

Aus dem
Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Christian Wahl-Schott

**Molekulare Mechanismen der Bildung und Funktion
von neutrophilen Granulozyten**



Kumulative Habilitationsschrift

Zum Erlangen der Lehrbefugnis (venia legendi)
für das Fach Physiologie
vorgelegt von

Dr. rer. nat. Daniela Maier-Begandt

(2026)

Fachmentorat

Prof. Dr. med. Christian Wahl-Schott

Prof. Dr. rer. nat. Barbara Walzog

Prof. Dr. med. Christoph Reichel

Inhaltsverzeichnis

1	Vorwort.....	3
2	Verzeichnis der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen	4
3	Einleitung	5
4	Ergebnisse und Diskussion.....	10
4.1	Die Rolle von VPS18 für die Reifung neutrophiler Granulozyten	10
4.2	Molekulare Regulatoren der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während der akuten Entzündungsreaktion	21
4.3	Der funktionelle Einfluss von CD18 auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Zebrafischlarven	27
5	Zusammenfassung und Ausblick	32
6	Literaturverzeichnis	36
7	Abkürzungsverzeichnis	44
8	Danksagung	46
9	Schriftenverzeichnis	47
9.1	Originalarbeiten als Erst-, oder Letztauthorin	47
9.2	Originalarbeiten als Ko-Autorin.....	48
9.3	Kasuistiken/Case Reports	49
9.4	Übersichtsartike/Reviews	49
9.5	Buchkapitel/Book Chapters	50
9.6	Sonstige Veröffentlichungen.....	50

1 Vorwort

Im Rahmen dieser kumulativen Habilitation habe ich molekulare Mechanismen untersucht, die die Generierung sowie Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten regulieren. Ebenso konnte ich nachweisen, dass die für die Rekrutierung essentiellen Moleküle nicht nur in Menschen und Mäusen, sondern auch im Modelltier Zebrafisch eine große Bedeutung haben.

Die experimentellen Analysen wurden am Institut für Kardiovaskuläre Physiologie und Pathophysiologie (Direktor Prof. Dr. med. Christian Wahl-Schott) an der LMU München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Barbara Walzog durchgeführt.

2 Verzeichnis der in der Habilitationsschrift zusammengefassten Publikationen

Gao J, Bader A, Linder MI, Cheng J, Richter M, Zehrer A, Mitt K, Popper B, Meissner F, Tatematsu M, Rohlfs M, Frenz-Wiessner S, Somekh I, Yacobovich J, Steinberg-Shemer O, Somech R, Soehnlein O, Schmid B, Klein C, Walzog B, **Maier-Begandt** D. (2025) Mutations in *VPS18* lead to a neutrophil maturation defect associated with disturbed vesicle homeostasis. *bioRxiv* [Preprint] 2025.08.15.670286.

Bader A, Winkelmann M, Forné I, Walzog B, **Maier-Begandt** D. (2022) Decoding the signaling profile of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) in innate immunity: A proteomic approach. *Eur J Immunol* 52:760-9.

Bader A, Gao J, Rivière T, Schmid B, Walzog B, **Maier-Begandt** D. (2021) Molecular Insights Into Neutrophil Biology From the Zebrafish Perspective: Lessons From CD18 Deficiency. *Front Immunol* 12:677994.

Zehrer A, Pick R, Salvermoser M, Boda A, Miller M, Stark K, Weckbach LT, Walzog B, **Begandt** D. (2018) A fundamental role of Myh9 for neutrophil migration in innate immunity. *J Immunol* 201:1748-64.

Pick R*, **Begandt** D*, Stocker TJ, Salvermoser M, Thome S, Böttcher RT, Montanez E, Harrison U, Forné I, Khandoga AG, Coletti R, Weckbach LT, Brechtele D, Haas R, Imhof A, Massberg S, Sperandio M, Walzog B. (2017) Coronin 1A, a novel player in integrin biology, controls neutrophil trafficking in innate immunity. *Blood* 130:847-58.
*gleichberechtigte Erstautoren.

3 Einleitung

Neutrophile Granulozyten sind die häufigsten Leukozyten im humanen Blut und die ersten Zellen, die an den Ort einer Entzündung rekrutiert werden (Borregaard, 2010; Ley et al., 2007). Sie werden im Knochenmark während der Granulopoiese gebildet, in den Blutstrom entlassen und wandern bei einer Entzündung in das umliegende Gewebe aus (Lawrence et al., 2018). Am Ort der Entzündung können sie, als Teil des angeborenen Immunsystems, mittels Phagozytose, Degranulation zytotoxischer Moleküle, Bildung und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und Bildung von *neutrophil extracellular traps* (NETs) Pathogene eliminieren und Zelldebris entfernen (Zhang et al., 2024). Darüber hinaus unterstützen sie physiologische Prozesse wie die Wundheilung, Angiogenese und Arteriogenese. Sie können aber auch zur Pathogenese entzündlicher Erkrankungen wie der Arteriosklerose sowie zur Tumormetastasierung beitragen (Christoffersson & Phillipson, 2018).

Während der Granulopoiese entwickeln sich aus Granulozyten-Monozyten-Progenitoren (GMP) die Myeloblasten als erste Vorläuferzellen der Granulozyten (Bardoel et al., 2014). Aus ihnen entstehen Promyelozyten als erste Vorläuferzellen der neutrophilen Granulozyten, die sich sequentiell in Myelozyten, Metamyelozyten, stabkernige und schließlich segmentkernige, reife neutrophile Granulozyten differenzieren (**Abbildung 1**). Diese klassische Einteilung erfolgt durch morphologische Charakteristika des Zellkerns, das Vorhandensein der verschiedenen Granula und die Zellgröße.

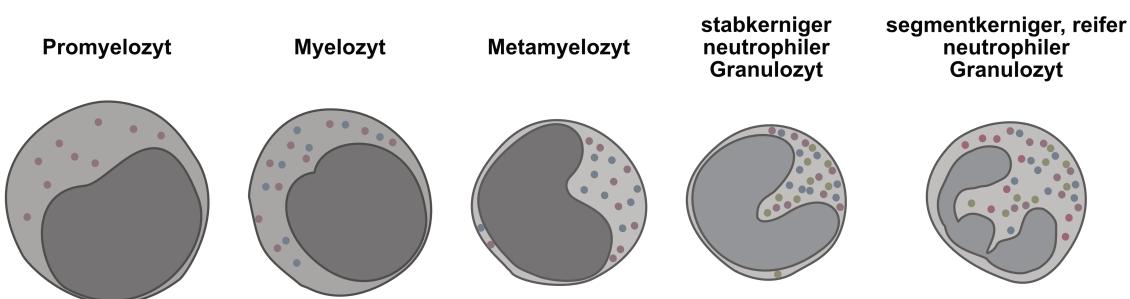


Abbildung 1. Darstellung der Granulopoiese mit den verschiedenen Vorläuferzellen von neutrophilen Granulozyten. Die einzelnen Reifestadien unterscheiden sich in Größe, Morphologie des Zellkerns sowie dem Vorhandensein verschiedener Granula. Abbildung modifiziert aus Cowland und Borregaard, Immunol Rev, 2016 (Cowland & Borregaard, 2016).

In den letzten Jahren wurde zusätzlich eine neue Einteilung mithilfe von Markern auf der Zelloberfläche etabliert, in denen die ersten Vorläuferzellen als Proneutrophile (ProNeu) 1 und 2 definiert wurden, die sich in Präneutrophile (PräNeu), dann unreife

und schließlich reife neutrophile Granulozyten (Neu) entwickeln (Evrard et al., 2018; Kwok et al., 2020).

Ist die Entwicklung von neutrophilen Granulozyten gestört, kann es zur Neutropenie und als Folge zu lebensbedrohlichen bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen bei diesen Patienten kommen. Neutropenien können u. a. durch seltene, angeborene Genmutationen hervorgerufen werden, die als kongenitale Neutropenien bezeichnet werden (Klein, 2011). Hierbei besitzen Mutationen in dem Gen *neutrophil expressed elastase* (*ELANE*) mit fast 50 % die höchste Prävalenz bei den Betroffenen (Skokowa et al., 2017). Vorläuferzellen von neutrophilen Granulozyten mit Mutationen in diesem Gen sterben verfrüht aufgrund einer gestörten Proteinhomöostase inklusive einer veränderten intrazellulären Vesikeldynamik (Rydzynska et al., 2021). Weiterhin wurden Mutationen u. a. in den Genen *Shwachman-Bodian-Diamond syndrome* (SBDS), *glucose-6-phosphatase catalytic subunit 1* (G6PT) und *hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1-associated protein X-1* (HAX1) als Ursache von kongenitalen Neutropenien identifiziert (Skokowa et al., 2017). Obwohl die molekularen Effekte, die durch Mutationen in einzelnen Genen zu einer Neutropenie führen können, teilweise bekannt sind, sind die molekularen Mechanismen für die Reifung von neutrophilen Granulozyten insgesamt noch unzureichend beschrieben.

Nach der Bildung im Knochenmark werden reife neutrophile Granulozyten in das Blut abgegeben und bei Auftreten einer Entzündung in das umliegende Gewebe an den Ort der Entzündung rekrutiert. Diese auf zellulärer Ebene gut beschriebene Kaskade erfolgt in aufeinander folgenden Schritten und umfasst die Induktion des Rollens, das langsame Rollen auf dem Endothel, die nachfolgende Adhäsion, die Adhäsionsverstärkung, das Abflachen mit Polarisierung und die Migration auf den Endothelzellen zum Ort der Transmigration (Ley et al., 2007) (**Abbildung 2**). Nach Durchqueren der Gefäßwand können die neutrophilen Granulozyten abluminal auf den Perizyten und interstitiell in Richtung des Entzündungsherdes wandern. Für die Schritte vom langsamen Rollen bis hin zur abluminalen Migration sind die Adhäsionsmoleküle der β_2 -Integrinfamilie (CD11/CD18) essentiell.

β_2 -Integrine sind heterodimere Glykoproteine, die aus einer gemeinsamen β -Untereinheit (CD18) und einer spezifischen α -Untereinheit (CD11a-d) bestehen. Die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten wird vorwiegend durch das *lymphocyte*

function-associated antigen-1 (LFA-1, CD11a/CD18) und das macrophage-1 antigen (Mac-1, CD11b/CD18) ermöglicht.

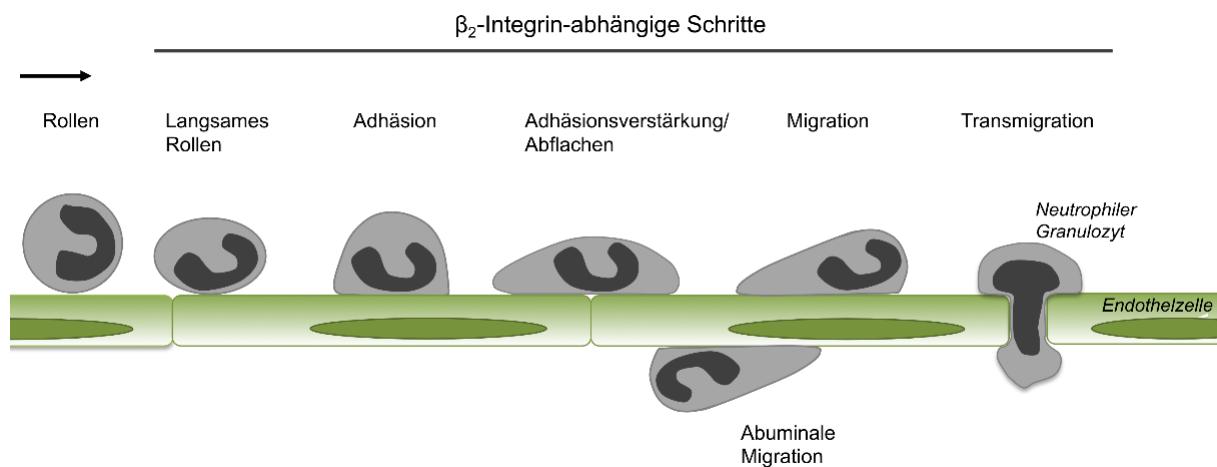


Abbildung 2. Darstellung der Rekrutierungskaskade von neutrophilen Granulozyten. Abbildung modifiziert aus Thome et al., Eur J Clin Invest, 2018 (Thome et al., 2018).

β₂-Integrine liegen in frei fließenden, nicht-aktivierten neutrophilen Granulozyten im Blut in einem inaktiven Zustand mit gekrümmter Konformation und geringer Affinität zu ihren Liganden vor (**Abbildung 3**). Nach Interaktion mit dem entzündeten Endothel gehen β₂-Integrine während des *inside-out signaling* in zwei Schritten vom inaktiven in einen aktivierte Zustand mit vollständig gestreckter Konformation und hoher Affinität zu ihren Liganden wie dem *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) über (Mocsai et al., 2015). Hierbei können β₂-Integrine in zwei verschiedenen Zwischenschritten in den aktivierte Zustand übergehen: entweder über eine gestreckte Konformation mit mittlerer Affinität oder über eine gekrümmte Konformation mit hoher Affinität (Fan et al., 2019; Fan et al., 2016).

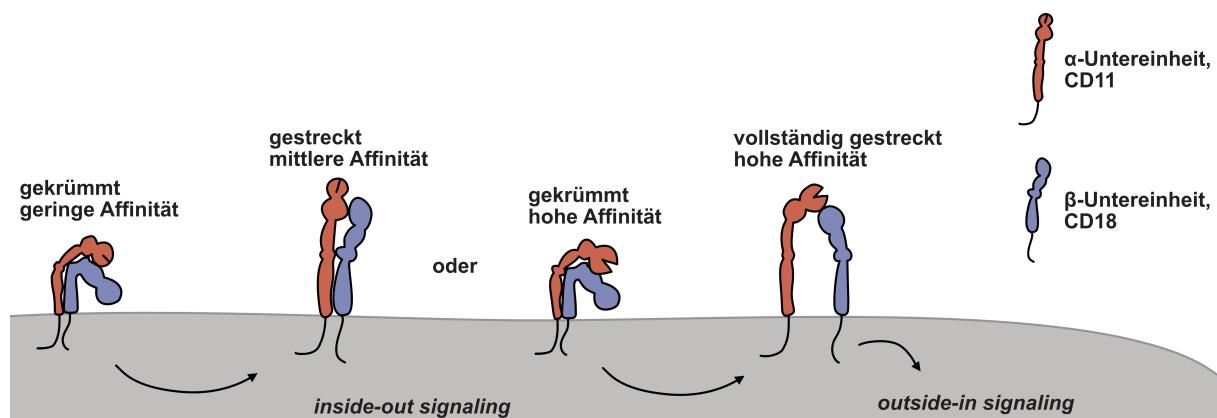


Abbildung 3. Aktivierung von β₂-Integrinen über intrazelluläre Signalkaskaden. Abbildung modifiziert aus Mocsai et al., Cardiovasc Res, 2015 und Fan et al., Nat Commun, 2016 (Fan et al., 2016; Mocsai et al., 2015).

Nach der Ligandenbindung können β_2 -Integrine während des *outside-in signalings* Signale in das Innere der Zelle weiterleiten. Die Integrinregulation erfolgt durch Bindung von intrazellulären Molekülen an die zytoplasmatischen Domänen der α - und β -Untereinheiten der Integrine und ist zeitlich und räumlich exakt reguliert. Die molekularen Mechanismen, die die Aktivierung und die induzierten Signalkaskaden der β_2 -Integrine und somit die Funktion neutrophiler Granulozyten steuern, sind bis heute nicht vollständig verstanden.

Die essentielle Bedeutung der β_2 -Integrine für die Funktion neutrophiler Granulozyten wird bei Patienten mit mutiertem oder gänzlich fehlendem CD18, der β -Untereinheit der β_2 -Integrine, ersichtlich. Diese Patienten leiden unter *leukocyte adhesion deficiency* (LAD) Typ-I (Anderson et al., 1985). Die neutrophilen Granulozyten dieser Patienten können durch einen Verlust bzw. eine Dysfunktion von CD18 nicht auswandern und verbleiben im Gefäßsystem. Die gestörte Auswanderung der neutrophilen Granulozyten unterbricht einen Rückkopplungsmechanismus im Gewebe, bei dem über Interleukin-17 (IL-17), *granulocyte-colony stimulating factor* (GCSF) sowie IL-23 die Granulopoiese im Knochenmark gesteuert wird (Forlow et al., 2001; Stark et al., 2005). Das Fehlen der neutrophilen Granulozyten im Gewebe führt demzufolge zu einer verstärkten Granulopoiese. Die Unfähigkeit der CD18-defizienten neutrophilen Granulozyten auszuwandern sowie der unterbrochene Rückkopplungsmechanismus führen schließlich dazu, dass LAD Typ-I Patienten eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Blut aufweisen, eine sogenannte Neutrophilie. Im Fall einer Infektion im Gewebe sind neutrophile Granulozyten daher nicht in der Lage Pathogene zu eliminieren, so dass Patienten mit LAD an wiederkehrenden bakteriellen Infektionen und Pilzinfektionen leiden.

Ein etabliertes *in vivo* Modell zur Analyse der Leukozytenrekrutierung neben der Maus sind Zebrafischlarven (Deng & Huttenlocher, 2012). Sie besitzen ein stark konserviertes Immunsystem und eignen sich besonders zur Analyse der angeborenen Immunabwehr, da das adaptive Immunsystem im Larvenstadium noch nicht entwickelt ist (Langenau et al., 2004). Neben den Vorteilen einer schnellen Entwicklung außerhalb des Mutterleibs, hoher Reproduktionszahlen und einer effizienten genetischen Manipulation mittels *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR)/Cas9-Technik, bleiben sie nach chemischer Inhibierung der Melanogenese optisch transparent und gewährleisten so eine hervorragende Qualität

des *live imaging* eines intakten Organismus. Obwohl die Zebrafischlarve ein anerkanntes Modell zur Analyse der Biologie von neutrophilen Granulozyten insbesondere der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten darstellt, ist die Bedeutung der β_2 -Integrine im Zebrafisch überraschenderweise nicht bekannt. Eine Beschreibung der funktionellen Bedeutung der β_2 -Integrine in Zebrafischlarven würde es dementsprechend erlauben, die Forschung der β_2 -Integrin-basierten Fragestellungen in Mensch und Maus um das Modelltier Zebrafisch zu ergänzen und vor allem spezifisch die technischen Vorteile des Zebrafisches zu nutzen, so dass insbesondere die Dynamik und Regulation der β_2 -Integrin-abhängigen Prozesse in neutrophilen Granulozyten *in vivo* mit hoher zeitlicher Dynamik aufgeklärt werden könnten - was in Säugetiermodellen nur eingeschränkt möglich ist.

Im Rahmen der vorliegenden Habilitationsschrift wurden die molekularen Mechanismen der Bildung und Funktion von neutrophilen Granulozyten weiter aufgeklärt. Im ersten Teil der Habilitationsarbeit wurde die funktionelle Bedeutung des *vacuolar protein sorting-associated protein 18 homolog* (VPS18) für die Reifung neutrophiler Granulozyten analysiert. Im zweiten Teil der Habilitationsarbeit wurde die Rolle von Coronin 1A (CORO1A) und Myosin-9 (MYH9) während der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten charakterisiert sowie die interagierenden Netzwerke des bekannten β_2 -Integrin-Regulators *hematopoietic progenitor kinase-1* (HPK1) entschlüsselt. Im dritten Teil der vorliegenden Habilitationsschrift wurde der funktionelle Einfluss von CD18 auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während der akuten Entzündungsreaktion in Zebrafischlarven untersucht.

Insgesamt wurden in dieser Habilitationsarbeit die molekularen Mechanismen der Bildung und Funktion von neutrophilen Granulozyten weiter entschlüsselt, um nicht nur das Verständnis der physiologischen Funktionen der untersuchten Proteine zu verbessern, sondern auch um neue Grundlagen für potentielle therapeutische Ansätze zur Behandlung monogener Erkrankungen zu schaffen.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Die Rolle von VPS18 für die Reifung neutrophiler Granulozyten

Zugeordnete Publikation

Gao J, Bader A, Linder MI, Cheng J, Richter M, Zehrer A, Mitt K, Popper B, Meissner F, Tatematsu M, Rohlfs M, Frenz-Wiessner S, Somekh I, Yacobovich J, Steinberg-Shemer O, Somech R, Soehnlein O, Schmid B, Klein C, Walzog B, **Maier-Begandt D.** (2025) Mutations in *VPS18* lead to a neutrophil maturation defect associated with disturbed vesicle homeostasis. *bioRxiv* [Preprint]. 2025.08.15.670286.

