



INSTITUT FÜR MOLEKULARE IMMUNOLOGIE UND
EXPERIMENTELLE ONKOLOGIE

Effekte von
Tissue inhibitor of metalloproteinases-1
auf die Homöostase
Neutrophiler Granulozyten

Julia Anna Nwabisa Kobuch

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der
Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Percy A. Knolle
Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. Achim Krüger
2. Univ.-Prof. Dr. Sevil Weinkauf
3. Prof. Dr. Sabine Steffens

Die Dissertation wurde am 17.03.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht
und am 12.10.2016 durch die Fakultät für Medizin angenommen.

Meiner Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGEN	IX
ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	2
I. EINLEITUNG	3
1 Neutrophile Granulozyten.....	3
1.1 Pathogenabwehr durch Neutrophile	3
1.1.1 Neutrophilen-Rekrutierung und -Aktivierung	4
1.1.2 Phagozytose und Eliminierung von Pathogenen.....	5
1.1.3 Neutrophilen-Granulae	6
1.1.4 Regulation weiterer inflammatorischer und immunologischer Prozesse.....	7
1.2 Neutrophile Granulozyten und inflammatorische Erkrankungen.....	8
1.3 Regulation der Neutrophilen-Homöostase	9
1.3.1 Granulopoese im Knochenmark.....	9
1.3.2 Neutrophilen-Freisetzung in die Blutbahn.....	11
1.3.3 Apoptose, Abbau und <i>Feedback</i> -Mechanismen	12
2 Tissue inhibitor of metalloproteinases-1.....	13
2.1 Die Familie der TIMPs.....	13
2.2 Protease-inhibitorische Funktion von TIMP-1.....	15
2.3 Protease-unabhängige Signalübertragung durch TIMP-1 über CD63	16
2.4 Expression und (patho-)physiologische Bedeutung von TIMP-1	17
3 Vorarbeiten und Fragestellung.....	19
II. MATERIAL UND METHODEN	20
1 Material	20
1.1 Versuchstiere.....	20

INHALTSVERZEICHNIS

1.2	Zelllinien.....	20
1.3	Plasmide und virale Vektoren.....	21
1.3.1	Plasmide für lentivirale Vektoren.....	21
1.3.2	Adenovirale Vektoren.....	21
1.4	Antikörper und rekombinante Proteine.....	22
1.4.1	FACS-Antikörper.....	22
1.4.2	Antikörper für IHC und Western Blot.....	22
1.4.3	Antikörper für <i>in vivo</i> -Applikationen.....	22
1.4.4	Rekombinante Proteine.....	23
1.4.5	Enzyme.....	23
1.5	<i>Primer</i> und <i>Probes</i> für qRT-PCR.....	23
1.5.1	<i>Probes</i> und Mastermix.....	23
1.5.2	Primer für Roche Probe Library.....	23
1.6	Zellkultur-Reagenzien.....	24
1.7	Kits.....	24
1.8	Puffer und Lösungen.....	24
1.8.1	Selbst hergestellte Puffer und Lösungen.....	24
1.8.2	Kommerziell erworbene Lösungen.....	25
1.9	Chemikalien.....	25
1.10	Geräte und Software.....	26
1.10.1	Geräte.....	26
1.10.2	Software.....	26
1.11	Sonstige Materialien.....	26
2	Methoden.....	27
2.1	Tierexperimentelle Methoden.....	27
2.1.1	Tierhaltung.....	27
2.1.2	Primärtumor-Modelle.....	27
2.1.3	Adenovirale Transduktion.....	27

2.1.4	Injektion von rekombinantem TIMP-1	28
2.1.5	BrdU-Experimente.....	28
2.1.6	Neutrophilen-Depletion	28
2.1.7	Antikörper-vermittelte Inhibition von CXCR4	28
2.1.8	Probengewinnung	29
2.2	Zellkultur.....	29
2.2.1	Kultivieren und Passagieren der Zelllinien	29
2.2.2	G-CSF-induzierte Differenzierung von 32Dcl3-Zellen.....	30
2.2.3	Inkubation von 32Dcl3-Zellen mit rTIMP-1	30
2.2.4	<i>Knock down</i> von CD63 in 32Dcl3-Zellen.....	30
2.2.5	Herstellung und Amplifikation viraler Vektoren	31
2.2.6	MACS-basierte Isolation und Kultivierung primärer Neutrophiler aus Blut und KM.....	32
2.2.7	Viabilitäts-Assay mit primären Neutrophilen.....	32
2.2.8	Migrations-Assay.....	33
2.3	Durchflusszytometrie	33
2.3.1	Färbung von Oberflächenmarkern auf 32Dcl3-Zellen.....	33
2.3.2	Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen in Blut und KM mittels <i>multi color</i> - Durchflusszytometrie	33
2.3.3	AnnexinV-Färbung auf Blut-Leukozyten	34
2.3.4	BrdU-Färbung in Blut- und KM-Leukozyten	34
2.3.5	Probenmessung und Auswertung	35
2.4	Immunhistochemie	35
2.4.1	Färbung von Neutrophilen oder SDF-1 auf KM-Paraffinschnitten.....	35
2.4.2	Färbung von Neutrophilen auf Gewebe-Cryoschnitten.....	36
2.4.3	DiffQuick-Färbung von Zytospins	36
2.5	Molekularbiologische Methoden	37
2.5.1	RNA-Isolierung aus Knochenmark.....	37
2.5.2	RNA-Isolierung aus 32Dcl3-Zellen	37

INHALTSVERZEICHNIS

2.5.3	Reverse Transkription.....	38
2.5.4	Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR	38
2.6	Proteinbiochemische Methoden	39
2.6.1	ELISA	39
2.6.2	Zytokin-Array	39
2.6.3	Proteinextraktion aus Zellen und Konzentrationsbestimmung	40
2.6.4	SDS-Gelelektrophorese und Western Blot	40
2.7	Datenauswertung und Statistik	41
III.	ERGEBNISSE	42
1	Effekte von TIMP-1 auf die Neutrophilenhomöostase	42
1.1	Hohe systemische TIMP-1-Spiegel induzieren Neutrophilie in Mäusen	42
1.1.1	TIMP-1-Plasmaspiegel korrelieren mit Neutrophilenzahlen im Blut.....	42
1.1.2	Adenoviral erhöhte systemische TIMP-1-Spiegel induzieren Neutrophilie	44
1.2	Ursachen der TIMP-1-induzierten Neutrophilie	46
1.2.1	TIMP-1 hat keine Auswirkungen auf die Überlebensdauer zirkulierender Neutrophiler ...	46
1.2.2	TIMP-1 führt zu keiner direkten Mobilisierung reifer KM-Neutrophiler.....	47
1.2.3	Hohe TIMP-1-Spiegel führen nicht zur Reduktion gespeicherter Neutrophiler.....	49
1.3	Hohe TIMP-1-Spiegel führen zur vermehrten Granulopoese im KM	50
1.3.1	Neutrophilen-Vorläufer sind angereichert im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln	50
1.3.2	Erhöhte Expression typischer Granulopoese-Marker im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln	51
1.3.3	Die Neutrophilen-Neubildung nach systemischer Depletion ist beschleunigt in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln	52
1.3.4	Die TIMP-1-vermittelte Neutrophilie im Blut ist auf vermehrte Reifung proliferierender Neutrophilen-Vorläufer im KM zurückzuführen	53
1.3.5	TIMP-1 steigert nicht die Proliferation von direkten Neutrophilen-Vorläufern	54
1.3.6	TIMP-1 fördert die G-CSF-induzierte Differenzierung von 32Dcl3-Zellen <i>in vitro</i>	56

1.4	Effekte von TIMP-1 auf Granulopoese und Neutrophilie sind unabhängig von der Protease-inhibitorischen Funktion.....	58
1.4.1	TIMP-1 führt nicht zum Anstieg wichtiger Granulopoese-regulierender Zytokine.....	58
1.4.2	Die <i>Signaling</i> -Funktion, nicht aber die Protease-inhibitorische Funktion von TIMP-1 induziert Neutrophilie im Blut.....	60
1.4.3	Die intakte TIMP-1- <i>Signaling</i> -Domäne reicht aus für die Induktion von Granulopoese	61
1.5	TIMP-1 Signalübertragung über CD63 fördert Granulopoese und Neutrophilie	62
1.5.1	In CD63-defizienten Mäusen haben hohe TIMP-1-Spiegel keinen Effekt auf Neutrophile	62
1.5.2	CD63 wird auf der Oberfläche von Neutrophilen-Vorläufern exprimiert.....	63
1.5.3	TIMP-1-induzierte Differenzierung von 32Dcl3-Zellen ist CD63-abhängig	64
1.6	TIMP-1-induzierte Neutrophilie in der Leber	65
1.6.1	Die Rekrutierung von Neutrophilen in die Leber erfolgt durch <i>Signaling</i> über CD63 und ist unabhängig von der Protease-inhibitorischen Funktion von TIMP-1	65
1.6.2	Der zeitliche Verlauf des Neutrophilen-Anstiegs im Blut und in der Leber ist unterschiedlich.....	68
1.7	Die Rolle von CXCR4 bei der TIMP-1-vermittelten Induktion von Neutrophilie	69
2	Effekte hoher systemischer TIMP-1-Spiegel auf weitere Leukozyten-Populationen.....	71
2.1	TIMP-1 hat keinen Einfluss auf B- und T-Lymphozyten im Blut, führt aber zu Veränderungen bei Monozyten und NK-Zellen.....	71
2.2	Megakaryozyten sind angereichert im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln	72
IV.	DISKUSSION	74
1	TIMP-1 als Neutrophilie-fördernder Faktor	74
2	TIMP-1 als Regulator hämatopoetischer Prozesse.....	76
3	Mechanismus der TIMP-1-induzierten Granulopoese: Protease-Inhibition <i>versus</i> direktes <i>Signaling</i> über CD63	80
4	Vergleich der TIMP-1-induzierten Neutrophilie in Blut und Leber	82
	LITERATURVERZEICHNIS.....	86
	DANKSAGUNG	XI
	PUBLIKATIONEN	XIII

INHALTSVERZEICHNIS

ANHANG	XV
1 Bestätigung der chemotaktischen Wirkung von rCXCL6 auf isolierte KM-Neutrophile	XV
2 Überleben von 32Dcl3-Zellen in Abwesenheit von rIL-3	XV
3 Repräsentative FACS-Plots von Blut-Proben	XVI
3.1 CD1 ^{nu/nu} -Mäuse mit HT1080-Tumoren	XVI
3.2 SCID-Mäuse mit NIH3T3-Tumoren	XVII
3.3 <i>Gating</i> -Strategie für verschiedene Blut-Leukozytenpopulationen.....	XVIII
3.4 DBA/2-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach AdT1-Transduktion	XIX
3.5 Mäuse mit adenoviral vermittelter Expression verschiedener TIMP-1-Varianten.....	XX
3.6 CD63- <i>knock out</i> -Mäuse nach AdT1-Transduktion	XXI
4 Repräsentative FACS-Plots zu KM-Proben.....	XXII
4.1 DBA/2-Mäuse nach Transduktion mit AdT1-Varianten	XXII
4.2 C57Bl/6-Mäuse nach Transduktion mit AdT1-Varianten.....	XXIII
Eidesstattliche Erklärung	XXIV

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung der Granulopoese.	11
Abb. 2: Schematische Darstellung der Interaktion des N-Terminus von TIMP-1 mit MMPs.	16
Abb. 3: Manipulation der TIMP-1-Expression in HT1080-Tumoren führt zu unterschiedlich hohen TIMP-1-Plasmaspiegeln in Mäusen.	42
Abb. 4: TIMP-1-Plasmaspiegel korrelieren mit erhöhten Blut-Neutrophilenzahlen in Mäusen mit HT1080-Tumoren.	43
Abb. 5: TIMP-1-Sekretion durch NIH3T3-Tumoren korreliert mit erhöhten Blut-Neutrophilen in SCID-Mäusen.	44
Abb. 6: TIMP-1-Plasmaspiegel in Mäusen nach adenoviraler Transduktion mit AdT1.	44
Abb. 7: Hohe systemische TIMP-1-Spiegel induzieren Neutrophilie in Mäusen.	45
Abb. 8: TIMP-1 hat keinen Einfluss auf die Lebensdauer von Blut-Neutrophilen <i>ex vivo</i> .	46
Abb. 9: TIMP-1 verringert nicht die Apoptoserate von Blut-Neutrophilen <i>in vivo</i> .	47
Abb. 10: Effekte von TIMP-1 auf Neutrophilenmigration <i>ex vivo</i> .	48
Abb. 11: TIMP-1 induziert keine direkte Neutrophilen-Mobilisierung <i>in vivo</i> .	48
Abb. 12: TIMP-1 führt zu keiner Reduktion gespeicherter Neutrophiler im KM.	49
Abb. 13: TIMP-1 führt nicht zur Mobilisierung von Neutrophilen aus der Milz.	50
Abb. 14: Neutrophilen-Vorläufer sind angereichert im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln.	51
Abb. 15: Expression Granulopoese-assoziiierter Gene im KM ist erhöht in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln.	51
Abb. 16: Hohe systemische TIMP-1-Spiegel führen zur vermehrten Granulopoese im KM.	52
Abb. 17: Der TIMP-1-induzierte Neutrophilenanstieg im Blut resultiert aus vermehrter Differenzierung proliferierender KM-Vorläufer.	54
Abb. 18: TIMP-1 steigert nicht direkt die Proliferation unreifer Neutrophiler.	55
Abb. 19: TIMP-1 fördert die Differenzierung von 32Dcl3-Zellen.	57
Abb. 20: TIMP-1-induzierte Signalwege in 32Dcl3-Zellen.	58
Abb. 21: Hohe TIMP-1-Spiegel haben keinen Einfluss auf Granulopoese-regulierende Zytokine.	59
Abb. 22: Induktion von Neutrophilie wird über die <i>Signaling</i> -Funktion von TIMP-1 vermittelt.	61
Abb. 23: Granulopoese wird durch die <i>Signaling</i> -Funktion von TIMP-1 gefördert.	61
Abb. 24: TIMP-1-Effekte auf Neutrophilie und Granulopoese sind in CD63- <i>knock out</i> -Mäusen nicht zu beobachten.	63
Abb. 25: CD63 wird auf der Zelloberfläche von Neutrophilen und Neutrophilen-Vorläufern exprimiert.	64

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 26: CD63 <i>knock down</i> in 32Dcl3-Zellen führt zur Aufhebung der durch TIMP-1 geförderten Differenzierung.	65
Abb. 27: Der TIMP-1-induzierte Neutrophilenanstieg in der Leber ist keine Folge adenoviraler Infektion.	66
Abb. 28: Der TIMP-1-induzierte Neutrophilenanstieg in der Leber wird durch die <i>Signaling</i> -Funktion vermittelt.	67
Abb. 29: Der TIMP-1-induzierte Neutrophilenanstieg in der Leber ist abhängig von CD63.	68
Abb. 30: Zeitlicher Verlauf des TIMP-1-induzierten Neutrophilen-Anstiegs in der Leber.	69
Abb. 31: Systemische CXCR4-Inhibition hemmt die TIMP-1-induzierte Neutrophilie in Leber und Blut.	69
Abb. 32: TIMP-1 hat keinen Einfluss auf CXCR4-Oberflächenspiegel von Neutrophilen.	70
Abb. 33: <i>Gating</i> verschiedener Leukozyten-Populationen im Blut.	71
Abb. 34: Quantifizierung weiterer Leukozyten-Populationen im Blut.	72
Abb. 35: TIMP-1 führt zum Anstieg von Megakaryozyten im KM.	73
Abb. 36: Mögliche Einflüsse von TIMP-1 in der Hierarchie hämatopoetischer Zelldifferenzierung.	78

ABKÜRZUNGEN

ADAM-10	<i>A disintegrin and metalloproteinase-10</i>
AdX	Für X codierender adenoviraler Vektor
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i> (Familie von Transkriptionsfaktoren)
CLP	Allgemeine lymphoide Vorläuferzelle (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMP	Allgemeine myeloide Vorläuferzelle (<i>common myeloid progenitor</i>)
CXCR4	CXC-Chemokinrezeptor-4 (SDF-1-Rezeptor)
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
ElaNe	Neutrophilen-Elastase
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FC	Durchflusszytometrie (<i>flow cytometry</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
GMP	Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzelle (<i>granulocyte monocyte progenitor</i>)
HPC	Hämatopoetische Vorläuferzelle (<i>hematopoietic progenitor cell</i>)
HSC	Hämatopoetische Stammzelle (<i>hematopoietic stem cell</i>)
HSPC	Hämatopoetische Stamm- oder Vorläuferzelle
IL-x	Interleukin-x
i.p.	intraperitoneal (in die Bauchhöhle)
i.v.	intravenös (in die Schwanzvene)
IHC	Immunhistochemie
KM	Knochenmark
LTF	Lactoferrin
MACS	Magnetische Zell-Separation (<i>magnetic cell sorting</i>)
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Intensität (<i>mean fluorescence intensity</i>)
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MP	Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
MT-MMP	Membranständige Matrixmetalloproteinase (<i>membrane-type MMP</i>)
MyRP	strikt-myeloider Vorläufer (<i>myeloid-restricted progenitor</i>)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (<i>natural killer cells</i>)

ABKÜRZUNGEN

N-TIMP-1	N-terminale Domäne von TIMP-1
N-TIMP-1/T2G	N-terminale Domäne von TIMP-1 mit Mutation des Threonin an Position 2 zu Glycin
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PMT	Photoelektronenvervielfacher (<i>photomultiplier tube</i>)
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -Polymerase-Kettenreaktion
rG-CSF	rekombinantes G-CSF-Protein
rIL-3	rekombinantes Interleukin-3-Protein
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RT	Raumtemperatur
rTIMP-1 / rT1	rekombinantes TIMP-1-Protein
s.c.	subkutan (unter die Haut)
SDF-1	<i>Stromal derived factor-1</i> , CXCR4-Ligand
shRNA	<i>short hairpin-RNA</i>
Stat3	<i>Signal transducer and activator of transcription-3</i>
TIMP-1, T1	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases-1</i>
TIMP-1/T2G	TIMP-1-Variante mit Mutation des Threonin an Position 2 zu Glycin
Ü/N	über Nacht
vvTIMP-1	TIMP-1-Variante mit zwei zusätzlichen Valin-Aminosäuren am N-Terminus
WB	Western Blot

ZUSAMMENFASSUNG

Neutrophile Granulozyten sind durch ihre Fähigkeit zur schnellen Freisetzung hochreaktiver mikrobizider Substanzen entscheidende Effektoren bei der Pathogenabwehr und haben eine fundamentale Bedeutung bei der Regulation von Entzündungsreaktionen im Gewebe. Aufgrund ihrer hohen zerstörerischen Kapazität kann eine unkontrollierte und übertriebene Neutrophilenaktivierung aber gravierende Gewebsschädigungen zur Folge haben. Entsprechend sind erhöhte Neutrophilen-Zahlen mit einer Vielzahl inflammatorischer Krankheiten wie Sepsis, Autoimmunerkrankungen und Krebs assoziiert. Die feine Regulation der Neutrophilen-Homöostase ist deshalb essentiell und findet auf mehreren Ebenen - Produktion im Knochenmark (KM), Freisetzung in die Peripherie, sowie durch Überlebensdauer, Verbrauch oder Beseitigung - statt. Zugrundeliegende regulatorische Mechanismen sind im Detail aber noch nicht vollständig geklärt.

Im Rahmen dieser Studie konnte mit *tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) ein neuer Faktor identifiziert werden, der die systemische Neutrophilen-Homöostase beeinflusst. Durch TIMP-1-sezernierende Tumoren oder mittels adenoviralen Gentransfers wurden in Mäusen systemisch erhöhte TIMP-1-Spiegel erzeugt, die ausreichten, um Neutrophilie im Blut und im Lebergewebe zu induzieren. Dies wurde weder durch verlängertes Überleben der Zellen in der Blutbahn, noch durch die direkte Mobilisierung reifer Neutrophiler aus dem KM oder anderen Gewebsspeichern verursacht. Stattdessen waren im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln eine Anreicherung von myeloiden Vorläufern und die vermehrte Expression Granulopoese-assoziiierter Gene zu beobachten. Markierungsexperimente mit BrdU zeigten zudem, dass proliferierende myeloide Vorläufer den Neutrophilen-Anstieg im Blut bedingten. Dabei stimulierte TIMP-1 nicht direkt die Proliferation dieser Vorläufer, förderte aber die G-CSF-abhängige Neutrophilendifferenzierung der Myeloblastenzelllinie 32Dcl3 *in vitro*.

TIMP-1-Varianten, die die Unterscheidung zwischen seiner Protease-inhibitorischen Funktion und der davon unabhängigen direkten *Signaling*-Funktion ermöglichen, zeigten, dass TIMP-1-*Signaling*-notwendig und ausreichend war, um Granulopoese und Neutrophilie zu induzieren. Dazu passend führte die Ablation von CD63, dem bisher einzigen bekannten Rezeptor der TIMP-1-*Signaling*-Domäne, zur Aufhebung der TIMP-1-Effekte auf Granulopoese und Neutrophilie.

Diese Ergebnisse zeigen, dass erhöhte TIMP-1-Spiegel in Mäusen durch *Signaling* über CD63 auf die Neutrophilen-Homöostase wirken. Dies könnte eine Erklärung für Beobachtungen aus der Klinik bieten, wo TIMP-1-Spiegel mit der Schwere und schlechten Prognose zahlreicher Entzündungs-assoziiierter Erkrankungen korrelieren, bei denen Neutrophilie und übermäßige Neutrophilen-Aktivierung maßgeblich zum Krankheitsverlauf beitragen.

SUMMARY

Based on their capability to efficiently release an arsenal of highly reactive microbicidal substances, neutrophils are major immune effectors during pathogen defense, and are crucial for the regulation of inflammatory responses in tissue. On the other hand, uncontrolled or exaggerated activation of these cells can cause severe tissue damage due to their highly destructive capacity. Accordingly, increased neutrophil counts are associated with a variety of inflammatory pathologies including sepsis, auto-immune diseases, or cancer. Thus, a fine-tuned balance of neutrophil homeostasis is crucial and is maintained on several levels - their production in the bone marrow (BM), release into the periphery, their survival, their consumption and/or clearance. However, regulatory mechanisms of neutrophil homeostasis on the different levels are still not completely understood.

In this study, *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) was identified as a new factor that regulates systemic neutrophil homeostasis. TIMP-1-secreting tumors or adenoviral gene transfer led to systemically increased TIMP-1 levels in mice, which were sufficient to induce neutrophilia in peripheral blood and liver tissue. This neutrophilia was not attributed to prolonged survival or direct mobilization of mature neutrophils from the BM or other storage sites. Instead, myeloid progenitors were found to be enriched, and expression of granulopoiesis-associated genes was up-regulated in the BM of mice with high TIMP-1 levels. BrdU pulse-labeling confirmed that proliferating progenitors accounted for TIMP-1-induced neutrophilia. Interestingly, TIMP-1 did not directly stimulate proliferation of these precursors, but was able to promote G-CSF-driven granulocytic differentiation of the myeloblast cell line 32Dcl3 *in vitro*.

TIMP-1 variants that dissect its protease-inhibitory from its direct signaling function revealed that the TIMP-1 signaling domain was necessary and sufficient to augment granulopoiesis and neutrophilia. Consequently, ablation of CD63, the only described receptor for the TIMP-1 signaling domain so far, abolished both enhanced granulopoiesis and TIMP-1-induced neutrophilia.

These findings demonstrate that elevated levels of TIMP-1 in mice impact on neutrophil homeostasis *via* signaling through CD63. This may provide a link to clinical observations that elevated levels of TIMP-1 correlate with high severity and bad prognosis in inflammation-associated malignancies, where neutrophilia or exaggerated neutrophil activation contribute to disease progression.

I. EINLEITUNG

1 Neutrophile Granulozyten

Neutrophile Granulozyten bilden mit 50 - 70 % den größten Anteil weißer Blutzellen im Menschen und sind von fundamentaler Bedeutung bei der Abwehr von Pathogenen und Infektionen, aber auch bei der Regulation von Entzündungsreaktionen und Wundheilung (Mócsai, 2013). Neutrophile sind hochmotile, kurzlebige, im Blut zirkulierende Leukozyten, die morphologisch durch ein granuläres Zytoplasma und charakteristisch segmentierte Zellkerne identifizierbar sind. Sie wurden erstmalig 1887 von Elie Metschnikoff, dem Nobelpreisträger und Entdecker der angeborenen Immunität, beschrieben, als er mit Rosendornen in Seestern-Larven stach und das Einwandern kleiner phagozytischer Zellen mit polymorphen Kernen beobachtete. Schon Metschnikoff postulierte eine wichtige Funktion dieser von ihm als Mikrophagen bezeichneten Zellen in der Pathogen-Abwehr (Kaufmann, 2008). Heute ist bekannt, dass Neutrophile einer der Hauptbestandteile des innate Immunsystems darstellen und als Phagozyten an vorderster Front an der Abwehr verschiedenster Pathogene beteiligt sind (Nathan, 2006).

In gesundem menschlichen Blut zirkulieren zwischen 1500 und 8000 Neutrophile / μl , die im Falle einer Infektion oder Verletzung jederzeit ins Gewebe rekrutiert werden können. Zirkulierende Neutrophile sind terminal differenzierte, nicht proliferierende Effektorzellen mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Stunden (Kumar und Sharma, 2010). Die fundamentale Bedeutung der Neutrophilen im Immunsystem wird aus der dramatisch erhöhten Empfänglichkeit von Patienten mit zu geringen Blut-Neutrophilenzahlen (Neutropenie) gegenüber Infektionskrankheiten deutlich (Bodey et al., 1966; Vento und Cainelli, 2003). Aber auch erhöhte Neutrophilenzahlen (Neutrophilie) sind mit einer Vielzahl von Krankheiten assoziiert, wie im Folgenden noch genauer erläutert wird.

1.1 Pathogenabwehr durch Neutrophile

Wie schon von Metschnikoff beobachtet, sind Neutrophile einer der ersten Zelltypen, die den Ort einer Verletzung oder Infektion erreichen und dort die Verbreitung von Pathogenen und körperfremden Substanzen im Organismus bekämpfen. Dazu sind sie mit einer Reihe hocheffizienter mikrobizider Waffen ausgestattet, die ihnen das schnelle Töten eingedrungener Pathogene ermöglichen. In den letzten Jahren wurde aber zunehmend erkannt, dass die Rolle der Neutrophilen im Immunsystem weit komplexer ist, und dass sie durch Kommunikation mit anderen Immunzelltypen als wichtige Regulatoren vieler inflammatorischer und immunologischer Prozesse fungieren (Kumar und Sharma, 2010; Mayadas et al., 2014).

1.1.1 Neutrophilen-Rekrutierung und -Aktivierung

Um an den Ort einer Infektion zu gelangen, müssen zirkulierende Neutrophile die Blutbahn verlassen und ins Gewebe einwandern. Dieser Prozess dauert nur wenige Minuten bis Stunden (Fauschou und Borregaard, 2003) und geschieht klassischerweise in mehreren Schritten. Initiiert wird die Kaskade durch aktiviertes Endothel, das hohe Spiegel an P- und E-Selektin aufweist, an die auf Neutrophilen konstitutiv exprimierte Liganden binden. Dieser erste Kontakt führt zum Abbremsen der Neutrophilen, die sich anschließend langsam am Endothel entlang fortbewegen, ein Prozess, der als *Rolling* bezeichnet wird (Ley et al., 2007). Dies ermöglicht das gezielte Abtasten der Endotheloberfläche nach inflammatorischen Signalen wie Zytokinen, Pathogenbestandteilen oder Immunkomplexen. Diese induzieren eine erste partielle Aktivierung der Neutrophilen, die sich in der vermehrten Oberflächenexpression verschiedener Adhäsionsmoleküle, insbesondere Integrine der β_2 -Familie wie LAF-1 und Mac-1 (CD11b/CD18), zeigt (Borregaard, 2010). Diese vermittelt schließlich den stabilen Arrest der Neutrophilen am Endothel. Schließlich erfolgt die Transmigration ins Gewebe, wobei die Überwindung der Endothelschicht entweder parazellulär, indem sich Neutrophile zwischen zwei Endothelzellen durchzwängen, oder transzellulär, also durch das Zytoplasma einer Endothelzelle hindurch, stattfindet. Die transzelluläre Extravasation ist seltener und erfordert das Umschließen der Neutrophilen durch die Endothelzelle. Der parazellulären Extravasation geht ein als *Crawling* bezeichneter Prozess voraus, in dem Neutrophile nach geeigneten Extravasationsstellen - häufig an Verzweigungen post-kapillarer Venolen - suchen. Die eigentliche Transmigration erfolgt durch Bildung invasiver Podosomen und durch überwiegend Integrin-vermittelte Interaktion der Neutrophilen mit Adhäsionsmolekülen innerhalb der endothelialen Verbindungsstellen (Borregaard, 2010; Mayadas et al., 2014). Das Durchbrechen der Basalmembran erfordert schließlich die Sekretion von Neutrophilen-Proteasen, sowie den Einsatz verschiedener Integrine und Adhäsionsmoleküle (Borregaard, 2010).

Detaillierte Mechanismen der Neutrophilen-Rekrutierung und -Transmigration variieren für unterschiedliche Organe je nach Beschaffenheit der dortigen Gefäßwand. So wird beispielsweise in der durch sehr enge endotheliale Verbindungen charakterisierten Blut-Hirnschranke die transzelluläre Extravasation bevorzugt. Die Extravasation ins Lungengewebe erfolgt meist schon im hier sehr engen Kapillargewebe, in dem der *Rolling*-Prozess aufgrund des langsamen Blutflusses überflüssig wird (Mayadas et al., 2014). Insbesondere die Neutrophilen-Rekrutierung in die Leber, die ebenfalls überwiegend im sinusoidalen Kapillarsystem stattfindet, unterscheidet sich schon allein aufgrund der porösen Beschaffenheit des dortigen Endothels deutlich von den für andere Organe beschriebenen Mechanismen. Die Adhäsion von Neutrophilen ans hepatische Endothel erfolgt ohne vorheriges *Rolling* und ist komplett unabhängig von Selektinen (McDonald und Kubes, 2012). Darüber hinaus variiert der molekulare Extravasationsmechanismus ins hepatische Gewebe unter septischen

und steril-inflammatorischen Bedingungen erheblich. Während bei Pathogen-unabhängiger Verletzung des Lebergewebes die Adhäsion konventionell über Interaktion des Neutrophilen-Integrinkomplexes Mac-1 mit ICAM-1 erfolgt (McDonald et al., 2010), ist als Reaktion auf die unter septischen Bedingungen hohen hepatischen IL-10-Spiegel Mac-1 auf Neutrophilen herunter reguliert, und die Endotheladhäsion erfolgt hauptsächlich über CD44, das mit Endothel-gebundenem Hyaluronan interagiert (McDonald et al., 2008). Die physiologische Bedeutung dieser unterschiedlichen Rekrutierungsmechanismen ist noch nicht geklärt, es wäre aber möglich, dass sie Auswirkungen auf die Aktivierung der Neutrophilen und deren anschließende Funktion im Gewebe haben (McDonald und Kubes, 2012).

Allgemein zeigen Gewebe-Neutrophile eine höhere Tendenz zur Phagozytose und zum Einsatz ihrer Abwehrmaschinerie, als zirkulierende Neutrophile. Die Regulation der Neutrophileninteraktion mit Endothel stellt somit nicht nur eine ausreichende Präsenz von Neutrophilen am Ort von Infektionen oder Verletzungen sicher, sie ist auch in deren Aktivierung und damit der gezielten Steuerung ihrer Funktion im Gewebe involviert (Borregaard, 2010).

