 819-35.
32. Kolaczowska, E. and P. Kuberski, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2013. 13(3): p. 159-75.
33. Kunkel, E.J., U. Jung, and K. Ley, *TNF-alpha induces selectin-mediated leukocyte rolling in mouse cremaster muscle arterioles*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 1997. 272(3): p. H1391-H1400.
34. Margraf, A., K. Ley, and A. Zarbock, *Neutrophil Recruitment: From Model Systems to Tissue-Specific Patterns*. *Trends in Immunology*, 2019.
35. Schymeinsky, J., M. Sperandio, and B. Walzog, *The mammalian actin-binding protein 1 (mAbp1): a novel molecular player in leukocyte biology*. *Trends Cell Biol*, 2011. 21(4): p. 247-55.
36. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte Migration into Inflamed Tissues*. *Immunity*, 2014. 41(5): p. 694-707.
37. Maas, S.L., O. Soehnlein, and J.R. Viola, *Organ-Specific Mechanisms of Transendothelial Neutrophil Migration in the Lung, Liver, Kidney, and Aorta*. *Frontiers in Immunology*, 2018. 9(2739).
38. Sadik, C.D., N.D. Kim, and A.D. Luster, *Neutrophils cascading their way to inflammation*. *Trends Immunol*, 2011. 32(10): p. 452-60.
39. Pober, J.S. and W.C. Sessa, *Evolving functions of endothelial cells in inflammation*. *Nature Reviews Immunology*, 2007. 7: p. 803.
40. Kansas, G., *Selectins and their ligands: current concepts and controversies*. *Blood*, 1996. 88(9): p. 3259-3287.

41. Kelly, M., J.M. Hwang, and P. Kubes, *Modulating leukocyte recruitment in inflammation*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007. 120(1): p. 3-10.
42. Petri, B., M. Phillipson, and P. Kubes, *The Physiology of Leukocyte Recruitment: An In Vivo Perspective*. *The Journal of Immunology*, 2008. 180(10): p. 6439-6446.
43. Ley, K., *The role of selectins in inflammation and disease*. *Trends in Molecular Medicine*, 2003. 9(6): p. 263-268.
44. McEver, R.P., J.H. Beckstead, K.L. Moore, L. Marshall-Carlson, and D.F. Bainton, *GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1989. 84(1): p. 92-99.
45. Berman, C.L., E.L. Yeo, J.D. Wencel-Drake, B.C. Furie, M.H. Ginsberg, and B. Furie, *A platelet alpha granule membrane protein that is associated with the plasma membrane after activation. Characterization and subcellular localization of platelet activation-dependent granule-external membrane protein*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1986. 78(1): p. 130-137.
46. Muller, W.A., *Getting Leukocytes to the Site of Inflammation*. *Veterinary Pathology*, 2013. 50(1): p. 7-22.
47. Zarbock, A., K. Ley, R.P. McEver, and A. Hidalgo, *Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow*. *Blood*, 2011. 118(26): p. 6743-6751.
48. Kunkel Eric, J. and K. Ley, *Distinct Phenotype of E-Selectin-Deficient Mice*. *Circulation Research*, 1996. 79(6): p. 1196-1204.
49. Bargatze, R.F., S. Kurk, E.C. Butcher, and M.A. Jutila, *Neutrophils roll on adherent neutrophils bound to cytokine-induced endothelial cells via L-selectin on the rolling cells*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1994. 180(5): p. 1785-1792.
50. Sundd, P., M.K. Pospieszalska, L.S. Cheung, K. Konstantopoulos, and K. Ley, *Biomechanics of leukocyte rolling*. *Biorheology*, 2011. 48(1): p. 1-35.
51. Sundd, P., E. Gutierrez, E.K. Koltsova, Y. Kuwano, S. Fukuda, M.K. Pospieszalska, A. Groisman, and K. Ley, *'Slings' enable neutrophil rolling at high shear*. *Nature*, 2012. 488(7411): p. 399-403.
52. Ramachandran, V., M. Williams, T. Yago, D.W. Schmidtke, and R.P. McEver, *Dynamic alterations of membrane tethers stabilize leukocyte rolling on P-selectin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(37): p. 13519-24.
53. Schmidtke, D.W. and S.L. Diamond, *Direct Observation of Membrane Tethers Formed during Neutrophil Attachment to Platelets or P-Selectin under Physiological Flow*. *The Journal of Cell Biology*, 2000. 149(3): p. 719-730.
54. Massena, S., G. Christoffersson, E. Hjertström, E. Zcharia, I. Vlodavsky, N. Ausmees, C. Rolny, J.-P. Li, and M. Phillipson, *A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils*. *Blood*, 2010. 116(11): p. 1924-1931.
55. Summers, C., S.M. Rankin, A.M. Condliffe, N. Singh, A.M. Peters, and E.R. Chilvers, *Neutrophil kinetics in health and disease*. *Trends in Immunology*, 2010. 31(8): p. 318-324.
56. Miralda, I., S.M. Uriarte, and K.R. McLeish, *Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2017. 7: p. 217-217.
57. Condliffe, A.M., E.R. Chilvers, C. Haslett, and I. Dransfield, *Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function*. *Immunology*, 1996. 89(1): p. 105-111.
58. Swain, S.D., T.T. Rohn, and M.T. Quinn, *Neutrophil Priming in Host Defense: Role of Oxidants as Priming Agents*. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2002. 4(1): p. 69-83.
59. Potera, R.M., M.J. Jensen, B.M. Hilkin, G.K. South, J.S. Hook, E.A. Gross, and J.G. Moreland, *Neutrophil azurophilic granule exocytosis is primed by TNF- $\alpha$  and partially regulated by NADPH oxidase*. *Innate Immunity*, 2016. 22(8): p. 635-646.
60. Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Structural basis of integrin regulation and signaling*. *Annu Rev Immunol*, 2007. 25: p. 619-47.

61. Herter, J. and A. Zarbock, *Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment*. The Journal of Immunology, 2013. 190(9): p. 4451-4457.
62. Harris, E.S., T.M. McIntyre, S.M. Prescott, and G.A. Zimmerman, *The Leukocyte Integrins*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(31): p. 23409-23412.
63. Sumagin, R., H. Prizant, E. Lomakina, R.E. Waugh, and I.H. Sarelius, *LFA-1 and Mac-1 Define Characteristically Different Intraluminal Crawling and Emigration Patterns for Monocytes and Neutrophils In Situ*. The Journal of Immunology, 2010. 185(11): p. 7057-7066.
64. Myones, B.L., J.G. Dalzell, N. Hogg, and G.D. Ross, *Neutrophil and monocyte cell surface p150,95 has iC3b-receptor (CR4) activity resembling CR3*. The Journal of Clinical Investigation, 1988. 82(2): p. 640-651.
65. Van der Vieren, M., H. Le Trong, C.L. Wood, P.F. Moore, T.S. John, D.E. Staunton, and W.M. Gallatin, *A novel leukointegrin, adb2, binds preferentially to ICAM-3*. Immunity, 1995. 3(6): p. 683-690.
66. Lefort, C.T. and K. Ley, *Neutrophil arrest by LFA-1 activation*. Front Immunol, 2012. 3: p. 157.
67. Legate, K.R. and R. Fässler, *Mechanisms that regulate adaptor binding to  $\beta$ -integrin cytoplasmic tails*. Journal of Cell Science, 2009. 122(2): p. 187-198.
68. Fan, Z. and K. Ley, *Leukocyte arrest: Biomechanics and molecular mechanisms of beta2 integrin activation*. Biorheology, 2015. 52(5-6): p. 353-77.
69. Petri, B. and M.G. Bixel, *Molecular events during leukocyte diapedesis*. The FEBS Journal, 2006. 273(19): p. 4399-4407.
70. Abram, C.L. and C.A. Lowell, *The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling*. Annual Review of Immunology, 2009. 27(1): p. 339-362.
71. Salas, A., M. Shimaoka, A.N. Kogan, C. Harwood, U.H. von Andrian, and T.A. Springer, *Rolling Adhesion through an Extended Conformation of Integrin  $\alpha$ Lb2 and Relation to  $\alpha$ l and  $\beta$ l-like Domain Interaction*. Immunity, 2004. 20(4): p. 393-406.
72. Schürpf, T. and T.A. Springer, *Regulation of integrin affinity on cell surfaces*. The EMBO Journal, 2011. 30(23): p. 4712-4727.
73. Fan, Z., S. McArdle, A. Marki, Z. Mikulski, E. Gutierrez, B. Engelhardt, U. Deutsch, M. Ginsberg, A. Groisman, and K. Ley, *Neutrophil recruitment limited by high-affinity bent  $\beta$ 2 integrin binding ligand in cis*. Nature Communications, 2016. 7: p. 12658.
74. Evans, R., I. Patzak, L. Svensson, K. De Filippo, K. Jones, A. McDowall, and N. Hogg, *Integrins in immunity*. J Cell Sci, 2009. 122(Pt 2): p. 215-25.
75. Nishida, N., C. Xie, M. Shimaoka, Y. Cheng, T. Walz, and T.A. Springer, *Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations*. Immunity, 2006. 25(4): p. 583-94.
76. Arnaout, M.A., B. Mahalingam, and J.P. Xiong, *Integrin Structure, Allostery, and Bidirectional Signaling*. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2005. 21(1): p. 381-410.
77. Fan, Z., W.B. Kiosses, H. Sun, M. Orecchioni, Y. Ghosheh, D.M. Zajonc, M.A. Arnaout, E. Gutierrez, A. Groisman, M.H. Ginsberg, and K. Ley, *High-Affinity Bent beta2-Integrin Molecules in Arresting Neutrophils Face Each Other through Binding to ICAMs In cis*. Cell Rep, 2019. 26(1): p. 119-130 e5.
78. Yago, T., N. Zhang, L. Zhao, C.S. Abrams, and R.P. McEver, *Selectins and chemokines use shared and distinct signals to activate  $\beta$ 2 integrins in neutrophils*. Blood Advances, 2018. 2(7): p. 731-744.
79. Wegener, K.L., A.W. Partridge, J. Han, A.R. Pickford, R.C. Liddington, M.H. Ginsberg, and I.D. Campbell, *Structural Basis of Integrin Activation by Talin*. Cell, 2007. 128(1): p. 171-182.
80. Lefort, C.T., J. Rossaint, M. Moser, B.G. Petrich, A. Zarbock, S.J. Monkley, D.R. Critchley, M.H. Ginsberg, R. Fassler, and K. Ley, *Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation*. Blood, 2012. 119(18): p. 4275-82.
81. Kim, M., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Bidirectional Transmembrane Signaling by Cytoplasmic Domain Separation in Integrins*. Science, 2003. 301(5640): p. 1720-1725.