Das Protein VPS18 wird ubiquitär exprimiert und ist ein Teil der Multiproteinkomplexe *class C core vacuole/endosome tethering* (CORVET) und *homotypic fusion and vacuole protein sorting* (HOPS), die für die Fusion von Vesikeln mit ihren Zielorganellen zuständig sind (Peplowska et al., 2007; Seals et al., 2000). Beide Multiproteinkomplexe bestehen aus den gleichen Kernkomponenten VPS11, VPS16, VPS18 und VPS33A (**Abbildung 4**). CORVET besteht zusätzlich aus den Untereinheiten VPS3 und VPS8 und erkennt so spezifisch Rab5-markierte Vesikel (Ostrowicz et al., 2010). HOPS besteht zusätzlich aus VPS39 und VPS41 und erkennt Rab7-markierte Vesikel, so dass CORVET insbesondere während der homotypischen Fusion von frühen Endosomen und HOPS vornehmlich während der Fusion von Lysosomen mit späten Endosomen und Autophagosomen beteiligt sind.

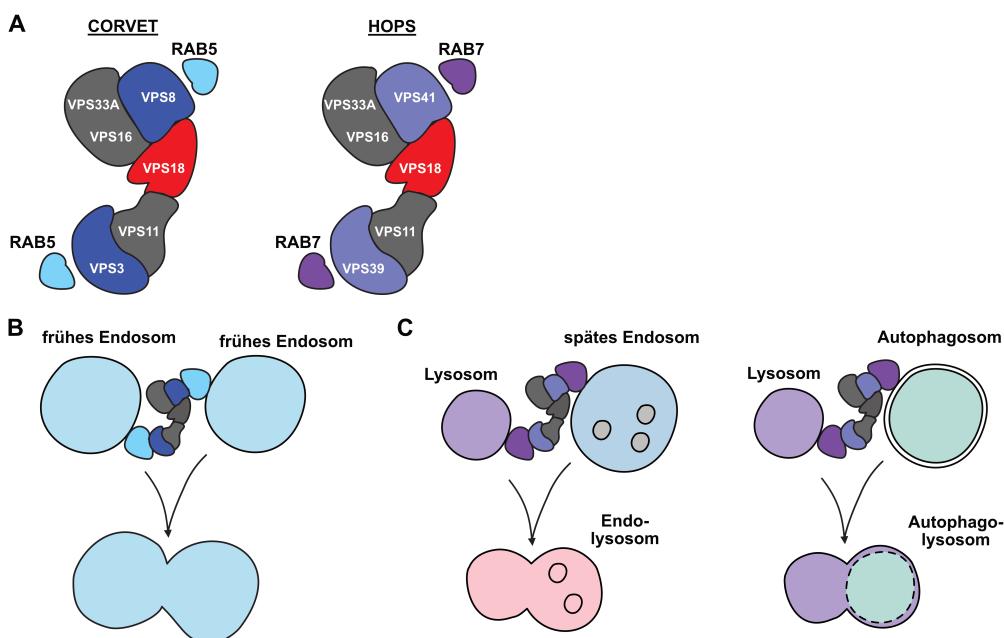


Abbildung 4. Multiproteinkomplexe CORVET und HOPS. Zusammensetzung (A) und Fusion von Vesikeln mit den entsprechenden Zielorganellen von CORVET (B) und HOPS (C). Abbildung modifiziert aus Bröcker et al., PNAS, 2012 und Spang, Front Cell Dev Biol, 2016 (Bröcker et al., 2012; Spang, 2016).

VPS18 ist essentiell für die Stabilität von HOPS, indem es direkt an VPS11, VPS16 und VPS41 bindet (Brocker et al., 2012; Graham et al., 2013; Hunter et al., 2017; Wartosch et al., 2015). Eine funktionelle Rolle für VPS18 in neutrophilen Granulozyten wurde bisher nicht beschrieben. *Vps18*-defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig und sterben schon embryonal oder sehr früh postnatal (Peng et al., 2012). Ebenso sterben Mäuse mit einem Knockout (KO) von *Vps18* in Zellen des Nervensystems postnatal aufgrund von neurologischen Störungen durch Defekte im endolysosomalen sowie autophagolysosomalen Transport, die zur Akkumulation von Autophagosomen und späten Endosomen führen. Im Rahmen eines genetischen Screenings wurde *vps18* als essentiell für die frühe Entwicklung von Zebrafischlarven identifiziert: Zebrafischlarven mit einem homozygoten *vps18* KO sterben bis Tag 10 nach der Befruchtung (*days post fertilization*, dpf) und zeigen einen Pigmentverlust (Amsterdam et al., 2004; Golling et al., 2002). In einer späteren Studie, die nach genetischen Modellen für Lebererkrankungen suchte, wurden bei diesen *vps18*-defizienten Zebrafischen zusätzlich Leberdefekte festgestellt (Sadler et al., 2005). Weiterführende Analysen führten diese Phänotypen auf Störungen im endolysosomalen Transport in Pigment- und Leberzellen zurück. Leukozyten wurden in diesen Zebrafischlarven nicht charakterisiert. Patienten mit Mutationen in *VPS18* wurden ebenfalls noch nicht beschrieben. Allerdings wurden Patienten mit Mutationen in den anderen CORVET und HOPS Kernkomponenten beschrieben. Patienten mit homozygoten Mutationen in *VPS16* sowie in *VPS33A* leiden u. a. unter Mukopolysaccharidose (MPS)- und MPS-plus-ähnlichen Symptomen, die von einer angeborenen Neutropenie begleitet werden (Pavlova et al., 2019; Sofou et al., 2021; Yildiz et al., 2021). Hierbei wurden ebenfalls Störungen im endolysosomalen sowie autophagolysosomalen Transport in verschiedenen Zelltypen festgestellt, die zur Akkumulation von Autophagosomen und Lysosomen führten. Dies könnte darauf hinweisen, dass eine gestörte Vesikeldynamik ebenfalls die Entwicklung von neutrophilen Granulozyten inhibieren könnte. In Übereinstimmung damit weisen Zellen von Patienten mit Mutationen in den Genen *ELANE*, *VPS13B* und *VPS45* Störungen in endolysosomalen und biosynthetischen Transportwegen auf, die zur Apoptose von Vorläuferzellen neutrophiler Granulozyten und folglich zu einer Neutropenie führt (Kolehmainen et al., 2003; Kollner et al., 2006; Vilboux et al., 2013). Um den Einfluss von VPS18 auf die Entwicklung von neutrophilen Granulozyten zu charakterisieren, wurde das Hoxb8-Zellsystem verwendet. Dieses ist eine murine Zelllinie von myeloiden Vorläuferzellen, die den Transkriptionsfaktor

Hoxb8 unter Kontrolle der Östrogen-bindenden Domäne des Östrogenrezeptors exprimiert (Redecke et al., 2013; Wang et al., 2006). In Gegenwart von Östrogen verbleiben die Zellen im Stadium der Promyelozyten und können nach Entfernen des Östrogens und Zugabe von GCSF über vier Tage in reife neutrophile Granulozyten differenziert werden.

Unter Anwendung der CRISPR/Cas9-Technik wurden Hoxb8-Zellen mit heterozygoten Mutationen in *Vps18* generiert und zwei Mutanten (Klon 1 und 2) für weitere Analysen verwendet (Gao et al., 2025). Mittels May-Grünwald-Giemsa-Färbung konnte nachgewiesen werden, dass heterozygote Mutationen in *Vps18* zu einer verzögerten Entwicklung von Vorläuferzellen und einer verringerten Produktion reifer neutrophiler Granulozyten während der Differenzierung im Vergleich zu Hoxb8-Kontrollzellen führten (**Abbildung 5**). Gleichzeitig stieg die Anzahl toter Zellen bis Tag 4 der Differenzierung bei *Vps18* Mutanten im Vergleich zu Kontrollzellen stark an.

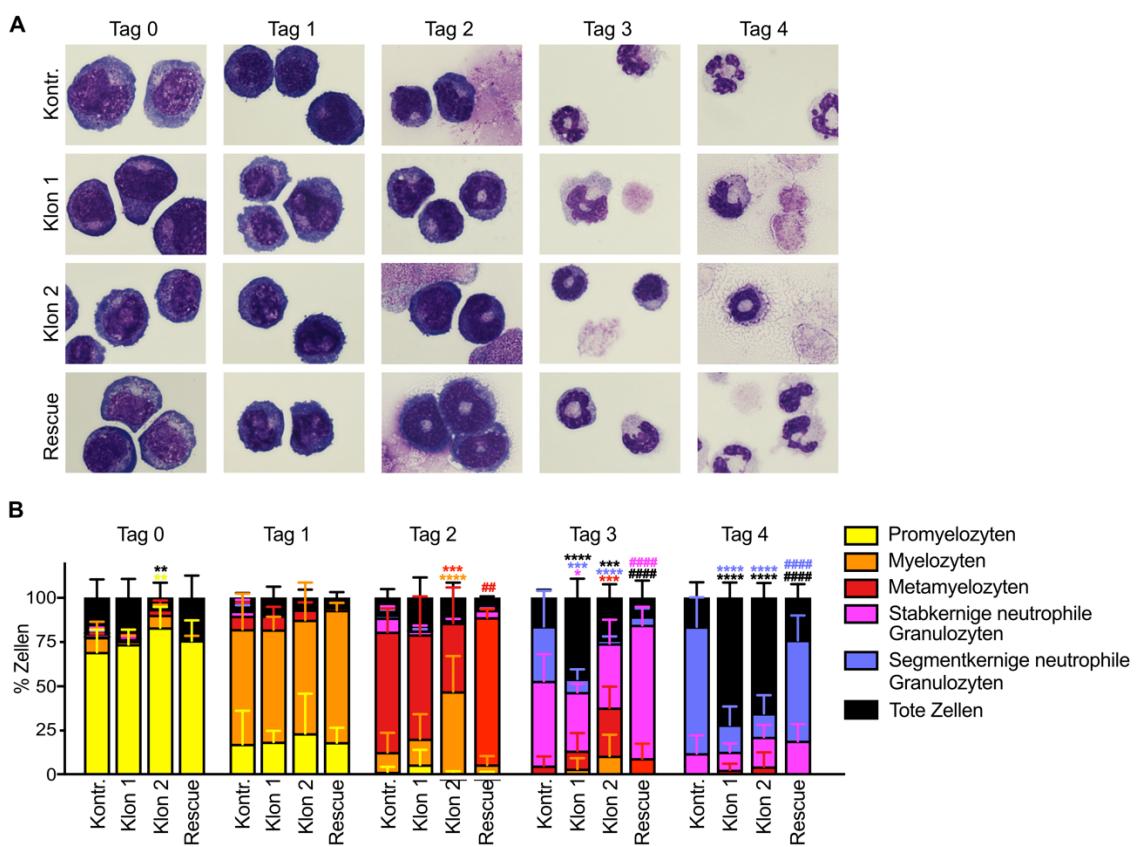


Abbildung 5. Analyse der Entwicklung von Hoxb8-Zellen mit und ohne Mutationen in *Vps18*. **(A)** Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von Kontroll-, *Vps18*-mutierten (Klon 1 und 2) und *rescue*-Hoxb8-Zellen nach May-Grünwald-Giemsa-Färbung. **(B)** Quantifizierung der spezifischen Entwicklungsstadien aus (A). Abbildung modifiziert aus Gao et al., bioRxiv, 2025 (Gao et al., 2025).

Rescue-Zellen, die durch Transduktion von *Vps18* Klon 1-Zellen mit einem für VPS18-EGFP codierenden Plasmid generiert wurden, starben nicht mehr während der Differenzierung, sondern reiften ähnlich wie Kontrollzellen zu segmentkernigen,

neutrophilen Granulozyten (**Abbildung 5**). Zur Verifizierung dieser Ergebnisse wurde die Differenzierung der Kontroll- sowie der mutierten Hoxb8-Zellen nach der neuen Einteilung mittels Oberflächenmarker im Spektraldurchflusszytometer evaluiert. Hierbei zeigten Hoxb8-Zellen mit heterozygoten Mutationen in *Vps18* im Verlauf der viertägigen Differenzierung eine deutlich verringerte Hochregulation von C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 2 (CXCR2) sowie CD101 im Vergleich zu Kontrollzellen, was den Defekt in der Entwicklung von unreifen zu reifen neutrophilen Granulozyten bestätigte (**Abbildung 6A-D**).

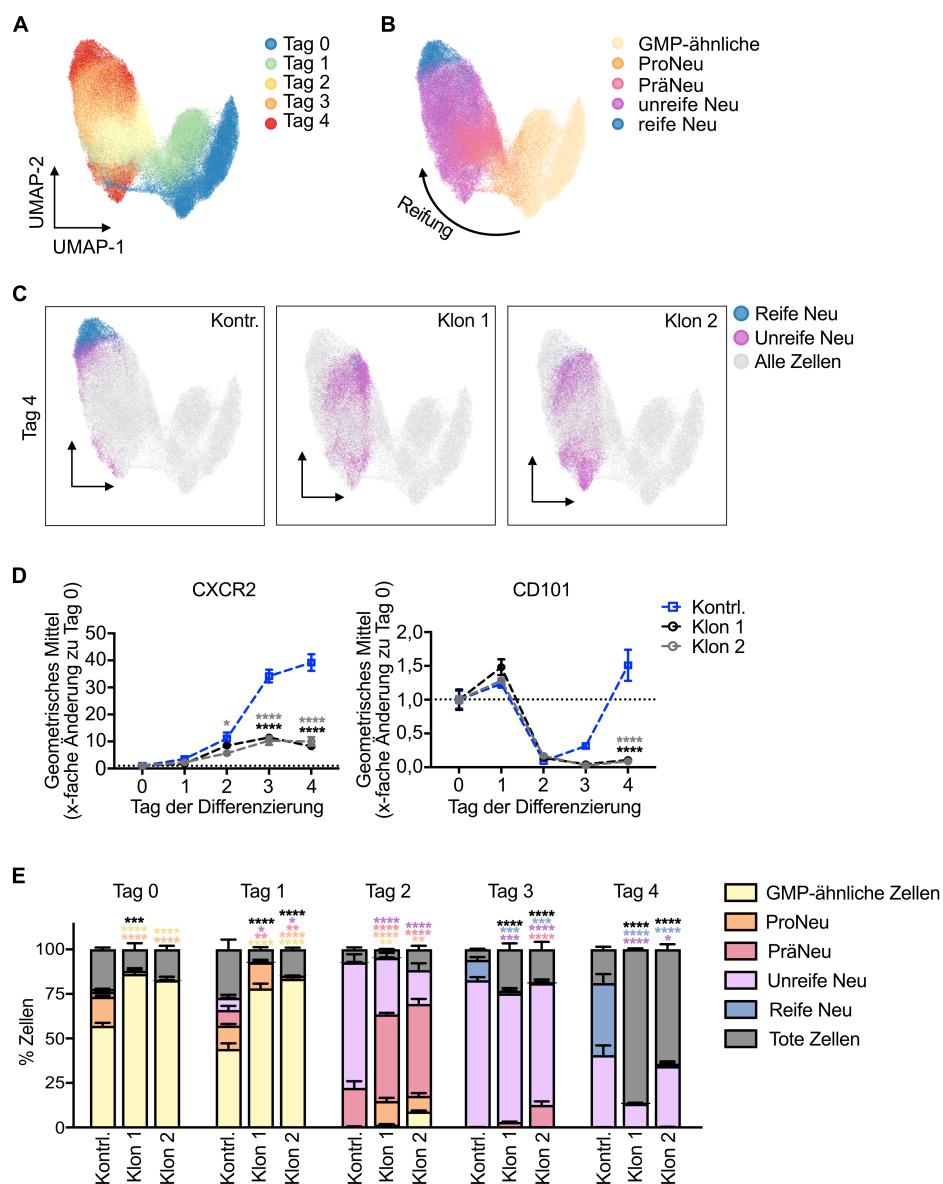


Abbildung 6. Charakterisierung der Entwicklung von Kontroll- und *Vps18*-mutierten (Klon 1 und 2) Hoxb8-Zellen. (**A-B**) Analyse mittels Spektraldurchflusszytometer mit anschließender dimensionaler Reduktion durch *uniform manifold approximation and projection* (UMAP) während der Differenzierung (Tag 0-4). (**C**) Darstellung der unreifen (lila) und reifen (blau) neutrophilen Granulozyten an Tag 4. (**D**) Oberflächenexpression von CXCR2 (links) und CD101 (rechts) während der Differenzierung. (**E**) Quantifizierung der spezifischen Entwicklungsstadien aus (A-B). Abbildung modifiziert aus Gao et al., bioRxiv, 2025 (Gao et al., 2025).

Wie zuvor beobachtet, stieg gleichzeitig die Anzahl toter Zellen bei Hoxb8-Zellen mit heterozygoten Mutationen in *Vps18* an (**Abbildung 6E**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass heterozygote Mutationen in *Vps18* die Entwicklung neutrophiler Granulozyten stören und zum Zelltod führen.

Um die molekularen und zellulären Folgen der Mutationen in *Vps18* genauer zu charakterisieren, wurden massenspektrometrische Analysen von Kontroll- sowie *Vps18*-mutierten Hoxb8-Zellen an Tag 0 und 2 der Differenzierung durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass in beiden *Vps18* Mutanten die weiteren Kernkomponenten von CORVET und HOPS, VPS11, VPS16 sowie VPS33A, in der Proteinmenge drastisch verringert waren, so dass diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass durch Mutationen in *Vps18* die Komplexe CORVET und HOPS instabil wurden (**Abbildung 7A-B**). Als Folge dessen konnte eine Akkumulation von Autophagosomen durch die erhöhte Menge der Markerproteine LC3B-II sowie p62 in *Vps18* Mutanten im Vergleich zu Kontrollzellen festgestellt werden (**Abbildung 7C-F**). Diese Ergebnisse konnten mittels Transmissionselektronenmikroskopie bestätigt werden. Hier wurden in *Vps18* Mutanten Vesikel mit irregulären Strukturen sowie größere Vesikel und Autophagosomen im Vergleich zu Kontrollzellen nachgewiesen (**Abbildung 7G-H**). Lysosomen schienen hingegen verringert zu sein, da der Marker für Lysosomen *lysosome-associated membrane glycoprotein 1* (LAMP1) sowie die Menge saurer Kompartimente nach Durchflusszytometrischer Messung mittels LysoTracker in *Vps18* Mutanten reduziert waren (**Abbildung 7I-J**). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch heterozygote Mutationen in *Vps18* die Stabilität von CORVET und HOPS und folglich die Vesikelhomöostase beeinträchtigt war, so dass es u. a. zu einer Akkumulation von Autophagosomen kam. Hierbei könnte eine Störung der Fusion von Autophagosomen mit Lysosomen vorliegen und zur Einleitung des Zelltodes führen, wie zuvor in der Literatur beschrieben (Bialik et al., 2018).

Zur Bestimmung der Art des Zelltods wurden Kontroll- sowie *Vps18*-mutierte Hoxb8-Zellen an jedem Tag der Differenzierung mittels Durchflusszytometrie nach Färbung mit Tetramethylrhodamin-Methylester (TMRM), Annexin V sowie SytoxRed analysiert (**Abbildung 8A-B**). Hierbei wurden TMRM-positive Zellen als lebend, Annexin V-positive Zellen als früh-apoptotisch und Annexin V- und SytoxRed-positive Zellen als spät-apoptotisch definiert. Während Kontrollzellen eine Vitalität von mehr als 60 % an allen Tagen der Differenzierung zeigten, wurden über 35 % der *Vps18* Mutanten ab Tag 3 der Differenzierung früh-apoptotisch, so dass bis Tag 4 weniger

als 4 % aller Zellen noch lebten. Gleichzeitig wiesen im Vergleich zu Kontrollzellen deutlich mehr *Vps18* Mutanten eine aktive Caspase-3 auf (**Abbildung 8C**).