1.1.2 Phagozytose und Eliminierung von Pathogenen

Die vollständige Neutrophilenaktivierung erfolgt im Gewebe und ist durch phagozytotische Aktivität, dem Freisetzen der Granula-Proteine, sowie der Bildung sogenannter NETs (*neutrophil extracellular traps*) charakterisiert, die gemeinsam die Fähigkeit dieser Zellen zur Pathogenzerstörung ausmachen. Die Aktivierung erfolgt über auf der Neutrophilenoberfläche exprimierte Rezeptoren für Zytokine, Pathogenbestandteile (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*), Gewebefragmenten (DAMPs, *damage-associated molecular patterns*) oder Immunkomplexen mit Antikörpern oder Komplement-Bestandteilen (Mayadas et al., 2014).

Die eigentliche Beseitigung der Pathogene geschieht in den meisten Fällen nach phagozytotischer Aufnahme innerhalb der dabei gebildeten Vakuole. Durch Verschmelzen der Vakuole mit Neutrophilen-Granulae, die mit einem Arsenal fertiger Waffen und Enzyme ausgestattet sind, entsteht das sogenannte Phagosom. In der Vakuolenmembran lokalisierte NADPH-Oxidase produziert Sauerstoffradikale und ROS (*reactive oxygen species*) direkt ins Innere des Phagosoms, wo sie durch Myeloperoxidase (MPO) zu noch toxischerer Hyperchlorsäure (HOCl) umgesetzt werden (Segal, 2005). Dies wird ergänzt durch die lokale Produktion von hochreaktivem Stickstoffoxid (NO) durch aus Granulae freigesetzter iNOS (*inducible nitric oxide synthase*). Weitere Enzyme, insbesondere Lactoferrin, Lysozym und α -Defensine, sowie verschiedene Neutrophilen-Proteasen (Reeves et al., 2002) bewirken die Zerstörung von Bakterienmembranen oder essentieller intrazellulärer Pathogenbestandteile (Mayadas et al., 2014; Segal, 2005).

Mit der Beschreibung sogenannter NETs (*neutrophil extracellular traps*) wurde erst kürzlich ein weiterer, extrazellulär ablaufender Mechanismus zur Pathogenabwehr entdeckt (Brinkmann et al.,

EINLEITUNG

2004). Dabei sezernieren Neutrophile ein Netzwerk aus Chromatinfäden, die beladen sind mit einer hohen Konzentration von antibakteriellen Enzymen und Peptiden wie Neutrophilen-Elastase und MPO, sowie pro-inflammatorischen Signalmolekülen (Borregaard, 2010). Pathogene werden in diesen Netzen eingefangen und direkt mit den daran gekoppelten mikrobiziden Substanzen in Kontakt gebracht. NETose, der Prozess der NETs-Sekretion, erfordert die Freisetzung von Granulae-Proteinen, sowie die Auflösung des Neutrophilen-Zellkerns. Sie stellt somit eine Sonderform der Neutrophilen-Apoptose dar, wobei sich NETs-sezernierende von apoptotischen Neutrophilen durch das Fehlen Phagozytose-stimulierender Signale unterscheiden. Es wurde aber sogar beobachtet, dass kernlose Neutrophile noch in der Lage sind, im Gewebe zu migrieren und Bakterien auf konventionelle Weise zu töten (Mayadas et al., 2014). NETs werden schließlich durch DNAsen aus dem Gewebe beseitigt.

Voraussetzung für die effektive Abwehr eingedrungener Pathogene ist die sofortige Initialisierung und der schnelle Ablauf der beschriebenen Abwehrmechanismen. Dies ist unter anderem dadurch gewährleistet, dass im Blut zirkulierende Neutrophile Vorräte anti-bakterieller und proteolytischer Proteine in ihren Granulae gespeichert haben und bei Bedarf sofort einsetzen können (Borregaard et al., 2007).

1.1.3 Neutrophilen-Granulae

Neutrophilen-Granulae sind zytoplasmatische Vesikel unterschiedlicher Größe, die während der Neutrophilen-Reifung im KM gebildet und mit unterschiedlichem Inhalt gefüllt werden. Entsprechend dem Zeitpunkt ihrer Entstehung und der unterschiedlichen Zusammensetzung werden vier Arten von Granulae unterschieden: (1) Primäre oder azurophile Granulae werden als erste gebildet und enthalten hohe Konzentrationen mikrobizider Substanzen, insbesondere das für die ROS-Produktion wichtige Enzym Myeloperoxidase (MPO). (2) Sekundäre oder spezifische Granulae enthalten ebenfalls überwiegend Effektorproteine für die Pathogenabwehr, insbesondere Lysozym und Lactoferrin. (3) Der Inhalt tertiärer oder gelatinolytischer Granulae besteht vor allem aus Proteasen, insbesondere der Gelatinase MMP-9, die für das Einwandern der Zellen ins Gewebe benötigt werden (Borregaard et al., 2007). Primäre, sekundäre und tertiäre Granulae entstehen durch Abspaltung und Fusion von Transport-Vesikeln aus dem Golgi-Apparat. Als letztes werden (4) sekretorische Vesikel gebildet. Diese entstehen durch Endozytose und enthalten überwiegend zytoplasmatische Proteine ohne nennenswerte anti-bakterielle Funktion. Ihre Membran ist aber sehr stark angereichert an verschiedenen Rezeptorproteinen und Adhäsionsmolekülen, die die Adhäsionsfähigkeit zirkulierender Neutrophiler und deren Sensitivität für inflammatorische Stimuli schnell verändern können (Faurischou und Borregaard, 2003).

Welche Proteine in welche Granulae verpackt werden, wird nicht durch in den Proteinen enthaltene Sortierungs-Informationen, sondern durch die zeitlich begrenzte Expression dieser Proteine während der Neutrophilen-Reifung reguliert (Le Cabec et al., 1996).

Entsprechend ihrer Zusammensetzung haben die vier Granulae-Typen unterschiedliche Effektor-Funktionen und kommen gezielt zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Neutrophilen-Aktivierung zum Einsatz. Dies wird durch die unterschiedliche Membranbeschaffenheit der vier Subtypen reguliert. Sekretorische Vesikel haben eine hohe Tendenz zur Exozytose und werden beispielsweise durch Selektine auf aktiviertem Endothel oder durch Chemokine wie IL-8 vollständig mobilisiert. Die Fusion mit der Neutrophilen-Membran erhöht dort die Präsenz von Adhäsionsmolekülen und Rezeptoren, die für das feste Anhaften ans Endothel und die Transmigration benötigt werden (Borregaard, 2010; Sengeløv et al., 1993). Gelatinolytische Granulae werden ebenfalls durch Exozytose sezerniert, haben aber eine höhere Aktivierungsschwelle. Die darin enthaltenen Proteasen helfen am Endothel haftenden Neutrophilen bei der Migration ins Gewebe (Faurischou und Borregaard, 2003; Sengeløv et al., 1993). Die Exozytose primärer und sekundärer Granulae ist stark limitiert (Sengeløv et al., 1993). Ihr mikrobizider Inhalt wird idealerweise ausschließlich ins Phagosom freigesetzt, wo er gezielt das Töten der Pathogene begünstigt, ohne dabei das umliegende Gewebe übermäßig zu schädigen.

Neutrophilen-Granulae sind somit eines der wichtigsten Mittel zur schnellen, effizienten und dennoch regulierten Pathogen-Bekämpfung. Sie ermöglichen es, Proteine in ihrer aktiven Form zu speichern und bei Bedarf sofort freizusetzen. Dadurch kommen Effektormoleküle gezielt dort in hoher Konzentration zum Einsatz, wo sie benötigt werden. Gleichzeitig wird eine Schädigung des körpereigenen Gewebes durch hochreaktive antibiotische Substanzen minimiert (Borregaard et al., 2007).

1.1.4 Regulation weiterer inflammatorischer und immunologischer Prozesse

Neutrophile wurden lange Zeit ausschließlich als reine Effektoren des innaten Immunsystems gesehen, die wenig Einfluss auf die adaptive Immunantwort haben. Neuere Erkenntnisse zeigen aber, dass sie neben ihrer Rolle in der direkten Beseitigung von Pathogenen auch wichtige immunregulatorische Funktionen ausüben (Mócsai, 2013). So sind Neutrophile eine Hauptquelle zentraler inflammatorischer Mediatoren und Signalmoleküle, darunter Komponenten des Komplementsystems, Fc-Rezeptoren und sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Chemokine und Zytokine (Mantovani et al., 2011). Die Kommunikation zwischen Neutrophilen und Makrophagen ist sowohl bei der Initiation als auch beim Beenden inflammatorischer Reaktionen entscheidend. Neutrophile, die als erste an den Ort einer Infektion oder Verletzung gelangen, rekrutieren durch Sekretion von Zytokinen und Granulae-Proteinen Makrophagen und erhöhen deren phagozytotische Aktivität. Andererseits werden Makrophagen durch Phagozytose apoptotischer Neutrophiler dazu stimuliert,

EINLEITUNG

anti-inflammatorische Zytokine freizusetzen, die entscheidend beim Auflösen einer Entzündung sind und Wundheilung fördern (Filardy et al., 2010).

Aktivierete Neutrophile tragen maßgeblich zur T-Zell-unabhängigen Aktivierung von B-Zellen in der Milz bei (Puga et al., 2012) und bilden eine wichtige Quelle B-Zell-stimulierender Zytokine (Mantovani et al., 2011; Schwaller et al., 2007). Auch die Reifung und Aktivierung Dendritischer Zellen (DCs) wird durch direkten Kontakt mit Neutrophilen stimuliert (van Gisbergen et al., 2005; Megiovanni et al., 2006), und viele von Neutrophilen sezernierte Substanzen wirken chemotaktisch auf DCs (Mayadas et al., 2014). Ferner können Neutrophile durch Antigenpräsentation, den Transport von Antigenen in Lymphknoten, oder indirekt über DCs die T-Zellaktivierung steuern (Mócsai, 2013).

Aber auch immunsuppressive Eigenschaften wurden für Neutrophile beschrieben. So inhibiert die Freisetzung von NO, ROS oder Arginase die Proliferation von T-Zellen (Mayadas et al., 2014), und von Neutrophilen sezernierte Substanzen können auch inhibitorisch auf die DC-Reifung und deren Fähigkeit zur T-Zell-Aktivierung wirken (Eken et al., 2008; Maffia et al., 2007). Diese Erkenntnisse zeigen, dass die Rolle von Neutrophilen weit komplexer ist, als ursprünglich angenommen, und dass ihre Funktion im Einzelnen keinesfalls starr, sondern von den jeweiligen Umständen abhängig ist.

1.2 Neutrophile Granulozyten und inflammatorische Erkrankungen

Aufgrund ihrer vielschichtigen Funktionen als Immuneffektoren einerseits und Immunregulatoren andererseits tragen Neutrophile unter physiologischen Bedingungen entscheidend zur Beseitigung körperfremder Bestandteile, Gewebereparatur und Wundheilung bei. Ihr hochreaktives Waffenarsenal wirkt aber relativ unspezifisch und kann bei falschem Einsatz auch massive Schäden des Körpergewebes hervorrufen (Nathan, 2006). Idealerweise ermöglicht das gezielte Freisetzen dieser Waffen ins Phagosom eine lokal hohe Konzentration mikrobizider Substanzen, ohne dabei mit umliegendem Gewebe in Kontakt zu kommen. Phagozytose und Granulae-Fusion laufen dabei innerhalb weniger Sekunden ab, was natürlich einen großen Vorteil für das Verhindern der Pathogenausbreitung darstellt (Segal, 2005). Andererseits bringt dies eine gewisse Fehleranfälligkeit mit sich, die das unkontrollierte Ausschütten des hochreaktiven Granulae-Inhalts ins Gewebe zur Folge hat. So können eine hohe Pathogendichte oder großflächig über geschädigtes Gewebe verteilte DAMPs zum unvollständigen Abkapseln der phagozytischen Vakuole von der Membran führen. Die anschließende Fusion einer solchen nach außen offenen Vakuole mit Granulae hat die Ausschüttung von ROS, Proteasen und mikrobiziden Substanzen ins Gewebe zur Folge (Mayadas et al., 2014). Tatsächlich sind in der Klinik hohe Neutrophilenzahlen mit einem fatalen Verlauf und schlechter Prognose bei systemischer Inflammation und Sepsis assoziiert (Brown und Treacher, 2009; Brown et al., 2006), und Neutrophile gelten als Ursache der Endothelschäden und Blutungen bei

Thrombohämorrhagischer Vaskulitis (Hirahashi et al., 2006). Auch die übermäßige Freisetzung von NETs ist mit verschiedenen Neutrophilen-assoziierten Pathologien wie Nephritis, Vaskulitis oder Sepsis (Mayadas et al., 2014), sowie mit verschiedenen Autoimmunerkrankungen (Németh und Mócsai, 2012; Wright et al., 2014) verbunden. Sogar bei Krebserkrankungen, wo Neutrophile lange Zeit als Tumor-bekämpfende Effektoren galten, können sie durch Modulation der Tumorumgebung (Sionov et al., 2014) oder durch direkte Interaktion mit Tumorzellen (Kitamura et al., 2015; Spicer et al., 2012) die Progression und Metastasierung fördern. Entsprechend sind in Krebspatienten hohe Neutrophilen-Zahlen sowohl im Blut, als auch im Gewebe mit erhöhter Metastasierung, schlechter Prognose und verkürztem Überleben des Patienten assoziiert, wie durch zahlreiche klinische Studien belegt wird (Buonaguro et al., 2015; Donskov, 2013).

Zusammengefasst sind Neutrophile aktiv am Voranschreiten inflammatorischer Krankheiten unterschiedlichster Ursache beteiligt, und zu hohe Neutrophilenzahlen oder eine übermäßige Neutrophilenaktivierung sind mit einer schlechten Prognose assoziiert.

1.3 Regulation der Neutrophilen-Homöostase

Aufgrund ihrer fundamentalen Bedeutung in der Pathogenabwehr einerseits und der Fähigkeit, massive Schädigungen auch gesunden Gewebes zu verursachen andererseits, unterliegt die Neutrophilen-Homöostase unter physiologischen Bedingungen einem fein regulierten Gleichgewicht. Dysbalancen dieses Gleichgewichts in beide Richtungen haben fatale klinische Folgen (Summers et al., 2010).

Die Regulation der Neutrophilen-Homöostase erfolgt auf verschiedenen Ebenen, was die flexible Reaktion auf Änderungen des Neutrophilen-Bedarfs an unterschiedlichen Stellen im Organismus erlaubt. Die wesentlichen Stellschrauben für die Neutrophilen-Gesamtzahl im Organismus sind ihre Produktionsrate im KM, die Freisetzung dort gespeicherter reifer Neutrophiler in die Blutbahn, ihre Überlebensdauer in der Peripherie, und schließlich die Beseitigung apoptotischer Neutrophiler vor allem in Leber, Milz und KM (Mayadas et al., 2014; Strydom und Rankin, 2013).

1.3.1 Granulopoese im Knochenmark

Um dem hohen Durchsatz der kurzlebigen Zellen gerecht zu werden, müssen täglich etwa 10^{11} Neutrophile neu gebildet werden. Bei Auftreten von Infektionen oder Entzündungen steigt dieser Bedarf sogar noch erheblich (Summers et al., 2010). Die Neutrophilen-Produktion, auch Granulopoese genannt, erfolgt im adulten Organismus im KM durch Proliferation und zunehmende Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen und wird im Wesentlichen durch Zytokine gesteuert. Der zentrale und wichtigste Regulator der Granulopoese ist *granulocyte colony stimulating factor* (G-CSF), der sowohl die Festlegung pluripotenter hämatopoetischer Vorläufer auf die

EINLEITUNG

Neutrophilen-Linie fördert, als auch die Proliferation von Neutrophilen-Vorläufern induziert und deren Reifung beschleunigt (Strydom und Rankin, 2013; Summers et al., 2010). Dennoch muss es noch eine Reihe weiterer Granulopoese-induzierender Faktoren geben, da G-CSF-defiziente Mäuse voll funktionelle, reife Neutrophile bilden (Lieschke et al., 1994).

Neutrophile entstehen in extravaskulären Bereichen des KM aus hämatopoetischen Stammzellen (HSCs), die sich durch voranschreitende Differenzierung auf myeloide Zellen, den gemeinsamen Vorläufern von Monozyten und Granulozyten, und schließlich auf die Neutrophilen-Linie festlegen (Strydom und Rankin, 2013; von Vietinghoff und Ley, 2008). Die einzelnen Differenzierungsstadien dieser auf Neutrophile festgelegten Vorläufer sind in Abbildung 1 dargestellt. Myeloblasten sind große Zellen mit einer relativ hohen Proliferationsrate, rundem Zellkern und agranulärem Zytoplasma. Im Myeloblasten-Stadium beginnt die Bildung primärer Granulae, die bis ins frühe Promyelozyten-Stadium abgeschlossen ist. Entsprechend weisen Myeloblasten hohe mRNA-Spiegel an MPO oder Neutrophilen-Elastase, den Hauptbestandteilen primärer Granulae, auf. Im Zytoplasma von Promyelozyten sind diese primären Granulae erkennbar. Die anschließende Bildung sekundärer Granulae beginnt in Promyelozyten und erfolgt überwiegend während des Myelozyten-Stadiums, für das entsprechend eine hohe Expression von Lactoferrin, sowie die zunehmend granuläre Morphologie charakteristisch sind (Borregaard et al., 2007; Theilgaard-Mönch et al., 2005). Mit Voranschreiten des Myelozyten-Stadiums sinkt die Proliferationsrate der Neutrophilen-Vorläufer und der Übergang ins Metamyelozyten-Stadium ist schließlich mit dem endgültigen Austritt aus dem Zellzyklus verbunden (Theilgaard-Mönch et al., 2005). Ab hier findet lediglich die weitere Reifung der Zellen statt. Dazu gehört die allmähliche Veränderung des Zellkerns von rund über nierenförmig (Metamyelozyt) und kreisförmig gebogen (*Band-Zelle*) zur für reife Neutrophile typischen segmentierten Morphologie, sowie die Bildung tertiärer Granulae und sekretorischer Vesikel (Borregaard, 2010; Borregaard et al., 2007).

All diese Differenzierungsschritte werden im Wesentlichen durch Transkriptionsfaktoren - insbesondere durch Vertreter der C/EBP-Familie (*CCAAT enhancer binding proteins*) oder durch PU.1 - gesteuert, die im entsprechenden Reifestadium hoch exprimiert sind und anschließend wieder herunter reguliert werden (Abb. 1, Fiedler und Brunner, 2012). C/EBP α induziert die Expression typischer Neutrophilen-Proteine, darunter die des G-CSF-Rezeptors oder von Neutrophilen-Elastase und MPO, und lenkt die Differenzierung myeloider Vorläufer in Richtung der Granulozytenlinie. C/EBP ϵ stimuliert die Bildung sekundärer Granulae und reguliert - wahrscheinlich zusammen mit C/EBP α - den Zellzyklusaustritt und damit den Übergang in die post-mitotischen Stadien. Die Expression von C/EBP β steigt kontinuierlich mit fortschreitender Reifung, und C/EBP β gilt außerdem als wichtigster Regulator der beschleunigten Notfall-Granulopoese bei erhöhtem Neutrophilenbedarf. PU.1 schließlich steuert die Expression wichtiger Membranproteine und

Adhäsionsmoleküle, allen voran von Mac-1, sowie die für die ROS-Produktion verantwortliche NADPH-Oxidase (Borregaard, 2010; Fiedler und Brunner, 2012).

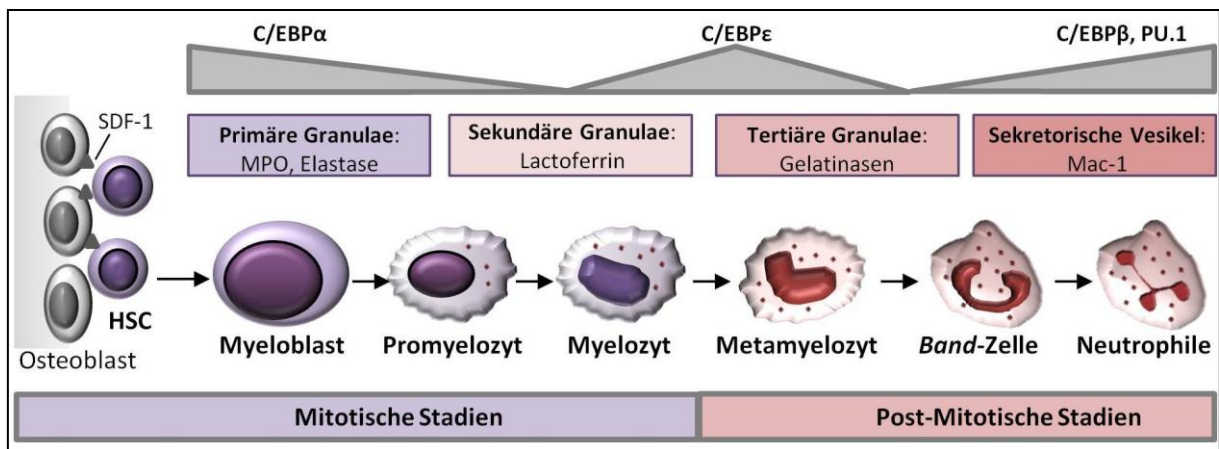


Abb. 1: Schematische Darstellung der Granulopoese. Neutrophile entstehen im KM aus hämatopoetischen Stammzellen durch fortschreitende Differenzierung, die durch die sequenzielle Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Bis zum Myelozyten-Stadium expandieren die Neutrophilen-Vorläufer durch Proliferation, anschließend erfolgt nur noch eine zunehmende Reifung der Zellen. Die Granulae-Produktion beginnt im Promyelozyten-Stadium und endet im *Band*-Stadium. [Modifiziert nach Borregaard, 2010]

Am Ende all dieser Differenzierungsprozesse entstehen im KM reife, voll funktionelle Neutrophile, die sich in ihrem Genexpressionsprofil, sowie in ihrer Funktionalität quasi nicht von Blut-Neutrophilen unterscheiden (Theilgaard-Mönch et al., 2005). Neben der Rolle als Neutrophilen-Produktionsstätte hat das KM eine wichtige Speicherfunktion einsatzbereiter Neutrophiler, die bei Bedarf jederzeit freigesetzt werden können (Strydom und Rankin, 2013).

1.3.2 Neutrophilen-Freisetzung in die Blutbahn

Im gesunden Organismus zirkulieren nur ca. 1-2 % aller Neutrophilen frei in der Blutbahn. Der Hauptanteil von über 90 % ist im KM gespeichert. Im Fall einer Infektion oder Verletzung erlaubt dies die schnelle Mobilisierung der Immuneffektoren in großer Zahl (Day und Link, 2012).

Hauptregulatoren der Neutrophilen-Retention im KM sind *stromal derived factor-1* (SDF-1) und sein Rezeptor CXCR4. SDF-1 wird im KM von verschiedenen stromalen Zellen konstitutiv hoch exprimiert und induziert bei Bindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor CXCR4 ein Retentionssignal in hämatopoetischen Zellen und Neutrophilen (Eash et al., 2009). Ablation oder Hemmung von CXCR4 induziert entsprechend die konstitutive Freisetzung von Neutrophilen, was zu Neutrophilie in der Peripherie und zur allmählichen Reduktion des KM-Speichers führt (Day und Link, 2012). G-CSF induziert neben seiner Granulopoese-stimulierenden Funktion auch die Mobilisierung von KM-Neutrophilen in die Blutbahn, indem es die SDF-1-Expression im KM reduziert und somit die Neutrophilen-Retention verringert (Day und Link, 2012; Strydom und Rankin, 2013). Reife KM-Neutrophile exprimieren geringe, aber detektierbare CXCR4-Spiegel auf ihrer Oberfläche, während

EINLEITUNG

CXCR4 auf der Oberfläche frisch isolierter Blut-Neutrophiler kaum detektierbar ist. Beide haben aber große Mengen CXCR4 intrazellulär gespeichert, die später an die Oberfläche seneszenten zirkulierender Neutrophiler transportiert werden und so deren Rekrutierung in Leber, Milz oder KM zur Beseitigung vermitteln. Die Steuerung der CXCR4-Oberflächenspiegel, und damit der Sensitivität gegenüber SDF-1, ist also eine Regulationsebene der Neutrophilen-Retention im KM (Strydom und Rankin, 2013).

Die Freisetzung reifer KM-Neutrophiler in die Blutbahn erfordert deren Migration durch die Gefäßwand der KM-Sinusoide. Wichtigster Stimulator dieses Prozesses ist die Aktivierung des Chemokinrezeptors CXCR2 durch seine Liganden CXCL1, CXCL2 und CXCL6, die alle stark chemotaktisch auf Neutrophile wirken. CXCR2 und CXCR4 sind Antagonisten, wobei normalerweise das durch CXCR4 vermittelte Retentionssignal dominiert und sich erst bei einer Reduktion dieses Signals die mobilisierende Wirkung von CXCR2 durchsetzt. Unter homeostatischen Bedingungen wird im KM viel SDF-1 exprimiert, und das Retentionssignal überwiegt. Inflammatorische Mediatoren - allen voran G-CSF - führen zur reduzierten Expression von SDF-1, zur Reduktion der CXCR4-Oberflächenspiegel auf Neutrophilen, und gleichzeitig zur vermehrten Expression von CXCR2-Liganden. Dadurch überwiegt das Mobilisierungssignal, und Neutrophile werden - dem Bedarf entsprechend - vermehrt in die Peripherie freigesetzt (Eash et al., 2010; Strydom und Rankin, 2013).

Neben dem KM existiert noch ein zweiter kurzfristiger Neutrophilenspeicher, der sogenannte *marginated pool*. Dabei handelt es sich um periphere Neutrophile, die den freien Blutstrom verlassen und an das Endothel vor allem in Lunge und Milz anhaften, ohne dabei aktiviert zu werden. Unter basalen Bedingungen befinden sich ca. 50 % der aus dem KM freigesetzten Neutrophilen in diesem kurzfristigen Speicher, aus dem sie durch Stress, Anstrengung oder Catecholamine schnell in die freie Zirkulation mobilisiert werden können (Summers et al., 2010; von Vietinghoff und Ley, 2008).

1.3.3 Apoptose, Abbau und *Feedback-Mechanismen*

Neutrophile zirkulieren nur für kurze Zeit in der Blutbahn bevor sie entweder in entzündliches Gewebe rekrutiert werden oder innerhalb weniger Stunden seneszent werden und durch spontane Induktion von Apoptose sterben (Mócsai, 2013). Neutrophilen-Nekrose würde zur unkontrollierten Freisetzung ihres zytotoxischen Inhalts und folglich zu massiven Gewebeschäden führen. Apoptose und anschließende Phagozytose durch Gewebe-Makrophagen - vor allem in Leber, Milz und KM - verhindern dies. Die Rekrutierung seneszenten zirkulierender Neutrophiler in die für ihre Beseitigung zuständigen Organe erfolgt vor allem durch SDF-1/CXCR4-*Signaling*. Dabei weisen seneszente Neutrophile typischerweise hohe CXCR4-Oberflächenspiegel auf, die ihre Sensitivität gegenüber SDF-1 erhöhen (Strydom und Rankin, 2013). Die Erkennung apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen ist durch ein verändertes Muster an Zelloberflächenmarkern, darunter die Exposition von Phosphatidylserin an der Membran-Außenseite, gewährleistet (Fox et al., 2010).

Die phagozytotische Aufnahme apoptotischer Neutrophiler verhindert nicht nur die unkontrollierte Freisetzung gewebeschädigender ROS, Proteine und Peptide, sie hat auch eine wichtige immunregulatorische Funktion. So induziert die Neutrophilen-Phagozytose in KM-Makrophagen die Produktion von G-CSF und stellt somit einen Rückkopplungsmechanismus zwischen Neutrophilen-Beseitigung, -Produktion und -Freisetzung dar, der konstante Level zirkulierender Neutrophiler sicherstellt (Summers et al., 2010). Andererseits induziert die Beseitigung apoptotischer Neutrophiler durch lokale Makrophagen in entzündeten Geweben oder durch Kupferzellen in der Leber einen antiinflammatorischen Phänotyp, der durch die Sekretion entzündungshemmender Zytokine gekennzeichnet ist. Dies stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus zur Beendigung einer Entzündungsreaktion und zur Induktion von Wundheilung und Gewebereparatur dar und kann Signale ans KM initiieren, die zur Reduktion der Granulopoieserate führen (Filardy et al., 2010; Stark et al., 2005). Durch solche *Feedback*-Mechanismen wird ermöglicht, dass die unterschiedlichen Kompartimente, die an der Regulation der Neutrophilen-Homöostase beteiligt sind, auf veränderte Situationen im Gewebe reagieren und die Neutrophilen-Bereitstellung entsprechend an den Bedarf anpassen können.

Inflammatorische Stimuli können die Induktion der Apoptose verzögern und so zur Anreicherung zirkulierender Neutrophiler führen (Lee et al., 1993; McCracken und Allen, 2014). Tatsächlich wird eine verlängerte Lebensdauer zirkulierender Neutrophiler in einer Reihe inflammatorischer Krankheiten beobachtet, und geht mit Neutrophilie einher, die als schlechter prognostischer Marker in diesen Krankheiten gilt. Entsprechend ist die spezifische Induktion der Neutrophilen-Apoptose ein vielversprechender therapeutischer Ansatz zur Behandlung dieser Krankheiten (McCracken und Allen, 2014).

Insgesamt ist die Regulation der Neutrophilen-Homöostase von immenser Bedeutung, um die immunologische Funktion dieser Zellen zu gewährleisten und gleichzeitig ihr zerstörerisches Potential zu kontrollieren. Aufgrund der Komplexität der Regulationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen, und der situationsabhängigen Interaktion beteiligter Kompartimente untereinander ist aber noch weitere intensive Forschung nötig, um ein umfassendes Verständnis dieser Prozesse zu erlangen und bei Krankheits-assoziierten Fehlregulationen intervenieren zu können.

2 *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1*

2.1 Die Familie der TIMPs

Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) sind natürliche, endogen exprimierte Breitbandinhibitoren von Metalloproteasen (MPs), insbesondere von sezernierten Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), sowie von membranständigen *membrane-type* MMPs (MT-MMPs) und *A disintegrin and*

EINLEITUNG

metalloproteinases (ADAMs). Diese Endopeptidasen sind eine der wichtigsten Regulatoren der Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix (EZM), die wiederum essentiell für die Organisation von Zellen und Gewebeverbänden ist (Brew und Nagase, 2010). Durch Proteolyse von EZM-Komponenten wie Collagen, Gelatin, Fibronektin oder Laminin, aber auch von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Zelloberflächenrezeptoren regulieren MPs nicht nur den Abbau oder Umbau der EZM, sondern auch die Aktivität und Bioverfügbarkeit von Signalmolekülen und deren Rezeptoren und beeinflussen damit Zellverhalten wie Adhäsion, Proliferation, Migration und Differenzierung (Khokha et al., 2013). Die präzise Regulation dieser wichtigen Enzyme ist deshalb von fundamentaler Bedeutung, und Dysbalancen des fein abgestimmten Gleichgewichts aus MP-Expression, -Aktivierung und -Inhibition durch TIMPs sind assoziiert mit Krankheiten wie Arthritis, Arteriosklerose, Nephritis, neurologischen Erkrankungen und Krebs (Brew und Nagase, 2010). In Wirbeltieren wurden vier Mitglieder der TIMP-Familie (TIMP-1, -2, -3, -4) identifiziert, deren grundlegender Mechanismus der MP-Inhibition gleich ist. Sie unterscheiden sich aber in ihrer Affinität zu einzelnen MMPs und ihrem inhibitorischen Spektrum, sowie ihrem Expressionsmuster und ihrer physiologischen Bedeutung (Khokha et al., 2013; Murphy, 2011). Alle TIMPs bestehen aus zwei unabhängig voneinander faltenden Domänen, einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne, die jeweils durch drei Disulfidbrücken stabilisiert werden. Die Interaktion mit dem aktiven Zentrum der MPs erfolgt in einer 1:1-Stöchiometrie über den N-Terminus, und C-terminal trunkierte TIMP-Varianten (N-TIMPs) sind ausreichend, um die meisten ihrer MP-Substrate zu inhibieren (Brew und Nagase, 2010). MP-Interaktionen mit der C-terminalen Domäne von TIMPs sind beispielsweise für pro-MMP-2 und -9 beschrieben, scheinen aber für die Regulation proteolytischer Prozesse nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Brew und Nagase, 2010).