82. Shao, B., T. Yago, P.A. Coghill, A.G. Klopocki, P. Mehta-D'souza, D.W. Schmidtke, W. Rodgers, and R.P. McEver, *Signal-dependent Slow Leukocyte Rolling Does Not Require Cytoskeletal Anchorage of P-selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1) or Integrin  $\alpha$ L $\beta$ 2*. *Journal of Biological Chemistry*, 2012. 287(23): p. 19585-19598.
83. Zhu, J., B.-H. Luo, T. Xiao, C. Zhang, N. Nishida, and T.A. Springer, *Structure of a Complete Integrin Ectodomain in a Physiologic Resting State and Activation and Deactivation by Applied Forces*. *Molecular Cell*, 2008. 32(6): p. 849-861.
84. Morikis, V.A., S. Chase, T. Wun, E.L. Chaikof, J.L. Magnani, and S.I. Simon, *Selectin catch-bonds mechanotransduce integrin activation and neutrophil arrest on inflamed endothelium under shear flow*. *Blood*, 2017. 130(19): p. 2101-2110.
85. Cappenberg, A., M. Kardell, and A. Zarbock, *Selectin-Mediated Signaling-Shedding Light on the Regulation of Integrin Activity in Neutrophils*. *Cells*, 2022. 11(8).
86. Giagulli, C., L. Ottoboni, E. Cavegion, B. Rossi, C. Lowell, G. Constantin, C. Laudanna, and G. Berton, *The Src family kinases Hck and Fgr are dispensable for inside-out, chemoattractant-induced signaling regulating beta 2 integrin affinity and valency in neutrophils, but are required for beta 2 integrin-mediated outside-in signaling involved in sustained adhesion*. *J Immunol*, 2006. 177(1): p. 604-11.
87. Leick, M., V. Azcutia, G. Newton, and F.W. Luscinskas, *Leukocyte recruitment in inflammation: basic concepts and new mechanistic insights based on new models and microscopic imaging technologies*. *Cell and Tissue Research*, 2014. 355(3): p. 647-656.
88. Sánchez-Madrid, F. and J.M. Serrador, *Bringing up the rear: defining the roles of the uropod*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009. 10: p. 353.
89. Ridley, A.J., M.A. Schwartz, K. Burridge, R.A. Firtel, M.H. Ginsberg, G. Borisy, J.T. Parsons, and A.R. Horwitz, *Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back*. *Science*, 2003. 302(5651): p. 1704-1709.
90. Phillipson, M., B. Heit, P. Colarusso, L. Liu, C.M. Ballantyne, and P. Kubes, *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. *J Exp Med*, 2006. 203(12): p. 2569-75.
91. Dewey, J.C.F., S.R. Bussolari, J.M.A. Gimbrone, and P.F. Davies, *The Dynamic Response of Vascular Endothelial Cells to Fluid Shear Stress*. *Journal of Biomechanical Engineering*, 1981. 103(3): p. 177-185.
92. Jones, D.H., D.C. Anderson, B.L. Burr, H.E. Rudloff, C.W. Smith, S.S. Krater, and F.C. Schmalstieg, *Quantitation of Intracellular Mac-1 (CD11b/CD18) Pools in Human Neutrophils*. *Journal of Leukocyte Biology*, 1988. 44(6): p. 535-544.
93. Hepper, I., J. Schymeinsky, L.T. Weckbach, S.M. Jakob, D. Frommhold, M. Sixt, M. Laschinger, M. Sperandio, and B. Walzog, *The mammalian actin-binding protein 1 is critical for spreading and intraluminal crawling of neutrophils under flow conditions*. *J Immunol*, 2012. 188(9): p. 4590-601.
94. Phillipson, M., B. Heit, S.A. Parsons, B. Petri, S.C. Mullaly, P. Colarusso, R.M. Gower, G. Neely, S.I. Simon, and P. Kubes, *Vav1 Is Essential for Mechanotactic Crawling and Migration of Neutrophils out of the Inflamed Microvasculature*. *The Journal of Immunology*, 2009. 182(11): p. 6870-6878.
95. Schymeinsky, J., R. Gerstl, I. Mannigel, K. Niedung, D. Frommhold, K. Panthel, J. Heesemann, M. Sixt, T. Quast, W. Kolanus, A. Mocsai, J. Wienands, M. Sperandio, and B. Walzog, *A fundamental role of mAbp1 in neutrophils: impact on beta(2) integrin-mediated phagocytosis and adhesion in vivo*. *Blood*, 2009. 114(19): p. 4209-20.
96. Burns, A.R., R.A. Bowden, S.D. MacDonell, D.C. Walker, T.O. Odebunmi, E.M. Donachie, S.I. Simon, M.L. Entman, and C.W. Smith, *Analysis of tight junctions during neutrophil transendothelial migration*. *Journal of Cell Science*, 2000. 113(1): p. 45-57.
97. Woodfin, A., M.B. Voisin, M. Beyrau, B. Colom, D. Caille, F.M. Diapouli, G.B. Nash, T. Chavakis, S.M. Albelda, G.E. Rainger, P. Meda, B.A. Imhof, and S. Nourshargh, *The junctional adhesion molecule JAM-C regulates polarized transendothelial migration of neutrophils in vivo*. *Nat Immunol*, 2011. 12(8): p. 761-9.

98. Huang, A.J., J.E. Manning, T.M. Bandak, M.C. Ratau, K.R. Hanser, and S.C. Silverstein, *Endothelial cell cytosolic free calcium regulates neutrophil migration across monolayers of endothelial cells*. The Journal of Cell Biology, 1993. 120(6): p. 1371-1380.
99. Dejana, E., *Endothelial cell-cell junctions: happy together*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2004. 5(4): p. 261-270.
100. Nourshargh, S., F. Krombach, and E. Dejana, *The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues*. Journal of Leukocyte Biology, 2006. 80(4): p. 714-718.
101. Nourshargh, S., S.A. Renshaw, and B.A. Imhof, *Reverse Migration of Neutrophils: Where, When, How, and Why?* Trends Immunol, 2016. 37(5): p. 273-286.
102. Mamdouh, Z., A. Mikhailov, and W.A. Muller, *Transcellular migration of leukocytes is mediated by the endothelial lateral border recycling compartment*. The Journal of Experimental Medicine, 2009. 206(12): p. 2795-2808.
103. Engelhardt, B. and H. Wolburg, *Mini-review: Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house?* European Journal of Immunology, 2004. 34(11): p. 2955-2963.
104. Dvorak, A.M. and D. Feng, *The Vesiculo-Vacuolar Organelle (VVO): A New Endothelial Cell Permeability Organelle*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2001. 49(4): p. 419-431.
105. Rowat, A.C., D.E. Jaalouk, M. Zwerger, W.L. Ung, I.A. Eydelnant, D.E. Olins, A.L. Olins, H. Herrmann, D.A. Weitz, and J. Lammerding, *Nuclear Envelope Composition Determines the Ability of Neutrophil-type Cells to Passage through Micron-scale Constrictions*. Journal of Biological Chemistry, 2013. 288(12): p. 8610-8618.
106. Barreiro, O., M. Yáñez-Mó, J.M. Serrador, M.C. Montoya, M. Vicente-Manzanares, R. Tejedor, H. Furthmayr, and F. Sánchez-Madrid, *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. The Journal of Cell Biology, 2002. 157(7): p. 1233-1245.
107. Phillipson, M., J. Kaur, P. Colarusso, C.M. Ballantyne, and P. Kubes, *Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration*. PLoS One, 2008. 3(2): p. e1649.
108. Petri, B., J. Kaur, E.M. Long, H. Li, S.A. Parsons, S. Butz, M. Phillipson, D. Vestweber, K.D. Patel, S.M. Robbins, and P. Kubes, *Endothelial LSP1 is involved in endothelial dome formation, minimizing vascular permeability changes during neutrophil transmigration in vivo*. Blood, 2011. 117(3): p. 942-952.
109. Hallmann, R., X. Zhang, J. Di Russo, L. Li, J. Song, M.-J. Hannocks, and L. Sorokin, *The regulation of immune cell trafficking by the extracellular matrix*. Current Opinion in Cell Biology, 2015. 36: p. 54-61.
110. Wang, S., M.B. Voisin, K.Y. Larbi, J. Dangerfield, C. Scheiermann, M. Tran, P.H. Maxwell, L. Sorokin, and S. Nourshargh, *Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils*. J Exp Med, 2006. 203(6): p. 1519-32.
111. Stark, K., A. Eckart, S. Haidari, A. Tirniceriu, M. Lorenz, M.L. von Bruhl, F. Gartner, A.G. Khandoga, K.R. Legate, R. Pless, I. Hepper, K. Lauber, B. Walzog, and S. Massberg, *Capillary and arteriolar pericytes attract innate leukocytes exiting through venules and 'instruct' them with pattern-recognition and motility programs*. Nat Immunol, 2013. 14(1): p. 41-51.
112. Proebstl, D., M.-B. Voisin, A. Woodfin, J. Whiteford, F. D'Acquisto, G.E. Jones, D. Rowe, and S. Nourshargh, *Pericytes support neutrophil subendothelial cell crawling and breaching of venular walls in vivo*. The Journal of Experimental Medicine, 2012. 209(6): p. 1219-1234.
113. Foxman, E.F., J.J. Campbell, and E.C. Butcher, *Multistep Navigation and the Combinatorial Control of Leukocyte Chemotaxis*. The Journal of Cell Biology, 1997. 139(5): p. 1349-1360.
114. McDonald, B., K. Pittman, G.B. Menezes, S.A. Hirota, I. Slaba, C.C. Waterhouse, P.L. Beck, D.A. Muruve, and P. Kubes, *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*. Science, 2010. 330(6002): p. 362-6.