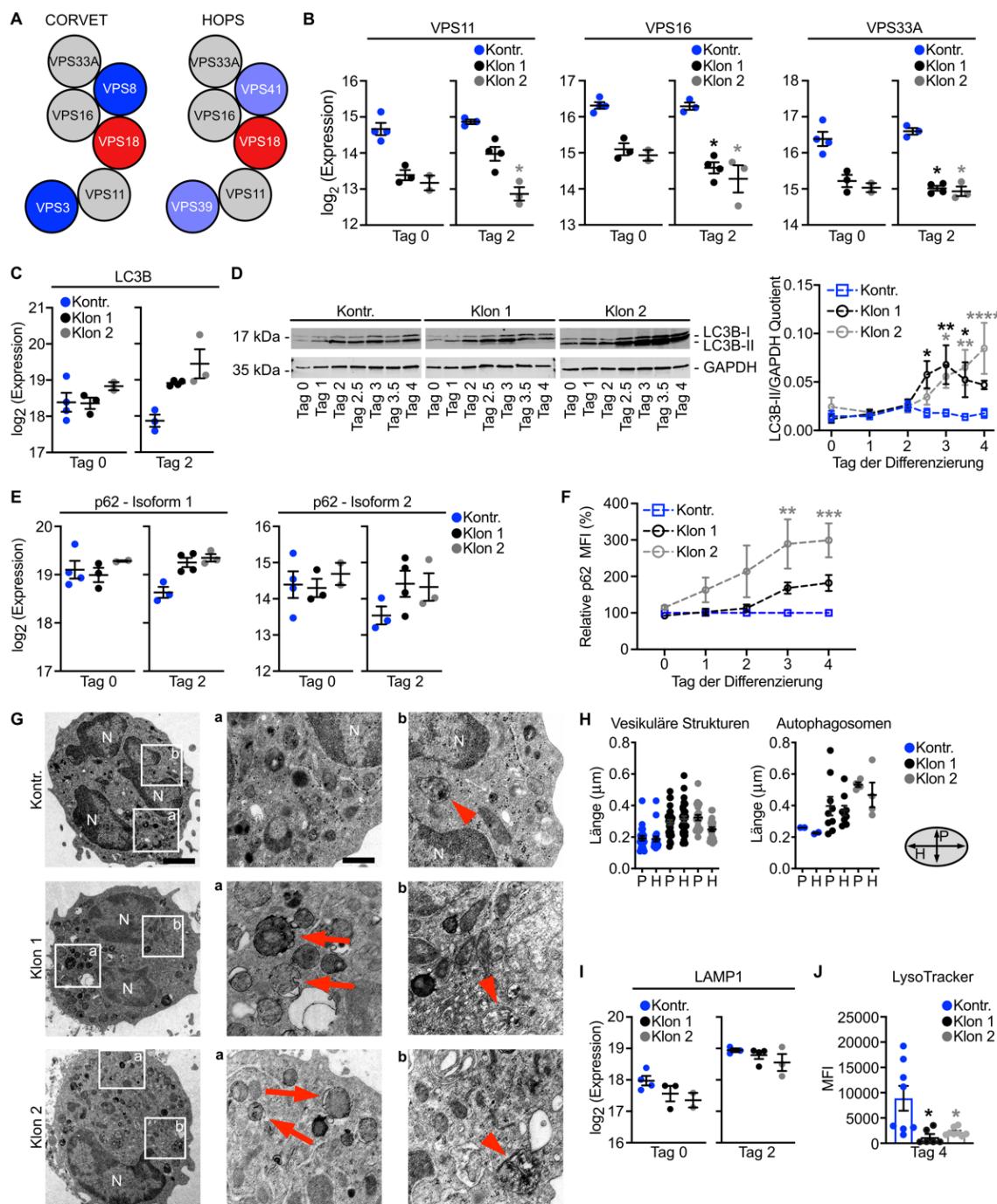


Abbildung 7. Analysen der Kernkomponenten von CORVET und HOPS sowie der vesikulären Homöostase in Kontroll- und *Vps18*-mutierten (Klon 1 und 2) Hoxb8-Zellen. (A) Schematische Darstellung der Komponenten von CORVET und HOPS. (B) Proteinmengen der Kernkomponenten VPS11, VPS16 und VPS33A. (C-F) Analysen der Proteinmengen der autophagosomalen Marker LC3B und p62 während der Differenzierung. (G-H) Repräsentative transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen (G) sowie Quantifizierung der Größe der vesikulären Strukturen und Autophagosomen (H). (I) Proteinmenge von LAMP1. (J) Quantifizierung der mit Lysotracker gefärbten Lysosomen. Abbildung modifiziert aus Gao et al., bioRxiv, 2025 (Gao et al., 2025).

Diesen Zelltod haben wir als verfrühte Apoptose definiert, da die *Vps18* Mutanten unreif an Apoptose sterben. Rescue-Zellen zeigten im Vergleich zu

Kontrollzellen weder eine veränderte Vitalität noch wurden mehr *rescue*-Zellen mit aktiver Caspase-3 detektiert (**Abbildung 8A-B,D**).

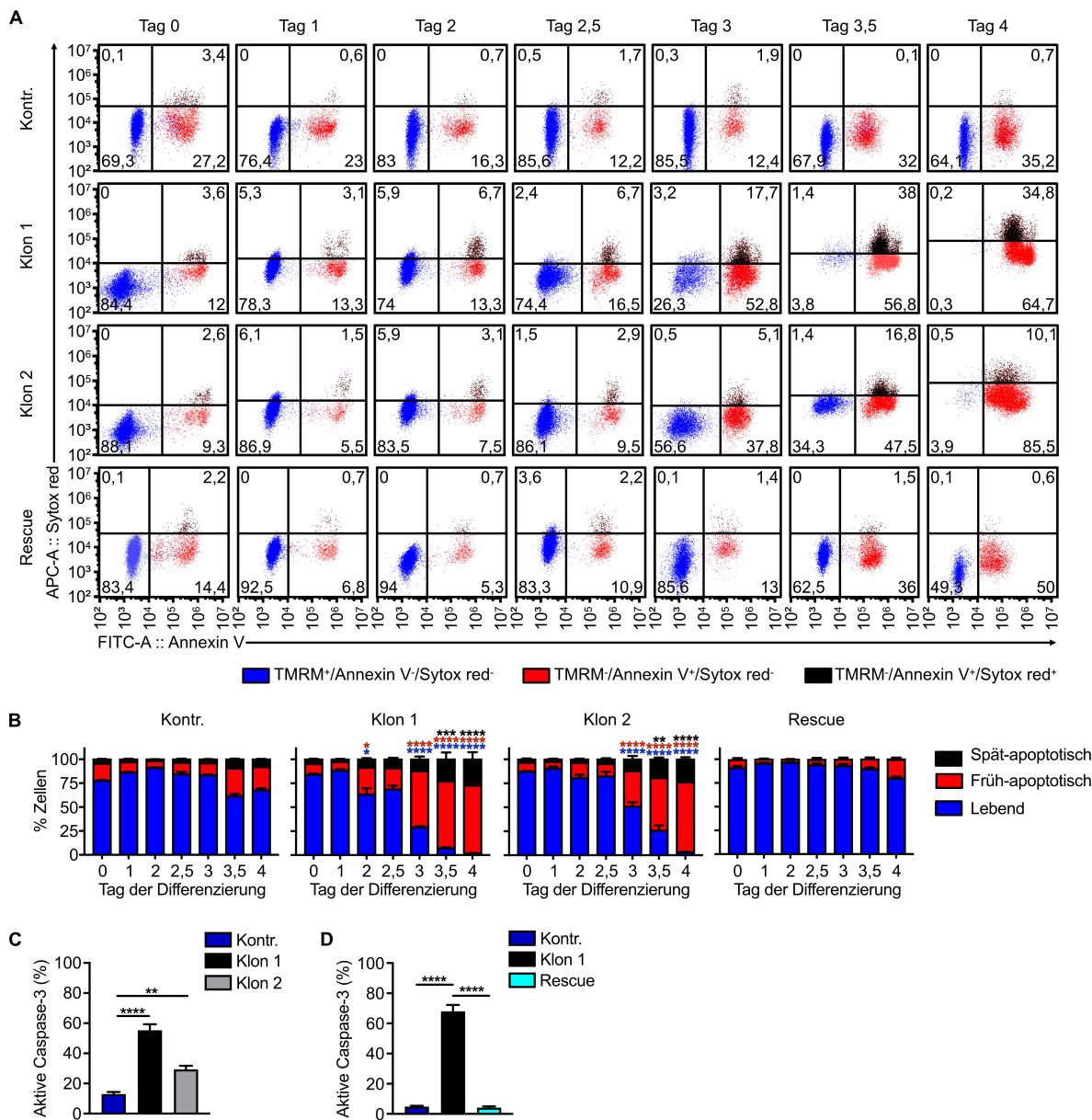


Abbildung 8. Zelltodanalyse von Kontroll-, *Vps18*-mutierten (Klon 1 und 2) und *rescue*-*Hoxb8*-Zellen. (A-B) Repräsentative Streudiagramme (A) und Quantifizierung (B) von lebenden, früh-apoptotischen und spät-apoptotischen Zellen während der Differenzierung. (C-D) Anzahl an Zellen positiv für aktive Caspase-3 an Tag 3 der Differenzierung. Abbildung modifiziert aus Gao et al., bioRxiv, 2025 (Gao et al., 2025).

Die Relevanz der erhobenen Befunde für den menschlichen Organismus wurde durch die Identifizierung einer Familie mit einer heterozygoten Mutation in *VPS18* deutlich (Kooperation mit Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein, Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München) (Gao et al., 2025). Hierbei sind der Vater sowie Kind 1 und Kind 3 von insgesamt 3 Kindern Träger der Mutation. Die Punktmutation in *VPS18* induziert ein verfrühtes Stopcodon, so dass nach 234 Aminosäuren das Protein verfrüht endet (Arg234*). Das erste Kind (Patientin 1) litt insbesondere in den ersten

beiden Lebensjahren an wiederkehrenden, bakteriellen Infektionen und an einer Neutropenie. Untersuchungen deuten auf einen Reifungsdefekt von neutrophilen Granulozyten hin (**Abbildung 9A**). Patientin 1 hat mit heute 7 Jahren eine geringe, aber normale absolute Neutrophilenzahl (ANC), leidet nicht mehr an wiederkehrenden Infektionen und ist phänotypisch gesund. Der Vater der Patientin trägt die gleiche heterozygote Mutation und hat eine ANC im unteren Normbereich. Das dritte Kind (Patient 2, 5 Monate zum Zeitpunkt der Untersuchung) hatte in den ersten Lebensmonaten ebenfalls eine geringe ANC (500). Diese Befunde deuten darauf hin, dass es sich im vorliegenden Fall um eine transiente Neutropenie handelt, bei der sich im Laufe der Entwicklung die ANC normalisiert (Gao et al., 2025).

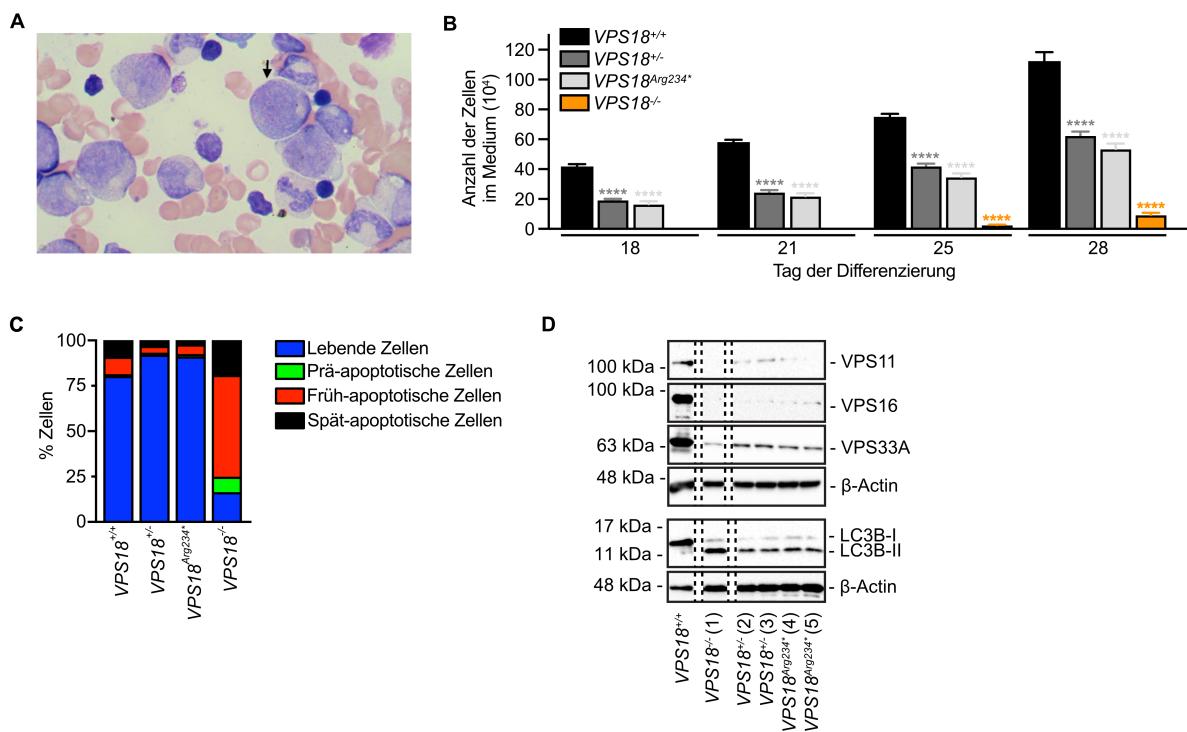


Abbildung 9. Charakterisierung der Entwicklung von *VPS18^{+/+}*, *VPS18^{+/-}*, *VPS18^{-/-}* sowie *VPS18^{+/Arg234*}* (spezifische Patientenmutation) iPS-Zellen. **(A)** Repräsentative mikroskopische Aufnahme des Knochenmarks der Patientin 1. Pfeil, Myelozyten. **(B)** Anzahl abgegebener, im Medium schwimmender Zellen während der Differenzierung von iPS-Zellen zu neutrophilen Granulozyten. **(C)** Zelltodanalyse an Tag 28. **(D)** Repräsentativer Western Blot der Proteinmenge von VPS11, VPS16, VPS33A, LC3B-I/II sowie β-Actin als Ladekontrolle an Tag 28. Abbildung modifiziert aus Gao et al., bioRxiv, 2025 (Gao et al., 2025).

Um die in Hoxb8-Zellen erlangten Erkenntnisse im humanen System auf Zellebene zu bestätigen, wurden humane induzierte pluripotente Stammzellen (iPS-Zellen) mit Mutationen in *VPS18* generiert (Kollaboration mit der AG Klein, Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU München), da keine Patientenzellen für zelluläre und molekulare Analysen zur Verfügung standen (**Abbildung 9B**). Es wurden *VPS18^{+/+}*-Zellen als Kontrollen, *VPS18^{+/-}*-Zellen, *VPS18^{-/-}*-Zellen sowie *VPS18^{+/Arg234*}*-Zellen mit der

spezifischen Patientenmutation mittels CRISPR/Cas9-Technik hergestellt und in neutrophile Granulozyten differenziert. IPS-Zellen lassen sich mithilfe verschiedener Medien und Zusätze über ca. 30 Tage zu reifen neutrophilen Granulozyten differenzieren (Linder et al., 2023). Dabei geben die iPS-Zellkolonien ab Tag 14 myeloische Vorläuferzellen in das Medium ab, die sich in weiteren 14 Tagen zu reifen neutrophilen Granulozyten entwickeln. Es zeigte sich eine starke Reduktion der Anzahl der ins Medium abgegebenen Vorläuferzellen um ca. 50 % in *VPS18^{+/−}*- sowie *VPS18^{+/Arg234*}*-Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen (**Abbildung 9B**). Interessanterweise produzierten *VPS18^{−/−}*-iPS-Kolonien verschwindend geringe Mengen an myeloischen Vorläuferzellen, was darauf hindeutet, dass homozygote *VPS18* KO-Zellen zwar als undifferenzierte iPS-Zellen lebensfähig sind, aber ein Großteil der Zellen während der Differenzierung stirbt. Diese Vermutung konnte in Zelltodanalysen bestätigt werden, in denen an Tag 28 der Differenzierung über 75 % der myeloischen Vorläuferzellen der *VPS18^{+/−}*, *VPS18^{−/−}*, sowie *VPS18^{+/Arg234*}*-Zellen vital waren, aber weniger als 25 % der *VPS18^{−/−}*-Zellen (**Abbildung 9C**). Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Beobachtungen in *Hoxb8*-Zellen überein: während wir heterozygote *Vps18* Mutanten generieren konnten, wurde keine homozygote *Vps18* KO-*Hoxb8*-Zelllinie erhalten. Darüber hinaus wurden in den aus *VPS18^{+/−}*, *VPS18^{+/Arg234*}*- sowie *VPS18^{−/−}*-iPS-Zellen generierten neutrophilen Granulozyten geringere Mengen an VPS11, VPS16 und VPS33A sowie erhöhte Mengen von LC3B-II im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen, so dass auch hier Mutationen in *VPS18* vermutlich eine Instabilität der Komplexe CORVET und HOPS hervorriefen und eine Akkumulation von Autophagosomen induzierten (**Abbildung 9D**).

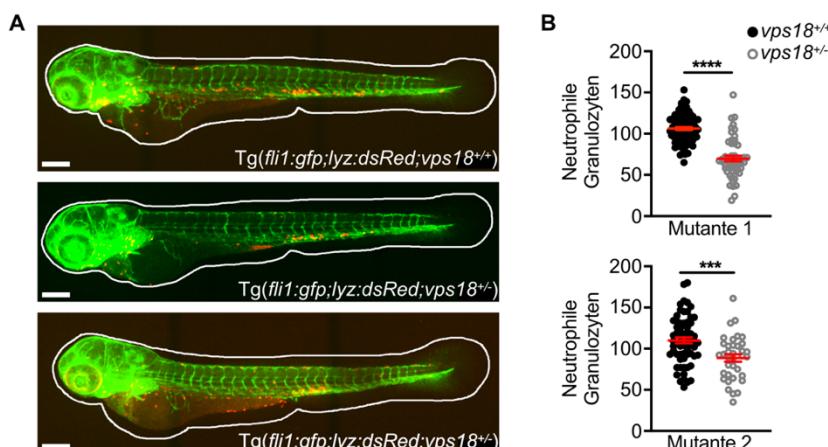


Abbildung 10. Analyse der Gesamtanzahl von neutrophilen Granulozyten in *vps18^{+/+}* und *vps18^{+/-}* Zebrafischlarven (Mutante 1 & 2). (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen von 3 dpf Larven. Maßstabskala, 200 µm. (B) Quantifizierung der Gesamtanzahl neutrophiler Granulozyten aus (A). Abbildung modifiziert aus Gao et al., bioRxiv, 2025 (Gao et al., 2025).

Um unsere Daten *in vivo* zu bestätigen, wurde das Zebrafischmodellsystem verwendet. Zur Analyse von neutrophilen Granulozyten in Zebrafischlarven wurde die transgene Zebrafischlinie Tg(*fli1a:egfp;lyz:dsRed*) verwendet, die stabil das Fluorochrom DsRed unter dem neutrophilen Granulozyten-spezifischen *lyz* Promotor und das *enhanced green fluorescent protein* (EGFP) unter dem Endothel-spezifischen *fli1* Promotor exprimieren (Hall et al., 2007; Lawson & Weinstein, 2002). Mittels CRISPR/Cas9-Technik wurden heterozygote Mutationen in *vps18* eingefügt und zwei *vps18^{+/−}* Mutanten zur Analyse verwendet (**Abbildung 10**). Drei Tage nach der Befruchtung besitzen *vps18^{+/+}*-Larven insgesamt ca. 110 neutrophile Granulozyten. Im Vergleich dazu war die Gesamtzahl an neutrophilen Granulozyten in beiden *vps18^{+/−}* Mutanten signifikant reduziert (**Abbildung 10B**), was darauf hindeutet, dass schon heterozygote Mutationen in *vps18* die Entwicklung von neutrophilen Granulozyten in Zebrafischlarven beeinträchtigen.