Darüber hinaus wurden aber seit Entdeckung der TIMPs immer wieder Protease-unabhängige Effekte auf Zellverhalten wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beschrieben, die eine komplexere Funktionsweise vermuten ließen. Tatsächlich wurden in den letzten Jahren Zelloberflächenrezeptoren identifiziert, die mit der C-terminalen Domäne einzelner TIMPs interagierten und so direkte Signalübertragung vermittelten (Chirco et al., 2006; Stetler-Stevenson, 2008). Die multi-funktionelle Wirkungsweise von TIMPs - als wichtige Regulatoren innerhalb des proteolytischen Netzwerkes einerseits, und als davon unabhängige, direkte *Signaling*-Moleküle andererseits - erklärt die vielschichtigen und zum Teil stark situationsabhängigen Effekte dieser Proteinfamilie im Gewebe. Weitere detaillierte und kontextabhängige Untersuchungen sind notwendig, um das Wirkspektrum einzelner TIMPs *in vivo* und ihre Beteiligung an verschiedenen Pathologien zu verstehen.

2.2 Protease-inhibitorische Funktion von TIMP-1

Humanes TIMP-1 wurde in den frühen 1970ern als erstes Mitglied der TIMP-Proteinfamilie in Form eines Collagenase-Inhibitors im Blutserum entdeckt (Woolley et al., 1975) und kurz darauf als 31 kDa großes, glycosyliertes Protein aufgereinigt. Den Namen *tissue inhibitor of metalloproteinases* erhielt das Protein etwas später, als sein breites inhibitorisches Spektrum erkannt worden war (Brew und Nagase, 2010). Das TIMP-1-Protein besteht aus 184 Aminosäuren, von denen die ersten 123 Aminosäuren zur N-terminalen Domäne und die letzten ca. 60 Aminosäuren zur C-terminalen Domäne falten. Wie alle TIMPs hemmt TIMP-1 generell alle 23 MMPs, sowie die Sheddase ADAM-10. Im Gegensatz zu den anderen TIMPs gilt es aber als schwacher Inhibitor von membranständigen MPs (MT-MMPs), insbesondere von MT1-, MT2-, MT3- und MT5-MMP, sowie von weiteren Mitgliedern der ADAM- und ADAM-TS-Familie (Brew und Nagase, 2010; Murphy, 2011).

Die inhibitorische Wirkung von TIMP-1 beruht im Wesentlichen auf der nicht-kovalenten Bindung des N-Terminus an die katalytische Domäne von MPs (Abb. 2). Diese enthält als zentrales Element ein von 3 Histidinen koordiniertes Zn^{2+} -Ion, an dem die Bindung eines H_2O -Moleküls und die hydrolytische Spaltung der Peptidbindung erfolgt. Durch die zweifache Koordination dieses Metallions durch die α -Amino- sowie die Carbonylgruppe des N-terminalen Cys₁ der TIMP-1-Sequenz wird das H_2O -Molekül aus dem katalytischen Zentrum der MPs verdrängt und so die Proteolyse verhindert. Die OH-Gruppe des Threonin an Position 2 der TIMP-1-Sequenz bindet in die S₁'-Tasche der MPs, die im Wesentlichen die Substratspezifität der MPs festlegt (Abb. 2). Entsprechend können Punktmutationen des Thr₂ der TIMP-1-Sequenz die Selektivität für bestimmte MMPs maßgeblich verändern (Hamze et al., 2007).

Strukturanalysen von TIMP-1-MMP-Komplexen identifizierten einige weitere Interaktionsstellen der N-terminalen Domäne von TIMP-1 mit MMPs, während Interaktionen mit der C-terminalen Domäne für die MMP-Inhibition nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen (Brew und Nagase, 2010). Entsprechend ist die N-terminale Domäne (N-TIMP-1) ausreichend, um die MMP-inhibitorische Wirkung von TIMP-1 zu erreichen, wie Studien mit einer C-terminal trunkierten Variante ($\Delta_{127-184}$) zeigten (Nimmo et al., 2015). Im Gegensatz dazu reicht N-TIMP-1 nicht aus, um ADAM-10 zu inhibieren, was auf eine essentielle Interaktion zwischen der TIMP-1-C-terminalen Domäne und ADAM-10 rückschließen lässt (Rapti et al., 2008). Des Weiteren wurden Interaktionen der C-terminalen Domäne mit der Hämopexin-Domäne von Pro-MMP-9 beschrieben. Da in diesem Komplex die N-terminale Domäne frei bleibt, ist er weiterhin in der Lage, MMPs zu inhibieren. Über die physiologische Bedeutung dieses Komplexes ist aber bisher wenig bekannt (Brew und Nagase, 2010).

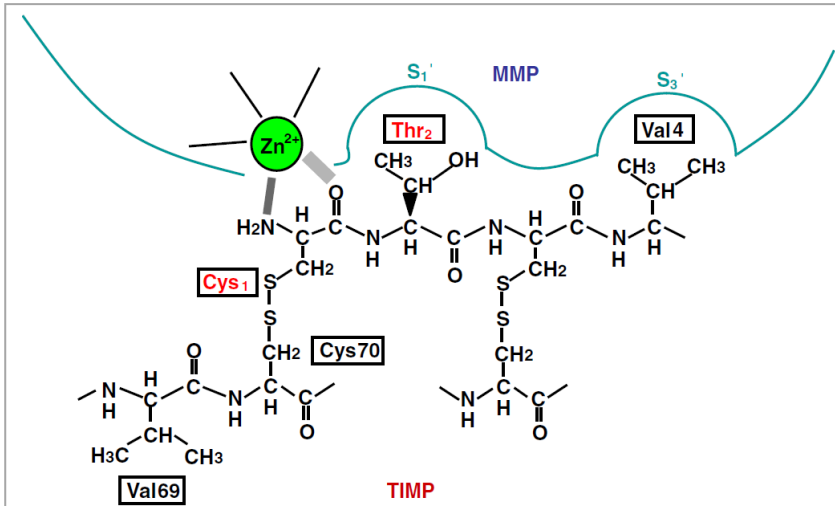


Abb. 2: Schematische Darstellung der Interaktion des N-Terminus von TIMP-1 mit MMPs. Das Zn^{2+} -Ion im katalytischen Zentrum der MMPs wird durch Cys₁ der TIMP-1-Sequenz chelatiert. Thr₂ interagiert mit der S₁'-Tasche der MMPs. Die SH-Gruppen von Cys₁ und Cys₃ bilden Disulfidbrücken innerhalb der TIMP-1-N-terminalen Domäne. (Murphy, 2011)

Durch die Interaktion mit Proteasen ist TIMP-1 ein funktionell bedeutender Bestandteil des komplexen proteolytischen Netzwerks, das den Abbau und Umbau von EZM-Bestandteilen, aber auch die Freisetzung und Aktivierung oder Deaktivierung von Signalmolekülen wie Wachstumsfaktoren, Zytokinen und deren Rezeptoren auf der Zelloberfläche reguliert und damit unter anderem Migration, Proliferation und Angiogenese reguliert (Chirco et al., 2006; Mason und Joyce, 2011). Tatsächlich konnte ein Teil der physiologischen Effekte von TIMP-1 seiner Proteaseinhibitorischen Funktion zugeordnet werden. Darüber hinaus beschreibt aber eine zunehmende Zahl an Studien TIMP-1-Effekte auf Zellverhalten wie Apoptose, Proliferation oder Differenzierung, die auch durch TIMP-1-Varianten hervorgerufen wurden, die nicht zur Protease-Inhibition fähig sind (Ries, 2014; Stetler-Stevenson, 2008).

2.3 Protease-unabhängige Signalübertragung durch TIMP-1 über CD63

Die Beobachtung dieser Protease-unabhängigen Effekte auf Zellverhalten führte zu der Annahme, dass TIMP-1 selbst als direkter Signalvermittler agieren könnte. Tatsächlich wurde beschrieben, dass radioaktiv markiertes rekombinantes TIMP-1-Protein an die Zelloberfläche von Keratinozyten oder Myelomzellen bindet (Chirco et al., 2006). Während lange kein eindeutiger TIMP-1-Rezeptor bekannt war, konnte schließlich 2006 in einem *Yeast two hybrid-Screening* das Membranprotein CD63 als direkter TIMP-1-Interaktionspartner identifiziert werden (Jung et al., 2006). CD63 gehört zur Familie der Tetraspanine, die aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären Schleifen und je einem kurzen zytoplasmatischen N- und C-terminalen Ende bestehen. Tetraspanine interagieren miteinander, sowie mit einer Vielzahl anderer Proteine, darunter Integrine, MHC-Moleküle, Immunglobuline, Signalmoleküle und Rezeptoren, und regulieren die Anordnung dieser Proteine auf der Zellmembran. Dadurch steuern sie intrazelluläre *Signaling*-Prozesse und Zellverhalten wie Adhäsion, Migration, Proliferation, Zellüberleben und Differenzierung. CD63 kommt überwiegend in

intrazellulären Vesikeln des endosomal-lysosomalen Kompartiments vor, ist aber auch auf der Zelloberfläche zahlreicher Zelltypen, darunter Thrombozyten, Neutrophile, Eosinophile und Basophile Granulozyten, zu finden (Pols und Klumperman, 2009). Auch die Membran primärer Neutrophilen-Granulae enthält CD63, wo es unter anderem eine wichtige Rolle beim Transport der Neutrophilen-Elastase spielt (Källquist et al., 2008).

Die Interaktion von TIMP-1 mit CD63 wurde ursprünglich auf der Membran von MCF10A-Zellen beschrieben. Dabei lag CD63 im Komplex mit β_1 -Integrin vor, und die Bindung von TIMP-1 an CD63 führte zur konstitutiven Aktivierung dieses Integrins (Jung et al., 2006), sowie von intrazellulären *downstream*-Signalwegen (Chirco et al., 2006). Im Gegensatz zur inhibitorischen Interaktion mit Proteasen erfolgt die Bindung von TIMP-1 an CD63 über die C-terminale Domäne (Warner, 2013), die aus diesem Grund auch als *Signaling*-Domäne bezeichnet wird. TIMP-1-Varianten, die nur die Protease-inhibitorische N-terminale Domäne enthalten (N-TIMP-1), folglich also nicht an CD63 binden können, erlauben die separate Untersuchung von TIMP-1-Effekten, die über seine Protease-inhibitorische Funktion vermittelt werden (Murphy et al., 1991). Analog wurden verschiedene TIMP-1-Varianten entwickelt, die eine intakte C-terminale Domäne aufweisen, aber durch Mutationen im N-Terminus nicht oder nur eingeschränkt zur Protease-Inhibition fähig sind, und somit ausschließlich die *Signaling*-Funktion von TIMP-1 vermitteln. Dies wird beispielsweise durch Blockieren der für die Zn^{2+} -Bindung nötigen freien α -Aminogruppe des Cys₁ durch zwei zusätzliche Valine am N-Terminus (vvTIMP-1, Egea et al., 2012), oder durch Punktmutation des für die MP-Bindung entscheidenden Thr₂ zu Glycin (TIMP-1/T2G) erreicht (Hamze et al., 2007). Tatsächlich konnten durch Untersuchungen mit diesen Varianten viele der TIMP-1-Effekte auf Zellen *in vitro* einer der zwei Funktionen von TIMP-1 zugeordnet werden (Ries, 2014). Über das Zusammenspiel der beiden Wirkmechanismen von TIMP-1 *in vivo* und deren Bedeutung für die Homöostase verschiedener Organe und Kompartimente ist aber noch sehr wenig bekannt.

2.4 Expression und (patho-)physiologische Bedeutung von TIMP-1

Die pleiotropen Aktivitäten von TIMP-1 - als Bestandteil des für sich schon komplexen proteolytischen Netzwerkes einerseits und als eigenständiges Signalmolekül andererseits - lassen eine vielschichtige Rolle bei physiologischen und auch pathologischen Prozessen vermuten. Tatsächlich wird TIMP-1 unter physiologischen Bedingungen in vielen Geweben, vor allem in Fortpflanzungsorganen und während der embryonalen Entwicklung von Organen und Kompartimenten exprimiert (Murphy, 2011). TIMP-1-*knock out*-Mäuse sind zwar lebensfähig und fruchtbar, zeigen aber Veränderungen im Reproduktionszyklus und Hormonhaushalt, bei kognitiven Prozessen, sowie beim Verlauf von Infektions-, Fibrose- oder Herz-Kreislaufkrankungen (Brew und Nagase, 2010). TIMP-1 wird überwiegend auf Expressionsebene durch Transkriptionsfaktoren wie AP-

EINLEITUNG

1, SP-1, NF κ B oder CRE reguliert, die typischerweise durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder Phorbolester induziert werden, und die auch die Expression von MMPs steuern (Chirco et al., 2006). Virale Proteine stimulieren ebenfalls die TIMP-1-Expression *in vitro* (Lin et al., 2015; Uchijima et al., 1994).

In Patienten werden erhöhte TIMP-1-Plasmaspiegel bei einer Vielzahl von Pathologien, insbesondere Arthritis (Murphy et al., 2009), Fibrose (Hernandez-Gea und Friedman, 2011; Zhu et al., 2012), Sepsis (Lauhio et al., 2011), Enzephalitis (Zhou et al., 2005), chronisch inflammatorischen Darmerkrankungen (Kapsoritakis et al., 2008), sowie bei verschiedenen Arten von Krebs (Bunatova et al., 2012; Würtz et al., 2008) beobachtet, und sind in den meisten dieser Krankheiten mit einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert. Interessanterweise sind all diese Krankheiten von Entzündungsreaktionen begleitet, bei denen die übermäßige Aktivierung inflammatorischer Zellen, insbesondere von Neutrophilen Granulozyten als krankheitsfördernd gilt und ebenfalls mit einer schlechten Prognose für den Patienten korreliert. Aufgrund dieser in unterschiedlichen Organen und in verschiedenstem klinischen Kontext beobachteten Verbindung hoher TIMP-1-Spiegel mit Inflammation stellt sich die Frage, ob erhöhte TIMP-1-Spiegel eine Folge der Entzündungsreaktion des Körpers sind, oder ob TIMP-1 diese aktiv vorantreibt. Tatsächlich konnte in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Krüger gezeigt werden, dass die experimentelle Erhöhung systemischer TIMP-1-Spiegel zu Veränderungen der Gewebshomöostase in der Leber führt, die einem inflammatorischen Phänotyp gleichen. So wurde die erhöhte Expression von akute Phase-Proteinen der S100-Familie, sowie von Zytokinen wie SDF-1 (Seubert et al., 2015) und CXCL-2 und -5 (unveröffentlichte Daten der Autorin) beobachtet. Des Weiteren führten hohe TIMP-1-Spiegel zu zellulären Veränderungen, darunter die Aktivierung hepatischer Sternzellen (bisher unveröffentlichte Daten von Barbara Grünwald), und interessanterweise auch eine erhöhte Anzahl Neutrophiler Granulozyten im Lebergewebe (Schrözlmaier et al., 2010; Seubert et al., 2015). Im Rahmen dieser Studie sollte im Detail untersucht werden, welche Effekte hohe TIMP-1-Spiegel auf die Homöostase Neutrophiler Granulozyten haben, und ob diese möglicherweise eine Erklärung für die in der Klinik beobachtete häufige Assoziation erhöhter TIMP-1-Spiegel mit inflammatorischen Krankheiten liefern können.

3 Vorarbeiten und Fragestellung

Wie im vorangehenden Abschnitt ausgeführt, sind erhöhte TIMP-1-Spiegel in einer Reihe inflammatorischer Erkrankungen zu beobachten, bei denen Neutrophile maßgeblich involviert sind, und sind dort assoziiert mit einer schlechten Prognose für den Patienten. Direkte pro-inflammatorische Effekte von TIMP-1 *in vivo* wurden aber bisher nicht beschrieben.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigten, dass TIMP-1 Effekte auf die Regulation Neutrophiler Granulozyten in der Leber hat (Schrötzlmair et al., 2010; Seubert et al., 2015). So führte die experimentelle Erhöhung systemischer TIMP-1-Spiegel in Mäusen zu einer erhöhten Zahl von Neutrophilen im Lebergewebe. Dies erforderte die Integrität der SDF-1 / CXCR4-Achse, da systemische Inhibition von CXCR4 den TIMP-1-induzierten hepatischen Neutrophilen-Anstieg komplett blockierte (Seubert et al., 2015).

Im Rahmen dieses Projektes sollte deshalb untersucht werden, inwieweit hohe TIMP-1-Spiegel die Homöostase von Neutrophilen Granulozyten in Mäusen systemisch beeinflussen, auf welcher Regulationsebene diese Effekte gegebenenfalls stattfinden, und welche Kompartimente dabei involviert sind. Um Aufschluss über molekulare Mechanismen zu erhalten, sollte außerdem ermittelt werden, wie TIMP-1 diese Effekte vermittelt. Durch den Einsatz von TIMP-1-Varianten, die die getrennte Untersuchung der Protease-inhibitorischen und der *Signaling*-Funktion ermöglichen, soll untersucht werden, ob die gefundenen Effekte auf die Neutrophilen-Homöostase einer der beiden Wirkungsweisen dieses Proteins zugeschrieben werden können, oder ob die Interaktion beider Funktionen dafür nötig ist. Im Anschluss sollten mögliche *downstream*-Effektoren identifiziert werden.

Die Ergebnisse dieser Fragestellungen sollen zum Verständnis der komplexen Regulationsmechanismen der Neutrophilen-Homöostase beitragen und könnten möglicherweise eine mechanistische Erklärung für die häufig in der Klinik beobachtete Assoziation hoher TIMP-1-Spiegel mit inflammatorischen Krankheiten und erhöhten Neutrophilen-Zahlen liefern.

II. MATERIAL UND METHODEN

1 Material

1.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Studie wurden Mäuse verschiedenen genetischen Hintergrundes verwendet, die sich unter anderem in ihrem Immunstatus unterscheiden (Lutz et al., 2012).

CD1^{nu/nu}-Mäuse sind Träger einer homozygoten Deletion im FoxN1-Gen, das zur Immundefizienz führt. Die Tiere sind haarlos und entwickeln keinen Thymus, sind somit T-Zell-defizient, haben aber funktionelle B- und NK-Zellen sowie alle myeloiden Leukozyten-Linien.

Fox Chase SCID-Mäuse haben eine autosomal-rezessive Mutation im SCID-Gen, die zu einer schweren Immundefizienz mit nicht funktionellen B- und T-Lymphozyten führt. NK-Zellen, Monozyten / Makrophagen und Granulozyten sind aber normal funktionsfähig.

DBA/2-Mäuse entstammen dem ältesten Inzucht-Stamm, der 1902 von C.C. Little entwickelt wurde. Die Tiere sind immunkompetent mit einem H2^d-MHC-Haplotyp.

FVB/N-Mäuse entstammen einer in den 1970ern etablierten Inzucht-Linie und sind immunkompetent mit einem H2^q-Haplotyp.

C57Bl/6J ist einer der weitverbreitetsten Inzucht-Mausstämme. Die Tiere sind immunkompetent mit einem H2^b-Haplotyp und normaler Entwicklung und Funktion aller Leukozyten-Populationen.

Alle bisher genannten Mausstämme wurden von Charles River (Sulfeld, Deutschland) bezogen.

CD63-knock out-Mäuse wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Paul Saftig (CAU Kiel, Deutschland) generiert (Schröder et al., 2009) und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Nach Embryonen-Transfer in C57Bl/6-Mäuse, die gemäß FELASA negativ für alle pathogenen Mikroorganismen (inkl. Helicobacter) waren, wurden alle CD63-knock out-Mäuse, sowie heterozygote und homozygote Geschwister durch Verpaarung von je zwei heterozygoten Weibchen mit einem heterozygoten Männchen in eigener Zucht generiert. Die Genotypisierung der Versuchstiere erfolgte durch Sonja Berchtold und Katja Honert mittels Schwanz-PCR.

1.2 Zelllinien

32Dcl3 ist ein Abkömmling der immortalisierten murinen Myeloblasten-Zelllinie 32D. 32Dcl3-Zellen sind semi-adhären, können in Gegenwart von IL-3 unbegrenzt in Kultur gehalten werden und in Abwesenheit von IL-3 durch G-CSF zur terminalen Granulozyten-Differenzierung stimuliert werden (Guchhait et al., 2003).

HT1080 ist eine tumorigene, adhären wachsende humane Fibrosarkom-Zelllinie, die 1972 aus einem 35-jährigen kaukasischen Patienten isoliert und immortalisiert wurde (Rasheed et al., 1974).

NIH3T3 ist eine aus NIH/Swiss-Mausembryonen generierte Fibroblasten-Zelllinie, die in Kultur adhären wächst (Jainchill et al., 1969).

293T-Zellen sind humane embryonale Nierenepithelzellen, die in Kultur adhären wachsen. Aufgrund ihrer hohen Transfektionseffizienz und der Expression des SV40-Antigens eignen sie sich gut als Verpackungszelllinie zur Herstellung lentiviraler Vektoren.

1.3 Plasmide und virale Vektoren

1.3.1 Plasmide für lentivirale Vektoren

Helferplasmide des ViraPower™-Systems:

pLP1 (gag, pol)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pLP2 (rev)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
pLP/VSVG (env)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Transferplasmide:

pLK0.1-Puro-shNT	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
pLK0.1-Puro-shCD63 #1 (TRCN 0000065683)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland Sequenz: CCGGCCAGGTGAAGTCAGAGTTTAACTCGAGTTAAAC TCTGACTTCACCTGGTTTTTG
pLK0.1-Puro-shCD63 #2 (TRCN 0000065684)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland Sequenz: CCGGCATGATTACATTTGCCATCTTCTCGAGAAGATGG CAAATGTAATCATGTTTTTG
pLK0.1-Puro-shCD63 #3 (TRCN 0000065685)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland Sequenz: CCGGGCAGTGGGATTGATCGCCATTCTCGAGAATGGC GATCAATCCCCTGCTTTTTG
pLK0.1-Puro-shCD63 #4 (TRCN 0000065686)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland Sequenz: CCGGGCGTGGAGACTATAGCAATATCTCGAGATATTG CTATAGTCTCCACGCTTTTTG
pLK0.1-Puro-shCD63 #5 (TRCN 0000065687)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland Sequenz: CCGGGTTGTCTTGAAGCAGGCCATTCTCGAGAATGGC CTGCTTCAAGACAACCTTTTTG

1.3.2 Adenovirale Vektoren

Addl70-3	von Prof. Martina Anton (TU München, Deutschland)
AdT1	kloniert von Dr. Charlotte Kopitz (TU München, Deutschland)
AdN-T1	kloniert von Dr. Charlotte Kopitz (TU München, Deutschland)
AdT1/T2G	kloniert von Katja Honert und Dr. Bastian Seubert (TU München, Deutschland)
AdvvT1	Sirion Biotech, Martinsried b. München, Deutschland
AdN-T1/T2G	Sirion Biotech, Martinsried b. München, Deutschland

1.4 Antikörper und rekombinante Proteine

1.4.1 FACS-Antikörper

Alle für FACS-Färbungen verwendeten Antikörper wurden über eBioscience, Frankfurt, Deutschland, oder von Biolegend, London, England bezogen.

Tabelle 1: FACS-Antikörper

Antigen	Konjugat (Farbstoff)	Klon	Hersteller	µl / Färbung
CD45	PerCP-Cy5.5	30-F11	eBioscience	0,3 µl
	V500	30-F11	eBioscience	1,0 µl
Ly6G	PE	1A8	Biolegend	0,2 µl
	BD Horizon™V450	1A8	Biolegend	0,5 µl
Ly6C	Alexa Flour 488	HK1.4	eBioscience	0,5 µl
CD11b	PE-Cy7	M1/70	eBioscience	0,3 µl
CD3	eFluor®450	17A2	eBioscience	0,5 µl
CD19	APC-eFluor®780	1D3	eBioscience	0,3 µl
CD49b	APC	DX5	eBioscience	1,5 µl
CD63	APC	NVG-2	eBioscience	1,0 µl
CXCR4	APC	L276F12	Biolegend	2,0 µl
BrdU	FITC	BU20A	eBioscience	3,0 µl
IgG	APC	Rat IgG2a, κ	eBioscience	wie Antikörper

1.4.2 Antikörper für IHC und Western Blot

Antikörper für Immunhistochemie (IHC) und Western Blot (WB) wurden entsprechend Tabelle 2 bezogen und verwendet.

Tabelle 2: Antikörper für IHC und Western Blot

Antigen	Klon	Herkunft	Verwendung	Hersteller	Verdünnung
Ly6G	1A8	rat	IHC	Biolegend	1:200 in TBS
SDF-1	FL-93	rabbit	IHC	Santa Cruz	1:50 in TBS
Anti-rabbit biotinyliert	polyklonal	goat	IHC	R&D	fertig aus rabbit-Kit
Anti-rat-HRP	EO468	rabbit	IHC	DAKO	1:100 in TBS
Stat3	79D7	rabbit	WB	Cell Signaling	1:2000 in 2,5% BSA/ TBS-T
P-Stat3	D3A7	rabbit	WB	Cell Signaling	1:2000 in 2,5% BSA/ TBS-T
NF _κ B	polyklonal	rabbit	WB	Cell Signaling	1:1000 in 2,5% BSA/ TBS-T
P-NF _κ B	polyklonal	rabbit	WB	Cell Signaling	1:1000 in 2,5% BSA/ TBS-T
P-Akt, P-MAPK (p42/44)	Pathscan	rabbit	WB	Cell Signaling	1:1000 in 2,5% BSA/ TBS-T
α-Tubulin	DM1A	mouse	WB	Calbiochem	1:500 in 2,5% BSA/ TBS-T
anti-rabbit IgG-HRP	polyklonal	donkey	WB	Amersham	1:5000 in 2,5% BSA/TBS-T
anti-mouse IgG-HRP	polyklonal	rabbit	WB	Amersham	1:2000 in 2,5% BSA/TBS-T

1.4.3 Antikörper für *in vivo*-Applikationen

Antikörper für *in vivo*-Applikationen (Tabelle 3) wurden in Azid- und Endotoxin-freiem PBS gelöst verabreicht.

Tabelle 3: Antikörper für *in vivo*-Applikationen

Antigen	Klon	Herkunft	Verwendung	Hersteller	Stock-Konz.
Ly6G	1A8 (LEAF)	rat	Neutrophilen-Depletion	Biolegend	10 mg/ml
IgG-Ctrl	IgG2a, κ (LEAF)	rat	Kontrolle für Neutrophilen-Depletion	Biolegend	10 mg/ml
CXCR4	12G5	mouse	CXCR4-Inhibition	Millipore	0,62 mg/ml
IgG	IgG2a, κ	mouse	Kontrolle für CXCR4-Inhibition	Millipore	0,62 mg/ml

1.4.4 Rekombinante Proteine

Rek. humanes TIMP-1	Prof. Gill Murphy (University of Cambridge, Cambridge, UK)
Rek. murines G-CSF	Peptidech GmbH, Hamburg, Deutschland
Rek. murines IL-3	Peptidech GmbH, Hamburg, Deutschland
Rek. murines IL-6	Peptidech GmbH, Hamburg, Deutschland
Rek. murines SDF-1	Peptidech GmbH, Hamburg, Deutschland
Rek. murines CXCL6	Peptidech GmbH, Hamburg, Deutschland
Rek. murines SCF	Peptidech GmbH, Hamburg, Deutschland

Alle von Peptidech bezogenen rekombinanten Proteine wurden den Herstellerangaben entsprechend zu einer Stock-Konzentration von 100 ng/μl in sterilem, Nuklease-freiem ddH₂O gelöst.

1.4.5 Enzyme

DNase I	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Streptavidin-HRP-Komplex für IHC	DAKO, Hamburg, Deutschland

1.5 Primer und Probes für qRT-PCR

1.5.1 Probes und Mastermix

18S Primer-Probe-Mix	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Universal Probe Library, Set human	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Universal Probe Library, Set murin	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
FastStart Universal Probe Master (Rox)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland

1.5.2 Primer für Roche Probe Library

Alle Primer-Oligonucleotide wurden von Metabion GmbH, Planegg / Steinkirchen, Deutschland bezogen. Die Primer wurden in einer Konzentration von 100 μM in Nuklease-freiem Wasser geliefert. Die Sequenzen der Oligos und zugehörige Roche-Probes wurden mithilfe der Assay Design-Software ermittelt und sind in Tabelle 4 angegeben.