115. Renkawitz, J., A. Kopf, J. Stopp, I. de Vries, M.K. Driscoll, J. Merrin, R. Hauschild, E.S. Welf, G. Danuser, R. Fiolka, and M. Sixt, *Nuclear positioning facilitates amoeboid migration along the path of least resistance*. *Nature*, 2019. 568(7753): p. 546-550.
116. Wisse, E., R.B. de Zanger, K. Charels, P. van der Smissen, and R.S. McCuskey, *The liver sieve: Considerations concerning the structure and function of endothelial fenestrae, the sinusoidal wall and the space of disse*. *Hepatology*, 1985. 5(4): p. 683-692.
117. Wong, J., B. Johnston, S.S. Lee, D.C. Bullard, C.W. Smith, A.L. Beaudet, and P. Kubes, *A minimal role for selectins in the recruitment of leukocytes into the inflamed liver microvasculature*. *The Journal of Clinical Investigation*, 1997. 99(11): p. 2782-2790.
118. Kuligowski, M.P., A.R. Kitching, and M.J. Hickey, *Leukocyte Recruitment to the Inflamed Glomerulus: A Critical Role for Platelet-Derived P-Selectin in the Absence of Rolling*. *The Journal of Immunology*, 2006. 176(11): p. 6991-6999.
119. Block, H., J.M. Herter, J. Rossaint, A. Stadtmann, S. Kliche, C.A. Lowell, and A. Zarbock, *Crucial role of SLP-76 and ADAP for neutrophil recruitment in mouse kidney ischemia-reperfusion injury*. *The Journal of Experimental Medicine*, 2012. 209(2): p. 407-421.
120. Ley, K., H.M. Hoffman, P. Kubes, M.A. Cassatella, A. Zychlinsky, C.C. Hedrick, and S.D. Catz, *Neutrophils: New insights and open questions*. *Science Immunology*, 2018. 3(30): p. eaat4579.
121. Harris, E.S., A.S. Weyrich, and G.A. Zimmerman, *Lessons from rare maladies: leukocyte adhesion deficiency syndromes*. *Current Opinion in Hematology*, 2013. 20(1): p. 16-25.
122. Crowley, C.A., J.T. Curnutte, R.E. Rosin, J. André-Schwartz, J.I. Gallin, M. Klempner, R. Snyderman, F.S. Southwick, T.P. Stossel, and B.M. Babior, *An Inherited Abnormality of Neutrophil Adhesion*. *New England Journal of Medicine*, 1980. 302(21): p. 1163-1168.
123. Hanna, S. and A. Etzioni, *Leukocyte adhesion deficiencies*. *Ann N Y Acad Sci*, 2012. 1250: p. 50-5.
124. Luhn, K., M.K. Wild, M. Eckhardt, R. Gerardy-Schahn, and D. Vestweber, *The gene defective in leukocyte adhesion deficiency II encodes a putative GDP-fucose transporter*. *Nat Genet*, 2001. 28(1): p. 69-72.
125. Schmidt, S., M. Moser, and M. Sperandio, *The molecular basis of leukocyte recruitment and its deficiencies*. *Mol Immunol*, 2013. 55(1): p. 49-58.
126. Kuijpers, T.W., E. van de Vijver, M.A. Weterman, M. de Boer, A.T. Tool, T.K. van den Berg, M. Moser, M.E. Jakobs, K. Seeger, O. Sanal, S. Unal, M. Cetin, D. Roos, A.J. Verhoeven, and F. Baas, *LAD-1/variant syndrome is caused by mutations in FERMT3*. *Blood*, 2009. 113(19): p. 4740-6.
127. Abram, C.L. and C.A. Lowell, *Leukocyte adhesion deficiency syndrome: a controversy solved*. *Immunology & Cell Biology*, 2009. 87(6): p. 440-442.
128. Fan, Z. and K. Ley, *Leukocyte Adhesion Deficiency IV. Monocyte Integrin Activation Deficiency in Cystic Fibrosis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2016. 193(10): p. 1075-7.
129. Metchnikoff, E., *Leçon sur la pathologie comparee de inflammation*. *Ann. Inst. Pasteur*, 1893. 7: p. 348-57.
130. Amulic, B., C. Cazalet, G.L. Hayes, K.D. Metzler, and A. Zychlinsky, *Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease*. *Annual Review of Immunology*, 2012. 30(1): p. 459-489.
131. Nordenfelt, P. and H. Tapper, *Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2011. 90(2): p. 271-284.
132. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action*. *Annual Review of Immunology*, 2002. 20(1): p. 825-852.
133. Allen, L.A. and A. Aderem, *Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement- and Fc receptor-mediated phagocytosis in macrophages*. *The Journal of Experimental Medicine*, 1996. 184(2): p. 627-637.
134. Kruger, P., M. Saffarzadeh, A.N. Weber, N. Rieber, M. Radsak, H. von Bernuth, C. Benarafa, D. Roos, J. Skokowa, and D. Hartl, *Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury*. *PLoS Pathog*, 2015. 11(3): p. e1004651.

135. Jankowski, A., C.C. Scott, and S. Grinstein, *Determinants of the Phagosomal pH in Neutrophils*. Journal of Biological Chemistry, 2002. 277(8): p. 6059-6066.
136. Allen, L.-A.H., B.R. Beecher, J.T. Lynch, O.V. Rohner, and L.M. Wittine, *Helicobacter pylori disrupts NADPH Oxidase Targeting in Human Neutrophils to Induce Extracellular Superoxide Release*. The Journal of Immunology, 2005. 174(6): p. 3658-3667.
137. Sheppard, F.R., M.R. Kelher, E.E. Moore, N.J.D. McLaughlin, A. Banerjee, and C.C. Silliman, *Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation*. Journal of Leukocyte Biology, 2005. 78(5): p. 1025-1042.
138. Baldrige, C.W. and R.W. Gerard, *The extra respiration of phagocytosis*. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1932. 103(1): p. 235-236.
139. Williams, R., *Killing controversy*. The Journal of Experimental Medicine, 2006. 203(11): p. 2404-2404.
140. Lambeth, J.D., *NOX enzymes and the biology of reactive oxygen*. Nature Reviews Immunology, 2004. 4(3): p. 181-189.
141. Kuijpers, T. and R. Lutter, *Inflammation and repeated infections in CGD: two sides of a coin*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2012. 69(1): p. 7-15.
142. Sheshachalam, A., N. Srivastava, T. Mitchell, P. Lacy, and G. Eitzen, *Granule Protein Processing and Regulated Secretion in Neutrophils*. Frontiers in Immunology, 2014. 5(448).
143. Faurschou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. 5(14): p. 1317-27.
144. Borregaard, N., O.E. Sørensen, and K. Theilgaard-Mönch, *Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins*. Trends in Immunology, 2007. 28(8): p. 340-345.
145. Sengeløv, H., L. Kjeldsen, and N. Borregaard, *Control of exocytosis in early neutrophil activation*. The Journal of Immunology, 1993. 150(4): p. 1535-1543.
146. Delclaux, C., C. Delacourt, M.P. D'Ortho, V. Boyer, C. Lafuma, and A. Harf, *Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane*. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 1996. 14(3): p. 288-295.
147. Kothari, N., R.S. Keshari, J. Bogra, M. Kohli, H. Abbas, A. Malik, M. Dikshit, and M.K. Barthwal, *Increased myeloperoxidase enzyme activity in plasma is an indicator of inflammation and onset of sepsis*. J Crit Care, 2011. 26(4): p. 435 e1-7.
148. Yipp, B.G. and P. Kubes, *NETosis: how vital is it?* Blood, 2013. 122(16): p. 2784-94.
149. Fuchs, T.A., U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky, *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. The Journal of Cell Biology, 2007. 176(2): p. 231-241.
150. Li, P., M. Li, M.R. Lindberg, M.J. Kennett, N. Xiong, and Y. Wang, *PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps*. The Journal of Experimental Medicine, 2010. 207(9): p. 1853-1862.
151. Clark, S.R., A.C. Ma, S.A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M.M. Kelly, K.D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G.D. Sinclair, E.M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. DeVinney, C.J. Doig, F.H.Y. Green, and P. Kubes, *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nature Medicine, 2007. 13: p. 463.
152. Pilsczek, F.H., D. Salina, K.K. Poon, C. Fahey, B.G. Yipp, C.D. Sibley, S.M. Robbins, F.H. Green, M.G. Surette, M. Sugai, M.G. Bowden, M. Hussain, K. Zhang, and P. Kubes, *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. 185(12): p. 7413-25.
153. Yipp, B.G., B. Petri, D. Salina, C.N. Jenne, B.N.V. Scott, L.D. Zbytnuik, K. Pittman, M. Asaduzzaman, K. Wu, H.C. Meijndert, S.E. Malawista, A. de Boisleury Chevance, K. Zhang, J. Conly, and P. Kubes, *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo*. Nature Medicine, 2012. 18: p. 1386.
154. Papayannopoulos, V. and A. Zychlinsky, *NETs: a new strategy for using old weapons*. Trends in Immunology, 2009. 30(11): p. 513-521.