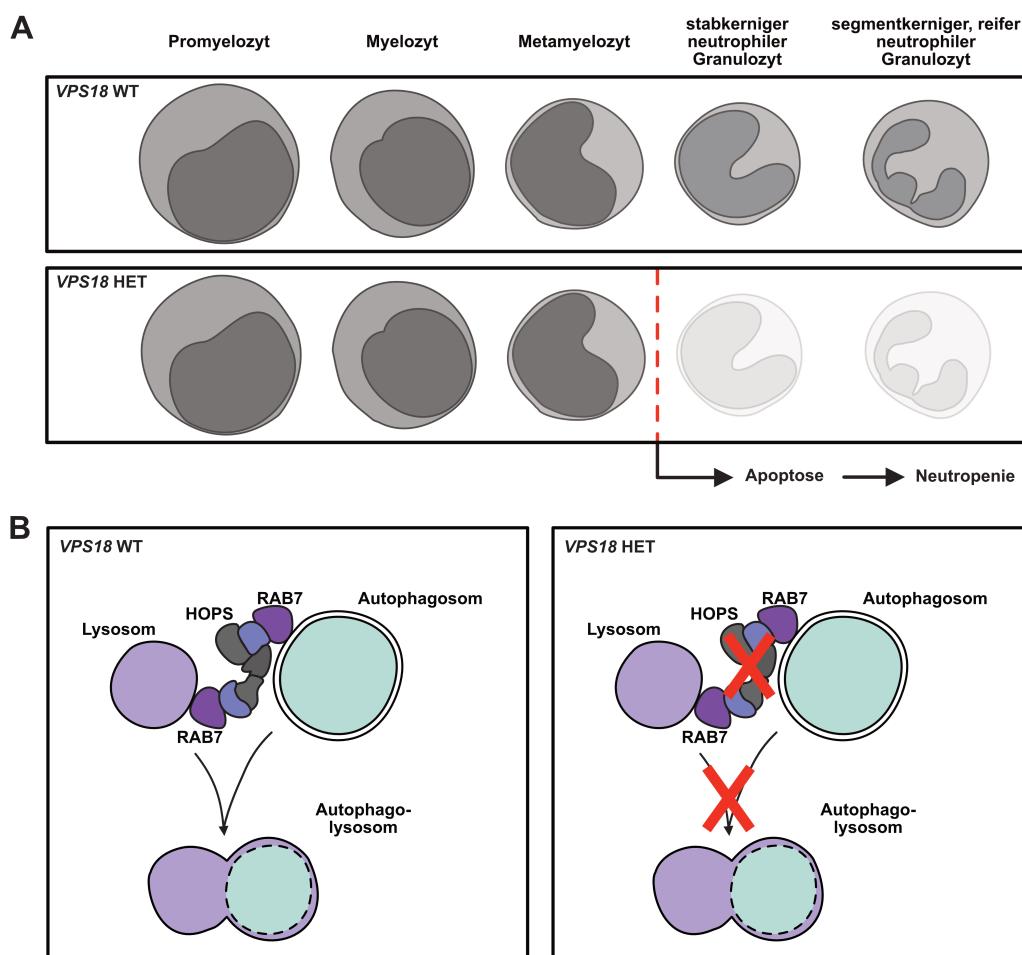


Abbildung 11. Zelluläre und molekulare Effekte von heterozygoten Mutationen in *VPS18*. **(A)** Heterozygote Mutationen in *VPS18* führen während der Granulozytenentwicklung zur Apoptose in Vorläuferzellen von neutrophilen Granulozyten und folglich zu einer Neutropenie. **(B)** Auf molekularer Ebene führen diese Mutationen zur Instabilität von CORVET/HOPS Komplexen, so dass vermutlich die Fusion von Vesikeln, insbesondere von Autophagosomen mit Lysosomen gestört ist und letztlich zur Induktion des Zelltods führen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass heterozygote Mutationen in *VPS18* während der Granulopoiese zu einer späten Reifungsstörung in Vorläuferzellen von neutrophilen Granulozyten führen. Die Entwicklung von Metamyelozyten zu stabkernigen neutrophilen Granulozyten ist gestört und führt zur Apoptose der unreifen neutrophilen Granulozyten, die wir als verfrüht definiert haben. Durch die daraus resultierende unzureichende Bildung von neutrophilen Granulozyten entsteht folglich eine Neutropenie (**Abbildung 11A**). Auf molekularer Ebene erzeugten die heterozygoten Mutationen in *VPS18* eine Instabilität der CORVET und HOPS Komplexe, so dass die Fusion von Vesikeln, insbesondere von Autophagosomen mit Lysosomen, gestört waren. Infolgedessen kam es zur Akkumulation von Autophagosomen und zur Reduktion von Lysosomen und letztlich zur Induktion des Zelltods (**Abbildung 11B**). Somit konnte dieser erste Teil der Habilitationsschrift einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der molekularen Mechanismen bei der Entwicklung neutrophiler Granulozyten leisten.

4.2 Molekulare Regulatoren der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten während der akuten Entzündungsreaktion

Zugeordnete Publikationen

Bader A, Winkelmann M, Forné I, Walzog B, **Maier-Begandt** D. (2022) Decoding the signaling profile of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) in innate immunity: A proteomic approach. *Eur J Immunol* 52:760-9. IF 5,4

Zehrer A, Pick R, Salvermoser M, Boda A, Miller M, Stark K, Weckbach LT, Walzog B, **Begandt** D. (2018) A fundamental role of Myh9 for neutrophil migration in innate immunity. *J Immunol* 201:1748-64. IF 4,718

Pick R*, **Begandt** D*, Stocker TJ, Salvermoser M, Thome S, Böttcher RT, Montanez E, Harrison U, Forné I, Khandoga AG, Coletti R, Weckbach LT, Brechtelefeld D, Haas R, Imhof A, Massberg S, Sperandio M, Walzog B. (2017) Coronin 1A, a novel player in integrin biology, controls neutrophil trafficking in innate immunity. *Blood* 130:847-58.
*gleichberechtigte Erstautoren. IF 15,132

Wie bereits beschrieben sind β_2 -Integrine essentiell für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten aus dem Blutstrom in das entzündete Gewebe. Dabei ist die Adhäsion an das entzündete Endothel der erste Schritt, der vollständig aktivierte, hochaffine β_2 -Integrine erfordert. Die Regulation der β_2 -Integrine erfolgt über die Bindung von intrazellulären Molekülen an die zytoplasmatischen Domänen ihrer α - und β -Untereinheiten. Unsere Arbeitsgruppe konnte Coronin 1A (CORO1A) als neuen Interaktor von CD18, der β -Untereinheit von β_2 -Integrinen, identifizieren und zeigen, dass CORO1A für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten essentiell ist (Pick et al., 2017). Mittels konfokaler superauflösender (CSRM) und *stimulated emmission depletion* (STED) Mikroskopie konnte die Co-Lokalisierung von CORO1A und CD18 in adhärenten, murinen neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden (**Abbildung 12**). Diese Interaktion konnte in *pull-down*-Analysen mit Peptiden des zytoplasmatischen CD18-Teils und Zelllysaten von humanen neutrophilen Granulozyten verifiziert werden. Unklar ist noch, ob diese Interaktion direkt oder indirekt mithilfe weiterer Proteine erfolgt. In weiteren *live-cell imaging* Experimenten konnte die Co-Lokalisierung von CORO1A mit β_2 -Integrinen spezifisch im hochaffinen, vollständig aktivierten Zustand während des Übergangs vom Rollen zur festen Adhäsion nachgewiesen werden (**Abbildung 12**).

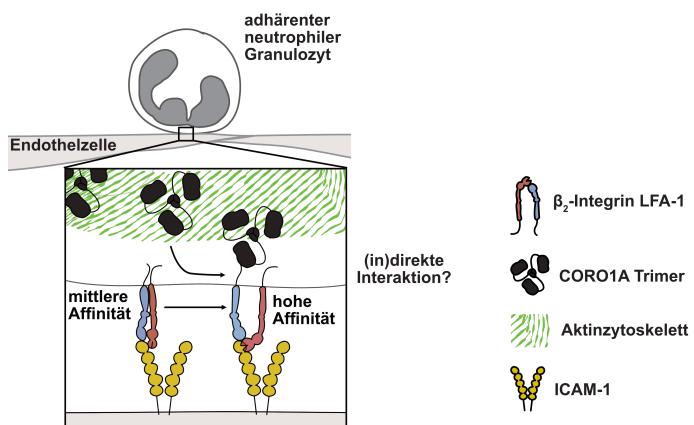


Abbildung 12. Die Interaktion von CORO1A und CD18 erfolgt in adhärenten neutrophilen Granulozyten während des hochaffinen, vollständig aktivierten Zustandes des β_2 -Integrins LFA-1 und verbindet LFA-1 über CORO1A mit dem Aktinzytoskelett.

Dabei war CORO1A sowohl während des Rollens als auch bei der Induktion der Adhäsion durchgehend mit dem kortikalen Aktinzytoskelett co-lokaliert. Daraus lässt sich schließen, dass CORO1A die Affinität der β_2 -Integreine reguliert und diese mit dem Aktinzytoskelett verbindet. Diese Daten weisen auf eine funktionelle Relevanz von CORO1A während der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten hin. Zur Prüfung dieser Hypothese wurden *in vitro* Flusskammer-Experimente zur Analyse der Adhäsion von murinen *Coro1A* Wildtyp (WT) und KO neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Hierbei adhärierten signifikant weniger *Coro1A* KO neutrophile Granulozyten im Vergleich zu *Coro1A* WT Zellen (**Abbildung 13**). In weiteren Versuchen wurde nachgewiesen, dass CORO1A die Affinität von LFA-1 und Mac-1 reguliert und CORO1A somit entscheidend für die Induktion der Adhäsion sowie für die Postadhäsionsschritte von neutrophilen Granulozyten *in vitro* ist. Diese Daten konnten im Mausmodell des entzündeten Cremastermuskels bestätigt werden, in dem in Abwesenheit von CORO1A eine reduzierte Anzahl adhärenter und ausgewanderter Leukozyten im Vergleich zu *Coro1A* WT Mäusen beobachtet werden konnte (**Abbildung 13**) (Pick et al., 2017). Weiterhin konnte in einem Infektionsmodell mit *Helicobacter pylori* in Abwesenheit von CORO1A eine verminderte Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in die Magenschleimhaut beobachtet werden, einhergehend mit einer verminderten Magenentzündung im Vergleich zu infizierten *Coro1A* WT Mäusen. Diese Ergebnisse wurden in *Blood* publiziert (Pick et al., 2017). Als ein weiterer wichtiger Regulator von β_2 -Integrinen wurde vor einiger Zeit das Protein *hematopoietic progenitor kinase 1* (HPK1) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. rer. nat. Barbara Walzog beschrieben (Jakob et al., 2013). HPK1 vermittelt die Induktion des hochaffinen Zustands des β_2 -Integrins LFA-1 nach Stimulation mit

rekombinantem, murinem CXCL1. Hierbei fungiert HPK1 im *inside-out signaling*, da die Umgehung des *inside-out signalings* mit Mn²⁺ die Bindungsfähigkeit des β₂-Integrins LFA-1 an seinen Liganden ICAM-1 in HPK1-defizienten neutrophilen Granulozyten wieder vollständig herstellt.

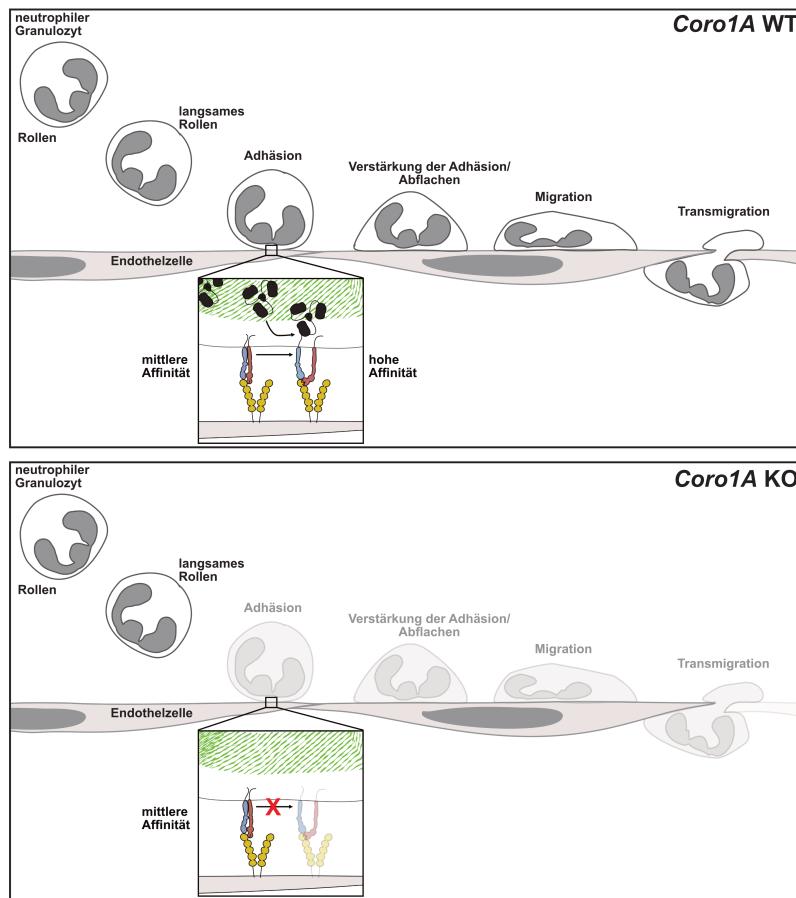


Abbildung 13. CORO1A reguliert die Affinität der β₂-Integrine LFA-1 und Mac-1 und damit die Schritte der Adhäsion sowie Verstärkung der Adhäsion, Migration und Transmigration. In genetischer Abwesenheit von *Coro1A* ist folglich die Adhäsion sowie Auswanderung der neutrophilen Granulozyten verringert.

Im Gegensatz dazu wurde HPK1 in B- und T-Lymphozyten als negativer Regulator von β₂-Integrinen beschrieben (Konigsberger et al., 2010; Patzak et al., 2010). Um diese unterschiedlichen Funktionen von HPK1 aufzuklären, wurden die interagierenden Netzwerke von HPK1 in neutrophilen-ähnlichen, differenzierten (d)HL-60 Zellen ohne sowie nach Stimulation mit Mn²⁺ analysiert (Bader et al., 2022). Hierzu wurden zwei HL-60 Zelllinien generiert, die zum einen das Fusionsprotein HPK1-EGFP und zum anderen nur EGFP exprimierten. Letztere diente als Kontrollzelllinie. Nach der Differenzierung fand eine Co-Immunopräzipitation mittels GFP Nano-Trap Kügelchen von dHL-60 EGFP und dHL-60 HPK1-EGFP Zelllysaten statt, die anschließend massenspektrometrisch analysiert wurden. Von den so identifizierten HPK1 interagierenden Proteinen konnte ein vorgeformtes Cluster von HPK1 in nicht-

aktivierten Zellen identifiziert werden, das Signalproteine wie *DNAX-activation protein 12* (DAP12), *spleen tyrosine kinase* (SYK) und *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (RAC1) enthält, die essentiell für die β_2 -Integrin-Aktivierung sind (**Abbildung 14**) (Glogauer et al., 2003; Mocsai et al., 2006; Mocsai et al., 2002; Schymeinsky et al., 2005). Nach Aktivierung verlässt HPK1 dieses Signalosom und findet sich in einem anderen Proteinnetzwerk mit komplett neuen Interaktionspartnern wieder.

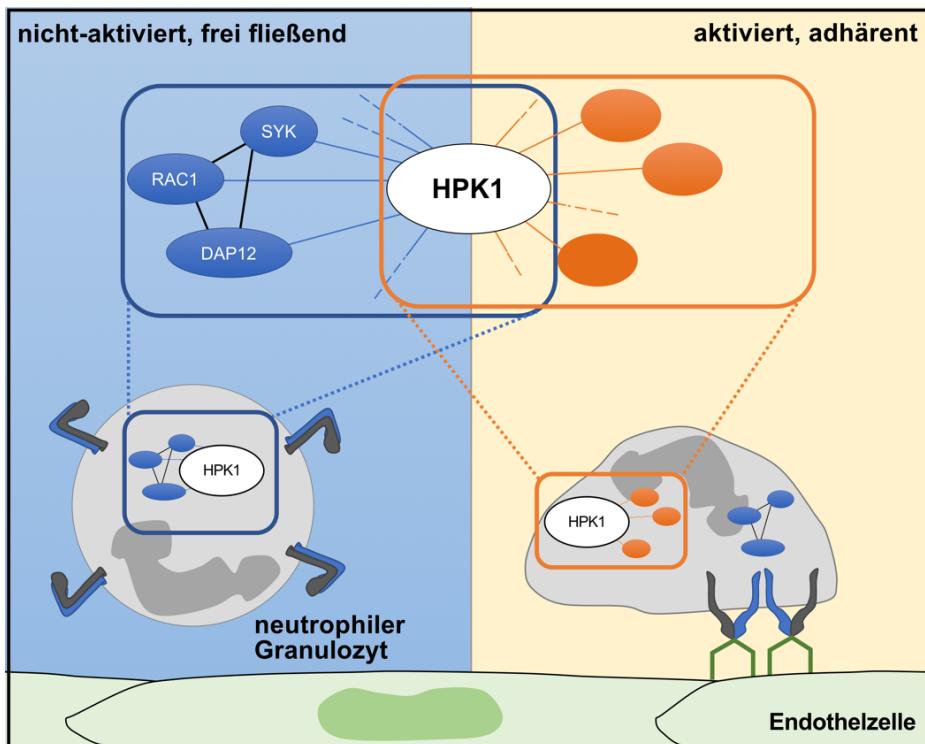


Abbildung 14. Die interagierenden Netzwerke von HPK1 verändern sich in nicht-aktivierten und aktivierten dHL-60 HPK1-EGFP Zellen. HPK1 interagiert in nicht-aktivierten Zellen mit Proteinen, die wichtig während der β_2 -Integrin-Aktivierung sind und findet sich in aktivierten Zellen in neuen Proteinnetzwerken wieder. Abbildung modifiziert aus Bader et al., Eur J Immunol, 2022 (Bader et al., 2022).

Dementsprechend deuten diese Daten darauf hin, dass HPK1 als Gerüstmolekül fungiert, um Proteinkomplexe zur raschen β_2 -Integrin-Aktivierung bereitzuhalten und später mit anderen Proteinen in einem anderen Netzwerk zu agieren. Interessanterweise wurden in diesem Screen HPK1-interagierende Proteine in neutrophilen-ähnlichen Zellen identifiziert, die in B- und T-Lymphozyten noch nicht als HPK1-Interaktionspartner beschrieben wurden, was die unterschiedlichen Funktionen von HPK1 in den verschiedenen Zellen des Immunsystems erklären könnte. Diese Ergebnisse wurden im *European Journal of Immunology* publiziert (Bader et al., 2022).