Tabelle 4: Primer für qRT-PCR

Gen / Amplikon	<i>forward-Primer-Sequenz</i>	<i>reverse-Primer-Sequenz</i>	Zugehörige Roche-Probe
muLy6G	ggctcagaaaagtcacca	cgtacgtggaagcgaacag	# 97
muMpo	ggaaggagacctagaggttg	tcccatccaccatgttta	# 7
muLtf	gggcaagtgcggttagtt	ccattgctttggaggatt	# 53
muCebp a	cgctggtgatcaacaagag	ggtggctgtaggggaag	# 101
muCebp b	atcgactcagcccctacct	tagtcgtcggaagagg	# 55
muCebp e	tcccctgcagtaccaagtg	gtgccttgagaaggggact	# 74
muPU.1	ggagaagctgatggcttg	caggcgaatcttttcttgc	# 94
huTIMP-1	gggcttcaccaagacctaca	tgaggggatggataaaca	# 76
muCd63	gcggcaggagagtactgaga	gagcaaaaactgacacctca	# 12

1.6 Zellkultur-Reagenzien

RPMI 1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
DMEM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
FCS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Asparagin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Arginin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin / EDTA	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Opti-MEM	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
MethoCult™	Stemcell Technologies, Köln, Deutschland
Lipofectamin-2000	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Puromycin	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Polybren	Sigma Aldrich, München, Deutschland
AlamarBlue	AbD Serotech, Düsseldorf, Deutschland
Trypanblau	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland

1.7 Kits

Human TIMP-1 DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Murine G-CSF ELISA Development Kit	Peprotech GmbH, Hamburg, Deutschland
Neutrophil isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
BrdU staining Kit	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit	eBioscience, Frankfurt am Main, Deutschland
BCA Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, USA
Mouse Cytokine Array G3 (RayBiotech)	BioCat GmbH, Heidelberg, Deutschland

1.8 Puffer und Lösungen

1.8.1 Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

PBS, 20x	2,8 M NaCl, 200 mM KCl, 160 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM KH ₂ PO ₄
PBS ²⁺	1x PBS, 0,9 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂
TBS, 10x	500 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl
TBS-T	1x TBS, 0,1% (v/v) Tween-20
10 x RIPA-Proteinlysepuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 7,4, 1,5 M NaCl, 2.5 % Desoxycholsäure, 10 % NP-40, 10 mM EDTA. Zugabe von Protease- und Phosphataseinhibitoren kurz vor Verwendung.
SDS-Gelelektrophorese-Puffer	25 mM Tris, pH 8,3, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS.
Blotting-Puffer	5 mM Tris, pH 8,3, 190 mM Glycin, 20 % Methanol
Zitratpuffer, pH6	2,1g Zitronensäuremonohydrat in 1l ddH ₂ O, pH 6.0
Fixierlösung	4 % Formaldehyd in 1x PBS
PFA-Lösung	2% Paraformaldehyd in 1x PBS
FACS-Puffer	1x PBS, 2 % (v/v) FCS
MACS-Puffer	PBS, 0,05 % (w/v) BSA, 2mM EDTA
TAE-Puffer	40mM Tris-Base, 20mM Essigsäure, 1mM EDTA

1.8.2 Kommerziell erworbene Lösungen

FACS Lysis Solution	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Cytofix™	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
RBC lysis buffer concentrate	eBioscience/Affimetrix, Frankfurt, Deutschland
AEC Substrate Buffer	DAKO, Hamburg, Deutschland
AEC Substrate Chromogen	DAKO, Hamburg, Deutschland
DAB Substrate Buffer	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
DAB Substrate Chromogen	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
Mayers Hämalaun	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trizol	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
TMB-Substrat für ELISA	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
DiffQuick	Dade Behring, Marburg, Deutschland
Clarity Western ECL Substrat	Biorad, München, Deutschland
Fixable Viability dye-eFluor® 506	eBioscience, Frankfurt, Deutschland

1.9 Chemikalien

Absolute	NENTM Life Science Products, Zaventem, Belgien
Agarose	Peq Gold Universal Agarose PeqLab, Erlangen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
BrdU	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
D-Glukose	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz
Eisessig (Essigsäure)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethanol (EtOH), zur Analyse, >99,9 %	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Ethanol 98 % für Immunhistologie	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Formaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Formamid	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
HEPES, >99,5 %	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz
Isopropanol	Apotheke Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Kaiser's Glycerin Gelatine	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Methanol, zur Analyse, >99,8 %	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdeoxycholat	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Fluka GmbH, Buchs, Schweiz
Natriumzitrat	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
NP40	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Nuklease-freies Wasser	Gibco/ Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Paraffin	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland

MATERIAL UND METHODEN

Roticlear	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck GmbH, Schwalbach, Deutschland
TEMED	Sigma GmbH, Deisenhofen, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Trizol Reagenz	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Tissue Tek Einbettmedium	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland

1.10 Geräte und Software

1.10.1 Geräte

BD FACSCanto™ II	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
ABI PRISM 7900 HAT (Taqman-Gerät)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Axiovert25 (Zellkultur-Mikroskop)	Carl Zeiss GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
IHC-Durchlichtmikroskop	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Axiovert 135 (Fluoreszenzmikroskop)	Carl Zeiss GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Wallac Victor ₂ Plate reader	Perkin Elmer, Waltham, USA
GenePix MicroArray Scanner	Molecular Cevices, Kalifornien, USA
Cryotom (HM500 OM)	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Paraffin-Einbettssystem (TBS88)	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Microtom (HM 355)	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Mini Bead Beater	Cole-Parmer, Kehl/Rhein, Deutschland
Shandon CytoSpin3	GMI, Ramsey, USA
ChemiDoc Station (Geldokumentation)	Biorad, München, Deutschland

1.10.2 Software

FlowJo v8.8.6 / v10.0.7	FlowJo LLC, Ashland, USA
Image Lab	Biorad, München, Deutschland
SigmaPlot	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
Social Science Statistics	http://www.socscistatistics.com/
ImageJ	http://imagej.nih.gov/ij/
ReaderFit	http://www.readerfit.com
Microsoft Office 2010	Microsoft Dtl. GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

1.11 Sonstige Materialien

Superfrost Plus Objektträger	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Deckgläschen	Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Transwell-Inserts, 3 µm Poren	Corning, Kaiserslautern, Deutschland
FACS-Röhrchen	Sarstedt AG&CO, Nümbrecht, Deutschland
Trucount™ tubes	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
MACS-Säulchen	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MicroAmp Optical 96-well Plate	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Assistent, Sondheim, Deutschland
PVDF-Western-Blot-Membran	GE Healthcare, München, Deutschland
Extradickes Filterpapier für WB	Biorad, München, Deutschland

2 Methoden

2.1 Tierexperimentelle Methoden

2.1.1 Tierhaltung

Alle Tierversuche wurden am Zentrum für Präklinische Forschung des Klinikums rechts der Isar durchgeführt. Versuchstiere waren in der Regel weibliche Mäuse im Alter von 7 - 10 Wochen. Lediglich für Experimente mit CD63-*knock out*-Tieren aus eigener Zucht wurden auch Männchen im gleichen Alter in die Versuchsgruppen mit einbezogen. In diesem Fall wurden Geschlechts-spezifische Unterschiede bei den untersuchten Parametern überprüft und konnten ausgeschlossen werden. Maximal 5 Mäuse pro Käfig wurden unter Pathogen-freien Bedingungen in für die Tierhaltung konzipierten Räumen mit 12 h-Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Nicht aus eigener Zucht stammende Versuchstiere wurden von Charles River bestellt und trafen mindestens 1 Woche vor Versuchsbeginn ein. Alle Behandlungen und Eingriffe wurden nach Richtlinien des Tierschutzgesetzes des Freistaates Bayern durchgeführt und waren vor Versuchsbeginn von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.1.2 Primärtumor-Modelle

2×10^6 HT1080-Fibrosarkomzellen in 100 μ l PBS wurden subkutan (s.c.) in die Nackenfalte von weiblichen CD1^{nu/nu}-Mäusen injiziert. Dazu wurden die Mäuse im Rollgriff gehalten, und die Kanüle in die zwischen Daumen und Zeigefinger gebildete Hautfalte geführt. Das Tumorstadium wurde durch Messen des Tumordurchmessers mit einer digitalen Schieblehre alle zwei bis drei Tage kontrolliert. Nach ca. 10 Tagen, als die Tumoren einen Durchmesser von 1 - 1,5 cm erreicht hatten, wurden die Mäuse geopfert. Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Haissi Cui und Barbara Grünwald geplant und durchgeführt. Die Injektion der Tumorzellen erfolgte durch Prof. Achim Krüger.

Für das NIH-Tumormodell wurden 2×10^6 NIH3T3-Zellen in 100 μ l PBS s.c. in die Nackenfalte von Fox Chase SCID-Mäusen injiziert und das Tumorstadium wiederum alle 2-3 Tage mit einer Schieblehre kontrolliert. Nach 28 Tagen, als die Tumoren einen Durchmesser von ca. 1 - 1,5 cm erreicht hatten, wurden die Mäuse geopfert. Die Injektion der Tumorzellen erfolgte durch Prof. Achim Krüger.

2.1.3 Adenovirale Transduktion

Adenovirale Vektoren wurden durch intravenöse (i.v.) Injektion in die Schwanzvene verabreicht. In der Regel wurden 2×10^9 virale Partikel (Hexontiter) je Maus in einem Volumen von 200 μ l PBS²⁺ injiziert. Die aus diesem Titer resultierenden TIMP-1-Plasmaspiegel wurden für jedes Virus-*Batch* überprüft und ggf. angepasst. Zur Erweiterung der Schwanzvenen wurden die Mäuse vor der Injektion für 20 - 30 min mit einer Infrarot-Lampe aufgewärmt. Die Injektion erfolgte in einem Inokulationsröhrchen (50 ml-Falkon mit ca. 3 - 4 mm breitem Längsschlitz) unter Verwendung von 27

MATERIAL UND METHODEN

G-Kanülen. Ab dem Zeitpunkt der Virusinjektion wurden die Mäuse und alle daraus gewonnenen unfixierten Proben unter Einhaltung der Richtlinien für S2-Material behandelt.

Die Vorbereitung der Virus-Spritzen erfolgte meist durch Katja Honert, die Injektion durch Prof. Achim Krüger und in Einzelfällen durch die Autorin.

2.1.4 Injektion von rekombinantem TIMP-1

Rekombinantes TIMP-1-Protein wurde als Puls in einer Dosierung von 2 mg/kg verabreicht. Dazu wurden 100 µl rT1 in LPS- und Azid-freiem PBS intraperitoneal (i.p.) in DBA/2 Mäuse injiziert. Kontrollmäuse wurden mit reinem PBS behandelt. 2 h nach der Injektion wurden die Mäuse geopfert. Durchführung und Probenahme in diesem Versuch erfolgte in Zusammenarbeit mit Haissi Cui.

2.1.5 BrdU-Experimente

DBA/2-Mäuse wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert, um die TIMP-1-Spiegel systemisch zu erhöhen. BrdU wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in LPS-freiem PBS gelöst und den Mäusen i.p. injiziert. Ein einzelner BrdU-Puls von 2 mg wurde 3 Tage nach Virusinfektion verabreicht, um gerade proliferierende Neutrophilen-Vorläufer zu markieren. In diesem Fall wurden die Mäuse 1 h später geopfert. Zur Unterscheidung zwischen gespeicherten und neu generierten reifen Neutrophilen wurde BrdU wiederholt über 3 Tage injiziert, um eine kontinuierliche Markierung aller in diesem Zeitraum proliferierender Zellen zu erzielen. Die erste Applikation erfolgte 3 h nach viraler Transduktion in einer Dosierung von 2 mg, gefolgt von 6 weiteren Injektionen von 1 mg alle 12 h. Am Tag 3 nach Virusinjektion wurden die Mäuse geopfert und Blut- und KM-Proben zur weiteren Analyse entnommen. Um in der anschließenden FACS-Analyse Hintergrund-Level für das *Gating* BrdU-negativer Zellen bestimmen zu können, wurde je zwei Kontroll-Mäusen in gleicher Weise PBS anstelle von BrdU verabreicht.

2.1.6 Neutrophilen-Depletion

Die Depletion Neutrophiler Granulozyten erfolgte durch systemische Applikation des Ly6G-spezifischen Antikörper 1A8 (Daley et al., 2008). DBA/2-Mäusen wurden einmalig entweder 400 µg 1A8 oder IgG-Kontrollantikörper in 200 µl sterilem, Endotoxin- und Azid-freiem PBS injiziert. 24 h später wurden die Mäuse entweder geopfert, um die Depletionseffizienz zu diesem Zeitpunkt zu bestätigen, oder mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und 3, 4 oder 7 Tage nach Virusinjektion geopfert.

2.1.7 Antikörper-vermittelte Inhibition von CXCR4

Zur systemischen Inhibition von CXCR4 wurden DBA/2- Mäusen 62 µg CXCR4-Antikörper (Klon 12G5) oder IgG-Kontrollantikörper in 100 µl Azid- und LPS-freiem PBS durch i.p. Injektion verabreicht. 24 h später wurden die Tiere mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und 3 Tage nach Virusinjektion geopfert.

Die Planung und Durchführung dieses Versuchs erfolgte in Zusammenarbeit mit Barbara Grünwald und Haissi Cui.

2.1.8 Probengewinnung

Alle Versuchstiere wurden mit CO₂ getötet. Die Probenahme erfolgte direkt im Anschluss. Dazu wurde die Maus mit dem Bauch nach oben an den Beinen fixiert, mit 80 % Ethanol besprüht und der Bauchraum geöffnet. Blutproben wurden aus der *Vena Cava Inferior* entnommen. Um die Gerinnung zu verhindern, wurden die dazu verwendeten Spritzen und Kanülen zuvor mit 1 M EDTA gespült. Aliquots dieses Vollbluts wurden ggf. bis zur FACS-Färbung auf Eis gelagert. Das restliche Blut wurde zur Plasmagewinnung bei 500 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert und die zellfreien Überstände sofort in Flüssigstickstoff weggefroren.

Organe - insbesondere Leber, Lunge und Milz - wurden mit Präparierbesteck vorsichtig entnommen und entweder sofort in Flüssigstickstoff weggefroren, in TissueTek™ eingebettet, oder für 24 h in Fixierlösung fixiert und anschließend dehydriert und in Paraffin eingebettet.

KM-Zellen wurden aus Femur und Tibia isoliert. Dazu wurden die Hinterbeine am Hüftknochen herausgeschnitten und von umliegendem Gewebe befreit, ohne dabei die Knochen selbst zu beschädigen und das KM freizulegen. Je Maus ein Oberschenkelknochen (Femur) wurde über Nacht in 2 % PFA fixiert, für 5 Tage in 0,5 M EDTA entkalkifiziert und anschließend ebenfalls dehydriert und in Paraffin eingebettet. Aus den übrigen Knochen wurden KM-Zellen isoliert, indem sie beidseitig knapp hinter den Gelenken geöffnet und mit einer 27 G-Kanüle und 1 ml kaltem PBS ausgespült wurden. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde für die FACS-Färbung auf Eis gelagert. Der Rest wurde bei 500 g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert und die zellfreien Überstände und Pellets in Flüssigstickstoff weggefroren.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Kultivieren und Passagieren der Zelllinien

Das routinemäßige Passagieren von Zellen erfolgte in der Regel durch Katja Honert. Alle Zellen wurden unter Normoxie bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

32Dcl3-Zellen wurden in RPMI-Medium inkl. 10 % FCS und 2 ng/ml rIL-3 kultiviert und alle 2 -3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschale abgeschabt und in einer Dichte von ca. 1×10^5 /ml in frisches Medium überführt.

HT1080-, NIH3T3-, und 293T-Zellen wurden in DMEM-Medium inkl. 2 mM Glutamin, 10 mM HEPES, 0,116 mg/ml L-Arginin und 0,036 mg/ml L-Asparagin kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Dazu wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und in einem der Zelldichte und Proliferationsrate angemessenen Split-Verhältnis ausplattiert.

MATERIAL UND METHODEN

HT1080-TIMP-1-Überexpressions- (HT1080-SF-T1) und TIMP-1-*knock down*-Zellen (HT1080-shT1), sowie NIH3T3-TIMP-1-Überexpressions- (NIH-SF-T1) und entsprechende Kontrollzellen (NIH-Ktrl) wurden durch Haissi Cui oder Katja Honert mittels stabiler lentiviraler Transduktion generiert.

2.2.2 G-CSF-induzierte Differenzierung von 32Dcl3-Zellen

32Dcl3-Zellen mit einer maximalen Passagenzahl von 15 wurden abgeschabt, abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und schließlich in einer Dichte von 8×10^5 /ml in RPMI inkl. 10 % FCS ohne IL-3 überführt. Um die Differenzierung zu stimulieren, wurden entweder 100 ng/ml rG-CSF oder 100 ng/ml rG-CSF und 1000 ng/ml rT1 zugesetzt. Alle zwei Tage wurden die Zellen in frisches Medium inkl. 50 ng/ml rG-CSF +/- 1000 ng/ml rT1 überführt. Nach 2 - 7 Tagen wurden die Zellen abgeschabt und gezählt. Für die Quantifizierung differenzierter Zellen anhand der Kernmorphologie wurden Zytospins angefertigt (s. Abschnitt 2.4.3). Zur Analyse der Genexpression wurden mindestens 2×10^5 Zellen mit PBS gewaschen und zur RNA-Isolierung in Trizol aufgenommen (s. Abschnitt 2.5.2). Die Analyse von Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie ist unter Abschnitt 2.3.1 beschrieben.

2.2.3 Inkubation von 32Dcl3-Zellen mit rTIMP-1

Um direkte Effekte von TIMP-1 auf die Genexpression oder intrazelluläres *Signaling* in 32Dcl3-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 /ml in IL-3-haltigem Medium ausgesät. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1000 ng/ml rTIMP-1 bzw. PBS als Vehikel-Kontrolle stimuliert. Für die Analyse der Effekte auf Genexpression wurde 20 h später mRNA isoliert, für intrazelluläres *Signaling* erfolgte 12 h später die Proteinextraktion.

2.2.4 Knock down von CD63 in 32Dcl3-Zellen

Für die lentivirale Infektion wurden 2×10^6 32Dcl3-Zellen in 1 ml IL3-haltigem Medium inkl. 8 µg/ml Polybren für 30 min bei RT vorinkubiert, anschließend 0,5 ml lentiviraler Überstand zugegeben und unter gelegentlichem Schwenken für 2 h im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden weitere 4 ml IL3-haltiges Medium zugegeben und Ü/N bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um Virus-Reste vollständig zu entfernen. Die Zellen wurden in einer Dichte von 2×10^5 / ml zunächst für weitere 24 h in IL3-haltigem Medium ohne Antibiotika kultiviert und anschließend in IL3-haltiges Medium inkl. 2,5 µg/ml Puromycin überführt, um infizierte Zellen zu selektionieren. Die Selektion wurde so lange fortgeführt, bis alle Zellen einer nicht transduzierten Kontrollschale tot waren. Dabei wurden die Zellen alle 2 Tage in frisches IL3- und Puromycin-haltiges Medium überführt.

Insgesamt wurden 32Dcl3-Zellen auf diese Weise mit 5 verschiedenen shRNA-Sequenzen gegen CD63 (shCD63 # 1 - 5), sowie einer zu keiner Gensequenz komplementären Kontroll-shRNA (*non targeting*, shNT) transduziert. Von den fünf shCD63-Konstrukten wurden die zwei Konstrukte, die zum effektivsten *knock down* führten (# 3 und # 5), für weitere Experimente verwendet.

2.2.5 Herstellung und Amplifikation viraler Vektoren

2.2.5.1 Adenovirale Vektoren

Die Herstellung sämtlicher adenoviraler Vektoren erfolgte durch oder in Zusammenarbeit mit Katja Honert durch Infektion von HEK293-Zellen mit einer vorherigen Virus-Charge. Dazu wurden HEK293-Zellen auf 15 cm-Schalen so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion ca. 70% konfluent waren. Zur Bestimmung der Zellzahl und der daraus errechneten Viruspartikelzahl wurden die Zellen einer Schale mit Trypsin abgelöst und gezählt. Von den übrigen Schalen wurde das Medium abgesaugt und 2 ml des in PBS²⁺ verdünnten Virus zugegeben, das zuvor so eingestellt wurde, dass die zugegebene Viruspartikelzahl dem 10-fachen der ermittelten Zellzahl entsprach (MOI = 10). Der Ansatz wurde unter gelegentlichem Schwenken zunächst für 30 min inkubiert, anschließend wurden 16 ml Medium zugegeben und ca. 48 h weiter im Brutschrank inkubiert, bis das Ablösen und die Lyse der infizierten Zellen klar erkennbar war. Die Virus-haltigen Überstände wurden in Falkons gesammelt. Noch nicht vollständig lysierte Zellen wurden vom Schalenboden abgeschabt, abzentrifugiert, um restliches Medium zu entfernen, und in ca. 0,5 ml 0,1 M TRIS durch wiederholtes Einfrieren und Auftauen lysiert. Die Lysate wurden mit 1/10 des Volumens 5% Na-Deoxycholat versetzt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 10 µl/ml 2 M MgCl₂ und 5 µl/ml DNaseI-Lösung (10 mg/ml in Tris/HCl pH 7,4, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 0,1 mg/ml BSA, 50 % Glycerol) zugegeben und unter gelegentlichem Schwenken bei 37°C für 1 h inkubiert, bei maximaler Geschwindigkeit für 15 min abzentrifugiert und die Virus-haltigen Überstände abgenommen.

Die weitere Virus-Aufreinigung erfolgte durch Zentrifugation in einem dreistufigen CsCl-Gradienten der Dichten 1,5 g/ml, 1,35 g/ml und 1,25 g/ml in 10 mM TRIS, pH 8,0. Dazu wurden die Virus-Überstände auf den Gradienten geschichtet und für 2 h bei 20000 rpm und 10°C zentrifugiert. Die Virus-Bande zwischen der 1,35 g/ml und der 1,25 g/ml-Phase wurde mit einer 20 G-Kanüle abgenommen, erneut auf CsCl der Dichte 1,35 g/ml geschichtet und Ü/N bei 30000 rpm zentrifugiert. Die in dem dabei gebildeten kontinuierlichen Dichtegradienten entstehende Bande wurde abgenommen, zur Entfernung des CsCl gegen 10 mM Tris, pH 8,0 dialysiert, mit 5 % (v/v) Glycerin versetzt und zur weiteren Verwendung aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.2.5.2 Lentivirale Vektoren

Zur Herstellung lentiviraler Vektoren für den CD63-*knock down* wurden 293T-Zellen mit den verschiedenen shCD63- bzw. shNT-kodierenden Plasmiden sowie mit Virus-Protein-kodierenden Helferplasmiden co-transfiziert. 293T-Zellen wurden so ausgesät, dass sie am Tag der Co-Transfektion ca. 60 - 70% konfluent waren. Für die Transfektion wurden 10 µg Transferplasmid (shNT / shCD63), 6,6 µg pMD.GP (pLP1, codiert für die viralen Proteine gag und pol), 3,5 µg pRSV-rev (pLP2) und 4,3 µg pMD.G (pLPVSVG) mit 3 ml Opti-MEM und 36 µl Lipofectamin gemischt und für 20 min bei RT

inkubiert, um die Bildung des DNA-Lipofectamin-Komplexes zu ermöglichen. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den 293T-Zellen abgenommen und durch 5 ml Opti-MEM inkl. 10% FCS ersetzt. Anschließend wurde die DNA-Lipofectamin-Mischung langsam auf die Zellen getropft und für ca. 6 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium erneut abgenommen und durch 32Dcl3-Medium (RPMI, 10% FCS, 2 ng/ml rIL-3) ersetzt, um zu gewährleisten, dass die Viruspartikel in das für die Transduktion der Zellen optimale Medium freigesetzt werden. Nach weiteren 20 - 24 h wurden die Virus-Überstände abgenommen, filtriert und in Aliquots bei -80°C weggefroren.

2.2.6 MACS-basierte Isolation und Kultivierung primärer Neutrophiler aus Blut und KM

Die Isolierung primärer Neutrophiler Granulozyten aus Vollblut oder aus KM-Zellen erfolgte mittels MACS-basierter negativer Selektion. Blutproben (je nach Mausstamm und Alter ca. 500 - 800 μ l) wurden abzentrifugiert (5 min, 500 g, 4°C), die Pellets zur Erythrozyten-Lyse für 5 min bei RT in 1 ml 1x RBC Lysis Buffer inkubiert und erneut abzentrifugiert. Falls die Pellets noch rötlich waren, wurde dieser Schritt wiederholt. KM-Zellen wurden durch Spülen der Femur und Tibia mit PBS isoliert und zur Beseitigung von Zellklumpen durch einen 70 μ m *cell strainer* gespült. Blut- und KM-Leukozyten wurden daraufhin abzentrifugiert und in 100 μ l (Blut) bzw. 200 μ l (KM) MACS-Puffer (PBS, 0,5 % BSA, 2 mM EDTA, steril filtriert) resuspendiert. Zur Markierung aller Nicht-Neutrophilen wurden 25 μ l (Blut) bzw. 50 μ l (KM) des im Kit enthaltenen Antikörper-Cocktails zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift in 5 ml PBS wurden die Zellen in 200 μ l MACS-Puffer und 50 μ l Anti-Biotin-Beads resuspendiert, für 15 min auf Eis inkubiert, erneut gewaschen und in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Diese Suspension wurde auf vorher mit MACS-Puffer äquilibrierte, im MACS-Separator eingespannte Säulchen (MS für Blut, LS für KM) gegeben. Nicht magnetisch markierte Neutrophile befanden sich im Durchfluss und wurden mit diesem aufgefangen. Anschließend wurde noch einmal mit MACS-Puffer nachgespült. Falls Rest-Leukozyten benötigt wurden, wurde die Säule aus dem MACS-Separator genommen und zur Elution der magnetisch markierten Zellen erneut mit MACS-Puffer gespült. Die Neutrophilen-Fraktion wurde abzentrifugiert, in Medium (RPMI, 10% FCS, Pen/Strep) aufgenommen und je nach weiterer Verwendung kultiviert.

2.2.7 Viabilitäts-Assay mit primären Neutrophilen

Effekte von TIMP-1 auf die Überlebensrate isolierter Neutrophiler wurde *ex vivo* anhand der Umsetzung von AlamarBlue durch lebende - und damit metabolisch aktive Neutrophile - untersucht. Dazu wurden 5×10^3 isolierte Blut-Neutrophile in 100 μ l Medium (RPMI, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, ggf. +/- 1000 ng/ml rT1) je *Well* in 96 *well*-Kulturplatten ausgesät und für bis zu 72 h im Brutschrank inkubiert. 30 min vor der jeweiligen Messung wurden 10 μ l AlamarBlue zugegeben, um dessen Umsetzung durch metabolisch aktive Zellen zu ermöglichen. Durch Messung der Fluoreszenz bei 590 nm wurde diese Umsetzung quantifiziert. Zur Auswertung wurde von jedem Messwert die mittlere

Fluoreszenz aus mit AlamarBlue versetztem Medium subtrahiert. Als 100 %-Referenzwert wurde ein Startwert 2 h nach Aussähen der Neutrophilen genommen, um den Zellen zu ermöglichen, sich an die Kulturbedingungen anzupassen. Da reife Neutrophile nicht proliferieren, kann die Quantifizierung Stoffwechsel-aktiver Zellen direkt als Maß für deren Überlebensrate gesehen werden.

2.2.8 Migrations-Assay

Die Migration isolierter KM-Neutrophiler in Richtung verschiedener Chemoattraktanten wurde in Boyden Chamber *Transwell*-Experimenten untersucht. Dazu wurden die Zellen in einem *Insert* ausgesät, das sie durch eine poröse Membran vom mit Chemoattraktanten versetzten Medium im unteren *Well* trennt. KM-Neutrophile wurden entweder aus unbehandelten Mäusen isoliert und 1 h mit rT1 (1000 ng/ml) vorinkubiert, oder direkt aus AdKtrl- und AdT1-transduzierten Mäusen isoliert. 5×10^5 Zellen wurden anschließend in *Transwell-Inserts* mit 3 μm Porendurchmesser ausgesät, und Medium inkl. dem jeweiligen Chemoattraktanten (1000 ng/ml rT1, 100 ng/ml rCXCL6 oder 10 % FCS) wurde in das untere *Well* gegeben. Um durch die Membran migrieren zu können, wurden die Zellen 1 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die *Inserts* aus den *Wells* genommen, an der unteren Membranseite haftende Zellen vorsichtig abgespült und migrierte Neutrophile im unteren *Well* mittels Durchflusszytometrie gezählt. Dazu wurden die Zellen im Gesamtvolumen resuspendiert, ein definiertes Volumen der Zellsuspension am FACS analysiert und die darin gemessene Zellzahl auf das Gesamtvolumen hochgerechnet. Alle Migrationsmessungen erfolgten in Triplikaten.

2.3 Durchflusszytometrie

2.3.1 Färbung von Oberflächenmarkern auf 32Dcl3-Zellen

Zur Quantifizierung von Differenzierungsmarkern oder CD63 auf der Oberfläche von 32Dcl3-Zellen wurden diese vorsichtig mit Zellschabern abgekratzt, mit Medium abgespült, abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Anschließend wurden ca. 5×10^5 Zellen in 100 μl FACS-Puffer (PBS, 2 % FCS) resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die entsprechenden Fluorophor-konjugierten Antikörper wurden in den in Tabelle 1 angegebenen Mengen zugegeben und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zum Waschen wurden die FACS-Röhrchen mit 4 ml PBS aufgefüllt und 5 min bei 500 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 400 μl FACS-Puffer resuspendiert, bei 4°C gelagert und innerhalb 1 h gemessen.

2.3.2 Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen in Blut und KM mittels *multi color*-Durchflusszytometrie

Zur Unterscheidung der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen wurden diese anhand typischer Oberflächenmarker gefärbt. T-Zellen wurden anhand des allgemeinen T-Zellmarkers CD3, B-

MATERIAL UND METHODEN

Lymphozyten anhand von CD19, und NK-Zellen anhand von CD49b-Expression identifiziert. Myeloide Zellen wurden durch CD11b-Expression von lymphoiden Zellen unterschieden und anhand der Marker Ly6G und Ly6C weiter unterteilt.

Die absolute Quantifizierung dieser Subpopulationen im Blut erfolgte in *trucount*TM tubes in einem Protokoll ohne Waschschriffe, um den Verlust der sehr kleinen *trucount Beads* zu vermeiden. Dazu wurden die jeweils benötigten FACS-Antikörper entsprechend der Mengenangaben aus Tabelle 1 mit FACS-Puffer und 1 µl Fc-Block in einem Gesamtvolumen von 20 µl je Probe gemischt, in *trucount*TM tubes pipettiert und mit exakt 50 µl Blut gemischt. Um den Pipettierfehler des zähflüssigen Blutes zu minimieren, wurde dabei revers pipettiert. Die Ansätze wurden lichtgeschützt 15 min bei RT oder 30 min bei 4°C inkubiert. Zur hypotonen Lyse von Erythrozyten und gleichzeitigen Fixierung wurden anschließend 450 µl 1x FACS LysingTM solution zugegeben und alles für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden 500 - 1000 µl PBS zugegeben, um das Fixans zu verdünnen und eine Schädigung der Fluorophore zu reduzieren. Die Färbung von KM-Leukozyten erfolgte analog mit 80 µl der aus Femur und Tibia isolierten Zellsuspension in normalen FACS-Röhrchen. Alle Proben wurden je nach Geräteverfügbarkeit innerhalb weniger Stunden am BD FACSCantoTM II gemessen.

2.3.3 AnnexinV-Färbung auf Blut-Leukozyten

Zur Unterscheidung der einzelnen Leukozyten-Subpopulationen wurden in frischen Blutproben zunächst die Oberflächenmarker CD45, CD11b, Ly6G, CD3, CD19 und CD49b angefärbt. Dazu wurden 50 µl Blut mit 10 µl Antikörper-Mastermix für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde zur Erythrozyten-Lyse 1 ml 1x RBC Lysis-Puffer zugegeben und für 5 min bei RT inkubiert, in FCS-freiem PBS gewaschen und abzentrifugiert (500 g, 5 min, 4°C). Zur Färbung toter Zellen wurden die Pellets in 100 µl des 1:1000 in PBS verdünntem Fixable Viability dye-eFluor[®]605 resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe, zunächst in FACS-Puffer (PBS mit FCS), dann in 1 ml 1x Annexin V Binding buffer. Anschließend wurden die Zellen in 100 µl AnnexinV Binding Buffer inkl. 5 µl AnnexinV-FITC für 30 min bei RT inkubiert, gefolgt von zwei weiteren Waschschriffen, zunächst in 1 ml AnnexinV Binding Buffer, dann in 4 ml FACS-Puffer. Zur Fixierung wurden die Zellen schließlich für 30 min bei RT in 100 µl CytotfixTM inkubiert, mit PBS gewaschen, in FACS-Puffer resuspendiert und gemessen. Zum Schutz der Fluorophore wurden alle Inkubationen im Dunkeln durchgeführt.

2.3.4 BrdU-Färbung in Blut- und KM-Leukozyten

Zunächst wurden in 50 µl Blut bzw. 80 µl KM-Zellsuspension die Oberflächenmarker CD45, CD11b, Ly6G, CD3, CD19 und CD49b gefärbt. Zur Erythrozyten-Lyse wurden Blutproben für 5 min in 1 ml, KM-Proben in 0,5 ml 1x RBC Lysis Buffer inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung der Membran wurden die Zellen 15 min bei RT in BrdU Staining Solution (1 Teil BrdU Staining Solution Concentrate, 3 Teile Fix Perm Dilutant) inkubiert und mit PBS gewaschen. Die

Pellets wurden in 100 µl DNaseI-Lösung (300 µg/ml DNaseI in FACS-Puffer) resuspendiert, zur Fragmentierung chromosomaler DNA 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend in FACS-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen für 30 min bei RT in 100 µl FACS-Puffer inkl. Fc-Block mit BrdU-Antikörper inkubiert und nach Zugabe von 500 µl FACS-Puffer gemessen.

2.3.5 Probenmessung und Auswertung

Die Messung erfolgte am BD FACSCanto™ II-Durchflusszytometer. Zur Ermittlung geeigneter PMT-Einstellungen am FACS-Gerät und zur Korrektur des *Spillover* einzelner Farben in andere Fluoreszenzkanäle wurden ungefärbte, bzw. nur mit einem Antikörper (*single colors*) gefärbte Proben angefertigt. Die Kompensation erfolgte am FACS-Gerät mithilfe der BD FACSDiva™ Software durch Messung dieser *single color*-Proben. Die Auswertung der Messdaten erfolgte mittels FlowJo-Software v8.8.6 oder v10.0.7. Die Quantifizierung einzelner Leukozyten-Populationen erfolgte durch *Gating* entsprechend der Expression von Oberflächenmarkern und Auswertung der Zellzahl im jeweiligen *Gate*. Die *Gating*-Strategie für Leukozytenpopulationen in Blut und Knochenmark erfolgte stets nach demselben Muster und ist anhand repräsentativer Plots im Anhang dargestellt (Anhang 3, 4). Die absolute Anzahl n von Blut-Leukozyten wurde entsprechend der folgenden Formel berechnet:

$$n = \frac{\text{Zellzahl im gate}}{\text{bead-Zahl im gate}} \times \frac{\text{bead-Gesamtzahl}}{50\mu\text{l}}$$

Zur Bestimmung der Oberflächenexpression von CD63 oder CXCR4 wurden von den MFI-Werten (mittlere Fluoreszenzintensität) Antikörper-gefärbter Proben die MFI-Werte IgG-gefärbter Kontrollen subtrahiert.