155. Beiter, K., F. Wartha, B. Albiger, S. Normark, A. Zychlinsky, and B. Henriques-Normark, *An Endonuclease Allows Streptococcus pneumoniae to Escape from Neutrophil Extracellular Traps*. *Current Biology*, 2006. 16(4): p. 401-407.
156. Wartha, F., K. Beiter, B. Albiger, J. Fernebro, A. Zychlinsky, S. Normark, and B. Henriques-Normark, *Capsule and d-alanylated lipoteichoic acids protect Streptococcus pneumoniae against neutrophil extracellular traps*. *Cellular Microbiology*, 2007. 9(5): p. 1162-1171.
157. Fuchs, T.A., A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D.D. Myers, S.K. Wroblewski, T.W. Wakefield, J.H. Hartwig, and D.D. Wagner, *Extracellular DNA traps promote thrombosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010. 107(36): p. 15880-15885.
158. Weckbach, L.T., U. Grabmaier, A. Uhl, S. Gess, F. Boehm, A. Zehrer, R. Pick, M. Salvermoser, T. Czermak, J. Pircher, N. Sorrelle, M. Migliorini, D.K. Strickland, K. Klingel, V. Brinkmann, U. Abu Abed, U. Eriksson, S. Massberg, S. Brunner, and B. Walzog, *Midkine drives cardiac inflammation by promoting neutrophil trafficking and NETosis in myocarditis*. *J Exp Med*, 2019. 216(2): p. 350-368.
159. Nicolai, L., A. Leunig, S. Brambs, R. Kaiser, M. Joppich, M.L. Hoffknecht, C. Gold, A. Engel, V. Polewka, M. Muenchhoff, J.C. Hellmuth, A. Ruhle, S. Ledderose, T. Weinberger, H. Schulz, C. Scherer, M. Rudelius, M. Zoller, O.T. Keppler, B. Zwissler, M. von Bergwelt-Baildon, S. Kaab, R. Zimmer, R.D. Bulow, S. von Stillfried, P. Boor, S. Massberg, K. Pekayvaz, and K. Stark, *Vascular neutrophilic inflammation and immunothrombosis distinguish severe COVID-19 from influenza pneumonia*. *J Thromb Haemost*, 2021. 19(2): p. 574-581.
160. Nicolai, L., A. Leunig, S. Brambs, R. Kaiser, T. Weinberger, M. Weigand, M. Muenchhoff, J.C. Hellmuth, S. Ledderose, H. Schulz, C. Scherer, M. Rudelius, M. Zoller, D. Hochter, O. Keppler, D. Teupser, B. Zwissler, M. von Bergwelt-Baildon, S. Kaab, S. Massberg, K. Pekayvaz, and K. Stark, *Immunothrombotic Dysregulation in COVID-19 Pneumonia Is Associated With Respiratory Failure and Coagulopathy*. *Circulation*, 2020. 142(12): p. 1176-1189.
161. Weckbach, L.T., K.T. Preissner, and E. Deindl, *The Role of Midkine in Arteriogenesis, Involving Mechanosensing, Endothelial Cell Proliferation, and Vasodilation*. *Int J Mol Sci*, 2018. 19(9).
162. Kadomatsu, K., M. Tomomura, and T. Muramatsu, *cDNA cloning and sequencing of a new gene intensely expressed in early differentiation stages of embryonal carcinoma cells and in mid-gestation period of mouse embryogenesis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1988. 151(3): p. 1312-8.
163. Weckbach, L.T., T. Muramatsu, and B. Walzog, *Midkine in inflammation*. *Scientific-WorldJournal*, 2011. 11: p. 2491-505.
164. Kadomatsu, K., R.P. Huang, T. Sukanuma, F. Murata, and T. Muramatsu, *A retinoic acid responsive gene MK found in the teratocarcinoma system is expressed in spatially and temporally controlled manner during mouse embryogenesis*. *J Cell Biol*, 1990. 110(3): p. 607-16.
165. Shaheen, K.Y.A., A.I. Abdel-Mageed, E. Safwat, and A.M. AlBreedy, *The Value of Serum Midkine Level in Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma*. *International Journal of Hepatology*, 2015. 2015: p. 6.
166. Vu Van, D., U. Heberling, M.P. Wirth, and S. Fuessel, *Validation of the diagnostic utility of urinary midkine for the detection of bladder cancer*. *Oncology letters*, 2016. 12(5): p. 3143-3152.
167. Jia, Q., Z. Meng, K. Xu, X. He, J. Tan, G. Zhang, X. Li, N. Liu, T. Hu, P. Zhou, S. Wang, A. Upadhyaya, X. Liu, H. Wang, and C. Zhang, *Serum midkine as a surrogate biomarker for metastatic prediction in differentiated thyroid cancer patients with positive thyroglobulin antibody*. *Scientific Reports*, 2017. 7: p. 43516.
168. Zhang, L., X. Song, Y. Shao, C. Wu, and J. Jiang, *Prognostic value of Midkine expression in patients with solid tumors: a systematic review and meta-analysis*. *Oncotarget*, 2018. 9(37): p. 24821-24829.

169. Stoica, G.E., A. Kuo, C. Powers, E.T. Bowden, E.B. Sale, A.T. Riegel, and A. Wellstein, *Midkine binds to anaplastic lymphoma kinase (ALK) and acts as a growth factor for different cell types*. J Biol Chem, 2002. 277(39): p. 35990-8.
170. Choudhuri, R., H.-T. Zhang, S. Donnini, M. Ziche, and R. Bicknell, *An Angiogenic Role for the Neurokines Midkine and Pleiotrophin in Tumorigenesis*. Cancer Research, 1997. 57(9): p. 1814-1819.
171. Muramaki, M., H. Miyake, I. Hara, and S. Kamidono, *Introduction of Midkine Gene into Human Bladder Cancer Cells Enhances Their Malignant Phenotype But Increases Their Sensitivity to Antiangiogenic Therapy*. Clinical Cancer Research, 2003. 9(14): p. 5152-5160.
172. Krzystek-Korpacka, M., M. Mierzchala, K. Neubauer, G. Durek, and A. Gamian, *Midkine, A Multifunctional Cytokine, in Patients with Severe Sepsis and Septic Shock: A Pilot Study*. Shock, 2011. 35(5): p. 471-477.
173. Iwasaki, W., K. Nagata, H. Hatanaka, T. Inui, T. Kimura, T. Muramatsu, K. Yoshida, M. Tasumi, and F. Inagaki, *Solution structure of midkine, a new heparin-binding growth factor*. EMBO J, 1997. 16(23): p. 6936-46.
174. Kojima, T., A. Katsumi, T. Yamazaki, T. Muramatsu, T. Nagasaka, K. Ohsumi, and H. Saito, *Human Ryudocan from Endothelium-like Cells Binds Basic Fibroblast Growth Factor, Midkine, and Tissue Factor Pathway Inhibitor*. Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(10): p. 5914-5920.
175. Novotny, W.F., T. Maffi, R.L. Mehta, and P.G. Milner, *Identification of novel heparin-releasable proteins, as well as the cytokines midkine and pleiotrophin, in human postheparin plasma*. Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology, 1993. 13(12): p. 1798-1805.
176. Kojima, S., T. Inui, H. Muramatsu, Y. Suzuki, K. Kadomatsu, M. Yoshizawa, S. Hirose, T. Kimura, S. Sakakibara, and T. Muramatsu, *Dimerization of Midkine by Tissue Transglutaminase and Its Functional Implication*. Journal of Biological Chemistry, 1997. 272(14): p. 9410-9416.
177. Muramatsu, T., *Midkine and Pleiotrophin: Two Related Proteins Involved in Development, Survival, Inflammation and Tumorigenesis*. The Journal of Biochemistry, 2002. 132(3): p. 359-371.
178. Asai, T., K. Watanabe, K. Ichihara-Tanaka, N. Kaneda, S. Kojima, A. Iguchi, F. Inagaki, and T. Muramatsu, *Identification of heparin-binding sites in midkine and their role in neurite-promotion*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 236(1): p. 66-70.
179. Tsutsui, J.-i., K. Uehara, K. Kadomatsu, S. Matsubara, and T. Muramatsu, *A new family of heparin-binding factors: Strong conservation of midkine (MK) sequences between the human and the mouse*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991. 176(2): p. 792-797.
180. Muramatsu, T., *Structure and function of midkine as the basis of its pharmacological effects*. British Journal of Pharmacology, 2014. 171(4): p. 814-826.
181. Maeda, N., K. Ichihara-Tanaka, T. Kimura, K. Kadomatsu, T. Muramatsu, and M. Noda, *A receptor-like protein-tyrosine phosphatase PTPzeta/RPTPbeta binds a heparin-binding growth factor midkine. Involvement of arginine 78 of midkine in the high affinity binding to PTPzeta*. J Biol Chem, 1999. 274(18): p. 12474-9.
182. Sakaguchi, N., H. Muramatsu, K. Ichihara-Tanaka, N. Maeda, M. Noda, T. Yamamoto, M. Michikawa, S. Ikematsu, S. Sakuma, and T. Muramatsu, *Receptor-type protein tyrosine phosphatase  $\zeta$  as a component of the signaling receptor complex for midkine-dependent survival of embryonic neurons*. Neuroscience Research, 2003. 45(2): p. 219-224.
183. Qi, M., S. Ikematsu, N. Maeda, K. Ichihara-Tanaka, S. Sakuma, M. Noda, T. Muramatsu, and K. Kadomatsu, *Haptotactic Migration Induced by Midkine: Involvement of Protein-Tyrosine Phosphatase  $\zeta$ , Mitogen-Activated Protein Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase*. Journal of Biological Chemistry, 2001. 276(19): p. 15868-15875.
184. Muramatsu, H., K. Zou, N. Sakaguchi, S. Ikematsu, S. Sakuma, and T. Muramatsu, *LDL receptor-related protein as a component of the midkine receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 270(3): p. 936-41.