Während der Rekrutierung spielt das Aktinzytoskelett in neutrophilen Granulozyten eine große Rolle. Nach dem Verstärken der Adhäsion erfolgt die Polarisierung der Zelle. Im Allgemeinen führt die Aktinpolymerisierung im vorderen

Bereich der Zelle, dem sogenannten Lamellipodium, zur Bildung von Protrusionen und erlaubt die Vorwärtsbewegung. Im hinteren Zellbereich, dem sogenannten Uropod führt die Kontraktion des Aktinmyosinnetzwerks zum Zusammenziehen des Uropods und unterstützt die Migration (Lammermann et al., 2008; Renkawitz et al., 2009). Die Rolle von Myosin-9 (*myosin heavy chain 9*, MYH9) für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten konnte in unserer Arbeitsgruppe weiter aufgeklärt werden (Zehrer et al., 2018). MYH9 ist die schwere Kette des Multiproteinkomplexes *nonmuscle myosin class II* (NMII). NMII-Komplexe sind essentiell, um die Polarisierung während der Migration beizubehalten. MYH9 ist in neutrophilen Granulozyten das einzige exprimierte MYH-Protein. Funktionelle Analysen von MYH9 waren bis dato begrenzt auf pharmakologische Inhibitoren. In unserer Studie wurden erstmals neutrophile Granulozyten mit genetischem, heterozygotem Knockout von *Myh9* aus *Vav-iCre⁺/Myh9^{wt/fl}* Mäusen verwendet (heterozygote *Myh9* KO neutrophile Granulozyten) (Zehrer et al., 2018). Neutrophile Granulozyten mit einem homozygoten *Myh9* KO konnten nicht generiert werden, da keine *Vav-iCre⁺/Myh9^{fl/fl}* Mäuse erhalten wurden und vermutlich der komplette KO von *Myh9* in den Vorläuferzellen des hämatopoietischen Systems letal ist. Das Migrationsverhalten von heterozygoten *Myh9* KO neutrophilen Granulozyten wurde in den schon beschriebenen Flusskammern analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass bei reduzierter MYH9-Expression die mechano- und chemotaktische Migration, Transmigration sowie dreidimensionale (3D) Migration signifikant verringert waren. Diese Ergebnisse konnten *in vivo* in einem Laser-induzierten Modell der Hautverletzung sowie bei akuter Peritonitis verifiziert werden und zeigten eine stark verringerte Auswanderung von *Myh9*-defizienten neutrophilen Granulozyten. Aufgrund der Herausforderung der *Vav-iCre⁺/Myh9^{wt/fl}* Mauszucht, haben wir auf das Hoxb8-Zellsystem zurückgegriffen. Zunächst konnten wir nachweisen, dass die aus Hoxb8-Zellen differenzierten neutrophilen Granulozyten (dHoxb8-Zellen) auch ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Rekrutierungskaskade *in vitro* darstellen und nicht nur, wie zuvor beschrieben, ein geeignetes Modell zur Analyse der Granulopoiese sind (Zehrer et al., 2018). dHoxb8-Zellen exprimierten die für die Rekrutierung essentiellen Untereinheiten der β_2 -Integrine in vergleichbaren Mengen und verhielten sich während der Rekrutierungsschritte des Rollens, der Adhäsion sowie der chemo- und mechanotaktischen Migration ähnlich wie murine neutrophile Granulozyten.

Zur weiteren Analyse des Effekts verringriger Mengen von MYH9 auf das Aktinmyosin-Netzwerk, wurden Hoxb8-Zellen aus fetalen Leberzellen von *Vav-iCre*-/*Myh9^{wt/fl}* sowie *Vav-iCre⁺/Myh9^{wt/fl}* Mäusen generiert, die ähnliche Migrationsdefekte wie die murinen heterozygoten *Myh9* KO neutrophilen Granulozyten zeigten (Zehrer et al., 2018). Die heterozygoten *Myh9* KO Hoxb8-Zellen wurden mit einem Plasmid transduziert, das für das Fusionsprotein MYH9-EGFP codiert und anschließend als *Myh9 rescue*-Hoxb8-Zellen definiert. Mittels STED Mikroskopie sowie *live-cell imaging* Studien von *Myh9 rescue*-dHoxb8-Zellen konnte gezeigt werden, dass MYH9 während der Migration am Lamellipodium sowie am Uropod lokalisiert. Hierbei dient es vor allem der Retraktion von Protrusionen sowie des Uropods zur gerichteten Migration (**Abbildung 15**). Diese Ergebnisse wurden im *Journal of Immunology* publiziert (Zehrer et al., 2018).

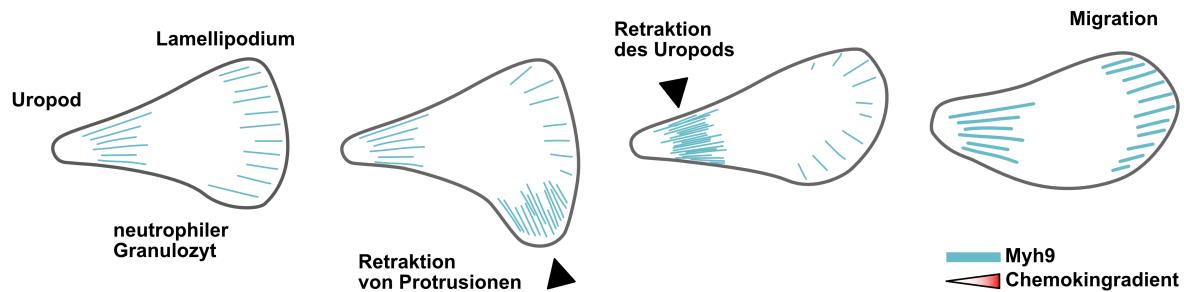


Abbildung 15. Zelluläre Lokalisation von MYH9 während der Migration von neutrophilen Granulozyten. Pfeilspitzen indizieren die Retraktion von Protrusionen bzw. des Uropods. Abbildung modifiziert aus Zehrer et al., J Immunol, 2018 (Zehrer et al., 2018).

4.3 Der funktionelle Einfluss von CD18 auf die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Zebrafischlarven

Zugeordnete Publikation

Bader A, Gao J, Rivière T, Schmid B, Walzog B, **Maier-Begandt D.** (2021) Molecular Insights Into Neutrophil Biology From the Zebrafish Perspective: Lessons From CD18 Deficiency. *Front Immunol.* 12:677994. IF 7,561

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass β_2 -Integrine neben ihrer funktionellen Bedeutung für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in Menschen und Mäusen auch in Zebrafischlarven die Rekrutierung während der akuten Entzündungsreaktion regulieren (Bader et al., 2021). Diese Rekrutierung an den Ort der Entzündung findet in Mäusen hauptsächlich β_2 -Integrin-abhängig aus dem Blutstrom statt. Erst nach der Auswanderung in das umliegende Gewebe wird die interstitielle Migration β_2 -Integrin-unabhängig (Lammermann et al., 2008). Im Larvenstadium des Zebrafisches ist die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten an den Entzündungsort sowohl intravaskulär als auch interstitiell möglich. Grundsätzlich befinden sich neutrophile Granulozyten im gesamten Larvenkörper im Gewebe und migrieren spontan durch das Interstitium (**Abbildung 16**) (Deng & Huttenlocher, 2012). Während einer akuten Entzündung findet die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zunächst aus dem Interstitium sowie vom *caudal hematopoietic tissue* (CHT), dem Ort der Hämatopoiese in Zebrafischlarven, aus statt. In späteren Phasen ab 4 h nach Induktion der Entzündung erfolgt die Rekrutierung wie beim Menschen über das Gefäßsystem (Galdames et al., 2014).

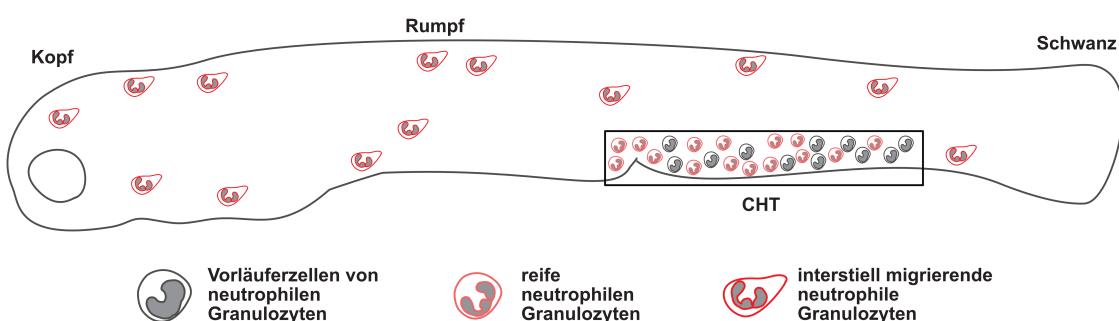


Abbildung 16. In Zebrafischlarven findet die Hämatopoiese im *caudal hematopoietic tissue* (CHT) statt. Reife neutrophile Granulozyten befinden sich im Gewebe und migrieren spontan während der Homöostase durch das Gewebe. Während der akuten Entzündung werden neutrophile Granulozyten zunächst interstitiell, zu späteren Zeitpunkten auch über das Gefäßsystem an den Ort der Entzündung rekrutiert.

Um die Rolle von β_2 -Integrinen für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten im Zebrafisch aufzuklären, wurde das Gen *itgb2*, das für die β -Untereinheit CD18 codiert, in der zuvor beschriebenen transgenen Linie *Tg(fli1a:egfp;lyz:dsRed)* mittels CRISPR/Cas9-Technik ausgeschaltet. Zwei verschiedene CD18 KO Linien (*Tg(fli1a:egfp;lyz:dsRed;itgb2^{-/-})* KO1 und KO2) wurden für die Analysen verwendet (Bader et al., 2021). In den nachfolgenden Abbildungen ist beispielhaft nur KO1 gezeigt. CD18 KO Larven zeigten bis 5 dpf ebenso wie die CD18 WT Larven eine phänotypisch normale Entwicklung sowie eine unveränderte Gesamtanzahl von neutrophilen Granulozyten (**Abbildung 17**).

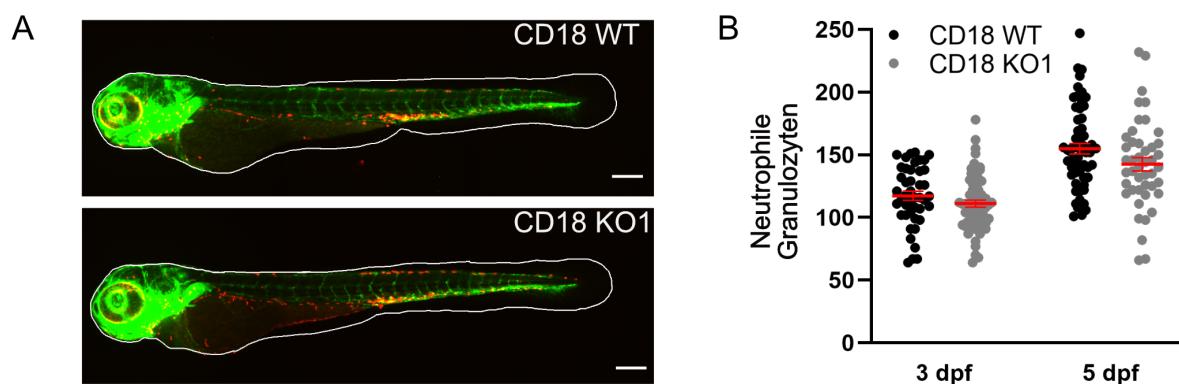


Abbildung 17. Analyse der Gesamtzahl von neutrophilen Granulozyten in CD18 WT und KO Zebrafischlarven. (A) Mikroskopische Aufnahmen von CD18 WT und KO Zebrafischlarven an 3 dpf. Endothelzellen, grün. Neutrophile Granulozyten, rot. Maßstabsskala, 200 µm. (B) Gesamtzahl der neutrophilen Granulozyten in CD18 WT und CD18 KO Zebrafischlarven an 3 und 5 dpf. Abbildung modifiziert aus Bader et al., Front Immunol, 2021 (Bader et al., 2021).

Um die Rolle von CD18 für die interstitielle Migration aufzuklären, wurden zunächst die Verteilung der neutrophilen Granulozyten innerhalb der Larven sowie die spontane Migration der neutrophilen Granulozyten im Gewebe charakterisiert (**Abbildung 18**). Die Verteilung der neutrophilen Granulozyten innerhalb von Kopf, Rumpf und Schwanz zeigte keine Unterschiede zwischen CD18 WT und KO Larven (**Abbildung 18A**). Mittels *live-cell imaging* am konfokalen Spinning-Disk-Mikroskop wurde die spontane Migration von neutrophilen Granulozyten unter nicht-inflammatorischen Bedingungen in der Kopfregion dokumentiert und ihre Migrationsgeschwindigkeit ermittelt (**Abbildung 18B**). Hierbei zeigten sich ebenfalls keine Unterschiede in der Migrationsgeschwindigkeit zwischen CD18 WT und KO Larven. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass β_2 -Integrine entbehrlich für die interstitielle Migration in Zebrafischlarven sind. Dies ist im Einklang mit Beobachtungen aus Mausmodellen, die zeigen, dass β_2 -Integrine für die interstitielle Leukozytenmigration nicht erforderlich sind (Lammermann et al., 2008). Im nächsten Schritt wurde die Rekrutierung der

neutrophilen Granulozyten zum Ort der Entzündung nach einer sterilen Schnittverletzung analysiert (**Abbildung 19A**). Während in den ersten 3 h nach einer Schwanzflossenverletzung keine Unterschiede in der Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zwischen CD18 WT und KO Larven beobachtet wurden, zeigte sich nach 6 h eine signifikant reduzierte Anzahl von neutrophilen Granulozyten am Ort der Entzündung der CD18 KO Larven im Vergleich zu CD18 WT Larven.

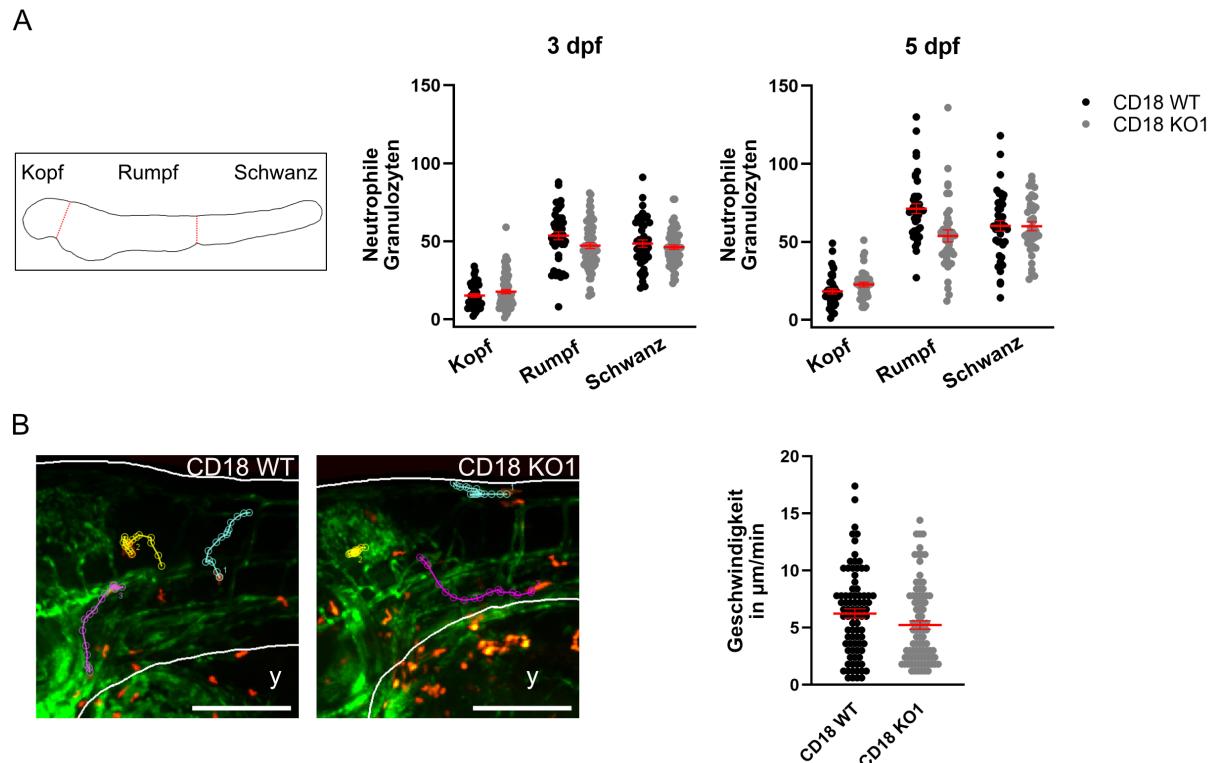


Abbildung 18. Analyse der interstitiellen Migration von neutrophilen Granulozyten in CD18 WT und KO Zebrafischlarven. (A) Schematische Darstellung der Aufteilung einer Zebrafischlarve in Kopf, Rumpf und Schwanz (links) und Quantifizierung der Anzahl neutrophiler Granulozyten in den entsprechenden Abschnitten (rechts). (B) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen sowie *single cell migration tracks* einzelner neutrophiler Granulozyten in der Kopfregion (links) und Quantifizierung der Geschwindigkeit einzelner neutrophiler Granulozyten (rechts) an 5 dpf. Y, Dottersack (*yolk*). Abbildung modifiziert aus Bader et al., Front Immunol, 2021 (Bader et al., 2021).

In vorherigen Studien in Zebrafischlarven wurde gezeigt, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in einem Zeitraum bis zu 4 h nach Verletzung interstitiell und erst ab 4 h nach Verletzung die Rekrutierung vermehrt aus dem Gefäßsystem erfolgt (Galdames et al., 2014). Damit deuten unsere Ergebnisse darauf hin, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Blutstrom CD18-abhängig ist. Interessanterweise konnte 6 h nach Verletzung eine erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Blutstrom nachgewiesen werden (**Abbildung 19B**).

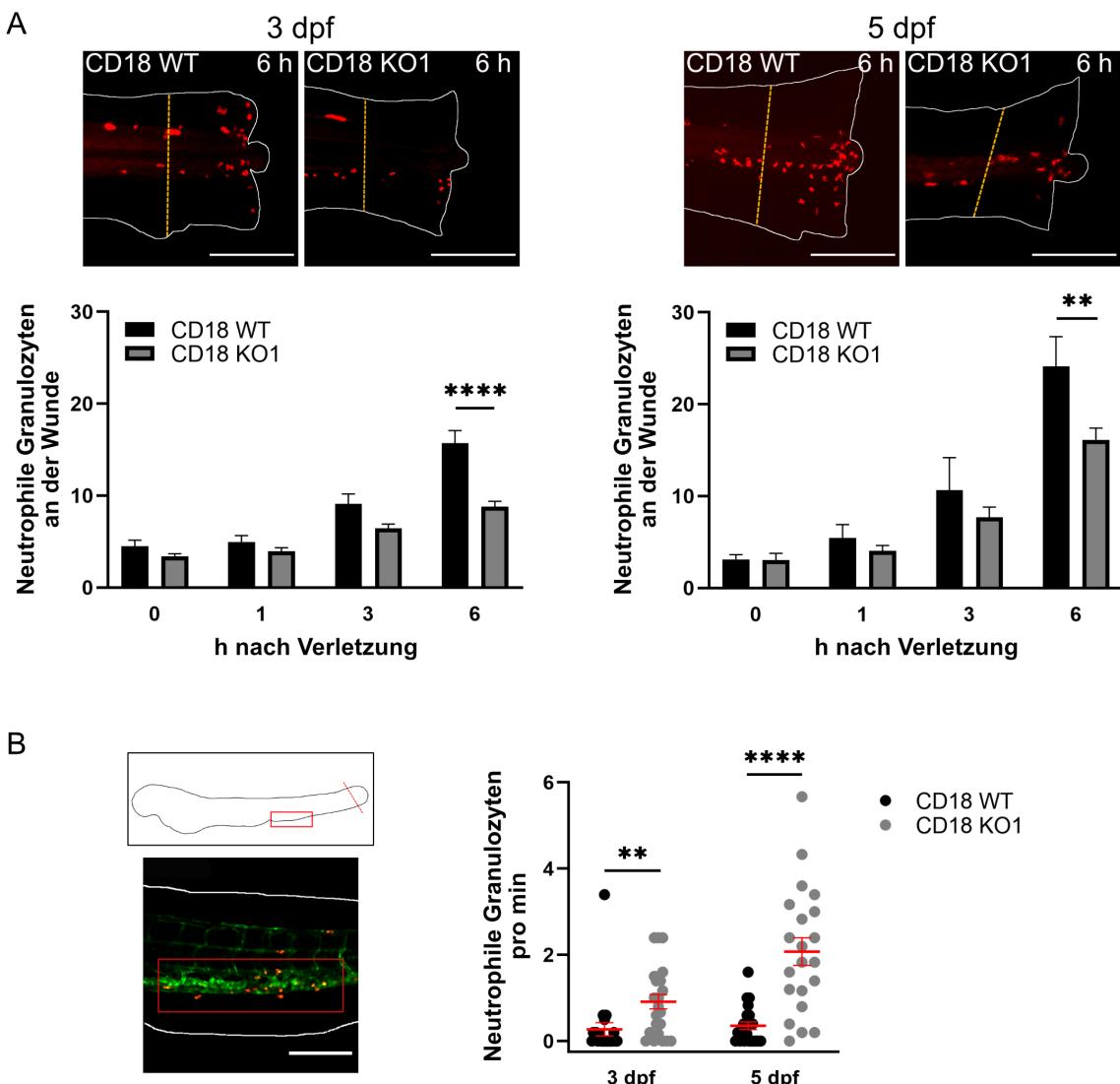


Abbildung 19. Rekrutierung neutrophiler Granulozyten während der akuten Entzündungsreaktion in CD18 WT und KO Zebrafischlarven an 3 und 5 dpf. (A) Repräsentative mikroskopische Aufnahmen der verletzten Schwanzflosse (oben) sowie die Quantifizierung der rekrutierten neutrophilen Granulozyten 0, 1, 3 und 6 h nach Verletzung (unten). (B) Links: Schematische Darstellung (oben) sowie repräsentative mikroskopische Aufnahme (unten) des Untersuchungsortes der *Vena cava caudalis* zur Quantifizierung intravaskulärer neutrophiler Granulozyten nach Verletzung der Schwanzflosse. Rechts: Quantifizierung intravaskulärer neutrophiler Granulozyten 6 h nach Verletzung. Abbildung modifiziert aus Bader et al., Front Immunol, 2021 (Bader et al., 2021).