2.4 Immunhistochemie

2.4.1 Färbung von Neutrophilen oder SDF-1 auf KM-Paraffinschnitten

Von in Paraffin eingebetteten Oberschenkelknochen (s. Abschnitt II.2.1.8) wurden am Mikrotom 4 µm dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und Ü/N bei 50°C getrocknet. Zur Entfernung des Paraffins wurden die Schnitte dreimal für 5 min in ein Roticlear-Bad gestellt, anschließend je zweimal 5 min in 100 % und 90 % rehydriert und in ddH₂O gespült. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte 30 min bei 37°C mit Proteinase K (0,02 mg/ml in TE-Puffer) inkubiert, zum Stoppen der Reaktion 5 min in kaltes PBS-T gestellt und anschließend zweimal 5 min mit TBS gewaschen. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Schnitte 5 min in 3% H₂O₂ in ddH₂O inkubiert, kurz in ddH₂O gespült und für 10 min in 1x TBS gestellt. Für die Detektion Neutrophiler Granulozyten wurde der Ly6G-Antikörper (Klon 1A8) 1:200 in PBS verdünnt, auf die Schnitte getropft und über Nacht bei 4°C in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Box (feuchte Kammer) inkubiert. Der SDF-1-Antikörper (Klon FL-93) wurde 1:50 verdünnt und ebenfalls bei 4°C Ü/N angewendet. Kontrollschnitte wurden mit IgG-Kontrollantikörper oder TBS inkubiert. Am

MATERIAL UND METHODEN

nächsten Morgen wurden die Schnitte zweimal 5 min in TBS-T gewaschen, bevor Biotin-gekoppelter anti-Ratten-Sekundärantikörper (1:100-Verdünnung in TBS) zugegeben und für 45 min bei RT inkubiert wurde. Nach zweimaligem Waschen in TBS-T wurde an Streptavidin gekoppelte Meerrettich-Peroxidase (1:500-Verdünnung in TBS) auf die Schnitte getropft, erneut für 30 min bei RT inkubiert und anschließend zweimal für 5 min in TBS-T gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte mit AEC. Dazu wurde entsprechend der Herstellerangaben AEC-Chromogenlösung frisch angesetzt, auf die Schnitte getropft und für 3 - 5 min inkubiert, wobei die Farbentwicklung genau beobachtet wurde. Sobald ein klares Signal erkennbar war, ohne dass unspezifische Hintergrundfärbung auf den Kontrollen auftrat, wurde die Farbentwicklung in ddH₂O gestoppt. Die Schnitte wurden anschließend zur Gegenfärbung der Zellkerne ca. 60 - 120 min in Mayer's Hämalaun-Lösung getaucht, anschließend mehrfach mit Leitungswasser gespült und unter leicht fließendem Wasserstrahl in Leitungswasser gebläut. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckt und am Mikroskop analysiert und ausgewertet.

Die SDF-1-Färbung, sowie ein Teil der Ly6G-Färbung erfolgten durch Dr. Susanne Schaten.

2.4.2 Färbung von Neutrophilen auf Gewebe-Cryoschnitten

Für die Quantifizierung von Neutrophilen im Lebergewebe wurden am Cryotom 7 µm dicke Schnitte von in TissueTek™ eingebetteten Leberstückchen angefertigt, auf Objektträger aufgezogen und ggf. bei -80°C gelagert.

Für die Färbung wurden die Schnitte mind. 30 min bei RT an der Luft trocknen gelassen, anschließend für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert, erneut für 15 - 20 min getrocknet und für 10 min in TBS rehydriert. Zur Blockierung endogener Peroxidasen wurden die Objektträger 5 min in Methanol + 0,3 % H₂O₂ inkubiert und anschließend zweimal 3 min in TBS gewaschen. Ly6G-Primärantikörper (Klon 1A8) bzw. IgG-Kontrollantikörper wurde in einer 1:200-Verdünnung in TBS auf die Schnitte getropft und über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden zweimal 5 min in TBS-T gewaschen. Dann wurde an Meerrettich-Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper (1:100-Verdünnung in TBS) zugegeben und für 2 h bei RT in der feuchten Kammer inkubiert. Die Schnitte wurden anschließend dreimal 5 min in TBS-T gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte durch DAB-Entwicklerlösung nach Herstellerangaben, wobei wiederum die Farbentwicklung beobachtet und nach ca. 4 - 6 min in H₂O gestoppt wurde. Zur Gegenfärbung wurden die Schnitte für 30 - 60 sek in Hämalaun-Lösung getaucht und ca. 10 min in Leitungswasser gebläut, bevor sie mit Glyceringelatine eingedeckt wurden.

2.4.3 DiffQuick-Färbung von Zytospins

32Dcl3-Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach G-CSF-Stimulierung abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend in PBS gezählt und auf eine Dichte von 1×10^5 Zellen/ml eingestellt.

0,5 ml dieser Zellsuspension wurden in der Zytospin-Zentrifuge 5 min bei 450 rpm auf Objektträger zentrifugiert. Die Zytospins wurden bei Raumtemperatur für mind. 10 min getrocknet, anschließend für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert und erneut mind. 15 min an der Luft getrocknet. Dann wurden die Objektträger fünfmal für je ca. 1 sek in DiffQuick-Färbelösung I und anschließend fünfmal 1 sek in Färbelösung II getaucht, zweimal mit Leitungswasser gespült und an der Luft getrocknet. Unmittelbar im Anschluss wurden die Zytospins am Mikroskop fotografiert. Für die Auswertung wurden pro Bildausschnitt Zellen mit segmentiertem Kern gezählt und deren Anteil an der Gesamtzellzahl berechnet. Pro Objektträger wurden mind. 5 Bilder ausgezählt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolierung aus Knochenmark

Knochenmark wurde - wie unter II.2.1.7 beschrieben - aus Femur und Tibia isoliert und bei 500 g und 4°C 5 min abzentrifugiert. Die Pellets wurden anschließend in 0,5 ml Trizol resuspendiert. Im Fall von KM-Isolaten aus C57Bl/6-Mäusen wurden den Proben zusätzlich Zirkonium-Kügelchen zugesetzt und auf dem Bead Beater geschüttelt. Dies war notwendig, um einen vollständigen Aufschluss der Zellen und extrazellulärer Matrix zu gewährleisten und somit Qualitätsverluste der RNA zu vermeiden. Die Proben wurden 5 min bei RT in Trizol inkubiert. Anschließend wurden 100 µl Chloroform zugegeben und durch vortexen gründlich vermischt. Nach 2 - 3 min wurden die Proben 15 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die RNA-enhaltende obere farblose Phase wurde abgenommen und zur RNA-Fällung mit 250 µl Isopropanol vermischt, 10 min bei RT inkubiert und erneut 10 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die RNA-Pellets wurden durch Zugabe von 1 ml 80% Ethanol und 5-minütiger Zentrifugation bei 7600 rpm und 4°C gewaschen. Anschließend wurden die zunächst weißlichen Pellets 10 - 30 min bei RT getrocknet, bis sie durchsichtig waren. Die RNA wurde je nach Ausgangszellzahl und Pellet-Größe in 20 - 50 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelöst.

2.5.2 RNA-Isolierung aus 32Dcl3-Zellen

32Dcl3-Zellen wurden entweder für den jeweils angezeigten Zeitraum in IL-3-freiem Medium mit G-CSF +/- rTIMP-1 stimuliert, oder für 20 h in IL-3-haltigem Medium mit rTIMP-1 inkubiert. Zur RNA-Isolierung wurden mind. 200 000 Zellen abgeschabt, in Falkons überführt, mit PBS gewaschen und bei 200 rpm für 5 min abzentrifugiert. Die Zellpellets wurden anschließend in 0,5 ml Trizol aufgenommen und 5 min bei RT inkubiert. Die weiteren Schritte der RNA-Extraktion entsprechen denen der RNA-Isolierung aus Knochenmark (Abschnitt II.2.5.1).

2.5.3 Reverse Transkription

Zunächst wurde die gelöste RNA zur Aufhebung spontan gebildeter Sekundärstrukturen für 10 min auf 60°C erhitzt. Anschließend wurde die Konzentration durch photometrische Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt, wobei ein Absorptionswert $A_{260} = 1,0$ für Einzelstrang-RNA einer Konzentration von 40 µg/ml entspricht. Falls die Probenkonzentration höher als 0,5 µg/µl war, wurde eine Vorverdünnung auf diese Konzentration gemacht und erneut gemessen. Für die reverse Transkription (RT) wurde die RNA in Nuklease-freiem Wasser auf 0,1 µg/µl eingestellt. Zur Qualitätskontrolle wurden Aliquots dieser Endverdünnung 1:1 mit 2x RNA-Ladepuffer gemischt und im 1 %-Agarosegel (1 g Agarose gelöst in 100 ml 1x TAE-Puffer) aufgetrennt. Wenn die RNA nicht degradiert war, also klar definierte Banden für 28S- und 18S-ribosomale RNA zu erkennen waren, wurden die Proben mithilfe des *High Capacity cDNA Reverse Transcription* Kit umgeschrieben.

Mengenangaben der für die RT-Reaktion eingesetzten Reagenzien:.

10x RT-Puffer	2,0 µl
25x dNTP-Mix (100µM)	0,8 µl
10x RT-random Primer	2,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transkriptase	1,0 µl
RNase Inhibitor	1,0 µl
nucleasefreies Wasser	3,2 µl

Die Reaktion wurde in 0,2-ml-Reaktionsgefäßen nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt 1:	10 min bei 25°C
Schritt 2:	120 min bei 37°C
Schritt 3:	5 sek bei 85°C

2.5.4 Genexpressionsanalyse mittels qRT-PCR

Genexpressionsanalysen auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR wurden mithilfe der Roche Universal Probe library durchgeführt. Die Auswahl geeigneter *Primer*- und *Probe*-Kombinationen für die jeweiligen Gene erfolgte im von Roche *online* zur Verfügung gestellten Assay Design Center (<http://lifescience.roche.com/shop/CategoryDisplay?identifier=Universal+Probe+Library>).

Die Messung der einzelnen Proben erfolgte jeweils in Triplikaten und wurde durch relative Quantifizierung nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) ausgewertet. Als endogener Standard diente 18S rRNA und wurde in einer 1:500-Verdünnung der cDNA-Proben gemessen. Die Messung der Zielgene erfolgte in 1:100-Verdünnungen. Dazu wurden je 10 µl der cDNA-Verdünnungen vorgelegt und der entsprechende Mastermix aus 12,5 µl FastStart Universal Probe Master (Rox), 0,25 µl *forward* Primer, 0,25 µl *reverse* Primer, 0,25 µl Probe und 1,75 µl Nuklease-freiem Wasser mit einer Multistep-Pipette hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurde für jedes Gen Nuklease-freies Wasser anstatt verdünnter cDNA mitgeführt.

2.6 Proteinbiochemische Methoden

2.6.1 ELISA

Die Quantifizierung von humanem TIMP-1 und murinem G-CSF im Plasma erfolgte mittels Sandwich-ELISA. Alle Antikörper und Reagenzien wurden den Herstellerangaben entsprechend verwendet. Zum *Coaten* der ELISA-Platten wurden 100 µl in PBS verdünnter *capture*-Antikörper über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Platten viermal mit 300 µl Waschpuffer gewaschen, ausgeklopft und zur Vermeidung unspezifischer Bindung mit Blocking-Puffer 1 h bei RT blockiert. In der Zwischenzeit wurden frische oder auf Eis aufgetaute Plasmaproben im vom Kit-Hersteller empfohlenen Puffer so verdünnt, dass die zu erwartende Konzentration im Bereich des Standards lag. Für TIMP-1-Spiegel in AdT1-transduzierten Mäusen entsprach dies in der Regel einer Verdünnung von 1:20 000, für G-CSF von 1:10. Die Proben wurden zusammen mit dem BSA-Standard in Duplikaten a 100 µl auf die Platte aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wurde der Detektionsantikörper zugegeben und für 2 h bei RT inkubiert und wiederum gewaschen. Anschließend wurde die Platte für 30 min mit Streptavidin-HRP-Lösung bei RT inkubiert und erneut gewaschen. Zur Entwicklung wurde die Platte mit 100 µl TMB-Substrat (1:1-Mischung aus Lösung A und B) für 20 min bei RT inkubiert und anschließend durch Zugabe von 50 µl 1 M H₂SO₄ Lösung gestoppt. Unmittelbar darauf wurde die Platte am Wallak *plate reader* durch Messung der Absorption bei 450 nm, sowie bei 590 nm zur Korrektur optischer Unregelmäßigkeiten der Platte ausgelesen. Die Auswertung erfolgte mithilfe der *online*-Software ReaderFit.

2.6.2 Zytokin-Array

Zur Untersuchung der Effekte hoher systemischer TIMP-1-Spiegel auf das Zytokin-Milieu wurden Plasmaproben aus je 5 AdKtrl- und AdT1-transduzierte Mäusen, sowie aus je 4 Mäusen mit HT1080-wt und -shT1-Tumoren *gepoolt*.

Zur Vorbereitung des Glas-Chips wurde dieser zunächst für 2 h unter der *Hood* getrocknet und anschließend für 30 min mit im Kit enthaltenen *Blocking Buffer* inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Plasmaproben 10 min bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert, je Gruppe exakt gleiche Volumina der Einzelproben *gepoolt* und 1:5 in Blocking buffer verdünnt. Je 100 µl dieser Verdünnung wurden Ü/N bei 4°C unter Schwenken auf dem Chip inkubiert und anschließend abpipettiert. Der Chip wurde nach Anleitung mit im Kit enthaltenem 1x Waschpuffer gewaschen, mit Sekundär-Antikörper und Streptavidin-Komplex entwickelt und am GenePix-Gerät bei 532 nm ausgelesen, wobei sich hier die vom Programm ermittelten automatischen PMT-Einstellungen am geeignetsten erwiesen. Zur Auswertung wurde vom Median des Fluoreszenz-Signals der einzelnen Signalpunkte der Median des Hintergrund-Signals abgezogen und anschließend Proben AdT1-transduzierter Mäuse mit AdKtrl-Mäusen und HT1080-wt-Mäuse mit HT1080-shT1-Mäusen verglichen.

2.6.3 Proteinextraktion aus Zellen und Konzentrationsbestimmung

Ca. 1×10^6 32Dcl3-Zellen wurden abgeschabt, mit kaltem PBS gewaschen und anschließend abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 100 μ l 1x RIPA-Puffer, dem unmittelbar vor Gebrauch Protease- und Phosphatase-Inhibitor zugesetzt worden war, resuspendiert und sofort auf Trockeneis oder in Flüssigstickstoff eingefroren. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits wurden die Proben auf Eis aufgetaut und zur Abtrennung unlöslicher Zellfragmente 5 min bei 10 000 g und 4°C abzentrifugiert. Dann wurden in einer 96 well-Platte 10 μ l der 1:10 verdünnten Zelllysate mit 200 μ l BCA-Lösung (Puffer A : Puffer B = 40 : 1) gemischt, für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend am Wallac *plate reader* die Absorption bei 590 nm gemessen. Als Referenz wurde die Absorption einer BSA-Verdünnungsreihe bekannter Konzentrationen gemessen, aus der der lineare Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration ermittelt und zur Berechnung der Probenkonzentrationen verwendet wurde. Die Auswertung erfolgte in Microsoft Excel.

2.6.4 SDS-Gelelektrophorese und Western Blot

50 μ g Gesamtprotein wurden auf 10 % Acrylamid-SDS-Gele aufgetragen. Dazu wurde die entsprechende Lysatmenge mit ddH_2O auf ein Volumen von 30 μ l eingestellt, dem 6 μ l 6 x Lämmli-Puffer zugesetzt wurden. Zur Denaturierung wurden die Proben 5 min auf 95°C erhitzt, anschließend kurz abzentrifugiert und auf Eis gestellt, bevor sie aufs Gel aufgetragen wurden. Als Größenreferenz wurden in eine Tasche 5 μ l Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 80 V, bis die Bromphenol-Bande des Laufpuffers den unteren Gelrand erreicht hatte.

Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte durch *semi dry blotting*. Dazu wurden auf Gelgröße zugeschnittene Filterpapiere und Membran, sowie das Gel selbst kurz in Transferpuffer äquilibriert und in der Reihenfolge Filter - Membran - Gel - Filter in die *Blotting*-Apparatur gestapelt und bei 15 V für 1 h - 1,5 h (je nach Proteingröße) geblottet. Ein gleichmäßiger Transfer wurde anschließend durch Ponceau S-Färbung der Membran sichergestellt.

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung wurde die Membran zunächst 1 h in 5 % BSA/TBS-T geblockt und zur Detektion spezifischer Proteine über Nacht mit dem entsprechenden Primärantikörper (Verdünnungen s. Tabelle 2) inkubiert. Am nächsten Tag wurden Membranen dreimal mindestens 10 min mit TBS-T gewaschen, bevor der Sekundärantikörper zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen in TBS-T erfolgte die Entwicklung mit Clarity Western ECL-Substrat an der ChemiDoc Station.

2.7 Datenauswertung und Statistik

Mittelwerte, Standardfehler und Korrelationskoeffizienten wurden mithilfe von Microsoft Excel berechnet. Einzelwerte innerhalb einer Gruppe wurden auf Normalverteilung überprüft und mittels zwei-seitigem *Student's t*-Test auf Signifikanz getestet. Wurden mehr als zwei Gruppen verglichen, wurde zuerst ein ANOVA-Test durchgeführt und bei gleichen Varianzen anschließend die Unterschiede der Einzelgruppen mittels *Student's t*-Test überprüft. Ein p-Wert $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

Diagramme und Plots wurden mithilfe von Sigma Plot 8.0 oder Sigma Plot 10.0 erstellt. Nicht-signifikante Unterschiede sind in den Abbildungen mit ns gekennzeichnet. Signifikante Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden mit einem Sternchen (*) gekennzeichnet, $p < 0,01$ mit zwei Sternchen (**), und $p < 0,001$ mit 3 Sternchen (***) .

III. ERGEBNISSE

1 Effekte von TIMP-1 auf die Neutrophilenhomöostase

1.1 Hohe systemische TIMP-1-Spiegel induzieren Neutrophilie in Mäusen

Aus Vorarbeiten (Schrözlmaier et al., 2010; Seubert et al., 2015) war zu Beginn dieser Studie bereits bekannt, dass hohe systemische TIMP-1-Level zu einem Neutrophilen-Anstieg im Lebergewebe führen. Um dies genauer zu untersuchen, wurde zunächst der Frage nachgegangen, ob TIMP-1 zur gezielten Rekrutierung von zirkulierenden Neutrophilen in die Leber führt, oder ob möglicherweise Effekte auf die systemische Neutrophilen-Regulation vorliegen.

1.1.1 TIMP-1-Plasmaspiegel korrelieren mit Neutrophilenzahlen im Blut

Um den Einfluss von TIMP-1 auf die generelle Neutrophilen-Homöostase zu untersuchen, wurden Primärtumoren mit unterschiedlich hoher TIMP-1-Expression implantiert. Dazu wurde die humane Fibrosarkom-Zelllinie HT1080 verwendet, die eine hohe endogene TIMP-1-Expression aufweist und im verwendeten Modell nicht metastasiert (Seubert et al., 2015), so dass Nebeneffekte durch streuende Tumorzellen ausgeschlossen werden können. Die endogene TIMP-1-Expression in HT1080-Zellen wurde mithilfe lentiviraler Vektoren manipuliert, wobei sowohl Überexpressions- als auch *knock down*-Zelllinien generiert wurden (Abb. 3 A). Diese Zellen wurden anschließend subkutan in die Nackenfalte immunsupprimierter Mäuse injiziert, woraus sich innerhalb von 10 Tagen Tumoren von ca. 1 cm Durchmesser bildeten. Die TIMP-1-Expression in den Tumorzellen hatte dabei keinen Einfluss auf das Tumorwachstum (Abb. 3 B), führte aber zu unterschiedlichen TIMP-1-Plasmaspiegeln (Abb. 3 C).

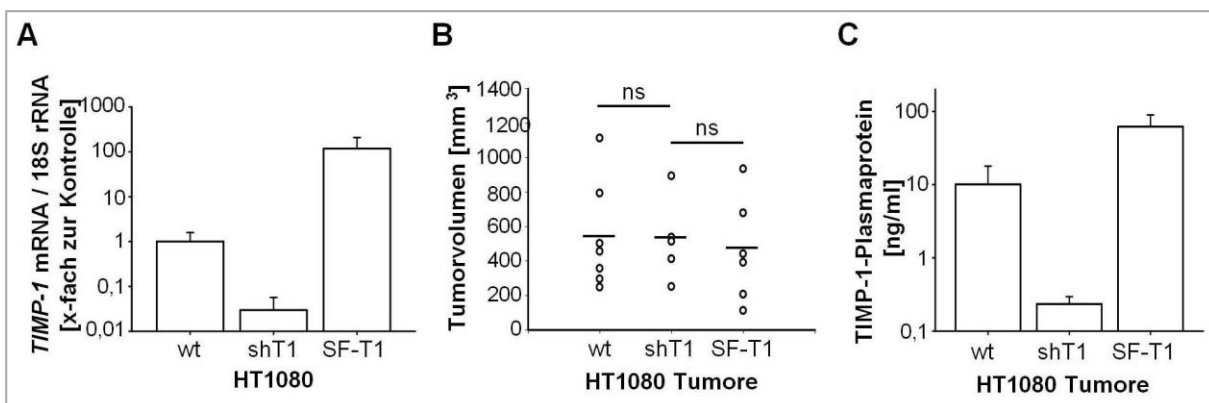


Abb. 3: Manipulation der TIMP-1-Expression in HT1080-Tumoren führt zu unterschiedlich hohen TIMP-1-Plasmaspiegeln in Mäusen. (A) TIMP-1-Expression in HT1080-Zellen vor (wt) bzw. nach lentiviraler Transduktion mit LV-shT1 zum *knock down* von TIMP-1 oder LV-SF-T1 zur TIMP-1-Überexpression. (B, C) 2×10^6 Zellen aus (A) wurden subkutan in die Nackenfalte von $CD1^{nu/nu}$ -Mäusen injiziert. Nach 10 Tagen, als die Tumoren einen Durchmesser von 10 mm erreichten, wurden die Mäuse getötet, das Tumorvolumen mit einer Schiebleere gemessen (B) und TIMP-1-Plasmaspiegel mittels ELISA ermittelt (C).

Um den Einfluss dieser unterschiedlichen TIMP-1-Spiegel auf die systemische Neutrophilen-homöostase zu analysieren, wurden Neutrophile im Blut mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (Abb. 4 A). Interessanterweise ergab sich hier eine positive Korrelation hoher systemischer TIMP-1-Spiegel mit Neutrophilenzahlen im peripheren Blut (Abb. 4 B).

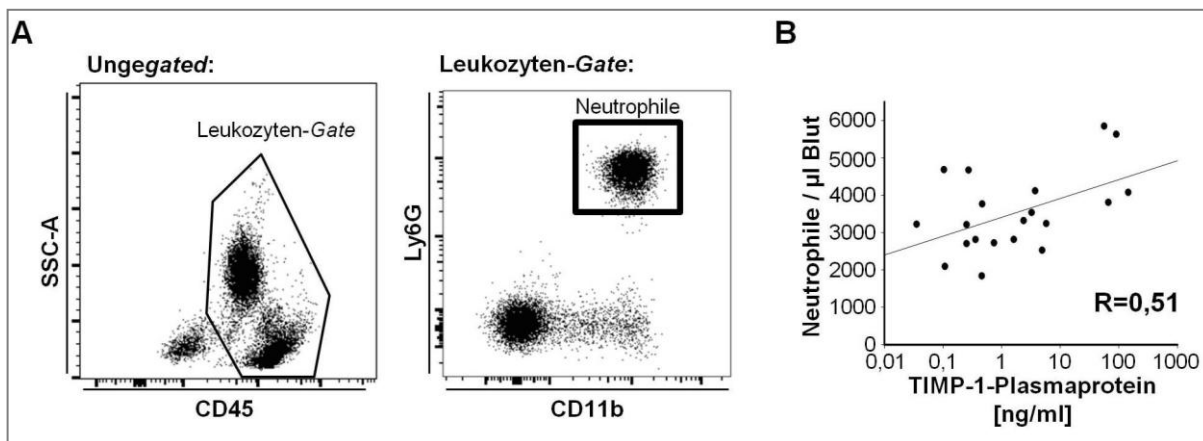


Abb. 4: TIMP-1-Plasmaspiegel korrelieren mit erhöhten Blut-Neutrophilen-Zahlen in Mäusen mit HT1080-Tumoren. (A) Durchflusszytometrische Analyse und *Gating* von Blut-Neutrophilen. Leukozyten wurden anhand der Expression des Pan-Leukozytenmarkers CD45 von Erythrozyten und anderen Zellen bzw. Zellfragmenten unterschieden. Innerhalb dieser Leukozyten-Population wurden Neutrophile anhand der Marker CD11b (auf myeloiden Zellen exprimiert) und Ly6G (spezifischer Marker für Maus-Neutrophile) charakterisiert und quantifiziert. (B) Absolute Quantifizierung der Blut-Neutrophilen in Abhängigkeit der TIMP-1-Plasmaspiegel.

Um auszuschließen, dass es sich bei dieser Beobachtung um Tumorzell-spezifische Effekte handelt, wurde das Experiment mit NIH3T3-Zellen wiederholt. Diese Zelllinie weist nur eine geringe endogene TIMP-1-Expression auf, die aber mittels lentiviralen Gentransfers erheblich gesteigert werden konnte (Abb. 5 A). Subkutane Injektion von NIH3T3-Zellen mit normaler (NIH-Ktrl) oder erhöhter TIMP-1-Expression (NIH-T1) in die Nackenfalte von SCID-Mäusen führte zur Bildung solider, nicht-metastatischer Tumoren innerhalb von 4 Wochen. Allerdings führte in dieser Zelllinie die TIMP-1-Überexpression auch zu verstärktem Tumorwachstum (Abb. 5 B). Interessanterweise korrelierten auch in diesen Mäusen die TIMP-1-Plasmaspiegel stark mit der Neutrophilen-Zahl im Blut (Abb. 5 C).

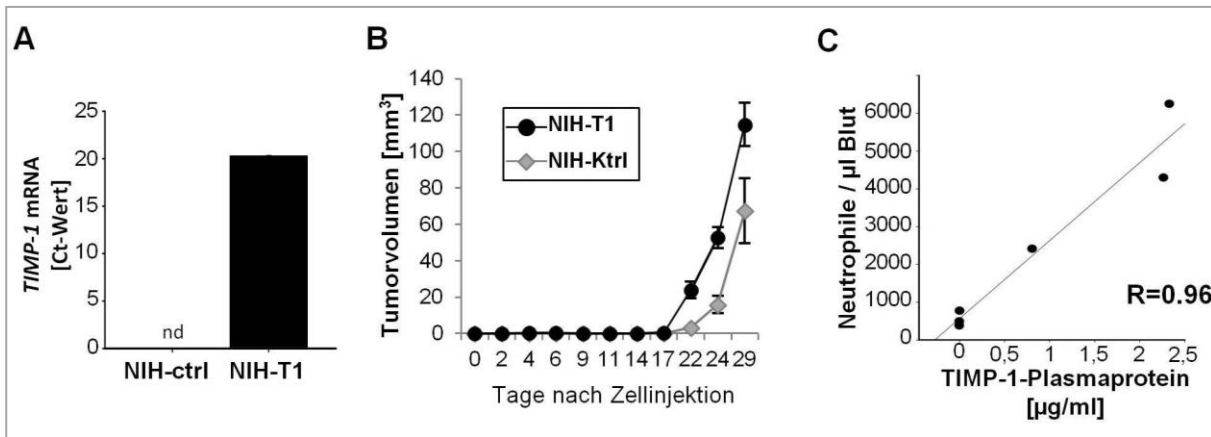


Abb. 5: TIMP-1-Sekretion durch NIH3T3-Tumoren korreliert mit erhöhten Blut-Neutrophilen in SCID-Mäusen. (A) NIH3T3-Zellen wurden mit einem lentiviralen Leer- (NIH-Ktrl) oder TIMP-1-Überexpressionsvektor (NIH-T1) transduziert. Die TIMP-1-Expression wurde *in vitro* mittels qRT-PCR quantifiziert. (B) 2×10^6 NIH3T3-Zellen wurden subkutan in die Nackenfalte von SCID-Mäusen injiziert und das Tumorwachstum wurde mithilfe einer Schiebleere analysiert. (C) Nach 4 Wochen, als die Tumoren einen Durchmesser von 10 - 15 mm erreichten, wurden die Mäuse getötet, TIMP-1-Plasmaspiegel wurden mittels ELISA bestimmt, und Blut-Neutrophile wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

1.1.2 Adenoviral erhöhte systemische TIMP-1-Spiegel induzieren Neutrophilie

Diese Ergebnisse deuten an, dass hohe systemische TIMP-1-Spiegel in Mäusen eine systemische Neutrophilie verursachen. Anhand der beschriebenen Primärtumormodelle kann aber nicht definitiv geklärt werden, ob TIMP-1 direkt diese Effekte verursacht oder ob durch die unterschiedliche TIMP-1-Expression in den Zellen ein möglicher sekundärer Faktor induziert wird, der zum beobachteten Neutrophilen-Anstieg führt. Um dies zu klären, wurde ein Modell herangezogen, bei dem in Mäusen systemisch erhöhte TIMP-1-Spiegel mittels adenoviraler Vektoren (AdT1) induziert wurden. Um Effekte der viralen Infektion selbst auszuschließen, wurde in allen Versuchen Kontrolltieren ein viraler Leervektor (AdKtrl) injiziert. Die Transduktion der Mäuse mit AdT1 führte innerhalb weniger Stunden zu erhöhten TIMP-1-Plasmaspiegeln, die drei Tage nach Infektion ihr Plateau erreichten und anschließend über mehrere Tage stabil waren (Abb. 6).

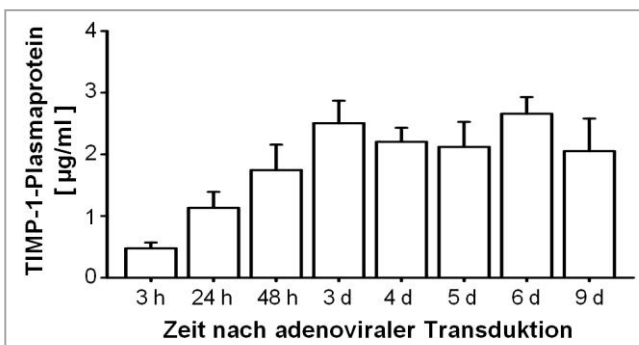


Abb. 6: TIMP-1-Plasmaspiegel in Mäusen nach adenoviraler Transduktion mit AdT1. DBA/2-Mäuse wurden mit AdT1 transduziert und zu den gezeigten Zeitpunkten nach Virusinjektion geopfert. TIMP-1-Plasmaspiegel wurden mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus je Zeitpunkt 5 Mäusen.