185. Weckbach, L.T., A. Gola, M. Winkelmann, S.M. Jakob, L. Groesser, J. Borgolte, F. Pogoda, R. Pick, M. Pruenster, J. Muller-Hocker, E. Deindl, M. Sperandio, and B. Walzog, *The cytokine midkine supports neutrophil trafficking during acute inflammation by promoting adhesion via beta2 integrins (CD11/CD18)*. *Blood*, 2014. 123(12): p. 1887-96.
186. Muramatsu, H., P. Zou, H. Suzuki, Y. Oda, G.Y. Chen, N. Sakaguchi, S. Sakuma, N. Maeda, M. Noda, Y. Takada, and T. Muramatsu, *alpha4beta1- and alpha6beta1-integrins are functional receptors for midkine, a heparin-binding growth factor*. *J Cell Sci*, 2004. 117(Pt 22): p. 5405-15.
187. Ueoka, C., N. Kaneda, I. Okazaki, S. Nadanaka, T. Muramatsu, and K. Sugahara, *Neuronal Cell Adhesion, Mediated by the Heparin-binding Neuroregulatory Factor Midkine, Is Specifically Inhibited by Chondroitin Sulfate E: Structural and Functional Implications of the Over-sulfated Chondroitin Sulfate*. *Journal of Biological Chemistry*, 2000. 275(48): p. 37407-37413.
188. Kurosawa, N., G.Y. Chen, K. Kadomatsu, S. Ikematsu, S. Sakuma, and T. Muramatsu, *Glypican-2 binds to midkine: the role of glypican-2 in neuronal cell adhesion and neurite outgrowth*. *Glycoconj J*, 2001. 18(6): p. 499-507.
189. Nakanishi, T., K. Kadomatsu, T. Okamoto, K. Ichihara-Tanaka, T. Kojima, H. Saito, Y. Tomoda, and T. Muramatsu, *Expression of Syndecan-1 and -3 during Embryogenesis of the Central Nervous System in Relation to Binding with Midkine*. *The Journal of Biochemistry*, 1997. 121(2): p. 197-205.
190. Gungor, C., H. Zander, K.E. Effenberger, Y.K. Vashist, T. Kalinina, J.R. Izbicki, E. Yekebas, and M. Bockhorn, *Notch signaling activated by replication stress-induced expression of midkine drives epithelial-mesenchymal transition and chemoresistance in pancreatic cancer*. *Cancer Res*, 2011. 71(14): p. 5009-19.
191. Kosugi, T., Y. Yuzawa, W. Sato, H. Arata-Kawai, N. Suzuki, N. Kato, S. Matsuo, and K. Kadomatsu, *Midkine is involved in tubulointerstitial inflammation associated with diabetic nephropathy*. *Laboratory Investigation*, 2007. 87: p. 903.
192. Kosugi, T., Y. Yuzawa, W. Sato, H. Kawai, S. Matsuo, Y. Takei, T. Muramatsu, and K. Kadomatsu, *Growth Factor Midkine Is Involved in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy*. *The American Journal of Pathology*, 2006. 168(1): p. 9-19.
193. Takada, T., K. Toriyama, H. Muramatsu, X.J. Song, S. Torii, and T. Muramatsu, *Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis*. *J Biochem*, 1997. 122(2): p. 453-8.
194. Terato, K., K.A. Hasty, R.A. Reife, M.A. Cremer, A.H. Kang, and J.M. Stuart, *Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen*. *The Journal of Immunology*, 1992. 148(7): p. 2103-2108.
195. Maruyama, K., H. Muramatsu, N. Ishiguro, and T. Muramatsu, *Midkine, a heparin-binding growth factor, is fundamentally involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. *Arthritis Rheum*, 2004. 50(5): p. 1420-9.
196. Krzystek-Korpacka, M., K. Neubauer, and M. Matusiewicz, *Circulating midkine in Crohn's disease: Clinical implications*. *Inflammatory Bowel Diseases*, 2010. 16(2): p. 208-215.
197. Liu, X., G.A. Mashour, H.D. Webster, and A. Kurtz, *Basic FGF and FGF receptor 1 are expressed in microglia during experimental autoimmune encephalomyelitis: Temporally distinct expression of midkine and pleiotrophen*. *Glia*, 1998. 24(4): p. 390-397.
198. Wang, J., H. Takeuchi, Y. Sonobe, S. Jin, T. Mizuno, S. Miyakawa, M. Fujiwara, Y. Nakamura, T. Kato, H. Muramatsu, T. Muramatsu, and A. Suzumura, *Inhibition of midkine alleviates experimental autoimmune encephalomyelitis through the expansion of regulatory T cell population*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008. 105(10): p. 3915-20.
199. Ross, R., *Atherosclerosis - An Inflammatory Disease*. *New England Journal of Medicine*, 1999. 340(2): p. 115-126.
200. Horiba, M., K. Kadomatsu, E. Nakamura, H. Muramatsu, S. Ikematsu, S. Sakuma, K. Hayashi, Y. Yuzawa, S. Matsuo, M. Kuzuya, T. Kaname, M. Hirai, H. Saito, and T. Muramatsu, *Neointima formation in a restenosis model is suppressed in midkine-deficient mice*. *J Clin Invest*, 2000. 105(4): p. 489-95.

201. Herz, J., U. Hamann, S. Rogne, O. Myklebost, H. Gausepohl, and K.K. Stanley, *Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor*. The EMBO Journal, 1988. 7(13): p. 4119-4127.
202. Lillis, A.P., L.B. Van Duyn, J.E. Murphy-Ullrich, and D.K. Strickland, *LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies*. Physiol Rev, 2008. 88(3): p. 887-918.
203. Beisiegel, U., W. Weber, G. Ihrke, J. Herz, and K.K. Stanley, *The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein*. Nature, 1989. 341(6238): p. 162-164.
204. Ashcom, J.D., S.E. Tiller, K. Dickerson, J.L. Cravens, W.S. Argraves, and D.K. Strickland, *The human alpha 2-macroglobulin receptor: identification of a 420-kD cell surface glycoprotein specific for the activated conformation of alpha 2-macroglobulin*. The Journal of Cell Biology, 1990. 110(4): p. 1041-1048.
205. Moestrup, S. and J. Gliemann, *Purification of the rat hepatic alpha 2-macroglobulin receptor as an approximately 440-kDa single chain protein*. Vol. 264. 1989. 15574-7.
206. Kristensen, T., S.K. Moestrup, J. Gliemann, L. Bendtsen, O. Sand, and L. Sottrup-Jensen, *Evidence that the newly cloned low-density-lipoprotein receptor related protein (LRP) is the alpha 2-macroglobulin receptor*. FEBS Letters, 1990. 276(1-2): p. 151-155.
207. Strickland, D.K., J.D. Ashcom, S. Williams, W.H. Burgess, M. Migliorini, and W.S. Argraves, *Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor*. Journal of Biological Chemistry, 1990. 265(29): p. 17401-4.
208. Herz, J. and D.K. Strickland, *LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor*. The Journal of Clinical Investigation, 2001. 108(6): p. 779-784.
209. Herz, J., R.C. Kowal, J.L. Goldstein, and M.S. Brown, *Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment*. The EMBO Journal, 1990. 9(6): p. 1769-1776.
210. Strickland, D.K., J.D. Ashcom, S. Williams, F. Battey, E. Behre, K. McTigue, J.F. Battey, and W.S. Argraves, *Primary structure of alpha 2-macroglobulin receptor-associated protein. Human homologue of a Heymann nephritis antigen*. Journal of Biological Chemistry, 1991. 266(20): p. 13364-13369.
211. Willnow, T.E., A. Rohlmann, J. Horton, H. Otani, J.R. Braun, R.E. Hammer, and J. Herz, *RAP, a specialized chaperone, prevents ligand-induced ER retention and degradation of LDL receptor-related endocytic receptors*. The EMBO journal, 1996. 15(11): p. 2632-2639.
212. Bu, G., H.J. Geuze, G.J. Strous, and A.L. Schwartz, *39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein*. The EMBO journal, 1995. 14(10): p. 2269-2280.
213. Rudenko, G., L. Henry, K. Henderson, K. Ichtchenko, M.S. Brown, J.L. Goldstein, and J. Deisenhofer, *Structure of the LDL Receptor Extracellular Domain at Endosomal pH*. Science, 2002. 298(5602): p. 2353-2358.
214. Lee, D., J.D. Walsh, I. Mikhailenko, P. Yu, M. Migliorini, Y. Wu, S. Krueger, J.E. Curtis, B. Harris, S. Lockett, S.C. Blacklow, D.K. Strickland, and Y.-X. Wang, *RAP Uses a Histidine Switch to Regulate Its Interaction with LRP in the ER and Golgi*. Molecular Cell, 2006. 22(3): p. 423-430.
215. Willnow, T.E., J.M. Moehring, N.M. Inocencio, T.J. Moehring, and J. Herz, *The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro*. The Biochemical journal, 1996. 313(Pt 1): p. 71-76.
216. Huang, W., K. Dolmer, and P.G.W. Gettins, *NMR Solution Structure of Complement-like Repeat CR8 from the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(20): p. 14130-14136.
217. Neels, J.G., B.M.M. van den Berg, A. Lookene, G. Olivecrona, H. Pannekoek, and A.-J. van Zonneveld, *The Second and Fourth Cluster of Class A Cysteine-rich Repeats of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Share Ligand-binding Properties*. Journal of Biological Chemistry, 1999. 274(44): p. 31305-31311.