Dementsprechend deutet die verringerte Anzahl neutrophiler Granulozyten am Ort der Entzündung sowie die erhöhte Anzahl an neutrophilen Granulozyten im Blutstrom möglicherweise auf eine beeinträchtigte Extravasation CD18-defizienter neutrophiler Granulozyten in das Gewebe hin (**Abbildung 20**). Dieser Phänotyp ähnelt dem der LAD Typ I beim Menschen sowie CD18-defizienter Mäuse, bei denen ebenfalls eine erhöhte Anzahl von neutrophilen Granulozyten im Blut vorliegt (Anderson et al., 1985; Walzog et al., 1999). In Menschen und Mäusen wird die Neutrophilie allerdings nicht nur durch die Unfähigkeit der neutrophilen Granulozyten Auszuwandern hervorgerufen, sondern auch durch den unterbrochenen Feedbackmechanismus, bei

dem durch die fehlenden neutrophilen Granulozyten im Gewebe die Granulopoiese im Knochenmark verstärkt wird (Forlow et al., 2001; Stark et al., 2005). Interessanterweise deuten Ergebnisse in Zebrafischen daraufhin, dass ein KD von CD18 zu einer Expansion von hämatopoietischen, pluripotenten Stammzellen im CHT führen könnte, so dass CD18 auch in diesem Modell möglicherweise zur Beeinflussung der Hämatopoiese beiträgt (Xue et al., 2019).

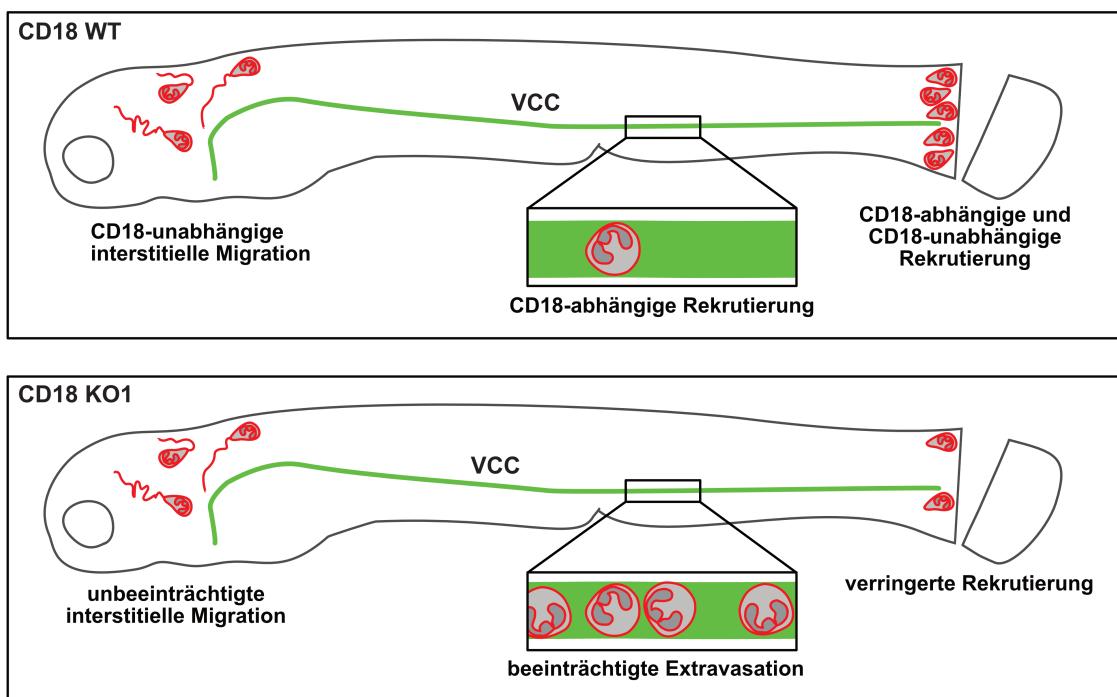


Abbildung 20. Die interstitielle Migration neutrophiler Granulozyten ist CD18-unabhängig, wohingegen die intravaskuläre Rekrutierung CD18 abhängig ist. In genetischer Abwesenheit von CD18 ist die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zum Ort der sterilen Entzündung an der Schwanzflosse verringert und ihre Anzahl in der Vena cava caudalis (VCC) erhöht. Letzteres ist vermutlich ein Resultat der beeinträchtigten Extravasation neutrophiler Granulozyten in Abwesenheit von CD18.

Zusammenfassend wurde im Rahmen dieser Studie erstmals gezeigt, dass die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten über den Blutstrom während der akuten Entzündungsreaktion im Modellsystem Zebrafisch genauso wie im humanen und murinen System abhängig von CD18 ist, während die interstitielle Migration in allen drei Systemen unabhängig von CD18 erfolgt (**Abbildung 20**). Dementsprechend konnte mit dieser Studie nachgewiesen werden, dass das Zebrafischmodell phänotypisch den Symptomen von LAD Typ I Patienten ähnelt und die CD18 KO Zebrafischlarven somit ein neues Modell zur Erforschung der LAD Typ I darstellen könnten. Diese Ergebnisse wurden in *Frontiers in Immunology* publiziert (Bader et al., 2021).

5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Habilitationsarbeit wurden neue Erkenntnisse zu den präzise regulierten Prozessen der Bildung und Funktion neutrophiler Granulozyten gewonnen. Störungen dieser Prozesse können zu angeborenen Neutropenien oder zu LADs führen (Klein, 2011; Roos et al., 2023). Im Gegensatz dazu kann es bei hyperaktiven neutrophilen Granulozyten zu Gewebsschädigungen kommen (Mortaz et al., 2018). Das bessere Verständnis dieser molekularen Mechanismen stellt somit einen potentiellen therapeutischen Ansatz für die Behandlung der oben genannten Erkrankungen dar.

Im ersten Teil dieser Habilitationsarbeit konnte gezeigt werden, dass Mutationen in *VPS18* die Entwicklung neutrophiler Granulozyten beeinträchtigen, indem die Komplexstabilität von CORVET und HOPS verringert wird, wodurch eine Störung in der Vesikelhomöostase entsteht und schließlich eine verfrühte Apoptose eingeleitet wird (Gao et al., 2025). Damit konnte *VPS18* als neues Protein identifiziert werden, das essentiell für die Homöostase neutrophiler Granulozyten ist und Mutationen in *VPS18* können dementsprechend zu einer angeborenen Neutropenie führen.

Im zweiten Teil dieser Habilitationsarbeit wurden weitere wichtige Proteine charakterisiert, die die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten regulieren (Bader et al., 2022; Pick et al., 2017; Zehrer et al., 2018). Wir konnten CORO1A als neuen Interaktionspartner von CD18 identifizieren, der die Affinität der β_2 -Integrine LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) regulieren kann und somit entscheidend für die Induktion der Adhäsion sowie für die Postadhäsionsschritte von neutrophilen Granulozyten *in vitro* und *in vivo* ist (Pick et al., 2017). Zusätzlich konnten wir für den schon bekannten β_2 -Integrin-Regulator HPK1 die Interaktionspartner vor und nach Integrinaktivierung entschlüsseln (Bader et al., 2022). Hierbei stellte sich heraus, dass HPK1 vermutlich als Gerüstmolekül dient, dass Proteine wie DAP12, SYK und RAC1 zur schnellen β_2 -Integrin-Aktivierung bereithält. Darüber hinaus wurde in einem genetischen Ansatz die Rolle von MYH9 für die Migration von neutrophilen Granulozyten genauer definiert (Zehrer et al., 2018). Hierbei wurde festgestellt, dass MYH9 spezifisch an retraktierenden Lammellipodien und am retraktierenden Uropod lokalisiert und für die schnelle Migration neutrophiler Granulozyten bedeutsam ist.

Im letzten Teil der Habilitationsarbeit wurde gezeigt, dass β_2 -Integrine für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten nicht nur in Menschen und Mäusen essentiell

sind, sondern dass β_2 -Integrine ebenfalls in Zebrafischlarven die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten aus dem Gefäßsystem während der akuten Entzündungsreaktion vermitteln, während die interstitielle Migration in allen drei Systemen unabhängig von β_2 -Integrinen ist (Bader et al., 2021).

Wie im Rahmen dieser Habilitationsarbeit gezeigt wurde, sind die Generierung und die Funktion von neutrophilen Granulozyten präzise regulierte Prozesse, deren molekulare Mechanismen nur unzureichend aufgeklärt sind. In Rahmen des von der DFG geförderten Teilprojekts „*Host-pathogen interactions in neutrophils*“ des Sonderforschungsbereichs (SFB)-Transregios (TRR)332 „*Neutrophils: origin, fate & function*“ wird die funktionelle Rolle von CORO1A für die Abwehr von Pathogenen durch neutrophile Granulozyten untersucht. Dieses Projekt beruht auf Daten aus der in dieser Habilitationsarbeit aufgeführten Publikation. Hierbei konnte im Infektionsmodell mit *Helicobacter pylori* in Abwesenheit von CORO1A neben der verminderten Einwanderung neutrophiler Granulozyten in die Magenschleimhaut, bei ca. 40 % der *Coro1A* KO-Mäuse eine komplett Eliminierung des ansonsten chronisch infizierenden Pathogens *H. pylori* beobachtet werden (Pick et al., 2017). Dies deutet auf eine Rolle von CORO1A während der Abwehr von *H. pylori* hin. Tatsächlich ist bereits bekannt, dass in infizierten Makrophagen die Pathogene *H. pylori* sowie *Mycobacterium tuberculosis* CORO1A in den Wirtszellen manipulieren, um dem Phagozytose- und Autophagie-vermitteltem Abbau zu entkommen (Ferrari et al., 1999; Jayachandran et al., 2007; Zheng & Jones, 2003). Die Rolle von CORO1A in neutrophilen Granulozyten bei der Abwehr beider Pathogene ist derzeit unbekannt. Als Mitverantwortliche des Forschungsvorhabens (Co-Teilprojektleiterin mit Prof. Dr. rer. nat. Barbara Walzog) möchte ich die Rolle von neutrophilen Granulozyten während der Pathogenabwehr von *H. pylori* und *Mycobacterium* Spezies weiter aufklären und die Manipulation von CORO1A durch diese Pathogene analysieren. Zur weiteren Aufklärung der Funktion von CORO1A wurde das Interaktom von CORO1A ermittelt und das *secretory carrier associated membrane protein 3* (SCAMP3) als ein neuer Interaktionspartner identifiziert (Pick et al., 2017). Die funktionelle Bedeutung von SCAMP3 ist in neutrophilen Granulozyten noch nicht beschrieben. Im zweiten Teil des TRR332-Teilprojekts soll daher die Rolle von SCAMP3 bei der Pathogenabwehr charakterisiert werden. Erste Ergebnisse in neutrophilen Granulozyten, die mit *Scamp3* KO Hoxb8-Zellen generiert wurden, deuten darauf hin, dass SCAMP3 für die korrekte Proteinausstattung der Granula unerlässlich ist und die Abwesenheit von

SCAMP3 in neutrophilen Granulozyten zu einer Beeinträchtigung der Eliminierung von Bakterien führt.

Insgesamt hat diese Arbeit dazu beigetragen, die molekularen Mechanismen der Bildung und Funktion neutrophiler Granulozyten weiter aufzuklären sowie das Verständnis der physiologischen Funktionen der untersuchten Proteine zu verbessern. Dies wiederum bildet die Grundlage, um potentielle und individualisierte Therapieansätze von u. a. aber nicht ausschließlich monogenen Erkrankungen, also Erkrankungen, denen ein spezifischer Gen- bzw. Proteindefekt zugrunde liegt, zu entwickeln. Patienten mit kongenitalen Neutropenien beispielsweise erhalten klassischerweise eine GCSF-Therapie zur Stimulation der Produktion von neutrophilen Granulozyten, um die ANC anzuheben. Sprechen Patienten nicht auf diese Therapie an ist die Ultima-Ratio-Therapie eine Stammzelltransplantation. Nicht immer findet sich jedoch ein passender Spender oder die Transplantation ist aufgrund diverser Risikofaktoren nicht durchführbar. Eine gezielte Gentherapie zur Behandlung von kongenitalen Neutropenien erfolgt noch nicht, allerdings wurde kürzlich eine kurative Gentherapie für Neutropeniepatienten mit Mutationen in *ELANE* vorgeschlagen (Nasri et al., 2024). Dieser Therapieansatz beruht auf dem Wissen um die physiologische Funktion des Proteins sowie die pathophysiologischen Auswirkungen des mutierten Proteins. Mittels CRISPR/Cas9-basierter Gentherapie soll in Patienten gezielt die Expression des *ELANE*-Gens ausgeschaltet werden, um die negativen Folgen des mutierten Proteins auf die Reifung neutrophiler Granulozyten zu eliminieren. Vielversprechende Versuche mit hematopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen von Patienten mit kongenitaler Neutropenie zeigten nach dieser gentherapeutischen Behandlung eine normale Neutrophilenreifung (Nasri et al., 2024). Eine sehr ähnliche Behandlung wurde zuvor schon in Patienten mit β-Thalassämie und Sichelzellenanämie erfolgreich durchgeführt (Frangoul et al., 2021). Diese beiden monogenen Erkrankungen entstehen in den meisten Fällen durch Genmutationen in der Hämoglobin-β-Untereinheit, so dass als Folge die Hämoglobinbildung gestört ist, die Patienten an Sauerstoffmangel leiden und dauerhaft Bluttransfusionen benötigen. Eine kurative Behandlung bestand zuvor nur in einer Stammzelltransplantation. Nun konnte mittels CRISPR/Cas9-basierter, individualisierter Gentherapie die Expression von fetalem Hämoglobin induziert werden, das die Funktion des Sauerstofftransports übernimmt, so dass die Patienten nicht mehr auf Bluttransfusionen angewiesen sind (Frangoul et al., 2021). Mithilfe dieser individuellen Gentherapien könnten zukünftig

weitere monogene Erkrankungen kurativ behandelt werden, gerade wenn eine Stammzelltransplantation durch fehlende Spender oder diverse Risikofaktoren nicht durchführbar ist.

Neben der Behandlung von monogenen Erkrankungen kann das bessere Verständnis der physiologischen Funktion von Proteinen ebenfalls zur Behandlung von weiteren inflammatorischen Erkrankungen verwendet werden. So werden derzeit pharmakologische Inhibitoren der HPK1-Kinaseaktivität in klinischen Studien der Phase 1 und 2 getestet (Zhu et al., 2022). Im Gegensatz zu neutrophilen Granulozyten, in denen HPK1 das β_2 -Integrin *signaling* positiv reguliert, inhibiert HPK1 in T- und B-Zellen das β_2 -Integrin sowie T- und B-Zellrezeptor *signaling* und mindert damit die Aktivierung dieser Zellen (Baker et al., 2009; Konigsberger et al., 2010; Patzak et al., 2010). Weiterhin verringert HPK1 über seine Kinaseaktivität die antitumorigene Aktivität von T- und dendritischen Zellen (Hernandez et al., 2018; Liu et al., 2019). Dementsprechend wurde in den letzten Jahren die pharmakologische Inhibierung der HPK1-Kinaseaktivität als potentielle Zielstruktur in der Krebstherapie identifiziert (Sawasdikosol & Burakoff, 2020; Si et al., 2020). Interessanterweise ist nicht bekannt, ob die Kinaseaktivität von HPK1 oder lediglich eine Kinase-unabhängige Gerüstfunktion von HPK1 eine Rolle während der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten spielt. Da die verminderte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten mit wiederkehrenden Infektionen einhergeht, wird die Rolle der HPK1-Kinaseaktivität für die Regulierung von β_2 -Integrinen in neutrophilen Granulozyten und deren Rekrutierung derzeit in meinem Team charakterisiert.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Entschlüsselung der molekularen Mechanismen und der physiologischen Funktionen der in dieser Habilitationsarbeit untersuchten Moleküle in neutrophilen Granulozyten die Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze darstellt. Diese könnten zukünftig dazu beitragen, dass monogene Erkrankungen kurativ mittels individualisierter, gentechnischer Therapien behandelt werden können.