Um direkte Effekte dieser erhöhten TIMP-1-Spiegel auf die Neutrophilenhomöostase zu analysieren, wurden Blut-Neutrophile in immunkompetenten DBA/2-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach viraler Transduktion quantifiziert. Tatsächlich stiegen in AdT1-transduzierten Mäusen Blut-Neutrophile allmählich an und waren drei Tage nach Infektion signifikant erhöht. Diese Neutrophilie war stabil über den analysierten Zeitraum von neun Tagen (Abb. 7 A).

Um auszuschließen, dass der Neutrophilenanstieg eine Folge viraler Infektion oder der Expression eines Fremdproteins ist, wurden Mäuse nur mit PBS²⁺, dem bei der Virusinjektion verwendeten Vehikel, mit Leervektor (AdKtrl), sowie mit für ein nicht funktionelles TIMP-1-Fragment codierendem Vektor (AdN-T1/T2G) behandelt. Für keinen dieser Kontroll-Vektoren wurden drei Tage nach Injektion Unterschiede zu PBS²⁺-behandelten Mäusen beobachtet (Abb. 7 B). Der Neutrophilenanstieg wird somit durch funktionelles TIMP-1 und nicht durch die Virusinfektion oder die Expression eines beliebigen Fremdproteins vermittelt.

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde der Effekt in weiteren immunkompetenten Mausstämmen unterschiedlichen Hintergrundes untersucht. Die in DBA/2-Mäusen beobachtete TIMP-1-induzierte Neutrophilie konnte sowohl in C57Bl/6-Mäusen, als auch in FVB/N-Mäusen bestätigt werden, auch wenn diese Mausstämme unterschiedliche Basalspiegel zirkulierender Neutrophiler aufweisen (Abb. 7 C).

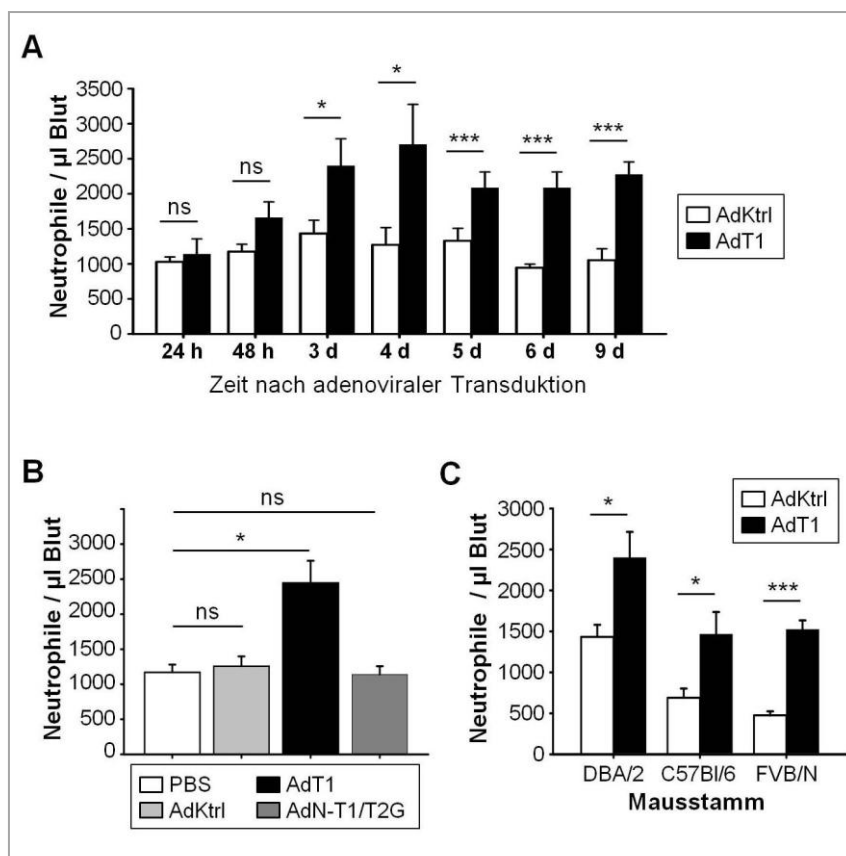


Abb. 7: Hohe systemische TIMP-1-Spiegel induzieren Neutrophilie in Mäusen.

(A) DBA/2-Mäusen wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Virusinjektion geopfert. Die absolute Zahl Neutrophiler im Blut wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. (B) DBA/2-Mäuse wurden 3 Tage nach i.v. Injektion von PBS, AdKtrl, AdT1 oder AdN-T1/T2G geopfert. Blut-Neutrophile wurden mittels Durchflusszytometrie absolut quantifiziert. (C) Blut-Neutrophile in Mäusen unterschiedlichen genetischen Hintergrundes wurden 3 Tage nach Transduktion mit AdKtrl oder AdT1 quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 5 Tieren.

1.2 Ursachen der TIMP-1-induzierten Neutrophilie

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass hohe systemische TIMP-1-Spiegel zu einem Anstieg von Neutrophilen im Blut führen. Um dem Mechanismus dieser TIMP-1-induzierten Neutrophilie näher zu kommen, sollte im Folgenden untersucht werden, auf welcher Ebene TIMP-1 die Regulation der Neutrophilen-Homöostase beeinflusst.

1.2.1 TIMP-1 hat keine Auswirkungen auf die Überlebensdauer zirkulierender Neutrophiler

Unter nicht-entzündlichen Bedingungen haben zirkulierende Neutrophile eine Halbwertszeit von wenigen Stunden, bevor sie apoptotisch werden (Strydom und Rankin, 2013; von Vietinghoff und Ley, 2008). Veränderungen dieser Überlebenszeit sind ein Regulationsmechanismus der Neutrophilenzahl in der Peripherie (Luo und Loison, 2008). Da TIMP-1 bereits für mehrere Zelltypen als anti-apoptotischer Faktor beschrieben wurde (Chirco et al., 2006; Lee et al., 2003), lag die Hypothese nahe, dass die beobachtete Neutrophilie durch eine längere Überlebensdauer zirkulierender Neutrophiler verursacht würde.

Um dies zu überprüfen, wurde der Einfluss von TIMP-1 auf die Viabilität reifer Blut-Neutrophiler *ex vivo* untersucht. Dazu wurden Neutrophile aus dem Blut unbehandelter Mäuse isoliert (Abb. 8 A) und in Gegenwart oder Abwesenheit von rekombinantem TIMP-1-Protein (rT1) kultiviert. Die Viabilität dieser Zellen wurde anhand ihrer Stoffwechselaktivität, gemessen an der Umsetzung von AlamarBlue, im zeitlichen Verlauf analysiert. Allerdings hatte die Gegenwart von rT1 keinerlei Einfluss auf die Überlebensdauer (Abb. 8 B). Dies wurde bestätigt mit Blut-Neutrophilen, die aus AdKtrl- oder AdT1-transduzierten Mäusen isoliert wurden. Auch hier wurden keine Unterschiede in der Überlebensdauer festgestellt (Abb. 8 C).

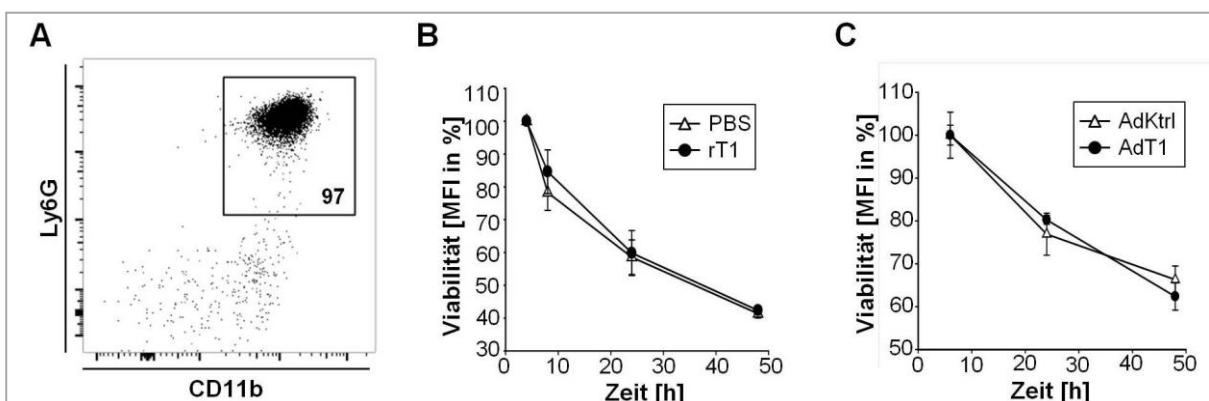


Abb. 8: TIMP-1 hat keinen Einfluss auf die Lebensdauer von Blut-Neutrophilen *ex vivo*. (A) Nachweis der Reinheit isolierter Blut-Neutrophiler mittels Durchflusszytometrie. (B) Analyse des Einflusses von rTIMP-1 auf die Viabilität isolierter Neutrophiler mittels AlamarBlue. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten. (C) Vergleich der Viabilität von Neutrophilen aus AdKtrl- und AdT1-transduzierten Mäusen *ex vivo* mittels AlamarBlue. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 5 Mäusen.

Ob diese *ex vivo*-Beobachtungen auch *in vivo* zutreffen, sollte durch direkte Quantifizierung apoptotischer Neutrophiler im Blut von Mäusen mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln analysiert werden. Sollte TIMP-1 die Neutrophilen-Halbwertszeit *in vivo* verlängern, würde man einen geringeren Anteil apoptotischer Neutrophiler im Blut AdT1-transduzierter Mäuse erwarten.

Dies wurde experimentell durch AnnexinV-Färbung frischer Blutproben mittels Durchflusszytometrie analysiert. Der Anteil AnnexinV-positiver Neutrophiler in AdT1-transduzierten Mäusen war im Vergleich zu AdKtrl-transduzierten Mäusen unverändert (Abb. 9 A), und die absolute Anzahl apoptotischer Neutrophiler im Blut war sogar leicht erhöht (Abb. 9 B). Diese Ergebnisse bestätigen die *in vitro*-Beobachtungen und sprechen eher für einen generell erhöhten Neutrophilendurchsatz in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln, als für eine durch verlängertes Überleben verursachte Akkumulation.

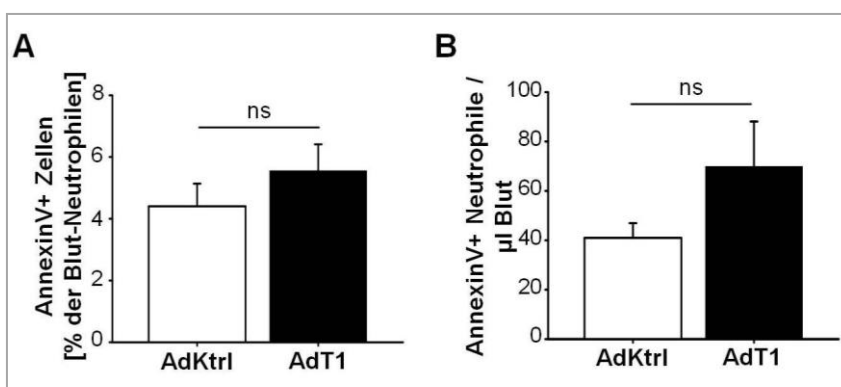


Abb. 9: TIMP-1 verringert nicht die Apoptoserate von Blut-Neutrophilen *in vivo*. 3 Tage nach AdKtrl- bzw. AdT1-Injektion wurden AnnexinV⁺ Neutrophile im Blut von DBA/2-Mäusen mittels FACS relativ (A) und absolut (B) quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 5 Tieren.

1.2.2 TIMP-1 führt zu keiner direkten Mobilisierung reifer KM-Neutrophiler

Eine weitere Regulationsebene für die Zahl zirkulierender Neutrophiler stellt ihre Mobilisierung aus dem Knochenmark (KM) dar. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob hohe systemische TIMP-1-Spiegel die vermehrte Freisetzung gespeicherter KM-Neutrophiler ins Blut induzieren. TIMP-1 könnte dabei selbst chemotaktisch wirken, die generelle Motilität von Neutrophilen erhöhen - was ebenfalls zur vermehrten Freisetzung ins Blut führen kann (Köhler et al., 2011) - oder die Retention reifer Neutrophiler im KM reduzieren.

Um eine direkte chemotaktische Wirkung von TIMP-1 zu überprüfen, wurden reife KM-Neutrophile isoliert und *ex vivo* in *transwell*-Migrationsexperimenten untersucht. Die Reinheit der isolierten Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie überprüft und betrug in allen Experimenten mindestens 93 % (Abb. 10 A). Anschließend wurde die Neutrophilen-Migration in reines Medium (Ktrl) oder in Medium, dem rT1 oder rCXCL6 (Positivkontrolle) als Chemoattraktanten zugesetzt worden waren, untersucht. Wie erwartet induzierte der Zusatz von CXCL6, einem typischen Neutrophilen-Chemoattraktanten, eine deutlich erhöhte Neutrophilen-Migration (Anhang 1). Dagegen hatte rT1 keinerlei chemotaktische Effekte (Abb. 10 B). Gleichermäßen wurde eine motilitätsfördernde

ERGEBNISSE

Wirkung von TIMP-1 ausgeschlossen. Dazu wurden isolierte KM-Neutrophile mit rT1 oder PBS vorinkubiert und anschließend ihr Migrationsverhalten in Richtung eines FCS-Gradienten analysiert. Auch hier hatte rTIMP-1 keine migrationsfördernde Wirkung (Abb. 10 C).

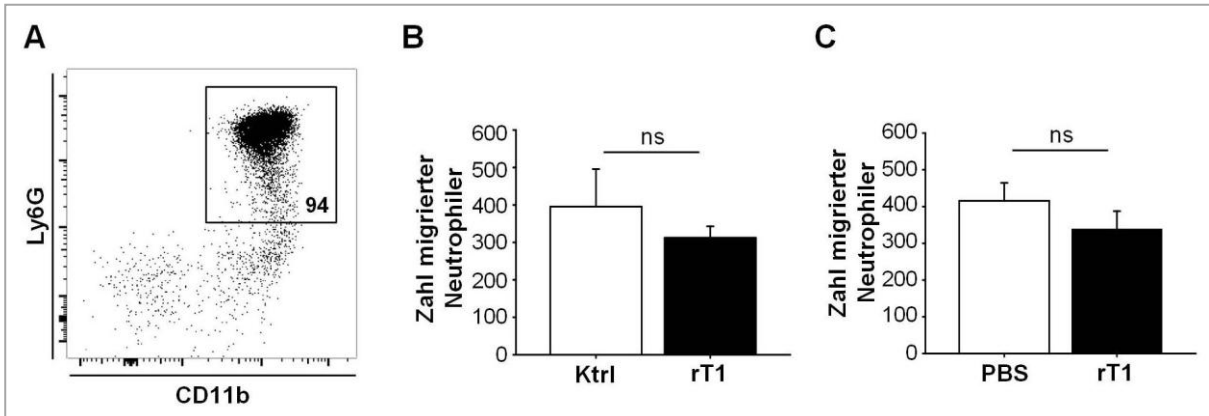


Abb. 10: Effekte von TIMP-1 auf Neutrophilenmigration *ex vivo*. (A) Nachweis der Reinheit MACS-isolierter KM-Neutrophiler mittels Durchflusszytometrie. (B, C) *Transwell*-Migrations-Assay mit isolierten KM-Neutrophilen und PBS (Ktrl) oder rT1 als Chemoattraktant (B), bzw. nach Vorinkubation mit PBS oder rT1 (C). Gezeigt sind je Mittelwert und Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten.

Um eine direkt durch TIMP-1 verursachte Mobilisierung von Neutrophilen *in vivo* zu untersuchen, wurde rT1 i.p. in Mäuse injiziert. Dies führte zu systemisch erhöhten TIMP-1-Spiegeln innerhalb weniger Minuten (Abb. 11 A). Zwei Stunden nach rT1-Injektion, einem Zeitpunkt zu dem durch mobilisierende Faktoren wie G-CSF Neutrophilie induziert ist (Semerad et al., 2002), wurden Neutrophile im Blut quantifiziert. Allerdings führte die Injektion von rT1 zu keiner Änderung der Blut-Neutrophilen (Abb. 11 B).

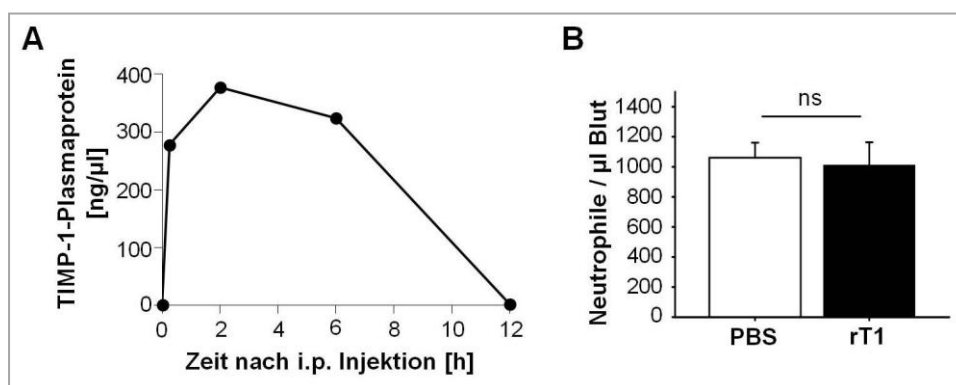


Abb. 11: TIMP-1 induziert keine direkte Neutrophilen-Mobilisierung *in vivo*. rT1 wurde i.p. in DBA/2-Mäuse injiziert. (A) Nachweis von rT1 im Plasma 10 min, 2 h, 6 h und 12 h nach Injektion mittels ELISA. (B) Quantifizierung von Blut-Neutrophilen 2 h nach Injektion von rT1 oder PBS mittels Durchflusszytometrie. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 5 Tieren.

1.2.3 Hohe TIMP-1-Spiegel führen nicht zur Reduktion gespeicherter Neutrophiler

Die unter 1.2.2 beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass TIMP-1 selbst keine direkte Neutrophilen-Mobilisierung ins Blut induziert. Allerdings schließen sie nicht aus, dass *in vivo* ein möglicher sekundärer Faktor durch TIMP-1 induziert wird, der dann zur vermehrten Freisetzung gespeicherter Neutrophiler aus dem KM oder dem *marginated Pool* führt. Wäre dies der Fall, würden hohe TIMP-1-Spiegel über längere Zeit zur Reduktion dieser Speicher führen.

Deshalb wurden reife Neutrophile - charakterisiert durch hohe Ly6G-Oberflächenspiegel (Satake et al., 2012; Abb. 12A) - im KM AdKtrl- oder AdT1-transduzierter Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels FACS quantifiziert. Interessanterweise wurde keine Reduktion, sondern sogar ein leichter Anstieg dieser Zellpopulation in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln beobachtet (Abb. 12 B). Dieses Ergebnis wurde durch immunhistochemische Färbung Ly6G-positiver Zellen im KM zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach AdT1-Transduktion bestätigt (Abb. 12 C, D).

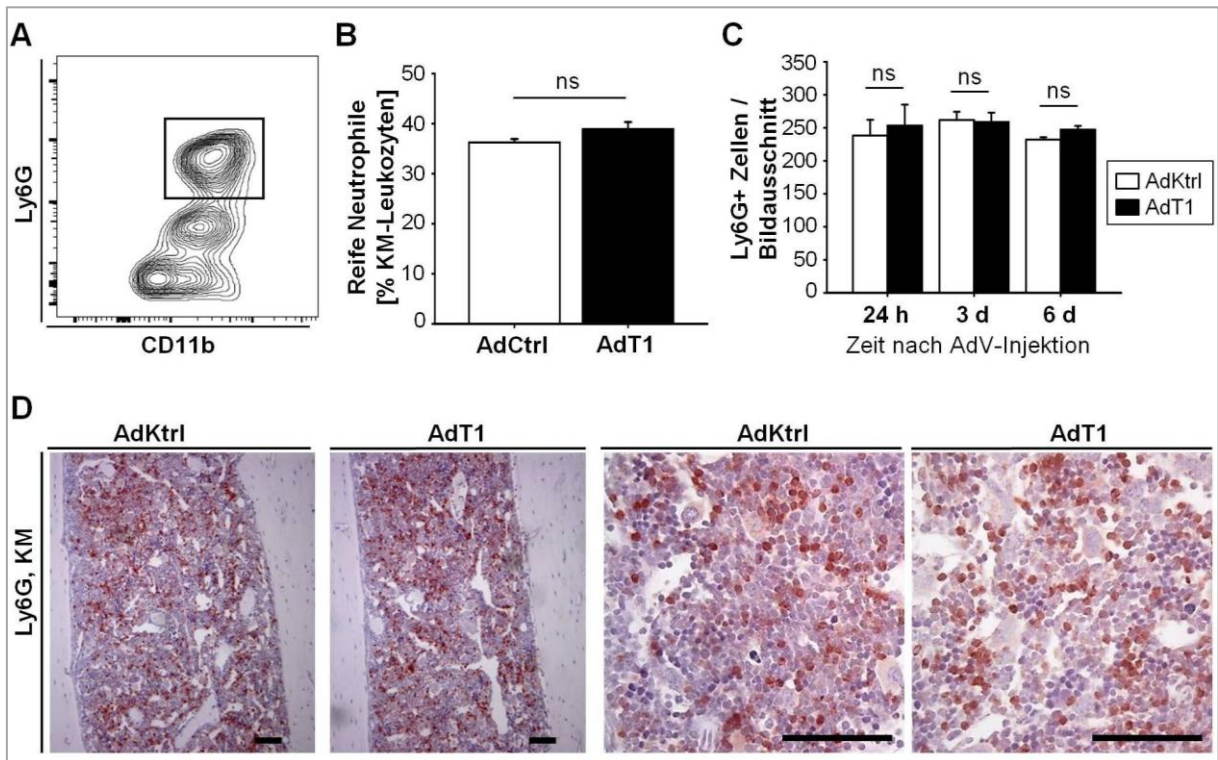


Abb. 12: TIMP-1 führt zu keiner Reduktion gespeicherter Neutrophiler im KM. DBA/2-Mäuse (n=5) wurden 1, 3 oder 6 Tage nach Infektion mit AdKtrl oder AdT1 getötet, und Femur und Tibia wurden entnommen. (A, B) Durchflusszytometrische Analyse von KM-Leukozyten 3 Tage nach Virusinjektion. Ein repräsentativer FACS-Plot inkl. *Gate* für reife Neutrophile (A) und deren relativer Anteil an KM-Leukozyten (B) sind dargestellt. (C, D) Immunhistochemische Färbung von Ly6G auf KM-Paraffinschnitten. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler Ly6G-positiver Zellen aus je 4 Tieren (C), sowie repräsentative Bilder in zwei Vergrößerungen (D, Balken, 100 µm)

ERGEBNISSE

Auch in der Milz als typisches Organ für den *marginated Pool* wurden Neutrophile mittels Immunhistochemie quantifiziert, und auch hier waren keine Unterschiede zwischen Mäusen mit normalen und erhöhten TIMP-1-Spiegeln feststellbar (Abb. 13). Die TIMP-1-induzierte Neutrophilie im Blut kann also nicht durch verstärkte Freisetzung und den erhöhten Verbrauch gespeicherter Neutrophiler erklärt werden.

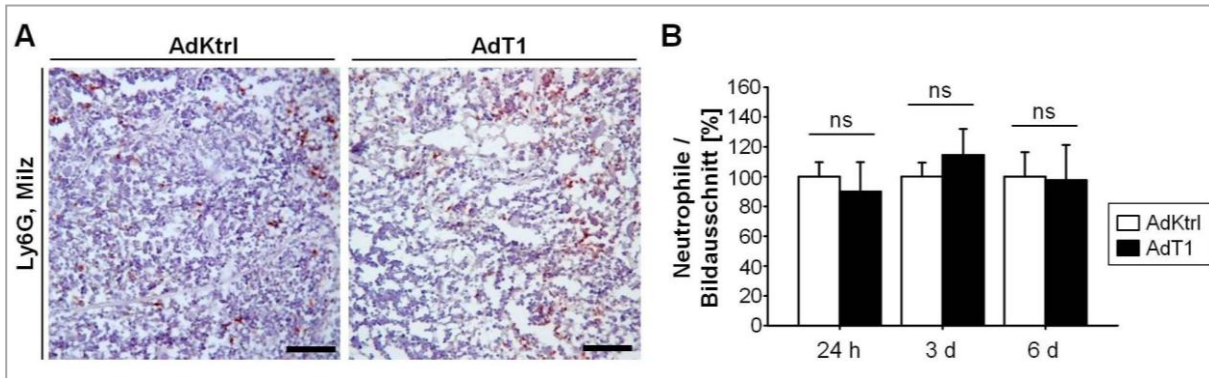


Abb. 13: TIMP-1 führt nicht zur Mobilisierung von Neutrophilen aus der Milz. DBA/2-Mäuse wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und 1, 3 oder 6 Tage später geopfert. Neutrophile im Milzgewebe wurden mittels Ly6G-IHC auf Milz-Cryoschnitten quantifiziert. Dargestellt sind repräsentative Bilder (A, Balken, 100 μ m), sowie Mittelwert und Standardfehler Ly6G-positiver Zellen pro Bildausschnitt (B) aus jeweils 4 Tieren.

1.3 Hohe TIMP-1-Spiegel führen zur vermehrten Granulopoese im KM

Aus den bisherigen Untersuchungen geht hervor, dass der TIMP-1-induzierte Anstieg zirkulierender Neutrophiler weder durch verlängerte Überlebensdauer im Blutstrom, noch durch vermehrte Mobilisierung aus Speichern erklärt werden kann. Die Beobachtung, dass der Anteil reifer Neutrophiler im KM trotz Zunahme der peripheren Neutrophilen nicht abnahm, sondern eher leicht stieg (Abb. 12 B), legt die Vermutung nahe, dass in diesen Mäusen die Neutrophilen-Produktionsrate erhöht ist. Im Folgenden wurde deshalb der Hypothese nachgegangen, dass hohe systemische TIMP-1-Spiegel die Granulopoese im KM fördern und dass dies die im Blut beobachtete Neutrophilie erklärt.

1.3.1 Neutrophilen-Vorläufer sind angereichert im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln

Zunächst wurden Neutrophilen-Vorläufer im KM mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Da reife Neutrophile nicht mehr proliferieren, sondern durch Differenzierung aus Vorläufern entstehen, ist im Fall einer erhöhten Neutrophilenproduktion eine Zunahme unreifer Vorläufer zu erwarten, die durch eine geringere Ly6G-Expression auf ihrer Zelloberfläche (Ly6G^{int}) identifiziert werden können (Abb. 14 A). Tatsächlich wurde beobachtet, dass in Mäusen mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln der Anteil dieser Population an KM-Leukozyten signifikant erhöht war (Abb. 14 B). Ebenso wie die Neutrophilie im Blut

konnte der Anstieg von Neutrophilen-Vorläufern im KM in verschiedenen Mausstämmen (DBA/2, C57Bl/6, CD1^{nu/nu}) reproduziert werden (s. Abb. 24 B für C57Bl/6).

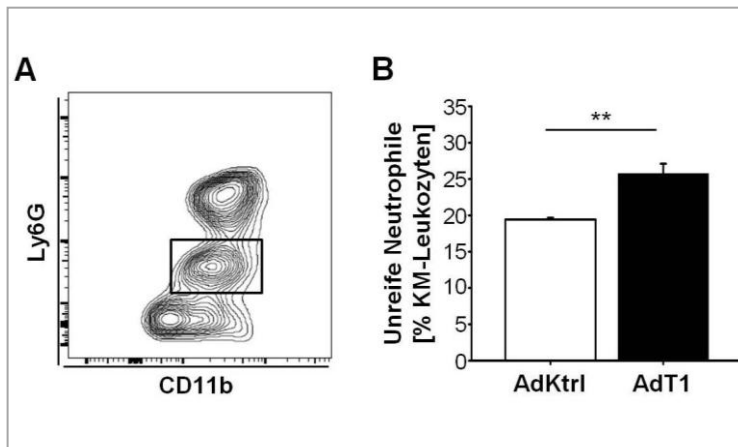


Abb. 14: Neutrophilen-Vorläufer sind angereichert im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln. DBA/2-Mäuse wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und drei Tage später geopfert. KM-Leukozyten aus Femur und Tibia wurden durchflusszytometrisch analysiert. (A) Repräsentativer FACS-Plot inkl. Gate für Ly6G^{int}-Vorläufer. (B) Relative Quantifizierung der Ly6G^{int}-Zellen in AdKtrl- und AdT1-Mäusen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 5 Tieren.

1.3.2 Erhöhte Expression typischer Granulopoese-Marker im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln

Um dieses Ergebnis weiter zu untermauern, wurde die Genexpression im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln analysiert. Charakteristisch für Neutrophile ist, dass bestimmte Proteine, vor allem Granulopoese-regulierende Transkriptionsfaktoren und Granulae-Proteine, nur in bestimmten Reifungsstadien in großen Mengen exprimiert werden (Theilgaard-Mönch et al., 2005). Um Effekte von TIMP-1 auf die Expression solcher Gene im KM zu untersuchen, wurde RNA aus KM-Zellen von AdKtrl- und AdT1-transduzierten Mäusen isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. Im Einzelnen wurde die Transkription des Oberflächenmarkers Ly6G, der Granulae-Proteine MPO, Lactoferrin (LTF) und Neutrophilen-Elastase (ElaNe), sowie der Transkriptionsfaktoren C/EBP- α , - β , - ϵ und PU.1 quantifiziert. Tatsächlich war die Expression all dieser Gene in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln erhöht (Abb. 15).

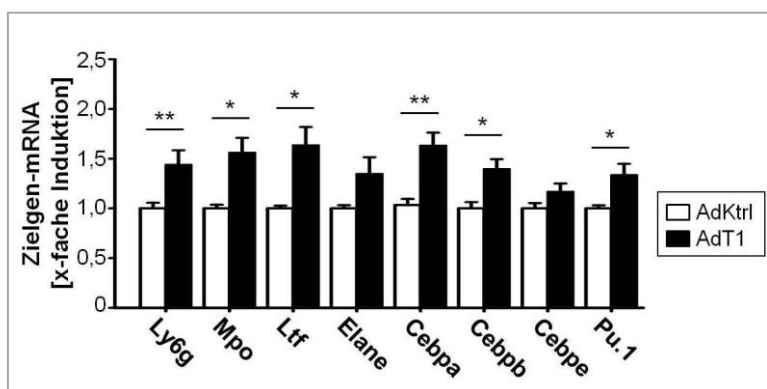


Abb. 15: Expression Granulopoese-assoziiertes Gene im KM ist erhöht in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln. mRNA-Expression typischer während der Granulopoese exprimierter Gene im KM von DBA/2-Mäusen 3 Tage nach Transduktion mit AdKtrl oder AdT1. mRNA wurde aus Komplet-KM isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus je 5 Mäusen.

1.3.3 Die Neutrophilen-Neubildung nach systemischer Depletion ist beschleunigt in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln

Bisher konnte gezeigt werden, dass das KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln mehr Neutrophilen-Vorläufer enthält. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob in diesen Mäusen tatsächlich mehr Neutrophile gebildet werden. Dazu wurden vorhandene reife Neutrophile systemisch durch Injektion des spezifischen Anti-Ly6G Antikörpers 1A8 depletiert (Daley et al., 2008). 24 h nach Antikörper-Injektion, einem Zeitpunkt, zu dem Blut-Neutrophile zu mehr als 90 % depletiert waren (Abb. 16 A), wurden die Mäuse mit AdKtrl bzw. AdT1 transduziert und die Erholung der Blut-Neutrophilenzahlen von der Depletion zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Virusinjektion überprüft. Interessanterweise wurde tatsächlich in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln ein schnellerer Wiederanstieg der Neutrophilen beobachtet (Abb. 16 B).