218. Migliorini, M.M., E.H. Behre, S. Brew, K.C. Ingham, and D.K. Strickland, *Allosteric Modulation of Ligand Binding to Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein by the Receptor-associated Protein Requires Critical Lysine Residues within Its Carboxyl-terminal Domain*. Journal of Biological Chemistry, 2003. 278(20): p. 17986-17992.
219. Nielsen, K.L., T.L. Holtet, M. Etzerodt, S.K. Moestrup, J. Gliemann, L. Sottrup-Jensen, and H.C. Thøgersen, *Identification of Residues in  $\alpha$ -Macroglobulins Important for Binding to the  $\alpha$ 2-Macroglobulin Receptor/Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*. Journal of Biological Chemistry, 1996. 271(22): p. 12909-12912.
220. Springer, T.A., *An extracellular  $\beta$ -propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components*. Journal of Molecular Biology, 1998. 283(4): p. 837-862.
221. Li, Y., M. Paz Marzolo, P. van Kerkhof, G.J. Strous, and G. Bu, *The YXXL Motif, but Not the Two NPXY Motifs, Serves as the Dominant Endocytosis Signal for Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(22): p. 17187-17194.
222. Reekmans, S.M., T. Pflanzner, P.L.S.M. Gordts, S. Isbert, P. Zimmermann, W. Annaert, S. Weggen, A.J.M. Roebroek, and C.U. Pietrzik, *Inactivation of the proximal NPXY motif impairs early steps in LRP1 biosynthesis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010. 67(1): p. 135-145.
223. Van Gool, B., S. Dedieu, H. Emonard, and A.J.M. Roebroek, *The Matricellular Receptor LRP1 Forms an Interface for Signaling and Endocytosis in Modulation of the Extracellular Tumor Environment*. Frontiers in Pharmacology, 2015. 6(271).
224. Rabiej, V.K., T. Pflanzner, T. Wagner, K. Goetze, S.E. Storck, J.A. Eble, S. Weggen, W. Mueller-Klieser, and C.U. Pietrzik, *Low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediated endocytosis of beta1-integrin influences cell adhesion and cell migration*. Exp Cell Res, 2016. 340(1): p. 102-15.
225. van Kerkhof, P., J. Lee, L. McCormick, E. Tetrault, W. Lu, M. Schoenfish, V. Oorschot, G.J. Strous, J. Klumperman, and G. Bu, *Sorting nexin 17 facilitates LRP recycling in the early endosome*. EMBO J, 2005. 24(16): p. 2851-61.
226. Worby, C.A. and J.E. Dixon, *Sorting out the cellular functions of sorting nexins*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002. 3(12): p. 919-931.
227. Burden, J.J., X.-M. Sun, A.B.G. García, and A.K. Soutar, *Sorting Motifs in the Intracellular Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor Interact with a Novel Domain of Sorting Nexin-17*. Journal of Biological Chemistry, 2004. 279(16): p. 16237-16245.
228. Farfan, P., J. Lee, J. Larios, P. Sotelo, G. Bu, and M.P. Marzolo, *A sorting nexin 17-binding domain within the LRP1 cytoplasmic tail mediates receptor recycling through the basolateral sorting endosome*. Traffic, 2013. 14(7): p. 823-38.
229. Gotthardt, M., M. Trommsdorff, M.F. Nevitt, J. Shelton, J.A. Richardson, W. Stockinger, J. Nimpf, and J. Herz, *Interactions of the Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family with Cytosolic Adaptor and Scaffold Proteins Suggest Diverse Biological Functions in Cellular Communication and Signal Transduction*. Journal of Biological Chemistry, 2000. 275(33): p. 25616-25624.
230. Klug, W., A. Dietl, B. Simon, I. Sinning, and K. Wild, *Phosphorylation of LRP1 regulates the interaction with Fe65*. FEBS Letters, 2011. 585(20): p. 3229-3235.
231. Trommsdorff, M., M. Gotthardt, T. Hiesberger, J. Shelton, W. Stockinger, J. Nimpf, R.E. Hammer, J.A. Richardson, and J. Herz, *Reeler/Disabled-like Disruption of Neuronal Migration in Knockout Mice Lacking the VLDL Receptor and ApoE Receptor 2*. Cell, 1999. 97(6): p. 689-701.
232. Guttman, M., G.N. Betts, H. Barnes, M. Ghassemian, P. van der Geer, and E.A. Komives, *Interactions of the NPXY microdomains of the low density lipoprotein receptor-related protein 1*. PROTEOMICS, 2009. 9(22): p. 5016-5028.
233. Wygrecka, M., J. Wilhelm, E. Jablonska, D. Zakrzewicz, K.T. Preissner, W. Seeger, A. Guenther, and P. Markart, *Shedding of Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein-1 in Acute Respiratory Distress Syndrome*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2011. 184(4): p. 438-448.

234. Potere, N., M.G. Del Buono, A.G. Mauro, A. Abbate, and S. Toldo, *Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 in Cardiac Inflammation and Infarct Healing*. *Front Cardiovasc Med*, 2019. 6: p. 51.
235. Herz, J., D.E. Couthier, and R.E. Hammer, *Correction: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation*. *Cell*, 1993. 73(3): p. 428.
236. Nakajima, C., P. Haffner, S.M. Goerke, K. Zurhove, G. Adelman, M. Frotscher, J. Herz, H.H. Bock, and P. May, *The lipoprotein receptor LRP1 modulates sphingosine-1-phosphate signaling and is essential for vascular development*. *Development*, 2014. 141(23): p. 4513-25.
237. Auderset, L., L. Landowski, L. Foa, and K. Young, *Low Density Lipoprotein Receptor Related Proteins as Regulators of Neural Stem and Progenitor Cell Function*. Vol. 2016. 2016. 1-16.
238. Saenko, E.L., A.V. Yakhyayev, I. Mikhailenko, D.K. Strickland, and A.G. Sarafanov, *Role of the Low Density Lipoprotein-related Protein Receptor in Mediation of Factor VIII Catabolism*. *Journal of Biological Chemistry*, 1999. 274(53): p. 37685-37692.
239. Mahley, R.W. and Y. Huang, *Atherogenic remnant lipoproteins: role for proteoglycans in trapping, transferring, and internalizing*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2007. 117(1): p. 94-98.
240. Willnow, T., Z. Sheng, S. Ishibashi, and J. Herz, *Inhibition of hepatic chylomicron remnant uptake by gene transfer of a receptor antagonist*. *Science*, 1994. 264(5164): p. 1471-1474.
241. Emonard, H., L. Théret, A.H. Bennisroune, and S. Dedieu, *Regulation of LRP-1 expression: Make the point*. *Pathologie Biologie*, 2014. 62(2): p. 84-90.
242. Pietrzik, C.U., I.-S. Yoon, S. Jaeger, T. Busse, S. Weggen, and E.H. Koo, *FE65 Constitutes the Functional Link between the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and the Amyloid Precursor Protein*. *The Journal of Neuroscience*, 2004. 24(17): p. 4259-4265.
243. Pietrzik, C.U., T. Busse, D.E. Merriam, S. Weggen, and E.H. Koo, *The cytoplasmic domain of the LDL receptor-related protein regulates multiple steps in APP processing*. *The EMBO Journal*, 2002. 21(21): p. 5691-5700.
244. Zerbinatti, C.V., D.F. Wozniak, J. Cirrito, J.A. Cam, H. Osaka, K.R. Bales, M. Zhuo, S.M. Paul, D.M. Holtzman, and G. Bu, *Increased soluble amyloid- $\beta$  peptide and memory deficits in amyloid model mice overexpressing the low-density lipoprotein receptor-related protein*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004. 101(4): p. 1075-1080.
245. Selkoe, D.J., *Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease*. *Nature*, 1999. 399(6738): p. A23-A31.
246. Tanzi, R., J. Gusella, P. Watkins, G. Bruns, P. St George-Hyslop, M. Van Keuren, D. Patterson, S. Pagan, D. Kurnit, and R. Neve, *Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus*. *Science*, 1987. 235(4791): p. 880-884.
247. Selvais, C., L. D'Auria, D. Tyteca, G. Perrot, P. Lemoine, L. Troeberg, S. Dedieu, A. Noël, H. Nagase, P. Henriët, P.J. Courtoy, E. Marbaix, and H. Emonard, *Cell cholesterol modulates metalloproteinase-dependent shedding of low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) and clearance function*. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2011. 25(8): p. 2770-2781.
248. von Arnim, C.A.F., A. Kinoshita, I.D. Peltan, M.M. Tangredi, L. Herl, B.M. Lee, R. Spoelgen, T.T. Hshieh, S. Ranganathan, F.D. Battey, C.-X. Liu, B.J. Bacsikai, S. Sever, M.C. Irizarry, D.K. Strickland, and B.T. Hyman, *The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) Is a Novel  $\beta$ -Secretase (BACE1) Substrate*. *Journal of Biological Chemistry*, 2005. 280(18): p. 17777-17785.
249. Quinn, K.A., P.G. Grimsley, Y.-P. Dai, M. Tapner, C.N. Chesterman, and D.A. Owensby, *Soluble Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP) Circulates in Human Plasma*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. 272(38): p. 23946-23951.

250. Quinn, K.A., V.J. Pye, Y.-P. Dai, C.N. Chesterman, and D.A. Owensby, *Characterization of the Soluble Form of the Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP)*. *Experimental Cell Research*, 1999. 251(2): p. 433-441.
251. Liu, Q., J. Zhang, H. Tran, M.M. Verbeek, K. Reiss, S. Estus, and G. Bu, *LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17*. *Molecular Neurodegeneration*, 2009. 4(1): p. 17.
252. Gaultier, A., S. Arandjelovic, X. Li, J. Janes, N. Dragojlovic, G.P. Zhou, J. Dolkas, R.R. Myers, S.L. Gonias, and W.M. Campana, *A shed form of LDL receptor-related protein-1 regulates peripheral nerve injury and neuropathic pain in rodents*. *The Journal of Clinical Investigation*, 2008. 118(1): p. 161-172.
253. Gorovoy, M., A. Gaultier, W.M. Campana, G.S. Firestein, and S.L. Gonias, *Inflammatory mediators promote production of shed LRP1/CD91, which regulates cell signaling and cytokine expression by macrophages*. *J Leukoc Biol*, 2010. 88(4): p. 769-78.
254. Selvais, C., H.I.s.P. Gaide Chevronnay, P. Lemoine, S.p. Dedieu, P. Henriet, P.J. Courtoy, E. Marbaix, and H. Emonard, *Metalloproteinase-Dependent Shedding of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Ectodomain Decreases Endocytic Clearance of Endometrial Matrix Metalloproteinase-2 and -9 at Menstruation*. *Endocrinology*, 2009. 150(8): p. 3792-3799.
255. May, P., Y.K. Reddy, and J. Herz, *Proteolytic Processing of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Mediates Regulated Release of Its Intracellular Domain*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(21): p. 18736-18743.
256. Mao, H., L. Xie, and X. Pi, *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1 Signaling in Angiogenesis*. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2017. 4(34).
257. Zurhove, K., C. Nakajima, J. Herz, H.H. Bock, and P. May, *Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1*. *Sci Signal*, 2008. 1(47): p. ra15.
258. Polavarapu, R., J. An, C. Zhang, and M. Yepes, *Regulated Intramembrane Proteolysis of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Mediates Ischemic Cell Death*. *The American Journal of Pathology*, 2008. 172(5): p. 1355-1362.
259. Boucher, P., P. Liu, M. Gotthardt, T. Hiesberger, R.G.W. Anderson, and J. Herz, *Platelet-derived Growth Factor Mediates Tyrosine Phosphorylation of the Cytoplasmic Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein in Caveolae*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(18): p. 15507-15513.
260. Loukinova, E., S. Ranganathan, S. Kuznetsov, N. Gorlatova, M.M. Migliorini, D. Loukinov, P.G. Ulery, I. Mikhailenko, D.A. Lawrence, and D.K. Strickland, *Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-induced Tyrosine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP): Evidence for Integrated Co-Receptor Function Between LRP and the PDGF*. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(18): p. 15499-15506.
261. Shi, Y., E. Mantuano, G. Inoue, W.M. Campana, and S.L. Gonias, *Ligand Binding to LRP1 Transactivates Trk Receptors by a Src Family Kinase-Dependent Pathway*. *Science Signaling*, 2009. 2(68): p. ra18-ra18.
262. Woldt, E., R.L. Matz, J. Terrand, M. Mlih, C. Gracia, S. Foppolo, S. Martin, V. Bruban, J. Ji, E. Velot, J. Herz, and P. Boucher, *Differential Signaling by Adaptor Molecules LRP1 and ShcA Regulates Adipogenesis by the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor*. *Journal of Biological Chemistry*, 2011. 286(19): p. 16775-16782.
263. Betsholtz, C., P. Lindblom, M. Bjarnegard, M. Enge, H. Gerhardt, and P. Lindahl, *Role of platelet-derived growth factor in mesangium development and vasculopathies: lessons from platelet-derived growth factor and platelet-derived growth factor receptor mutations in mice*. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 2004. 13(1): p. 45-52.
264. Lindahl, P., B.R. Johansson, P. Levéen, and C. Betsholtz, *Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice*. *Science*, 1997. 277(5323): p. 242-245.
265. Pompili, V.J., D. Gordon, H. San, Z. Yang, D.W.M. Muller, G.J. Nabel, and E.G. Nabel, *Expression and Function of a Recombinant PDGF B Gene in Porcine Arteries*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1995. 15(12): p. 2254-2264.