6 Literaturverzeichnis

- Amsterdam, A., Nissen, R. M., Sun, Z., Swindell, E. C., Farrington, S., & Hopkins, N. (2004). Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(35), 12792-12797. doi:10.1073/pnas.0403929101
- Anderson, D. C., Schmalsteig, F. C., Finegold, M. J., Hughes, B. J., Rothlein, R., Miller, L. J., Kohl, S., Tosi, M. F., Jacobs, R. L., Waldrop, T. C., & et al. (1985). The severe and moderate phenotypes of heritable Mac-1, LFA-1 deficiency: their quantitative definition and relation to leukocyte dysfunction and clinical features. *J Infect Dis*, 152(4), 668-689. doi:10.1093/infdis/152.4.668
- Bader, A., Gao, J., Riviere, T., Schmid, B., Walzog, B., & Maier-Begandt, D. (2021). Molecular Insights Into Neutrophil Biology From the Zebrafish Perspective: Lessons From CD18 Deficiency. *Front Immunol*, 12, 677994. doi:10.3389/fimmu.2021.677994
- Bader, A., Winkelmann, M., Forne, I., Walzog, B., & Maier-Begandt, D. (2022). Decoding the signaling profile of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) in innate immunity: A proteomic approach. *Eur J Immunol*, 52(5), 760-769. doi:10.1002/eji.202149283
- Baker, R. G., Hsu, C. J., Lee, D., Jordan, M. S., Maltzman, J. S., Hammer, D. A., Baumgart, T., & Koretzky, G. A. (2009). The adapter protein SLP-76 mediates "outside-in" integrin signaling and function in T cells. *Mol Cell Biol*, 29(20), 5578-5589. doi:10.1128/MCB.00283-09
- Bardoel, B. W., Kenny, E. F., Sollberger, G., & Zychlinsky, A. (2014). The balancing act of neutrophils. *Cell Host Microbe*, 15(5), 526-536. doi:10.1016/j.chom.2014.04.011
- Bialik, S., Dasari, S. K., & Kimchi, A. (2018). Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death. *J Cell Sci*, 131(18). doi:10.1242/jcs.215152
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*, 33(5), 657-670. doi:10.1016/j.jimmuni.2010.11.011
- Brocker, C., Kuhlee, A., Gatsogiannis, C., Balderhaar, H. J., Honscher, C., Engelbrecht-Vandre, S., Ungermaann, C., & Raunser, S. (2012). Molecular architecture of the multisubunit homotypic fusion and vacuole protein sorting (HOPS) tethering complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(6), 1991-1996. doi:10.1073/pnas.1117797109
- Christoffersson, G., & Phillipson, M. (2018). The neutrophil: one cell on many missions or many cells with different agendas? *Cell Tissue Res*, 371(3), 415-423. doi:10.1007/s00441-017-2780-z
- Cowland, J. B., & Borregaard, N. (2016). Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev*, 273(1), 11-28. doi:10.1111/imr.12440
- Deng, Q., & Huttenlocher, A. (2012). Leukocyte migration from a fish eye's view. *J Cell Sci*, 125(Pt 17), 3949-3956. doi:10.1242/jcs.093633

- Evrard, M., Kwok, I. W. H., Chong, S. Z., Teng, K. W. W., Becht, E., Chen, J., Sieow, J. L., Penny, H. L., Ching, G. C., Devi, S., Adrover, J. M., Li, J. L. Y., Liong, K. H., Tan, L., Poon, Z., Foo, S., Chua, J. W., Su, I. H., Balabanian, K., Bachelerie, F., Biswas, S. K., Larbi, A., Hwang, W. Y. K., Madan, V., Koeffler, H. P., Wong, S. C., Newell, E. W., Hidalgo, A., Ginhoux, F., & Ng, L. G. (2018). Developmental Analysis of Bone Marrow Neutrophils Reveals Populations Specialized in Expansion, Trafficking, and Effector Functions. *Immunity*, 48(2), 364-379 e368. doi:10.1016/j.immuni.2018.02.002
- Fan, Z., Kiosses, W. B., Sun, H., Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Zajonc, D. M., Arnaout, M. A., Gutierrez, E., Groisman, A., Ginsberg, M. H., & Ley, K. (2019). High-Affinity Bent beta(2)-Integrin Molecules in Arresting Neutrophils Face Each Other through Binding to ICAMs In cis. *Cell Rep*, 26(1), 119-130 e115. doi:10.1016/j.celrep.2018.12.038
- Fan, Z., McArdle, S., Marki, A., Mikulski, Z., Gutierrez, E., Engelhardt, B., Deutsch, U., Ginsberg, M., Groisman, A., & Ley, K. (2016). Neutrophil recruitment limited by high-affinity bent beta2 integrin binding ligand in cis. *Nat Commun*, 7, 12658. doi:10.1038/ncomms12658
- Ferrari, G., Langen, H., Naito, M., & Pieters, J. (1999). A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell*, 97(4), 435-447. doi:10.1016/s0092-8674(00)80754-0
- Forlow, S. B., Schurr, J. R., Kolls, J. K., Bagby, G. J., Schwarzenberger, P. O., & Ley, K. (2001). Increased granulopoiesis through interleukin-17 and granulocyte colony-stimulating factor in leukocyte adhesion molecule-deficient mice. *Blood*, 98(12), 3309-3314. doi:10.1182/blood.v98.12.3309
- Frangoul, H., Altshuler, D., Cappellini, M. D., Chen, Y. S., Domm, J., Eustace, B. K., Foell, J., de la Fuente, J., Grupp, S., Handgretinger, R., Ho, T. W., Kattamis, A., Kurnytsky, A., Lekstrom-Himes, J., Li, A. M., Locatelli, F., Mapara, M. Y., de Montalembert, M., Rondelli, D., Sharma, A., Sheth, S., Soni, S., Steinberg, M. H., Wall, D., Yen, A., & Corbacioglu, S. (2021). CRISPR-Cas9 Gene Editing for Sickle Cell Disease and beta-Thalassemia. *N Engl J Med*, 384(3), 252-260. doi:10.1056/NEJMoa2031054
- Galdames, J. A., Zuniga-Traslavina, C., Reyes, A. E., & Feijoo, C. G. (2014). Gcsf-Chr19 promotes neutrophil migration to damaged tissue through blood vessels in zebrafish. *J Immunol*, 193(1), 372-378. doi:10.4049/jimmunol.1303220
- Gao, J., Bader, A., Linder, M. I., Cheng, J., Richter, M., Zehrer, A., Mitt, K., Popper, B., Meissner, F., Tatematsu, M., Rohlf, M., Frenz-Wiessner, S., Somekh, I., Yacobovich, J., Steinberg-Shemer, O., Somech, R., Soehnlein, O., Schmid, B., Klein, C., Walzog, B., & Maier-Begandt, D. (2025). Mutations in VPS18 lead to a neutrophil maturation defect associated with disturbed vesicle homeostasis. *bioRxiv [Preprint]*, 2025.2008.2015.670286. doi:10.1101/2025.08.15.670286
- Glogauer, M., Marchal, C. C., Zhu, F., Worku, A., Clausen, B. E., Foerster, I., Marks, P., Downey, G. P., Dinauer, M., & Kwiatkowski, D. J. (2003). Rac1 deletion in mouse neutrophils has selective effects on neutrophil functions. *J Immunol*, 170(11), 5652-5657. doi:10.4049/jimmunol.170.11.5652

- Golling, G., Amsterdam, A., Sun, Z., Antonelli, M., Maldonado, E., Chen, W., Burgess, S., Haldi, M., Artzt, K., Farrington, S., Lin, S. Y., Nissen, R. M., & Hopkins, N. (2002). Insertional mutagenesis in zebrafish rapidly identifies genes essential for early vertebrate development. *Nat Genet*, 31(2), 135-140. doi:10.1038/ng896
- Graham, S. C., Wartosch, L., Gray, S. R., Scourfield, E. J., Deane, J. E., Luzio, J. P., & Owen, D. J. (2013). Structural basis of Vps33A recruitment to the human HOPS complex by Vps16. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(33), 13345-13350. doi:10.1073/pnas.1307074110
- Hall, C., Flores, M. V., Storm, T., Crosier, K., & Crosier, P. (2007). The zebrafish lysozyme C promoter drives myeloid-specific expression in transgenic fish. *BMC Dev Biol*, 7, 42. doi:10.1186/1471-213X-7-42
- Hernandez, S., Qing, J., Thibodeau, R. H., Du, X., Park, S., Lee, H. M., Xu, M., Oh, S., Navarro, A., Roose-Girma, M., Newman, R. J., Warming, S., Nannini, M., Sampath, D., Kim, J. M., Grogan, J. L., & Mellman, I. (2018). The Kinase Activity of Hematopoietic Progenitor Kinase 1 Is Essential for the Regulation of T Cell Function. *Cell Rep*, 25(1), 80-94. doi:10.1016/j.celrep.2018.09.012
- Hunter, M. R., Scourfield, E. J., Emmott, E., & Graham, S. C. (2017). VPS18 recruits VPS41 to the human HOPS complex via a RING-RING interaction. *Biochem J*, 474(21), 3615-3626. doi:10.1042/BCJ20170588
- Jakob, S. M., Pick, R., Brechtefeld, D., Nussbaum, C., Kiefer, F., Sperandio, M., & Walzog, B. (2013). Hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) is required for LFA-1-mediated neutrophil recruitment during the acute inflammatory response. *Blood*, 121(20), 4184-4194. doi:10.1182/blood-2012-08-451385
- Jayachandran, R., Sundaramurthy, V., Combaluzier, B., Mueller, P., Korf, H., Huygen, K., Miyazaki, T., Albrecht, I., Massner, J., & Pieters, J. (2007). Survival of mycobacteria in macrophages is mediated by coronin 1-dependent activation of calcineurin. *Cell*, 130(1), 37-50. doi:10.1016/j.cell.2007.04.043
- Klein, C. (2011). Genetic defects in severe congenital neutropenia: emerging insights into life and death of human neutrophil granulocytes. *Annu Rev Immunol*, 29, 399-413. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101259
- Kolehmainen, J., Black, G. C., Saarinen, A., Chandler, K., Clayton-Smith, J., Traskelin, A. L., Perveen, R., Kivistie-Kallio, S., Norio, R., Warburg, M., Fryns, J. P., de la Chapelle, A., & Lehesjoki, A. E. (2003). Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am J Hum Genet*, 72(6), 1359-1369. doi:10.1086/375454
- Kollner, I., Sodeik, B., Schreek, S., Heyn, H., von Neuhoff, N., Germeshausen, M., Zeidler, C., Kruger, M., Schlegelberger, B., Welte, K., & Beger, C. (2006). Mutations in neutrophil elastase causing congenital neutropenia lead to cytoplasmic protein accumulation and induction of the unfolded protein response. *Blood*, 108(2), 493-500. doi:10.1182/blood-2005-11-4689
- Konigsberger, S., Peckl-Schmid, D., Zaborsky, N., Patzak, I., Kiefer, F., & Achatz, G. (2010). HPK1 associates with SKAP-HOM to negatively regulate Rap1-

mediated B-lymphocyte adhesion. *PLoS One*, 5(9).
doi:10.1371/journal.pone.0012468

Kwok, I., Becht, E., Xia, Y., Ng, M., Teh, Y. C., Tan, L., Evrard, M., Li, J. L. Y., Tran, H. T. N., Tan, Y., Liu, D., Mishra, A., Liong, K. H., Leong, K., Zhang, Y., Olsson, A., Mantri, C. K., Shyamsunder, P., Liu, Z., Piot, C., Dutertre, C. A., Cheng, H., Bari, S., Ang, N., Biswas, S. K., Koeffler, H. P., Tey, H. L., Larbi, A., Su, I. H., Lee, B., St John, A., Chan, J. K. Y., Hwang, W. Y. K., Chen, J., Salomonis, N., Chong, S. Z., Grimes, H. L., Liu, B., Hidalgo, A., Newell, E. W., Cheng, T., Ginhoux, F., & Ng, L. G. (2020). Combinatorial Single-Cell Analyses of Granulocyte-Monocyte Progenitor Heterogeneity Reveals an Early Uni-potent Neutrophil Progenitor. *Immunity*, 53(2), 303-318 e305. doi:10.1016/j.jimmuni.2020.06.005

Lammermann, T., Bader, B. L., Monkley, S. J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Critchley, D. R., Fassler, R., & Sixt, M. (2008). Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature*, 453(7191), 51-55. doi:10.1038/nature06887

Langenau, D. M., Ferrando, A. A., Traver, D., Kutok, J. L., Hezel, J. P., Kanki, J. P., Zon, L. I., Look, A. T., & Trede, N. S. (2004). In vivo tracking of T cell development, ablation, and engraftment in transgenic zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7369-7374. doi:10.1073/pnas.0402248101

Lawrence, S. M., Corriden, R., & Nizet, V. (2018). The Ontogeny of a Neutrophil: Mechanisms of Granulopoiesis and Homeostasis. *Microbiol Mol Biol Rev*, 82(1). doi:10.1128/MMBR.00057-17

Lawson, N. D., & Weinstein, B. M. (2002). In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol*, 248(2), 307-318. doi:10.1006/dbio.2002.0711

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I., & Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 678-689. doi:10.1038/nri2156

Linder, M. I., Mizoguchi, Y., Hesse, S., Csaba, G., Tatematsu, M., Lyszkiewicz, M., Zietara, N., Jeske, T., Hastreiter, M., Rohlf, M., Liu, Y., Grabowski, P., Ahomaa, K., Maier-Begandt, D., Schwestka, M., Pazhakh, V., Isiaku, A. I., Briones Miranda, B., Blomberg, P., Saito, M. K., Rusha, E., Alizadeh, Z., Pourpak, Z., Kobayashi, M., Rezaei, N., Unal, E., Hauck, F., Drukker, M., Walzog, B., Rappaport, J., Zimmer, R., Lieschke, G. J., & Klein, C. (2023). Human genetic defects in SRP19 and SRPRA cause severe congenital neutropenia with distinctive proteome changes. *Blood*, 141(6), 645-658. doi:10.1182/blood.2022016783

Liu, J., Curtin, J., You, D., Hillerman, S., Li-Wang, B., Eraslan, R., Xie, J., Swanson, J., Ho, C. P., Oppenheimer, S., Warrack, B. M., McNaney, C. A., Nelson, D. M., Blum, J., Kim, T., Fereshteh, M., Reily, M., Shipkova, P., Murtaza, A., Sanjuan, M., Hunt, J. T., & Salter-Cid, L. (2019). Critical role of kinase activity of hematopoietic progenitor kinase 1 in anti-tumor immune surveillance. *PLoS One*, 14(3), e0212670. doi:10.1371/journal.pone.0212670

- Mocsai, A., Abram, C. L., Jakus, Z., Hu, Y., Lanier, L. L., & Lowell, C. A. (2006). Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nat Immunol*, 7(12), 1326-1333. doi:10.1038/ni1407
- Mocsai, A., Walzog, B., & Lowell, C. A. (2015). Intracellular signalling during neutrophil recruitment. *Cardiovasc Res*, 107(3), 373-385. doi:10.1093/cvr/cvv159
- Mocsai, A., Zhou, M., Meng, F., Tybulewicz, V. L., & Lowell, C. A. (2002). Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity*, 16(4), 547-558. doi:10.1016/s1074-7613(02)00303-5
- Mortaz, E., Alipoor, S. D., Adcock, I. M., Mumby, S., & Koenderman, L. (2018). Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. *Front Immunol*, 9, 2171. doi:10.3389/fimmu.2018.02171
- Nasri, M., Ritter, M. U., Mir, P., Dannenmann, B., Kaufmann, M. M., Arreba-Tutusaus, P., Xu, Y., Borbaran-Bravo, N., Klimiankou, M., Lengerke, C., Zeidler, C., Cathomen, T., Welte, K., & Skokowa, J. (2024). CRISPR-Cas9n-mediated ELANE promoter editing for gene therapy of severe congenital neutropenia. *Mol Ther*, 32(6), 1628-1642. doi:10.1016/j.ymthe.2024.03.037
- Ostrowicz, C. W., Brocker, C., Ahnert, F., Nordmann, M., Lachmann, J., Peplowska, K., Perz, A., Auffarth, K., Engelbrecht-Vandre, S., & Ungermaann, C. (2010). Defined subunit arrangement and rab interactions are required for functionality of the HOPS tethering complex. *Traffic*, 11(10), 1334-1346. doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01097.x
- Patzak, I. M., Konigsberger, S., Suzuki, A., Mak, T. W., & Kiefer, F. (2010). HPK1 competes with ADAP for SLP-76 binding and via Rap1 negatively affects T-cell adhesion. *Eur J Immunol*, 40(11), 3220-3225. doi:10.1002/eji.201040313
- Pavlova, E. V., Shatunov, A., Wartosch, L., Moskvina, A. I., Nikolaeva, L. E., Bright, N. A., Tylee, K. L., Church, H. J., Ballabio, A., Luzio, J. P., & Cox, T. M. (2019). The lysosomal disease caused by mutant VPS33A. *Hum Mol Genet*, 28(15), 2514-2530. doi:10.1093/hmg/ddz077
- Peng, C., Ye, J., Yan, S., Kong, S., Shen, Y., Li, C., Li, Q., Zheng, Y., Deng, K., Xu, T., & Tao, W. (2012). Ablation of vacuole protein sorting 18 (Vps18) gene leads to neurodegeneration and impaired neuronal migration by disrupting multiple vesicle transport pathways to lysosomes. *J Biol Chem*, 287(39), 32861-32873. doi:10.1074/jbc.M112.384305
- Peplowska, K., Markgraf, D. F., Ostrowicz, C. W., Bange, G., & Ungermaann, C. (2007). The CORVET tethering complex interacts with the yeast Rab5 homolog Vps21 and is involved in endo-lysosomal biogenesis. *Dev Cell*, 12(5), 739-750. doi:10.1016/j.devcel.2007.03.006
- Pick, R., Begandt, D., Stocker, T. J., Salvermoser, M., Thome, S., Bottcher, R. T., Montanez, E., Harrison, U., Forne, I., Khandoga, A. G., Coletti, R., Weckbach, L. T., Brechtefeld, D., Haas, R., Imhof, A., Massberg, S., Sperandio, M., & Walzog, B. (2017). Coronin 1A, a novel player in integrin biology, controls neutrophil trafficking in innate immunity. *Blood*, 130(7), 847-858. doi:10.1182/blood-2016-11-749622

- Redecke, V., Wu, R., Zhou, J., Finkelstein, D., Chaturvedi, V., High, A. A., & Hacker, H. (2013). Hematopoietic progenitor cell lines with myeloid and lymphoid potential. *Nat Methods*, 10(8), 795-803. doi:10.1038/nmeth.2510
- Renkawitz, J., Schumann, K., Weber, M., Lammermann, T., Pflicke, H., Piel, M., Polleux, J., Spatz, J. P., & Sixt, M. (2009). Adaptive force transmission in amoeboid cell migration. *Nat Cell Biol*, 11(12), 1438-1443. doi:10.1038/ncb1992
- Roos, D., van Leeuwen, K., Madkaikar, M., Kamblji, P. M., Gupta, M., Mathews, V., Rawat, A., Kuhns, D. B., Holland, S. M., de Boer, M., Kanegane, H., Parvaneh, N., Lorenz, M., Schwarz, K., Klein, C., Sherkat, R., Safari, M., Wolach, B., den Dunnen, J. T., Kuijpers, T. W., & Koker, M. Y. (2023). Hematologically important mutations: Leukocyte adhesion deficiency (second update). *Blood Cells Mol Dis*, 99, 102726. doi:10.1016/j.bcmd.2023.102726
- Rydzynska, Z., Pawlik, B., Krzyzanowski, D., Mlynarski, W., & Madzio, J. (2021). Neutrophil Elastase Defects in Congenital Neutropenia. *Front Immunol*, 12, 653932. doi:10.3389/fimmu.2021.653932
- Sadler, K. C., Amsterdam, A., Soroka, C., Boyer, J., & Hopkins, N. (2005). A genetic screen in zebrafish identifies the mutants vps18, nf2 and foie gras as models of liver disease. *Development*, 132(15), 3561-3572. doi:10.1242/dev.01918
- Sawasdikosol, S., & Burakoff, S. (2020). A perspective on HPK1 as a novel immuno-oncology drug target. *eLife*, 9. doi:10.7554/eLife.55122
- Schymeinsky, J., Then, C., & Walzog, B. (2005). The non-receptor tyrosine kinase Syk regulates lamellipodium formation and site-directed migration of human leukocytes. *J Cell Physiol*, 204(2), 614-622. doi:10.1002/jcp.20323
- Seals, D. F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W. T., & Price, A. (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(17), 9402-9407. doi:10.1073/pnas.97.17.9402
- Si, J., Shi, X., Sun, S., Zou, B., Li, Y., An, D., Lin, X., Gao, Y., Long, F., Pang, B., Liu, X., Liu, T., Chi, W., Chen, L., Dimitrov, D. S., Sun, Y., Du, X., Yin, W., Gao, G., Min, J., Wei, L., & Liao, X. (2020). Hematopoietic Progenitor Kinase1 (HPK1) Mediates T Cell Dysfunction and Is a Druggable Target for T Cell-Based Immunotherapies. *Cancer Cell*, 38(4), 551-566 e511. doi:10.1016/j.ccr.2020.08.001
- Skokowa, J., Dale, D. C., Touw, I. P., Zeidler, C., & Welte, K. (2017). Severe congenital neutropenias. *Nat Rev Dis Primers*, 3, 17032. doi:10.1038/nrdp.2017.32
- Sofou, K., Meier, K., Sanderson, L. E., Kaminski, D., Montoliu-Gaya, L., Samuelsson, E., Blomqvist, M., Agholme, L., Gartner, J., Muhlhausen, C., Darin, N., Barakat, T. S., Schlotawa, L., van Ham, T., Asin Cayuela, J., & Sterky, F. H. (2021). Bi-allelic VPS16 variants limit HOPS/CORVET levels and cause a mucopolysaccharidosis-like disease. *EMBO Mol Med*, 13(5), e13376. doi:10.15252/emmm.202013376
- Spang, A. (2016). Membrane Tethering Complexes in the Endosomal System. *Front Cell Dev Biol*, 4, 35. doi:10.3389/fcell.2016.00035