Des Weiteren wurde überprüft, ob das KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln vermehrt in der Lage ist, differenzierte Zellen zu produzieren. Dies wurde *ex vivo* anhand der Fähigkeit des KM zur Koloniebildung untersucht. Dazu wurden KM-Zellen aus AdKtrl- bzw. AdT1-transduzierten Mäusen isoliert und in gleicher Zahl als Einzelzellsuspension in Methocult-Medium inkl. verschiedener Zytokine ausplattiert. Im Verlauf von 7 Tagen bildeten sich aus einzelnen hämatopoetischen Vorläufern Kolonien (Abb. 16 C, links), die quantifiziert wurden. Tatsächlich war mit KM-Zellen aus Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln eine erhöhte Koloniebildung zu verzeichnen (Abb. 16 C, rechts).

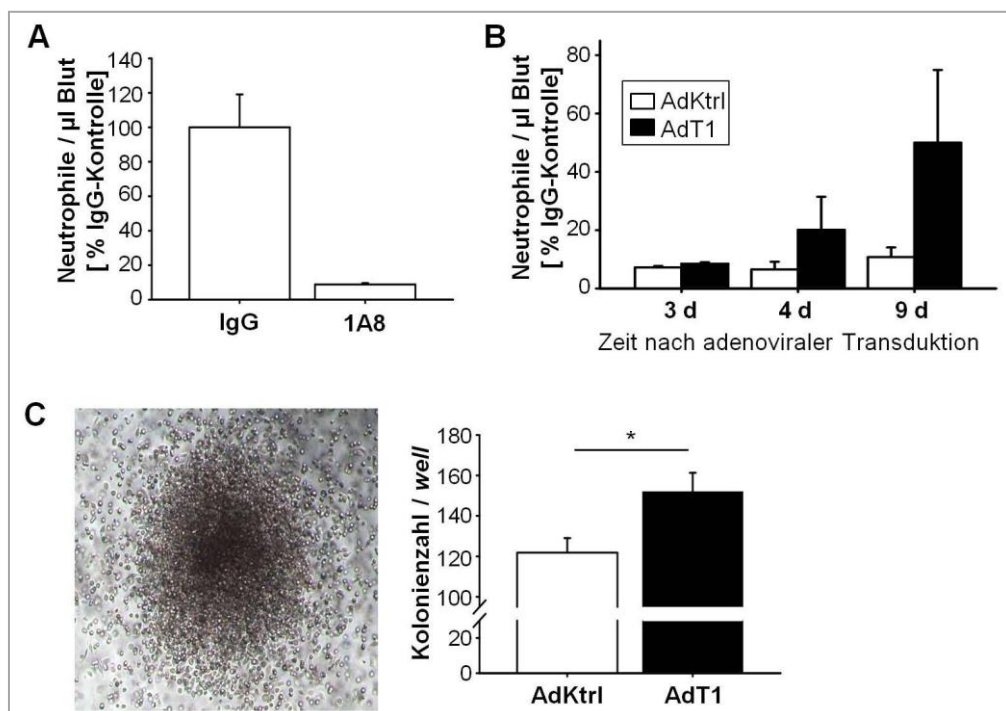


Abb. 16: Hohe systemische TIMP-1-Spiegel führen zur vermehrten Granulopoese im KM. (A, B) Zur Depletion existierender Neutrophiler wurde DBA/2-Mäusen anti-Ly6G-Antikörper bzw. IgG-Kontrollantikörper i.p. injiziert. 24 h später wurde die Depletionseffizienz im Blut überprüft (A). Anschließend wurden Mäuse mit AdKtrl bzw. AdT1 transduziert und die Erholung der Blut-Neutrophilen-Zahlen über die Zeit beobachtet (B). Gezeigt sind jeweils

Mittelwert und Standardfehler der Blut-Neutrophilenzahlen relativ zu IgG-behandelten Kontrollmäusen (n=3). (C) KM-Zellen wurden 3 Tage nach Transduktion mit AdKtrl oder AdT1 aus DBA/2-Mäusen isoliert und als Einzelzellsuspension in Methocult inkl. SCF, IL-3, IL-6 und G-CSF ausplattiert. 7 Tage später wurden Kolonien gezählt. Dargestellt sind ein repräsentatives Bild einer Kolonie (links), sowie Mittelwert und Standardfehler der Kolonienzahlen (rechts, n=5).

1.3.4 Die TIMP-1-vermittelte Neutrophilie im Blut ist auf vermehrte Reifung proliferierender Neutrophilen-Vorläufer im KM zurückzuführen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass hohe TIMP-1-Spiegel in Mäusen die Granulopoese im KM fördern. Die Hypothese, dass eine vermehrte Neutrophilen-Produktion der Grund für die TIMP-1-induzierte Neutrophilie ist, liegt deshalb auf der Hand. Um dies zu bestätigen, soll im Folgenden gezeigt werden, dass die höhere Blut-Neutrophilenzahl auf neu generierte Neutrophile zurückzuführen ist. Dazu wurde die Tatsache ausgenutzt, dass reife Neutrophile nicht mehr proliferieren. BrdU, ein Thymidinanalogon, das von proliferierenden Zellen während der Replikation stabil in die DNA eingebaut wird, sollte deshalb nur von Zellen inkorporiert werden, die zum Zeitpunkt der BrdU-Applikation in einem mitotischen Differenzierungsstadium waren, nicht aber von reifen Neutrophilen. Somit wären gespeicherte reife Neutrophile von neu generierten, zum Zeitpunkt der BrdU-Applikation proliferierenden Zellen unterscheidbar. Dieser Umstand wurde für das folgende Experiment ausgenutzt: TIMP-1-Spiegel wurden zunächst durch adenovirale Transduktion systemisch erhöht. Beginnend mit dem Zeitpunkt erhöhter TIMP-1-Plasmaspiegel wurde diesen Mäusen durch wiederholte i.p. Injektion kontinuierlich BrdU verabreicht. Nach 3 Tagen, der Zeit, ab der die TIMP-1-induzierte Neutrophilie zu beobachten war (vgl. Abb. 7 A), wurden reife Neutrophile im Blut und KM auf BrdU-Inkorporation hin untersucht. Als Kontrolle für das *Gating* BrdU-negativer Zellen wurde einer Maus lediglich PBS injiziert. So waren BrdU-positive und BrdU-negative Neutrophile mittels Durchflusszytometrie klar zu unterscheiden (Abb. 17 A). Tatsächlich war in AdT1-transduzierten Mäusen der Anteil BrdU-positiver Blut-Neutrophiler signifikant höher als in Kontrollmäusen (Abb. 17 A, B). Die absolute Quantifizierung BrdU-negativer Neutrophiler ergab zudem keine Unterschiede der beiden Gruppen, wohingegen die absolute Zahl BrdU-positiver Neutrophiler in AdT1-Mäusen erhöht war (Abb. 17 C). Dies zeigt, dass der beobachtete Neutrophilen-Anstieg in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln ausschließlich auf neu generierte Neutrophile zurückzuführen ist, und nicht durch vermehrte Freisetzung gespeicherter reifer Neutrophiler verursacht wird. Auch im KM war der Anteil BrdU-positiver reifer Neutrophiler in AdT1-transduzierten Mäusen höher als in AdKtrl-Mäusen (Abb. 17 D). Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse, dass TIMP-1 die Produktion reifer Neutrophiler aus proliferierenden Vorläufern fördert.

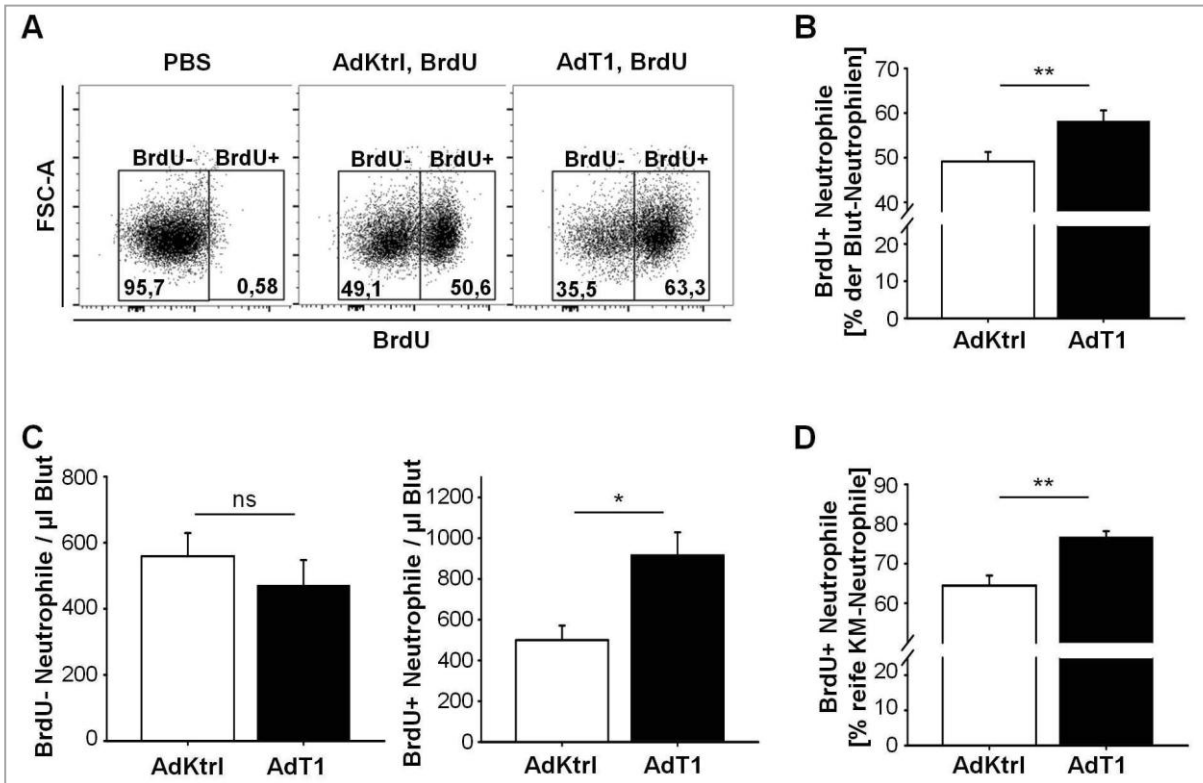


Abb. 17: Der TIMP-1-induzierte Neutrophilenanstieg im Blut resultiert aus vermehrter Differenzierung proliferierender KM-Vorläufer. DBA/2-Mäuse wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert. Beginnend 3 h nach Virusinjektion wurde alle 12 h BrdU durch i.p. Injektion verabreicht. Nach 3 Tagen wurden Blut- und KM-Proben entnommen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. (A) Repräsentative FACS-Plots und *Gating* BrdU-positiver und BrdU-negativer Blut-Neutrophiler einer nicht mit BrdU-behandelten (links), sowie einer AdKtrl- (Mitte) und einer AdT1-transduzierten mit BrdU behandelten Maus. Zahlen in den *Gates* entsprechen dem prozentualen Anteil an Blut-Neutrophilen. (B) Relative Quantifizierung BrdU-positiver Blut-Neutrophiler. (C) Absolute Quantifizierung BrdU-negativer (links) und BrdU-positiver (rechts) Blut-Neutrophiler. (D) Relative Quantifizierung BrdU-positiver reifer Neutrophiler im KM. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardfehler aus 5 Mäusen.

1.3.5 TIMP-1 steigert nicht die Proliferation von direkten Neutrophilen-Vorläufern

Im Folgenden soll geklärt werden, auf welcher Ebene die vermehrte Neutrophilenproduktion erreicht wird. Reife Neutrophile entstehen aus hämatopoetischen Vorläufern, deren Fähigkeiten, zu verschiedenen Leukozyten-Typen zu differenzieren, mit fortschreitender Reifung zunehmend eingeschränkt sind. Die Neutrophilen-Produktionsrate wird also zum einen dadurch reguliert, wie stark die Differenzierung pluripotenter hämatopoetischer Vorläuferzellen in Richtung der Granulozyten-Linie verlagert wird. Daneben sind hämatopoetische Vorläufer bis zum Metamyelozytenstadium in der Lage, in ihrem jeweiligen Differenzierungsgrad zu proliferieren, wodurch die Zahl heranreifender Neutrophiler ebenfalls reguliert wird (Borregaard, 2010). In Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln wurde neben der vermehrten Bildung und Freisetzung reifer Neutrophiler auch eine Zunahme unreifer Vorläufer beobachtet, die Ly6G exprimieren und somit in ihrer Differenzierung bereits auf die Granulozyten-Linie beschränkt sind (Satake et al., 2012). Die

Akkumulation dieser Ly6G^{int}-Zellen könnte sowohl durch eine vermehrte Proliferation eben dieser Vorläufer, als auch durch die bevorzugte Differenzierung hämatopoetischer Zellen in diese Richtung erklärt werden. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, ob hohe systemische TIMP-1-Spiegel direkt die Proliferation der Ly6G^{int}-Population im KM fördern. Dazu wurden wiederum TIMP-1-Spiegel adenoviral erhöht. 3 Tage später wurden durch einen einzelnen BrdU-Puls alle zu diesem Zeitpunkt proliferierenden Zellen markiert. Wie erwartet war ein relativ hoher Anteil der unreifen Neutrophilen (Ly6G^{int}) BrdU-positiv, wohingegen quasi alle reifen Neutrophilen (Ly6G^{hi}) BrdU-negativ waren, also nicht mehr proliferierten (Abb. 18 A). Interessanterweise wurden aber keine Unterschiede im Anteil BrdU-positiver unreifer Neutrophiler in AdKtrl- und AdT1-Mäusen beobachtet (Abb. 18 B). Gleichermäßen führte die Anwesenheit von rTIMP-1 zu keiner erhöhten Proliferationsrate der myeloiden Vorläuferzelllinie 32Dcl3 *in vitro* (Abb. 18 C). Demnach scheint TIMP-1 nicht direkt die Proliferation von Neutrophilen-Vorläufern zu induzieren.

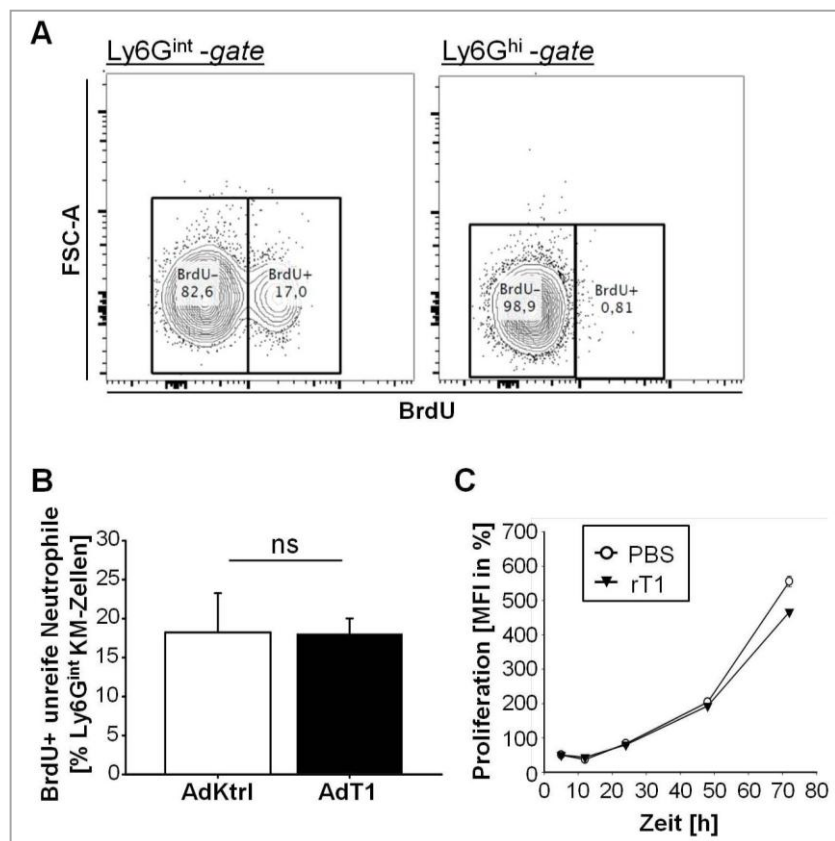


Abb. 18: TIMP-1 steigert nicht direkt die Proliferation unreifer Neutrophiler. (A, B) DBA/2-Mäuse wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert. Drei Tage später wurde ein einzelner BrdU-Puls verabreicht und die Mäuse 2 h später geopfert. KM-Zellen wurden nach Färbung von Oberflächenmarkern und inkorporiertem BrdU im Durchflusszytometer analysiert. (A) Repräsentative FACS-Plots für BrdU-positive und -negative unreife (Ly6G^{int}, links) und reife (Ly6G^{hi}, rechts) Neutrophile. Zahlen in *Gates* entsprechen dem Anteil der jeweiligen Population in %. (B) Quantifizierung BrdU-positiver Neutrophilen-Vorläufer in AdKtrl- und AdT1-Mäusen. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 5 Mäusen. (C) Proliferation von 32Dcl3-Zellen in An- und Abwesenheit von rT1.

1.3.6 TIMP-1 fördert die G-CSF-induzierte Differenzierung von 32Dcl3-Zellen *in vitro*

Da hohe systemische TIMP-1-Spiegel keinen direkten pro-proliferativen Effekt auf unreife Neutrophile zu haben scheinen, sollte überprüft werden, ob TIMP-1 die Differenzierung hämatopoetischer Vorläufer-Zellen zu Neutrophilen fördert. Dies wurde anhand der etablierten Modellzelllinie 32Dcl3 untersucht. Dabei handelt es sich um eine murine Myeloblasten-Zelllinie, die durch Stimulation mit G-CSF terminal zu Neutrophilen differenziert, die funktionell in vielen Eigenschaften nativen Neutrophilen gleichen (Guchhait et al., 2003; Valtieri et al., 1987). Differenzierte 32Dcl3-Zellen sind erkennbar durch charakteristisch segmentierte Kernmorphologie (Valtieri et al., 1987), erhöhte CD11b-Oberflächen-Spiegel (Ai et al., 2008), sowie die Expression granulärer Proteine wie MPO und LTF (Valtieri et al., 1987).

Um zu untersuchen, ob TIMP-1 die Neutrophilen-Differenzierung fördert, wurden 32Dcl3-Zellen mit rekombinantem TIMP-1-Protein (rT1) inkubiert. Bemerkenswerterweise war TIMP-1 allein nicht in der Lage, Proliferation oder Überleben der Zellen in Abwesenheit von IL-3 und G-CSF über mehrere Tage aufrechtzuerhalten (Anhang 2). Inkubation der Zellen mit TIMP-1 für 20 h in Gegenwart von IL-3 führte aber bereits zu einer Hochregulation der Transkriptionsfaktoren C/EBP- α , C/EBP- β und PU.1 (Abb. 19 A). Wurden 32Dcl3-Zellen in Anwesenheit von rT1 mit G-CSF stimuliert, wurde nach fünf und sieben Tagen ein signifikant höherer Anteil an Zellen mit segmentiertem Kern beobachtet (Abb. 19 B). Dies wurde durch FACS-Analyse der CD11b-Oberflächenexpression bestätigt (Abb. 19 C). Auch die Genexpressionsanalyse der Granulae-Proteine MPO und LTF ergab eine stärkere Hoch-Regulation dieser Gene durch G-CSF und TIMP-1 als durch G-CSF allein (Abb. 19 D, E).

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse an, dass TIMP-1 tatsächlich die Differenzierung hämatopoetischer Vorläufer-Zellen zu Neutrophilen fördert.

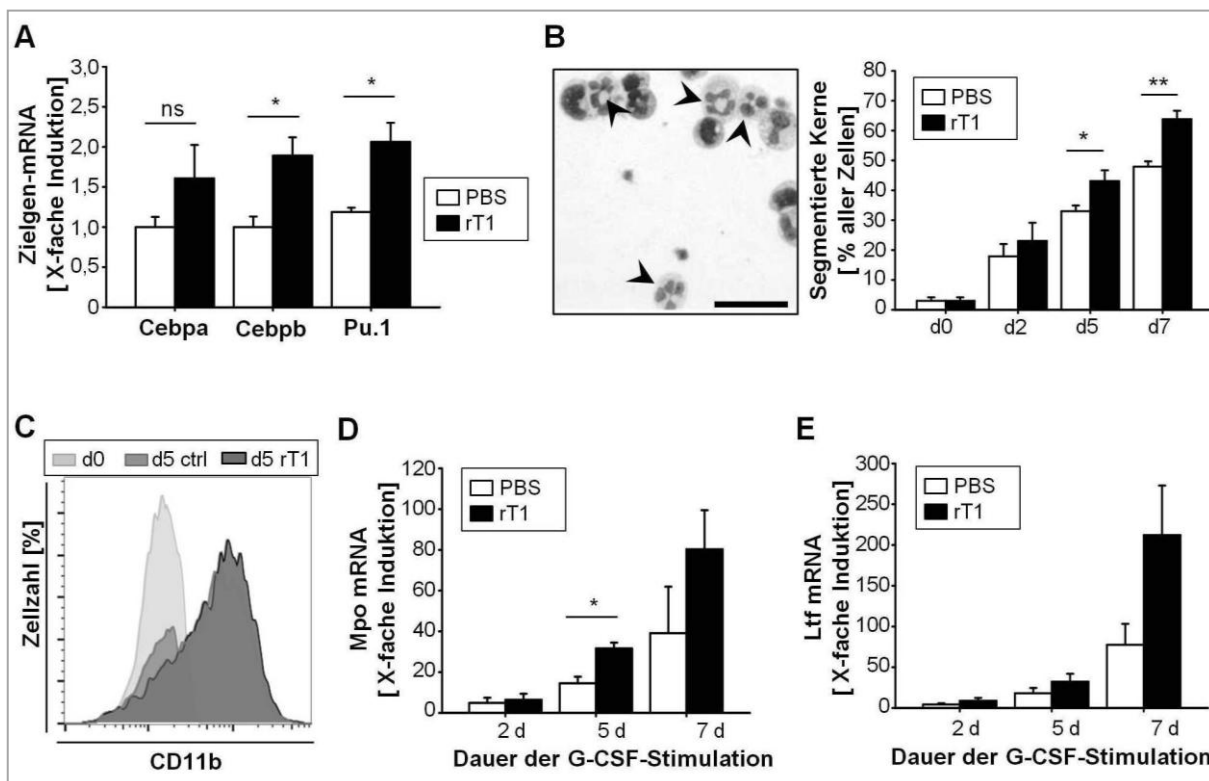


Abb. 19: TIMP-1 fördert die Differenzierung von 32Dcl3-Zellen. (A) 32Dcl3-Zellen wurden in Anwesenheit von IL-3 für 20 h mit rTIMP-1 inkubiert. Anschließend wurde RNA isoliert und mittels qRT-PCR die Expressions-Spiegel der Transkriptionsfaktoren C/EBP- α und- β sowie PU.1 quantifiziert. (B-D) 32Dcl3-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von rTIMP-1 mit G-CSF stimuliert und die Differenzierung zu den angezeigten Zeitpunkten auf verschiedene Weise analysiert. (B) Repräsentatives Bild einer DiffQuick-Färbung von Zytospins (links, Balken, 50 μ m) und Quantifizierung von Zellen mit segmentiertem Kern (rechts, Mittelwert und Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten). (C) FACS-Analyse der CD11b-Oberflächen-Spiegel an Tag 5 der G-CSF-Stimulation. (D, E) Expressionsanalyse der granulären Proteine MPO (D) und LTF (E) mittels qRT-PCR. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardfehler aus 3 unabhängigen Experimenten.

Da rT1 einen direkten Einfluss auf die Genexpression und das Differenzierungsverhalten von 32Dcl3-Zellen zu haben scheint, wurde untersucht, ob intrazelluläre Signalwege durch TIMP-1 aktiviert werden. Dazu wurden Zellen für 12 h mit rT1 inkubiert und anschließend zur Proteinextraktion lysiert. Zum *Screening* möglicher relevanter Signalwege wurde die Phosphorylierung wichtiger Signalproteine mittels Western Blot quantifiziert. Tatsächlich wurden in mit rT1 inkubierten 32Dcl3-Zellen erhöhte Spiegel von Phospho-STAT-3 (P-Stat3) und Phospho-NF κ B (P-NF κ B) vorgefunden, wohingegen für Akt, MAPK, RSK und S6 keine Veränderungen beobachtet wurden (Abb. 20 A). Zwei unabhängige Wiederholungen dieses Experimentes konnten die erhöhte Phosphorylierung von STAT3 bestätigen (Abb. 20 B), während die von NF κ B nicht eindeutig reproduziert werden konnte (Abb. 20 C). Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse an, dass TIMP-1 tatsächlich intrazelluläre Signalwege in 32Dcl3-Zellen aktiviert, die die Neutrophilen-Differenzierung regulieren.

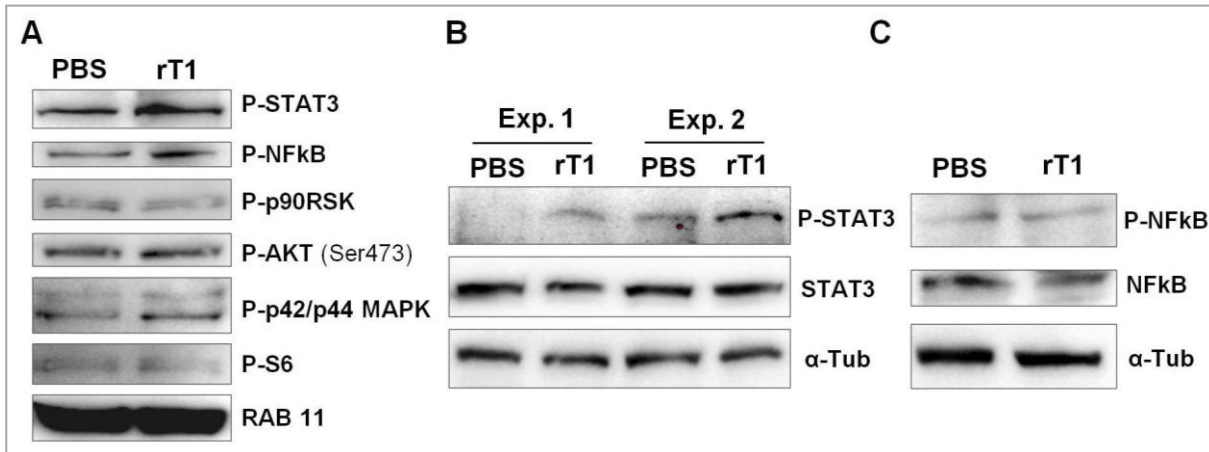


Abb. 20: TIMP-1-induzierte Signalwege in 32Dcl3-Zellen. 32Dcl3-Zellen wurden für 12 h mit rTIMP-1 inkubiert. Anschließend wurde die Phosphorylierung wichtiger Signalproteine mittels Western Blot analysiert. Als Ladungskontrolle wurde α -Tubulin (α -Tub) gemessen.

1.4 Effekte von TIMP-1 auf Granulopoese und Neutrophilie sind unabhängig von der Protease-inhibitorischen Funktion

Bisher konnte gezeigt werden, dass hohe systemische TIMP-1-Spiegel in Mäusen Neutrophilie induzieren, und dass dies auf eine gesteigerte Neutrophilen-Produktion im KM zurückzuführen ist, wobei TIMP-1 die Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen in Richtung der Granulozyten-Linie zu fördern scheint. Im Folgenden soll geklärt werden, auf welcher Ebene dies geschieht, ob weitere Zytokine oder andere Faktoren dabei eine Rolle spielen, und welche molekularen Prozesse in der Zelle ablaufen.

1.4.1 TIMP-1 führt nicht zum Anstieg wichtiger Granulopoese-regulierender Zytokine

Zunächst sollte überprüft werden, ob hohe TIMP-1-Spiegel zu einem veränderten Zytokin-Milieu in Mäusen führen, das die Induktion von Granulopoese und Neutrophilie erklären würde. Ein naheliegender Faktor ist G-CSF, da hohe G-CSF-Plasmaspiegel sowohl die Bildung als auch Freisetzung von Neutrophilen stark induzieren (Semerad et al., 2002) und bereits beschrieben wurde, dass die Ablation der durch TIMP-1 gehemmten Protease ADAM-10 in Mäusen zu einer Akkumulation von G-CSF führt (Weber et al., 2013; Yoda et al., 2011). Es wurden also G-CSF-Plasmaspiegel in AdKtrl- und AdT1-transduzierten Mäusen mittels ELISA quantifiziert. Diese stiegen in beiden Gruppen kurz nach Virusinjektion an, sanken aber innerhalb von 24 h wieder und waren ab da kaum oberhalb der Detektionsgrenze. Ein Unterschied zwischen Mäusen mit normalen und hohen TIMP-1-Spiegeln wurde nicht beobachtet (Abb. 21 A).

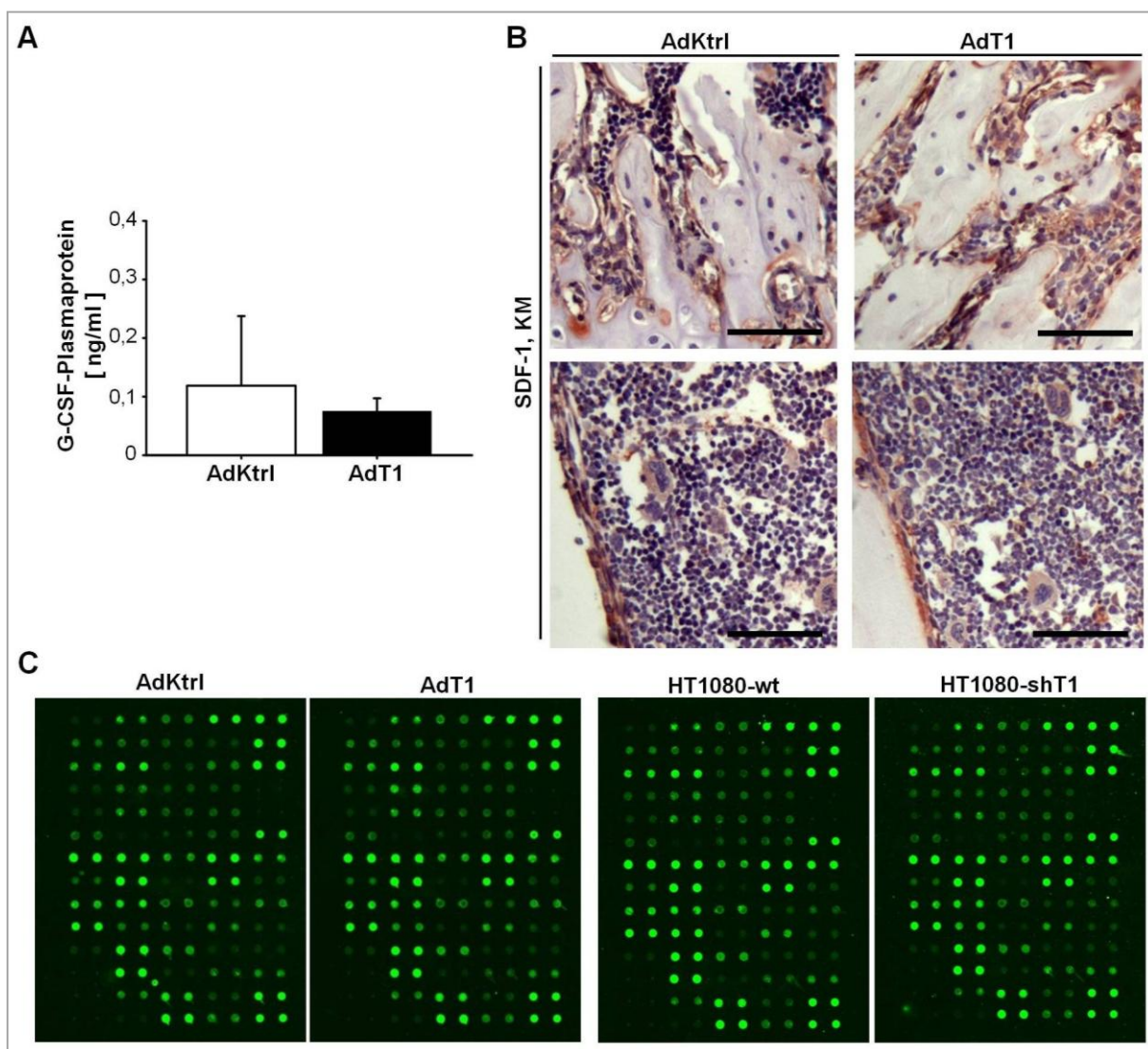


Abb. 21: Hohe TIMP-1-Spiegel haben keinen Einfluss auf Granulopoese-regulierende Zytokine. (A, B) DBA/2-Mäuse (n=5) wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und 3 Tage später geopfert. (A) Quantifizierung der G-CSF-Plasmaspiegel durch ELISA. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 5 Tieren. (B) SDF-1-IHC auf KM-Schnitte. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte aus Spongiosa (oben) und Diaphyse (unten) der Femur einer AdKtrl- und einer AdT1-transduzierten Maus. Maßstabsbalken: 100 μ m. (C) Zytokinarray auf Plasmaproben aus Mäusen mit unterschiedlichen TIMP-1-Spiegeln, die entweder durch Transduktion mit AdKtrl bzw. AdT1 (links), oder durch T1-sezernierende HT1080-Primärtumoren mit unterschiedlichen Expressionsspiegeln (rechts) erreicht wurden. Blutproben aus 5 Mäusen je Gruppe wurden gepoolt.