266. Lillis, A.P., I. Mikhailenko, and D.K. Strickland, *Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability*. J Thromb Haemost, 2005. 3(8): p. 1884-93.
267. Boucher, P., M. Gotthardt, W.P. Li, R.G. Anderson, and J. Herz, *LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis*. Science, 2003. 300(5617): p. 329-32.
268. Czekay, R.-P., K. Aertgeerts, S.A. Curriden, and D.J. Loskutoff, *Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins*. The Journal of cell biology, 2003. 160(5): p. 781-791.
269. Bornstein, P., *Matricellular proteins: an overview*. Journal of cell communication and signaling, 2009. 3(3-4): p. 163-165.
270. Orr, A.W., C.E. Pedraza, M.A. Pallero, C.A. Elzie, S. Goicoechea, D.K. Strickland, and J.E. Murphy-Ullrich, *Low density lipoprotein receptor-related protein is a calreticulin co-receptor that signals focal adhesion disassembly*. The Journal of cell biology, 2003. 161(6): p. 1179-1189.
271. Orr, A.W., C.A. Elzie, D.F. Kucik, and J.E. Murphy-Ullrich, *Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration*. J Cell Sci, 2003. 116(Pt 14): p. 2917-27.
272. Salicioni, A.M., A. Gaultier, C. Brownlee, M.K. Cheezum, and S.L. Gonias, *Low density lipoprotein receptor-related protein-1 promotes beta1 integrin maturation and transport to the cell surface*. J Biol Chem, 2004. 279(11): p. 10005-12.
273. Bres, E.E. and A. Faissner, *Low Density Receptor-Related Protein 1 Interactions With the Extracellular Matrix: More Than Meets the Eye*. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2019. 7(31).
274. Spijkers, P.P., P. da Costa Martins, E. Westein, C.G. Gahmberg, J.J. Zwaginga, and P.J. Lenting, *LDL-receptor-related protein regulates beta2-integrin-mediated leukocyte adhesion*. Blood, 2005. 105(1): p. 170-7.
275. Cao, C., D.A. Lawrence, Y. Li, C.A. Von Arnim, J. Herz, E.J. Su, A. Makarova, B.T. Hyman, D.K. Strickland, and L. Zhang, *Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration*. EMBO J, 2006. 25(9): p. 1860-70.
276. Ranganathan, S., C. Cao, J. Catania, M. Migliorini, L. Zhang, and D.K. Strickland, *Molecular basis for the interaction of low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) with integrin alphaMbeta2: identification of binding sites within alphaMbeta2 for LRP1*. J Biol Chem, 2011. 286(35): p. 30535-41.
277. Herter, J.M. and T.N. Mayadas, *Midkine, a middle manager of beta2 integrins*. Blood, 2014. 123(12): p. 1777-9.
278. Rohlmann, A., M. Gotthardt, T.E. Willnow, R.E. Hammer, and J. Herz, *Sustained somatic gene inactivation by viral transfer of Cre recombinase*. Nat Biotechnol, 1996. 14(11): p. 1562-5.
279. Clausen, B.E., C. Burkhardt, W. Reith, R. Renkawitz, and I. Forster, *Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice*. Transgenic Res, 1999. 8(4): p. 265-77.
280. de Boer, J., A. Williams, G. Skavdis, N. Harker, M. Coles, M. Tolaini, T. Norton, K. Williams, K. Roderick, A.J. Potocnik, and D. Kioussis, *Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre*. Eur J Immunol, 2003. 33(2): p. 314-25.
281. Roebroek, A.J., S. Reekmans, A. Lauwers, N. Feyaerts, L. Smeijers, and D. Hartmann, *Mutant Lrp1 knock-in mice generated by recombinase-mediated cassette exchange reveal differential importance of the NPXY motifs in the intracellular domain of LRP1 for normal fetal development*. Mol Cell Biol, 2006. 26(2): p. 605-16.
282. Schymeinsky, J., A. Sindrilaru, D. Frommhold, M. Sperandio, R. Gerstl, C. Then, A. Mocsai, K. Scharffetter-Kochanek, and B. Walzog, *The Vav binding site of the non-receptor tyrosine kinase Syk at Tyr 348 is critical for beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated neutrophil migration*. Blood, 2006. 108(12): p. 3919-27.
283. Willeke, T., S. Behrens, K. Scharffetter-Kochanek, P. Gaetgens, and B. Walzog, *Beta2 integrin (CD11/CD18)-mediated signaling involves tyrosine phosphorylation of c-Cbl in human neutrophils*. J Leukoc Biol, 2000. 68(2): p. 284-92.

284. Shimshek, D.R., J. Kim, M.R. Hubner, D.J. Spergel, F. Buchholz, E. Casanova, A.F. Stewart, P.H. Seeburg, and R. Sprengel, *Codon-improved Cre recombinase (iCre) expression in the mouse*. *Genesis*, 2002. 32(1): p. 19-26.
285. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. 227(5259): p. 680-5.
286. Zehrer, A., R. Pick, M. Salvermoser, A. Boda, M. Miller, K. Stark, L.T. Weckbach, B. Walzog, and D. Begandt, *A Fundamental Role of Myh9 for Neutrophil Migration in Innate Immunity*. *J Immunol*, 2018. 201(6): p. 1748-1764.
287. Wang, G.G., K.R. Calvo, M.P. Pasillas, D.B. Sykes, H. Hacker, and M.P. Kamps, *Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8*. *Nat Methods*, 2006. 3(4): p. 287-93.
288. Redecke, V., R. Wu, J. Zhou, D. Finkelstein, V. Chaturvedi, A.A. High, and H. Hacker, *Hematopoietic progenitor cell lines with myeloid and lymphoid potential*. *Nat Methods*, 2013. 10(8): p. 795-803.
289. Liebermann, D.A. and B. Hoffman, *Myeloid progenitors on demand*. *Nat Methods*, 2006. 3(4): p. 248-9.
290. Ran, F.A., P.D. Hsu, J. Wright, V. Agarwala, D.A. Scott, and F. Zhang, *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. *Nat Protoc*, 2013. 8(11): p. 2281-308.
291. Shalem, O., N.E. Sanjana, E. Hartenian, X. Shi, D.A. Scott, T.S. Mikkelsen, D. Heckl, B.L. Ebert, D.E. Root, J.G. Doench, and F. Zhang, *Genome-Scale CRISPR-Cas9 Knockout Screening in Human Cells*. *Science*, 2014. 343(6166): p. 84-87.
292. Sack, U., A. Tarnok, and G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie; 163 Tabellen*. 2006: Karger.
293. Jakob, S.M., R. Pick, D. Brechtefeld, C. Nussbaum, F. Kiefer, M. Sperandio, and B. Walzog, *Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response*. *Blood*, 2013. 121(20): p. 4184-94.
294. Cox, G., *Optical Imaging Techniques in Cell Biology*. 2012: Crc Press Inc.
295. Hell, S.W., *Microscopy and its focal switch*. *Nat Methods*, 2009. 6(1): p. 24-32.
296. Sperandio, M., J. Pickard, S. Unnikrishnan, S.T. Acton, and K. Ley, *Analysis of leukocyte rolling in vivo and in vitro*. *Methods Enzymol*, 2006. 416: p. 346-71.
297. Ganz, T., V. Gabayan, H.I. Liao, L. Liu, A. Oren, T. Graf, and A.M. Cole, *Increased inflammation in lysozyme M-deficient mice in response to Micrococcus luteus and its peptidoglycan*. *Blood*, 2003. 101(6): p. 2388-92.
298. Moestrup, S.K., J. Gliemann, and G. Pallesen, *Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues*. *Cell Tissue Res*, 1992. 269(3): p. 375-82.
299. Strickland, D.K., M.Z. Kounnas, and W.S. Argraves, *LDL receptor-related protein: a multiligand receptor for lipoprotein and proteinase catabolism*. *FASEB J*, 1995. 9(10): p. 890-8.
300. Ding, Z.M., J.E. Babensee, S.I. Simon, H. Lu, J.L. Perrard, D.C. Bullard, X.Y. Dai, S.K. Bromley, M.L. Dustin, M.L. Entman, C.W. Smith, and C.M. Ballantyne, *Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration*. *J Immunol*, 1999. 163(9): p. 5029-38.
301. Ye, M., H. Iwasaki, C.V. Laiosa, M. Stadtfeld, H. Xie, S. Heck, B. Clausen, K. Akashi, and T. Graf, *Hematopoietic Stem Cells Expressing the Myeloid Lysozyme Gene Retain Long-Term, Multilineage Repopulation Potential*. *Immunity*, 2003. 19(5): p. 689-699.
302. Faust, N., F. Varas, L.M. Kelly, S. Heck, and T. Graf, *Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages*. *Blood*, 2000. 96(2): p. 719-726.
303. Georgiades, P., S. Ogilvy, H. Duval, D.R. Licence, D.S. Charnock-Jones, S.K. Smith, and C.G. Print, *VavCre transgenic mice: a tool for mutagenesis in hematopoietic and endothelial lineages*. *Genesis*, 2002. 34(4): p. 251-6.
304. Moestrup, S.K., K. Kalltoft, C.M. Petersen, S. Pedersen, J. Gliemann, and E.I. Christensen, *Immunocytochemical identification of the human  $\alpha$ 2-macroglobulin receptor in*