- Stark, M. A., Huo, Y., Burcin, T. L., Morris, M. A., Olson, T. S., & Ley, K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity*, 22(3), 285-294. doi:10.1016/j.immuni.2005.01.011
- Thome, S., Begandt, D., Pick, R., Salvermoser, M., & Walzog, B. (2018). Intracellular beta2 integrin (CD11/CD18) interacting partners in neutrophil trafficking. *Eur J Clin Invest*, 48 Suppl 2, e12966. doi:10.1111/eci.12966
- Vilboux, T., Lev, A., Malicdan, M. C., Simon, A. J., Jarvinen, P., Racek, T., Puchalka, J., Sood, R., Carrington, B., Bishop, K., Mullikin, J., Huizing, M., Garty, B. Z., Eyal, E., Wolach, B., Gavrieli, R., Toren, A., Soudack, M., Atawneh, O. M., Babushkin, T., Schiby, G., Cullinane, A., Avivi, C., Polak-Charcon, S., Barshack, I., Amariglio, N., Rechavi, G., van der Werff ten Bosch, J., Anikster, Y., Klein, C., Gahl, W. A., & Somech, R. (2013). A congenital neutrophil defect syndrome associated with mutations in VPS45. *N Engl J Med*, 369(1), 54-65. doi:10.1056/NEJMoa1301296
- Walzog, B., Scharffetter-Kochanek, K., & Gaehtgens, P. (1999). Impairment of neutrophil emigration in CD18-null mice. *Am J Physiol*, 276(5), G1125-1130. doi:10.1152/ajpgi.1999.276.5.G1125
- Wang, G. G., Calvo, K. R., Pasillas, M. P., Sykes, D. B., Hacker, H., & Kamps, M. P. (2006). Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nat Methods*, 3(4), 287-293. doi:10.1038/nmeth865
- Wartosch, L., Gunesdogan, U., Graham, S. C., & Luzio, J. P. (2015). Recruitment of VPS33A to HOPS by VPS16 Is Required for Lysosome Fusion with Endosomes and Autophagosomes. *Traffic*, 16(7), 727-742. doi:10.1111/tra.12283
- Xue, Y., Liu, D., Cui, G., Ding, Y., Ai, D., Gao, S., Zhang, Y., Suo, S., Wang, X., Lv, P., Zhou, C., Li, Y., Chen, X., Peng, G., Jing, N., Han, J. J., & Liu, F. (2019). A 3D Atlas of Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Expansion by Multi-dimensional RNA-Seq Analysis. *Cell Rep*, 27(5), 1567-1578 e1565. doi:10.1016/j.celrep.2019.04.030
- Yildiz, Y., Kosukcu, C., Aygun, D., Akcaboy, M., Oztek Celebi, F. Z., Tasci Yildiz, Y., Sahin, G., Aytekin, C., Yuksel, D., Lay, I., Ozgul, R. K., & Dursun, A. (2021). Homozygous missense VPS16 variant is associated with a novel disease, resembling mucopolysaccharidosis-plus syndrome in two siblings. *Clin Genet*, 100(3), 308-317. doi:10.1111/cge.14002
- Zehrer, A., Pick, R., Salvermoser, M., Boda, A., Miller, M., Stark, K., Weckbach, L. T., Walzog, B., & Begandt, D. (2018). A Fundamental Role of Myh9 for Neutrophil Migration in Innate Immunity. *J Immunol*, 201(6), 1748-1764. doi:10.4049/jimmunol.1701400
- Zhang, F., Xia, Y., Su, J., Quan, F., Zhou, H., Li, Q., Feng, Q., Lin, C., Wang, D., & Jiang, Z. (2024). Neutrophil diversity and function in health and disease. *Signal Transduct Target Ther*, 9(1), 343. doi:10.1038/s41392-024-02049-y
- Zheng, P. Y., & Jones, N. L. (2003). Helicobacter pylori strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein. *Cell Microbiol*, 5(1), 25-40. doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00250.x

Zhu, Q., Chen, N., Tian, X., Zhou, Y., You, Q., & Xu, X. (2022). Hematopoietic Progenitor Kinase 1 in Tumor Immunology: A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem*, 65(12), 8065-8090. doi:10.1021/acs.jmedchem.2c00172

7 Abkürzungsverzeichnis

ANC	absolute Neutrophilenzahl
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CHT	<i>caudal hematopoietic tissue</i>
CORO1A	Coronin 1A
CORVET	<i>class C core vacuole/endosome tethering</i>
CRISPR	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
CSRM	konfokale superauflösende Mikroskopie
CXCL1	<i>chemokine (C-X-C-motif) ligand-1</i>
CXCR2	C-X-C-Motiv-Chemokinrezeptor 2
DAP12	<i>DNAX-activation protein 12</i>
dpf	<i>days post fertilization</i>
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ELANE	<i>neutrophil expressed elastase</i>
GCSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GMPs	Granulozyten-Monozyten-Progenitoren
HET	heterozygot
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
HOPS	<i>homotypic fusion and vacuole protein sorting</i>
HPK1	<i>hematopoietic progenitor kinase-1</i>
ICAM-1	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
IL-17	Interleukin-17
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen
KO	Knockout
LAD	<i>leukocyte adhesion deficiency</i>
LAMP1	<i>lysosome-associated membrane glycoprotein 1</i>
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
Lyz	Lysozym C
Mac-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MPS	Mukopolysaccharidose
MYH9	Myosin-9
NETs	<i>neutrophil extracellular traps</i>
NMII	<i>nonmuscle myosin class II</i>

RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
SCAMP3	<i>secretory carrier associated membrane protein 3</i>
STED	<i>stimulated emission depletion</i>
SYK	<i>spleen tyrosine kinase</i>
TMRM	Tetramethylrhodamin-Methylester
UMAP	<i>uniform manifold approximation and projection</i>
VCC	<i>Vena cava caudalis</i>
VPS18	<i>vacuolar protein sporting-associated protein 18 homolog</i>
WT	Wildtyp

8 Danksagung

Ein großer Dank gilt Frau Professorin Dr. rer. nat. Barbara Walzog, die mich als Chefin und vor allem Mentorin immer unterstützt und gefördert hat. Vielen Dank! Weiterhin möchte ich mich bei Prof. Dr. med Christian Wahl-Schott für die Übernahme des Vorsitzes meines Fachmentorats sowie für seine Unterstützung bedanken! Ebenfalls danke ich Prof. Dr. med. Christoph Reichel als Mitglieds meines Fachmentorats.

Allen weiteren Beteiligten, vor allem den Mitgliedern der AG Walzog, insbesondere Jincheng Gao, Dr. phil. nat. Robert Pick, Sarah Thome, Dr. med. Michael Winkelmann und Dr. rer. nat. Annette Zehrer, danke ich von Herzen. Herzlich möchte ich mich auch bei allen Kooperationspartnern und Drittmittelgebern bedanken, besonders bei Prof. Dr. med. Dr. sci. nat. Christoph Klein, Dr. rer. nat. Monika Linder, Prof. Dr. rer. nat. Felix Meissner, PD Dr. med. vet. Bastian Popper und Dr. Bettina Schmid.

Weiterhin danke ich meinem ehemaligen Chef und Mentor Prof. Brant Isakson, PhD, der mich in der Zeit an der *University of Virginia* unterstützt und gefördert hat. Darüber hinaus möchte ich meiner Weggefährtin und Kollegin Dr. rer. nat. Almke Bader danken, mit der ich einen Großteil meiner wissenschaftlichen Arbeiten diskutiert und durchgeführt habe. Meinen Kolleginnen Prof. Miranda Good, PhD und Prof. Lauren Biwer, PhD danke ich für den bis heute andauernden, wertvollen Austausch.

Mein Dank gilt vor allem meinem Ehemann Andreas, der mich über die Jahre auf dem Weg zur Habilitation immer unterstützt hat. Ich möchte ebenfalls meinen Eltern danken, die mir den Weg einer akademischen Karriere ermöglicht haben. Herzlich möchte ich meiner Freundin Franziska für die inspirierenden und motivierenden Gespräche danken.

9 Schriftenverzeichnis

9.1 Originalarbeiten als Erst-, oder Letztautorin

- 2022 Bader A, Winkelmann M, Forné I, Walzog B, **Maier-Begandt** D. (2022) Decoding the signaling profile of hematopoietic progenitor kinase 1 (HPK1) in innate immunity: A proteomic approach. *Eur J Immunol* 52:760-9.
IF: 5,4
- 2021 Bader A, Gao J, Rivière T, Schmid B, Walzog B, **Maier-Begandt** D. (2021) Molecular Insights Into Neutrophil Biology From the Zebrafish Perspective: Lessons From CD18 Deficiency. *Front Immunol.* 12:677994.
IF: 7,561
- Maier-Begandt** D, Comstra HS, Molina SA, Krüger N, Ruddiman CA, Chen YL, Chen X, Biwer LA, Johnstone SR, Lohman A, Good ME, DeLallo LJ, Hong K, Bacon H, Yan Z, Sonkusare S, Koval M, Isakson BE. (2021) A venous-specific purinergic signaling cascade initiated by Pannexin 1 regulates TNF α -induced increases in endothelial permeability. *Sci Signal* 14, eaba2940.
IF: 9,517
- 2018 Zehrer A, Pick R, Salvermoser M, Boda A, Miller M, Stark K, Weckbach LT, Walzog B, **Begandt** D. (2018) A fundamental role of Myh9 for neutrophil migration in innate immunity. *J Immunol* 201:1748-64.
IF: 4,718
- 2017 Pick R*, **Begandt** D*, Stocker TJ, Salvermoser M, Thome S, Böttcher RT, Montanez E, Harrison U, Forné I, Khandoga AG, Coletti R, Weckbach LT, Brechtefeld D, Haas R, Imhof A, Massberg S, Sperandio M, Walzog B. (2017) Coronin 1A, a novel player in integrin biology, controls neutrophil trafficking in innate immunity. *Blood* 130:847-58. *gleichberechtigte Erstautoren.
IF: 15,132
- 2015 **Begandt** D*, Bader A*, Antonopoulos GC, Schomaker M, Kalies S, Meyer H, Ripken T, Ngezahayo A. (2015) Gold nanoparticle-mediated (GNOME) laser perforation: a new method for a high-throughput analysis of gap junction intercellular coupling. *J Bioenerg Biomembr* 47: 441-9. *gleichberechtigte Erstautoren.
IF: 2,080
- 2013 **Begandt** D, Bader A, Gerhard L, Lindner J, Dreyer L, Ngezahayo A. (2013) Dipyridamole-related enhancement of gap junction coupling in the GM-7373 aortic endothelial cells correlates with an increase in the amount of connexin 43 mRNA and protein as well as gap junction plaques. *J Bioenerg Biomembr* 45: 409-19.
IF: 2,708
- Begandt** D, Bader A, Dreyer L, Eisert N, Reeck T, Ngezahayo A. (2013) Biphasic increase of gap junction coupling induced by dipyridamole in the rat aortic A-10 vascular smooth muscle cell line. *J Cell Commun Signal* 7: 151-61.
IF: 2,828

- 2010 **Begandt** D, Bintig W, Oberheide K, Schlie S, Ngezahayo A. (2010) Dipyridamole increases gap junction coupling in bovine GM-7373 aortic endothelial cells by a cAMP-protein kinase A dependent pathway. *J Bioenerg Biomembr* 42: 79-84.
IF: 3,637

9.2 Originalarbeiten als Ko-Autorin

- 2024 Ishikawa-Ankerhold H, Busch B, Bader A, **Maier-Begandt** D, Dionisio F, Namineni S, Vladymyrov M, Harrison U, van den Heuvel D, Tomas L, Walzog B, Massberg S, Schulz C, Haas R. (2024) Novel multiphoton intravital imaging enables real-time study of Helicobacter pylori interaction with neutrophils and macrophages in the mouse stomach. *PLoS Pathog* 20(9):e1012580.
IF 5,5 (2023, 2024 update)

- 2023 Schulz B, Schumacher V, Ngezahayo A, **Maier-Begandt** D, Schadzek N, Wilhelm J, Weidner W, Pilatz A, Fietz D, Kliesch S, Schnepel N, Hambruch N, Rode K, Langeheine M, Brehm R. (2023) Analysis of connexin 43, connexin 45 and N-cadherin in the human sertoli cell line FS1 and the human seminoma-like cell line TCam-2 in comparison with human testicular biopsies. *BMC Cancer* 23:232.
IF 3,4 (2023, 2024 update)

Linder MI, Mizoguchi Y, Hesse S, Csaba G, Tatematsu M, Łyszkiewicz M, Ziętara N, Jeske T, Hastreiter M, Rohlfis M, Liu Y, Grabowski P, Ahomaa K, **Maier-Begandt** D, Schwestka M, Pazhakh V, Isiaku AI, Briones Miranda B, Blombery P, Saito MK, Rusha E, Alizadeh Z, Pourpak Z, Kobayashi M, Rezaei N, Unal E, Hauck F, Drukker M, Walzog B, Rappaport J, Zimmer R, Lieschke GJ, Klein C. (2023) Human genetic defects in SRP19 and SRPRA cause severe congenital neutropenia with distinctive proteome changes. *Blood* 141:645-58.

IF 21,0 (2023, 2024 update)

- 2022 Stutte S, Ishikawa-Ankerhold H, Lynch L, Eickhoff S, Nasisionyte S, Guo C, van den Heuvel D, Setzensack D, Colonna M, **Maier-Begandt** D, Weckbach L, Brocker T, Schulz C, Walzog B, von Andrian U. (2022) High-Fat Diet Rapidly Modifies Trafficking, Phenotype, and Function of Plasmacytoid Dendritic Cells in Adipose Tissue. *J Immunol* 208:1445-55.
IF 4,4

- 2020 Werner AC, Weckbach LT, Salvermoser M, Pitter B, Cao J, **Maier-Begandt** D, Forné I, Schnittler HJ, Walzog B, Montanez E. (2020) Coronin 1B Controls Endothelial Actin Dynamics at Cell-Cell Junctions and Is Required for Endothelial Network Assembly. *Front Cell Dev Biol* 8:708.
IF: 6,684

- 2017 Roth H, Samereier M, **Begandt** D, Pick R, Salvermoser M, Brechtel D, Schleicher M, Walzog B, Müller-Taubenberger A. (2017) Filamin A promotes efficient migration and phagocytosis of neutrophil-like HL-60 cells. *Eur J Cell Biol* 96: 553-66.

IF: 2,939

Bader A, Bintig W, **Begandt** D, Klett A, Siller IG, Gregor C, Schaarschmidt F, Weksler B, Romero I, Couraud PO, Hell SW, Ngezahayo A. (2017) Adenosine receptors regulate gap junction coupling of the human cerebral microvascular endothelial cells hCMEC/D3 by Ca²⁺ influx through cyclic nucleotide-gated channels. *J Physiol* 595: 2497-2517.

IF: 4,540

- 2016 Blödow A, **Begandt** D, Bader A, Becker A, Burghard A, Kühne D, Kral A, Ngezahayo A. (2016) ATP-sensitive K⁺ channels (Kir6.1/SUR1) regulate gap junctional coupling in cochlear-supporting cells. *Pflugers Arch* 468: 1215-22.

IF: 3,156

- 2015 Lohman AW, Leskov IL, Butcher JT, Johnstone SR, Stokes TA, **Begandt** D, DeLallo LJ, Best AK, Penuela S, Leitinger N, Ravichandran KS, Stokes KY, Isakson BE. (2015) Pannexin 1 channels regulate leukocyte emigration through the venous endothelium during acute inflammation. *Nat Commun* 6:7965.

IF: 11,329

- 2012 Bintig W, **Begandt** D, Schlingmann B, Gerhard L, Pangalos M, Dreyer L, Hohnjec N, Couraud PO, Romero IA, Weksler BB, Ngezahayo A. (2012) Purine receptors and Ca(2+) signalling in the human blood-brain barrier endothelial cell line hCMEC/D3. *Purinergic Signal* 8: 71-80.

IF: 2,635

- 2011 Pangalos M, Bintig W, Schlingmann B, Feyerabend F, Witte F, **Begandt** D, Heisterkamp A, Ngezahayo A. (2011) Action potentials in primary osteoblasts and in the MG-63 osteoblast-like cell line. *J Bioenerg Biomembr* 43: 311-22.

IF: 2,813

9.3 Kasuistiken/Case Reports

-

9.4 Übersichtsartike/Reviews

- 2023 **Maier-Begandt D***, Alonso-Gonzalez N*, Klotz L*, Erpenbeck L, Jablonska J, Immler R, Hasenberg A, Mueller TT, Herrero-Cervera A, Aranda-Pardos I, Flora K, Zarbock A, Brandau S, Schulz C, Soehnlein O, Steiger S; TRR332 consortium. (2023) Neutrophils - Biology and Diversity. *Nephrol Dial Transplant* gfad266. (Review) *gleichberechtigte Erstautoren.

IF: 4,8 (2023, 2024 update)

- 2020 Rivière T, Bader A, Pogoda K, Walzog B, **Maier-Begandt** D. (2020) Structure and Emerging Functions of LRCH Proteins in Leukocyte Biology. *Front Cell Dev Biol* 8:584134. (Review)

IF: 6,684

- 2018 Salvermoser M, **Begandt** D, Alon R, Walzog B. (2018) Nuclear deformation

during neutrophil migration at sites of inflammation. *Front Immunol* 9:2680. (Review)
IF: 4,716

Thome S, **Begandt** D, Pick R, Salvermoser M, Walzog B. Intracellular β_2 integrin (CD11/CD18) interacting partners in neutrophil trafficking. (2018) *Eur J Clin Invest* 48:e12966. (Review)
IF: 2,784

2017 **Begandt** D, Thome S, Sperandio M, Walzog B. (2017) How neutrophils resist shear stress at blood vessel walls: molecular mechanisms, subcellular structures, and cell-cell interactions. *J Leukoc Biol* 102:699-709. (Review)
IF: 4,224

Begandt D*, Good ME*, Keller AS, DeLallo LJ, Rowley C, Isakson BE, Figueroa XF. (2017) Pannexin channel and connexin hemichannel expression in vascular function and inflammation. *BMC Cell Biol* 18: 2. (Review)
*gleichberechtigte Erstautoren.

IF: 2,769

2015 Shu X, Keller TC 4th, **Begandt** D, Butcher JT, Biwer L, Keller AS, Columbus L, Isakson BE. (2015) Endothelial nitric oxide synthase in the microcirculation. *Cell Mol Life Sci* 72: 4561-75. (Review)
IF: 5,694

Good ME, **Begandt** D, DeLallo LJ, Keller AS, Billaud M, Isakson BE. (2015) Emerging concepts regarding pannexin 1 in the vasculature. *Biochem Soc Trans* 43: 495-501. (Review)
IF: 2,679

9.5 Buchkapitel/Book Chapters

2016 Good ME*, **Begandt** D*, DeLallo LJ, Johnstone SR, Isakson BE. (2016) Small interfering RNA-mediated connexin gene knockdown in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Methods Mol Biol* 1437: 71-82. (Protokoll)
*gleichberechtigte Erstautoren.
IF: NA.

9.6 Sonstige Veröffentlichungen

Artikel auf Preprint-Servern

2025 Bader A, Gao J, Reiter N, Siemes D, Zehrer A, Schmid B, Forné I, Engel DR, Walzog B, **Maier-Begandt** D. (2025) SCAMP3 is essential for proper formation and function of neutrophil granules. *bioRxiv* [Preprint]. 2025.08.15.670532.
IF: NA.

Gao J, Bader A, Linder MI, Cheng J, Richter M, Zehrer A, Mitt K, Popper B, Meissner F, Tatematsu M, Rohlfis M, Frenz-Wiessner S, Somekh I, Yacobovich J, Steinberg-Shemer O, Somech R, Soehnlein O, Schmid B, Klein C, Walzog

B, **Maier-Begandt** D. (2025) Mutations in *VPS18* lead to a neutrophil maturation defect associated with disturbed vesicle homeostasis. *bioRxiv* [Preprint]. 2025.08.15.670286.

IF: NA.

Protokoll-Artikel

2022 Molina SA, **Maier-Begandt** D, Isakson BE, Koval M. (2022) Electrophysiological Measurements of Isolated Blood Vessels. *Bio Protoc* 12:e4359. (Protokoll)

IF: 0,0