- monocytes and fibroblasts: Monoclonal antibodies define the receptor as a monocyte differentiation antigen.* Experimental Cell Research, 1990. 190(2): p. 195-203.
305. Overton, C.D., P.G. Yancey, A.S. Major, M.F. Linton, and S. Fazio, *Deletion of macrophage LDL receptor-related protein increases atherogenesis in the mouse.* Circ Res, 2007. 100(5): p. 670-7.
  306. Jardí, M., J. Inglés-Esteve, M. Burgal, C. Azqueta, F. Velasco, C. López-Pedreira, L.A. Miles, and J. Félez, *Distinct patterns of urokinase receptor (uPAR) expression by leukemic cells and peripheral blood cells.* Thromb Haemost, 1996. 76(6): p. 1009-19.
  307. Liberale, L., M. Bertolotto, S. Minetti, P. Contini, D. Verzola, P. Ameri, G. Ghigliotti, A. Pende, G.G. Camici, F. Carbone, and F. Montecucco, *Recombinant Tissue Plasminogen Activator (r-tPA) Induces In-Vitro Human Neutrophil Migration via Low Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 (LRP-1).* International Journal of Molecular Sciences, 2020. 21(19): p. 7014.
  308. Weckbach, L.T., L. Groesser, J. Borgolte, J.I. Pagel, F. Pogoda, J. Schymeinsky, J. Muller-Hocker, M. Shakibaei, T. Muramatsu, E. Deindl, and B. Walzog, *Midkine acts as proangiogenic cytokine in hypoxia-induced angiogenesis.* Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2012. 303(4): p. H429-38.
  309. Long, D.S., M.L. Smith, A.R. Pries, K. Ley, and E.R. Damiano, *Microviscometry reveals reduced blood viscosity and altered shear rate and shear stress profiles in microvessels after hemodilution.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. 101(27): p. 10060-10065.
  310. Hynes, R.O., *Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.* Cell, 1992. 69(1): p. 11-25.
  311. Staunton, D.E., M.L. Dustin, H.P. Erickson, and T.A. Springer, *The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus.* Cell, 1990. 61(2): p. 243-54.
  312. Davis, G.E., *The Mac-1 and p150,95  $\beta$ 2 integrins bind denatured proteins to mediate leukocyte cell-substrate adhesion.* Experimental Cell Research, 1992. 200(2): p. 242-252.
  313. Zhou, X., X.P. Gao, J. Fan, Q. Liu, K.N. Anwar, R.S. Frey, and A.B. Malik, *LPS activation of Toll-like receptor 4 signals CD11b/CD18 expression in neutrophils.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. 288(4): p. L655-62.
  314. Wujak, L., R.T. Böttcher, O. Pak, H. Frey, E. El Agha, Y. Chen, S. Schmitt, S. Bellusci, L. Schaefer, N. Weissmann, R. Fässler, and M. Wygrecka, *Low density lipoprotein receptor-related protein 1 couples  $\beta$ 1 integrin activation to degradation.* Cellular and Molecular Life Sciences, 2017. 75(9): p. 1671-1685.
  315. Böttcher, R.T., C. Stremmel, A. Meves, H. Meyer, M. Widmaier, H.Y. Tseng, and R. Fässler, *Sorting nexin 17 prevents lysosomal degradation of beta1 integrins by binding to the beta1-integrin tail.* Nat Cell Biol, 2012. 14(6): p. 584-92.
  316. Moser, M., M. Bauer, S. Schmid, R. Ruppert, S. Schmidt, M. Sixt, H.-V. Wang, M. Spreandio, and R. Fässler, *Kindlin-3 is required for  $\beta$ 2 integrin-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells.* Nature Medicine, 2009. 15: p. 300.
  317. Muramatsu, T. and K. Kadomatsu, *Midkine: an emerging target of drug development for treatment of multiple diseases.* British Journal of Pharmacology, 2014. 171(4): p. 811-813.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

ApoE	Apolipoprotein E
APP	<i>Beta-amyloid Precursor Protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrom</i>
bp	<i>Base pairs</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CLS	<i>Confocal Laser Scanning</i>
CR	<i>Cysteine-rich Complement-type Repeats</i>
CRISPR/Cas9	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR-associated Protein 9</i>
CSD	<i>Confocal Spinning Disc</i>
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) Ligand</i>
Dab1	<i>Disabled-1</i>
DAMPs	<i>Damage-associated Molecular Patterns</i>
DC	Dendritische Zellen
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSB	Doppelstrangbruch
EAE	Enzephalomyelitis
EAM	<i>Experimental Autoimmune Myocarditis</i>
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fetales Kälberserum
FLT3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
fMLP	N-formyl-L-Methionyl-L-Leucyl-Phenylalanin
G-CSF	<i>Granulocyte-colony Stimulating Factor</i>
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
h	Human
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDR	<i>Homology Directed Repair</i>
HEC	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
ICAM	<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
ICD	Intrazytoplasmatische Domäne
iCre	Improved-Cre
IL8	Interleukin-8
iMK	Immobilisiertes MK
LAD	Leukozyten-Adhäsions-Defekt
LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein</i>
LRPAP	<i>Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein-associated Protein</i>
m	Murin
Mac-1	<i>Macrophage-1 Antigen</i>
MACS	<i>Magnetic-activated Cell Sorting</i>

MEF	Murine embryonale Fibroblasten
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MIDAS	<i>Metal Ion-Dependent Adhesion Site</i>
min	Minuten
MK	Midkine
MMP	Matrix-Metalloproteasen
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
MPO	Myeloperoxidase
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NHEJ	<i>Non-homologous End-joining</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated Molecular Patterns</i>
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PDGFR $\beta$	<i>Platelet-derived Growth Factor Receptor <math>\beta</math></i>
PECAM-1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PSGL-1	<i>P-Selectin Glycoprotein Ligand 1</i>
PTN	Pleiotrophin
r	Rekombinant
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPTP $\beta$ /PTP $\zeta$	<i>Receptor-like Protein Tyrosine Phosphatase <math>\beta</math>/Protein Tyrosine Phosphatase <math>\zeta</math></i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	<i>Soluble</i>
SCF	Stem Cell Factor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard Error of Mean</i>
sgRNA	Single-guide RNA
SMC	<i>Smooth Muscle Cells</i>
Snx17	<i>Sorting Nexin 17</i>
STED	<i>Stimulated Emission Depletion</i>
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
tPA/PAI-1	<i>Tissue Plasminogen Activator/Plasminogen Activator Inhibitor-1</i>
Tris	Trizma Base
TSP	Thrombospondin
uPA	<i>Urokinase Plasminogen Activator</i>
VE-Cadherin	<i>Vascular Endothelial-Cadherin</i>
WT	Wildtyp

## 7.2 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt zuerst Frau Prof. Dr. Barbara Walzog für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Sie hat mir das Thema anvertraut und durch Ihre kontinuierliche Unterstützung und Ihren Rat die Durchführung der Promotion ermöglicht. Ihre herausragende Expertise hat mich eine wissenschaftliche Arbeitsweise gelehrt, welche die Grundlage meiner klinischen Tätigkeit bildet.

Zudem möchte ich den Mitgliedern des *Thesis Advisory Committee*, Herrn Prof. Dr. Steffen Massberg und Herrn Prof. Dr. Markus Sperandio für die konstruktiven Diskussionen und Impulse danken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Ludwig Weckbach für die exzellente Betreuung und Motivation in allen Phasen dieser Dissertation.

Weiterhin danke ich dem SFB914 für die finanzielle Unterstützung sowie die hervorragenden Rahmenbedingungen für die wissenschaftliche Ausbildung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl und Herrn Prof. Dr. Markus Sperandio für die Unterstützung am Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie.

Allen Mitgliedern der AG Walzog sei für die Zusammenarbeit während der experimentellen Arbeiten herzlich gedankt, vor allem Dr. Robert Pick, Dr. Annette Zehrer, Dr. Melanie Salvermoser, Severin Gylstorff, Tanja Vlaovic und Judith Arcifa. Besonders danke ich Herrn Dr. Robert Pick für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der CSD-, STED- und CLS-Mikroskopie, Frau Dr. Annette Zehrer für die Generierung der Hoxb8-SCF- und Hoxb8-FL-Zellen und Frau Dr. Melanie Salvermoser für ihre Expertise bei der Generierung von LRP1-defizienten Hoxb8-FL-Zellen mittels CRISPR/Cas9.

Dem ehemaligen Leiter des Förderprogrammes für Forschung und Lehre (FöFoLe) Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann möchte ich für die finanzielle Unterstützung und wissenschaftliche Ausbildung im Rahmen des Promotionsstudiums „Molekulare und klinisch-translationale Medizin“ der medizinischen Fakultät der LMU danken.

Diese Arbeit wäre ohne meine Familie nicht möglich gewesen, welche mir das Studium und die Promotion ermöglicht und mich immer auf meinem Lebensweg unterstützt hat. Deswegen gilt meinen Eltern ein besonderer Dank. Zuletzt danke ich von Herzen meiner Ehefrau Barbara Geß für die Unterstützung.

### 7.3 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits im *Journal of Experimental Medicine* veröffentlicht:

Weckbach L.T., U. Grabmaier, A. Uhl, **S. Gess**, F. Boehm, A. Zehrer, R. Pick, M. Salvermoser, T. Czermak, J. Pircher, N. Sorrelle, M. Migliorini, D.K. Strickland, K. Klingel, V. Brinkmann, U. Abu Abed, U. Eriksson, S. Massberg, S. Brunner and B. Walzog, *Midkine drives cardiac inflammation by promoting neutrophil trafficking and NETosis in myocarditis*. J Exp Med, 2019. 216(2): p. 350-368.

## 7.4 Eidesstattliche Versicherung

Geß, Sebastian

---

Name, Vorname

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

**Die funktionelle Bedeutung von LRP1 für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Rahmen der akuten Entzündungsreaktion**

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

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

München, 5.12.2023

---

Ort, Datum

Sebastian Geß

---

Unterschrift Doktorand