Ein weiteres Zytokin, das für die Regulation hämatopoetischer Prozesse, und insbesondere für die Retention reifer Neutrophiler im KM eine wichtige Rolle spielt, ist SDF-1. Da in einigen Mäusstämmen bereits ein Effekt von TIMP-1 auf SDF-1-Spiegel in der Leber beobachtet wurde (Seubert et al., 2015), wurde überprüft, ob hohe systemische TIMP-1-Spiegel mit Veränderungen der SDF-1-Menge oder - Lokalisation im KM einhergehen. Die immunhistochemische Färbung von SDF-1 auf KM-Schnitten ergab aber ebenfalls keine Unterschiede zwischen AdKtrl- und AdT1-transduzierten Mäusen (Abb. 21 B). Um mögliche Unterschiede weiterer Zytokine zu erfassen, wurde ein Zytokinarray auf

Plasmaproben von AdKtrl- und AdT1-transduzierten Mäusen, sowie von Mäusen mit TIMP-1-sezernierenden HT1080-Tumoren (s. Abschnitt III.1.1.1) gemacht. In beiden Modellen führten unterschiedliche TIMP-1-Spiegel zu keinen nennenswerten Unterschieden im Zytokin-Milieu (Abb. 21 C).

1.4.2 Die *Signaling*-Funktion, nicht aber die Protease-inhibitorische Funktion von TIMP-1 induziert Neutrophilie im Blut

Die unter 1.4.1 beschriebenen Ergebnisse, sowie die Beobachtung, dass rTIMP-1 *in vitro* direkt, d.h. ohne die Beteiligung weiterer Zytokine die Differenzierung von 32Dcl3-Zellen förderte, deuten an, dass TIMP-1 selbst die Effekte auf Granulopoese und Neutrophilie vermittelt. Im Folgenden sollten dafür verantwortliche TIMP-1-Interaktionspartner und *downstream*-Mechanismen identifiziert werden. Dazu sollte zunächst analysiert werden, ob die Induktion von Neutrophilie und Granulopoese einer der beiden TIMP-1-Funktionen - Protease-Inhibition oder direkte Signalübertragung - zugeordnet werden kann. Dies wurde durch adenovirale Expression verschiedener TIMP-1-Varianten untersucht, die die differentielle Betrachtung nur einer der beiden Funktionen ermöglichen. AdN-T1 kodiert nur für die N-terminale Domäne (N-TIMP-1), die ausreicht, um die meisten durch TIMP-1 inhibierten Proteasen zu hemmen (Brew und Nagase, 2010), der aber die über den C-Terminus vermittelte direkte *Signaling*-Funktion fehlt. AdT1/T2G kodiert für die TIMP-1/T2G-Variante, bei der die Mutation der Aminosäure Threonin zu Glycin an Position 2 der N-terminalen Domäne dazu führt, dass Proteasen nicht mehr oder deutlich schwächer inhibiert werden, die *Signaling*-Funktion aber erhalten bleibt. Ähnlich verhält es sich mit AdvvT1, dem Vektor für eine Variante, bei der zwei zusätzliche Valin-Aminosäuren am N-Terminus die Protease-Bindung verhindern (Egea et al., 2012).

Um zu untersuchen, ob eine der beiden TIMP-1-Funktionen ausreicht, um Neutrophilie zu induzieren, wurden DBA/2-Mäuse mit den für diese Varianten kodierenden Vektoren transduziert und die Blut-Neutrophilen 3 Tage nach Virusinjektion absolut quantifiziert. Wie erwartet, war die Blut-Neutrophilenzahl in AdT1-Mäusen höher als in AdKtrl-Mäusen. Dagegen führte die Expression von N-TIMP-1 zu keinem Neutrophilen-Anstieg, sondern sogar eher zu einem leichten Rückgang. Interessanterweise waren aber sowohl TIMP-1/T2G, als auch vvTIMP-1 in der Lage, Neutrophilie zu induzieren, und dies sogar etwas stärker als voll funktionelles TIMP-1 (Abb. 22 A). Um diese Daten zu bestärken, wurde das Experiment in C57Bl/6-Mäusen wiederholt. Auch hier reichte die N-terminale Domäne nicht aus, um Neutrophilie zu induzieren, während in AdT1/T2G- und AdvvT1-transduzierten Mäusen erhöhte Blut-Neutrophilenzahlen beobachtet wurden (Abb. 22 B).

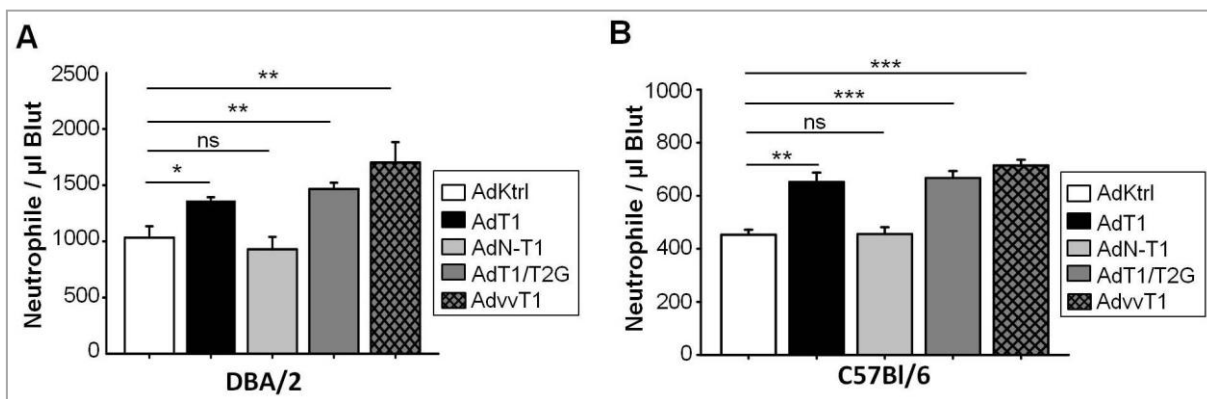


Abb. 22: Induktion von Neutrophilie wird über die *Signaling*-Funktion von TIMP-1 vermittelt. DBA/2-Mäuse (A) oder C57Bl/6-Mäuse (B) wurden mit adenoviralen Vektoren transduziert, die für die verschiedenen TIMP-1-Varianten kodieren. 3 Tage später wurden die Mäuse geopfert und Neutrophile im peripheren Blut mittels Durchflusszytometrie absolut quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 5 (DBA/2) bzw. 6 (C57Bl/6) Mäusen pro Gruppe.

1.4.3 Die intakte TIMP-1-Signaling-Domäne reicht aus für die Induktion von Granulopoese

Die in 1.4.2 dargestellten Ergebnisse deuten an, dass die *Signaling*-Domäne von TIMP-1 für die Induktion von Neutrophilie verantwortlich ist, wohingegen die Protease-inhibitorische Funktion keinen Einfluss zu haben scheint. Ob dies auch für die durch TIMP-1 gesteigerte Granulopoese gilt, sollte durch Untersuchung des KMs analysiert werden. Dazu wurde mittels Durchflusszytometrie die zelluläre KM-Zusammensetzung von Mäusen untersucht, die die verschiedenen TIMP-1-Varianten exprimieren. Tatsächlich wurde in AdT1/T2G- und in AdvvT1-transduzierten, nicht aber in AdN-T1-transduzierten Mäusen ein erhöhter Anteil unreifer Neutrophilen-Vorläufer (Ly6G^{int}) vorgefunden (Abb. 23 A). Auch die Genexpressionsanalyse in Gesamt-KM ergab, dass die mRNA-Spiegel von Granulopoese-Markern in AdT1/T2G-transduzierten Mäusen signifikant erhöht waren (Abb. 23 B).

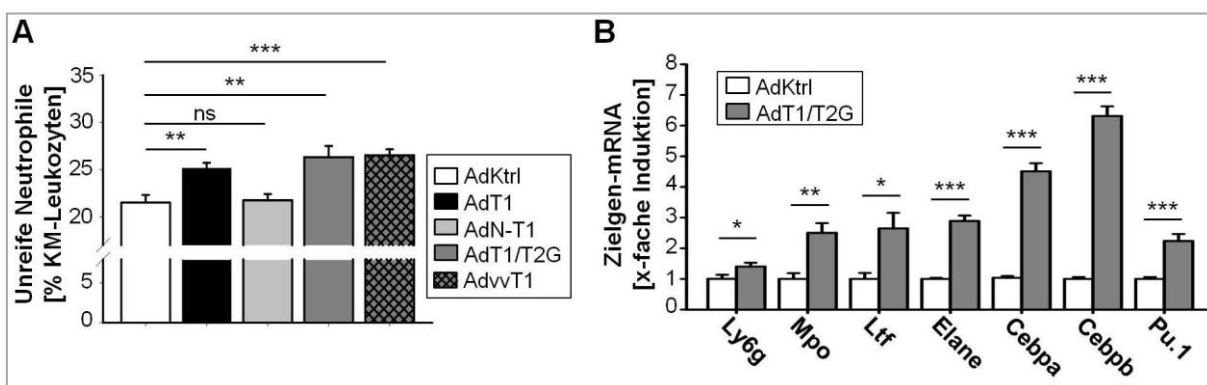


Abb. 23: Granulopoese wird durch die *Signaling*-Funktion von TIMP-1 gefördert. DBA/2-Mäuse wurden mit AdKtrl, AdT1, AdN-T1, AdT1/T2G oder AdvvT1 transduziert und 3 Tage später geopfert. (A) Durchflusszytometrische relative Quantifizierung von Ly6G^{int}-Neutrophilen-Vorläufern im KM. (B) Genexpression von Granulopoese-Markern im KM. mRNA wurde aus Komplet-KM isoliert und die entsprechenden Gene mittels qRT-PCR quantifiziert. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardfehler aus 5 Mäusen.

1.5 TIMP-1 Signalübertragung über CD63 fördert Granulopoese und Neutrophilie

1.5.1 In CD63-defizienten Mäusen haben hohe TIMP-1-Spiegel keinen Effekt auf Neutrophilie

Die unter 1.4 beschriebenen Experimente ergaben, dass die Protease-inhibitorische Funktion von TIMP-1 allein keinen Effekt auf die Neutrophilen-Homöostase hatte, wohingegen die intakte C-terminale *Signaling*-Funktion erforderlich und auch ausreichend war, um Neutrophilie und Granulopoese zu fördern. Bisher ist das Tetraspanin CD63 der einzige beschriebene *Signaling*-Rezeptor für die C-terminale Domäne von TIMP-1. Die Hypothese lag daher nahe, dass auch die in dieser Studie beschriebenen Effekte von TIMP-1 durch Interaktion mit CD63 hervorgerufen werden. Um dies zu überprüfen, wurde untersucht, ob die Präsenz von CD63 für die TIMP-1-vermittelte Induktion von Neutrophilie und Granulopoese erforderlich ist. Dazu wurden TIMP-1-Spiegel in CD63 *knock out*-Mäusen (CD63^{-/-}), sowie in heterozygot (CD63^{+/-}) und homozygot (CD63^{+/+}) CD63-exprimierenden Geschwistern durch adenovirale Transduktion systemisch erhöht. Drei Tage später wurden Blut-Neutrophile quantifiziert. Wie aus dem Vergleich AdKtrl-transduzierter Kontrolltiere aller drei Genotypen hervorgeht, hatte die Präsenz oder Abwesenheit von CD63 keinen Einfluss auf Basalspiegel der Blut-Neutrophilen. Die in CD63^{+/-}-Mäusen wiederum beobachtete TIMP-1-induzierte Neutrophilie war aber tatsächlich in CD63^{-/-}-Mäusen signifikant reduziert. In CD63^{-/-}-Mäusen erzeugten hohe TIMP-1-Spiegel keinen signifikanten Anstieg der Blut-Neutrophilen (Abb. 24 A). Ein ähnliches Muster ergab sich für die Neutrophilen-Vorläufer im KM. Auch hier war die TIMP-1-induzierte Zunahme der Ly6G^{int}-Population in CD63^{+/-}-Mäusen signifikant reduziert und in CD63^{-/-}-Mäusen vollständig aufgehoben (Abb. 24 B). Und auch der Vergleich der Genexpression im KM dieser Mäuse ergab einen Anstieg der Granulopoese-Marker in CD63^{+/-}-Mäusen, der in CD63^{-/-}-Mäusen komplett blockiert war (Abb. 24 C). Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass TIMP-1-vermittelte Effekte auf die Neutrophilen-Homöostase in Mäusen die Präsenz von CD63 erfordern.

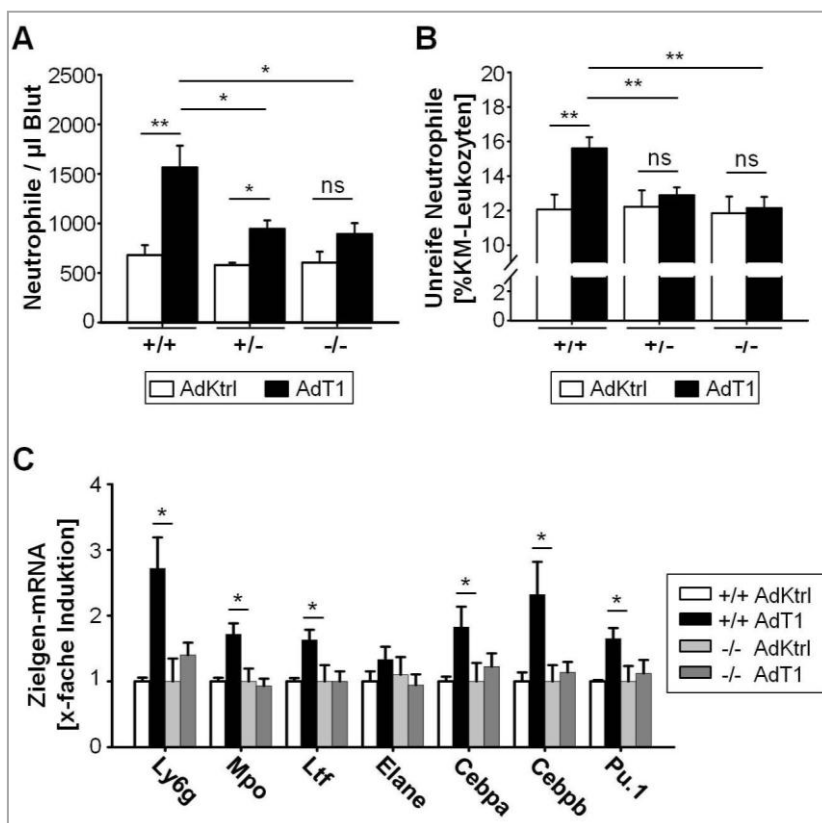


Abb. 24: TIMP-1-Effekte auf Neutrophilie und Granulopoese sind in CD63-knock out-Mäusen nicht zu beobachten. C57Bl/6-Mäuse mit homozygotem CD63 *knock out* ($n=6$), sowie deren hetero- ($n=7$) und homozygote ($n=5$) Geschwister wurden mit AdKtrl bzw. AdT1 transduziert und 3 Tage später geopfert. (A, B) Absolute Quantifizierung von Blut-Neutrophilen (A) und relative Quantifizierung unreifer KM Neutrophiler ($Ly6G^{int}$) (B) mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler der Gruppen. (C) Genexpressionsanalyse von Granulopoese-Markern in KM-Lysaten mittels qRT-PCR. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 4 Tieren.

1.5.2 CD63 wird auf der Oberfläche von Neutrophilen-Vorläufern exprimiert

Die vorangegangenen Versuche zeigten also, dass Effekte von TIMP-1 auf die Neutrophilen-Homöostase die Präsenz von CD63 erfordern. Um näher zu spezifizieren, ob die TIMP-1/CD63-Interaktion direkt auf Neutrophilen-Vorläufern stattfinden könnte, wurden CD63-Oberflächenspiegel auf reifen KM-Neutrophilen und Neutrophilen-Vorläufern mittels Durchflusszytometrie untersucht. Erwartungsgemäß wurde CD63 auf beiden Populationen detektiert, wobei unreife Neutrophile höhere Oberflächenspiegel aufwiesen als reife Neutrophile (Abb. 25 A). Neutrophile und Neutrophilen-Vorläufer in heterozygoten Mäusen exprimierten deutlich reduzierte CD63-Spiegel und in *knock out*-Mäusen war erwartungsgemäß kein CD63 detektierbar (Abb. 25 A).

Da 32Dcl3-Zellen *in vitro* direkt auf rTIMP-1 reagierten, wurde auch in diesen myeloiden Vorläufern die CD63-Expression überprüft. Sowohl CD63-mRNA, als auch -Oberflächenprotein waren deutlich messbar (Abb. 25 B).

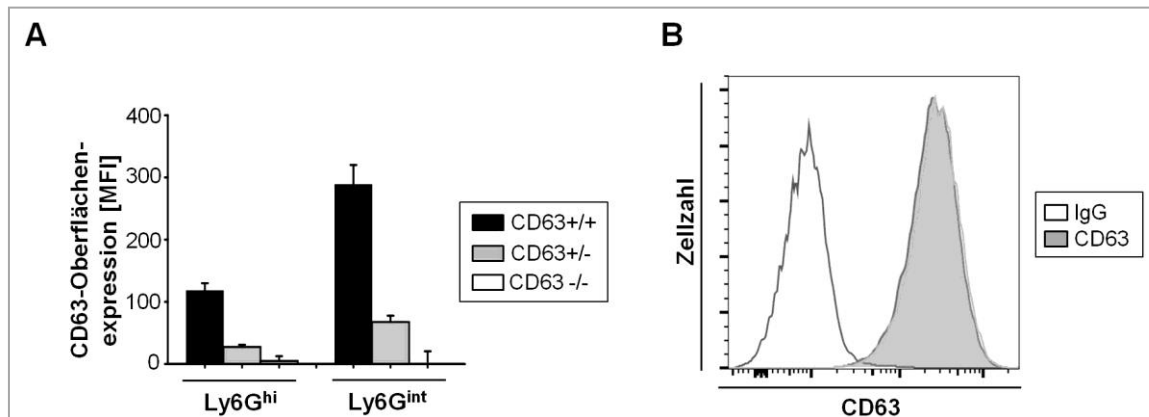


Abb. 25: CD63 wird auf der Zelloberfläche von Neutrophilen und Neutrophilen-Vorläufern exprimiert. (A) Durchflusszytometrische Analyse der CD63-Oberflächenspiegel auf reifen KM-Neutrophilen, sowie Neutrophilen-Vorläufern. KM wurde aus CD63^{+/+}, CD63^{+/-} und CD63^{-/-}-Mäusen isoliert und auf die Oberflächenmarker Ly6G, CD11b und CD63 gefärbt. Die CD63-Expression auf CD11b⁺Ly6G^{int}-Vorläufern und Ly6G^{hi}-reifen Neutrophilen wurde aus der Differenz der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) dieser Populationen und entsprechend IgG-gefärbter Zellen errechnet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus jeweils 5 Mäusen. (B) Durchflusszytometrische Analyse der CD63-Oberflächenexpression auf 32Dcl3-Zellen. Unstimulierte 32Dcl3-Zellen wurden mit CD63-Antikörper oder IgG-Isotyp gefärbt. Tote Zellen wurden durch *Gating* von der Analyse ausgeschlossen.

1.5.3 TIMP-1-induzierte Differenzierung von 32Dcl3-Zellen ist CD63-abhängig

Nachdem gezeigt werden konnte, dass 32Dcl3-Zellen CD63 exprimieren, sollte überprüft werden, ob die durch TIMP-1 geförderte Differenzierung dieser Zellen ebenfalls die Präsenz von CD63 erfordert. Dazu wurde die Expression von CD63 durch stabile lentivirale Transduktion mit CD63-shRNA reduziert. Kontrollzellen wurden mit *non targeting* shRNA (shNT) transduziert. Zwei unterschiedlichen Sequenzen der CD63-mRNA komplementäre shRNAs führten zur Reduktion der CD63-Expression in 32Dcl3-Zellen um ca. 70 bzw. 85% (Abb. 26 A). Diese *knock down*-Zellen wurden in An- und Abwesenheit von rTIMP-1 mit G-CSF stimuliert. Das Ausmaß der Differenzierung wurde anhand des Anteils an Zellen mit segmentiertem Kern quantifiziert. Tatsächlich war 5 Tage nach Beginn der G-CSF-Stimulation der TIMP-1-induzierte Anstieg differenzierter 32Dcl3-Zellen nur in shNT-Kontrollzellen zu beobachten (Abb. 26 B). Dies wurde durch die Quantifizierung der CD11b-Oberflächenexpression bestätigt. Während rTIMP-1 zu einem erhöhten Anteil an shNT-Zellen mit hoher CD11b-Expression führte, war auch dieser Effekt in den *knock down*-Zellen kaum erkennbar (Abb. 26 C). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass auch die durch TIMP-1 geförderte Differenzierung von 32Dcl3-Zellen durch *Signaling* über CD63 vermittelt wird.

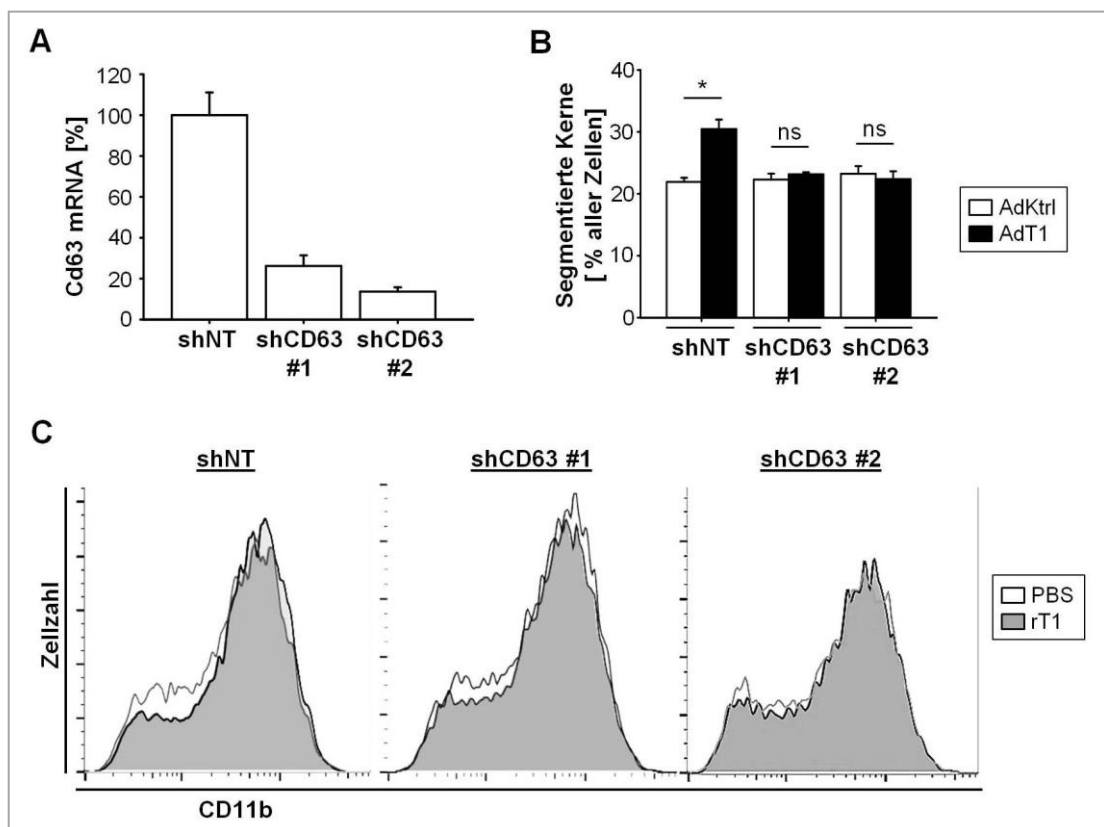


Abb. 26: CD63 knock down in 32Dcl3-Zellen führt zur Aufhebung der durch TIMP-1 geförderten Differenzierung. (A) Nachweis der CD63-knock down-Effizienz. 32Dcl3-Zellen wurden stabil mit lentiviralen Vektoren transduziert, die für shNT oder zwei unterschiedliche CD63-shRNAs kodieren. RNA wurde isoliert und die CD63-mRNA-Spiegel mittels qRT-PCR quantifiziert. (B) Zellen aus (A) wurden für 5 Tage in An- und Abwesenheit von rTIMP-1 mit G-CSF stimuliert. Der Anteil differenzierter Zellen wurde durch Auszählen von Zellen mit segmentiertem Kern auf Zytospins ermittelt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus 4 unabhängigen Experimenten. (C) Durchflusszytometrische Analyse der CD11b-Oberflächenexpression auf Zellen nach 5-tägiger Stimulation mit G-CSF in An- und Abwesenheit von rT1.

1.6 TIMP-1-induzierte Neutrophilie in der Leber

TIMP-1 scheint also die Regulation hämatopoetischer Prozesse im KM zu beeinflussen, was zu einer vermehrten Neutrophilen-Differenzierung und Freisetzung ins Blut führt und die dort beobachtete Neutrophilie erklärt. Darüber hinaus war bereits zu Beginn dieser Studie bekannt, dass hohe systemische TIMP-1-Spiegel mit einer erhöhten Neutrophilen-Zahl im Lebergewebe einhergehen. Ob für die Akkumulation von Neutrophilen in der Leber die gleichen TIMP-1-induzierten Mechanismen verantwortlich sind, wie für die Induktion von Neutrophilie im Blut, sollte im Folgenden geklärt werden.

1.6.1 Die Rekrutierung von Neutrophilen in die Leber erfolgt durch Signaling über CD63 und ist unabhängig von der Protease-inhibitorischen Funktion von TIMP-1

Zunächst sollte sichergestellt werden, dass auch die Rekrutierung von Neutrophilen in die Leber keine Folge der viralen Infektion oder der dortigen Expression eines Fremdproteins ist. Letzteres war

ERGEBNISSE

insbesondere von Bedeutung, da adenovirale Vektoren vor allem Hepatozyten infizieren, die dann die Hauptquelle des Fremdproteins darstellen (Zhu et al., 1997). Anhand immunhistochemischer Färbung wurden Neutrophile im Lebergewebe von unbehandelten Mäusen mit denen von Mäusen drei Tage nach adenoviraler Infektion mit AdKtrl, AdT1, sowie dem für die funktionslose Variante N-TIMP-1/T2G kodierendem Vektor AdN-T1/T2G verglichen. Tatsächlich war nur in AdT1-transduzierten Mäusen ein Neutrophilen-Anstieg zu beobachten, während in AdKtrl- und AdN-T1/T2G-infizierten Mäusen die Neutrophilenzahlen denen völlig unbehandelter Mäusen entsprachen (Abb. 27).

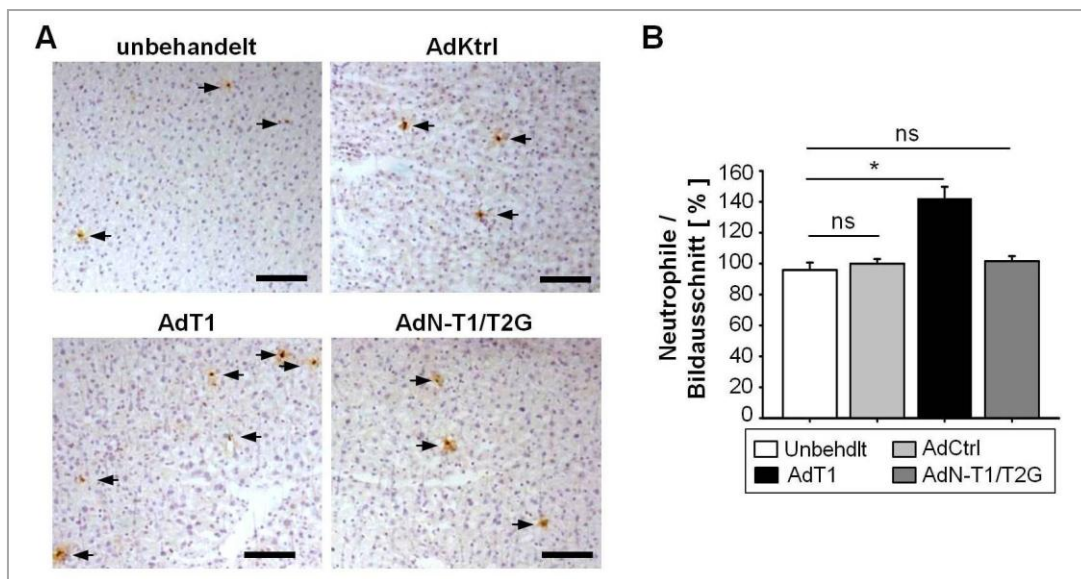


Abb. 27: Der TIMP-1-induzierte Neutrophilenanstieg in der Leber ist keine Folge adenoviraler Infektion. C57Bl/6-Mäuse wurden mit AdKtrl, AdT1 oder AdN-T2/T2G transduziert und 3 Tage nach Virusinjektion zusammen mit unbehandelten Mäusen geopfert. (A) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Ly6G-Färbung auf Leber-Cryoschnitten. Pfeile zeigen auf Neutrophile. Balken, 100 μ m. (B) Quantifizierung der Neutrophilen im Lebergewebe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler Ly6G-positiver Zellen pro Bildausschnitt aus 4 Tieren pro Gruppe.

Um zu untersuchen, ob der Neutrophilen-Anstieg in der Leber einer der beiden Funktionen von TIMP-1 zugeordnet werden kann, wurden Mäuse mit der ausschließlich Protease-inhibitorisch aktiven Variante AdN-T1, oder mit den nur zum direkten *Signaling* fähigen Varianten AdT1/T2G und AdvvT1 transduziert. Wie im Blut hatten auch in der Leber hohe systemische Spiegel von N-TIMP-1 keinen Einfluss auf Neutrophile im Gewebe. Dagegen führten sowohl TIMP-1/T2G als auch vvTIMP-1 zu signifikant erhöhten hepatischen Neutrophilenzahlen. Dies wurde in zwei Mausstämmen - C57Bl/6 (Abb. 28 A, B) und DBA/2 (Abb. 28 C) - bestätigt. Somit scheint auch die Neutrophilen-Rekrutierung in die Leber - unabhängig von der Protease-Inhibition - durch die direkte *Signaling*-Funktion von TIMP-1 induziert zu werden.

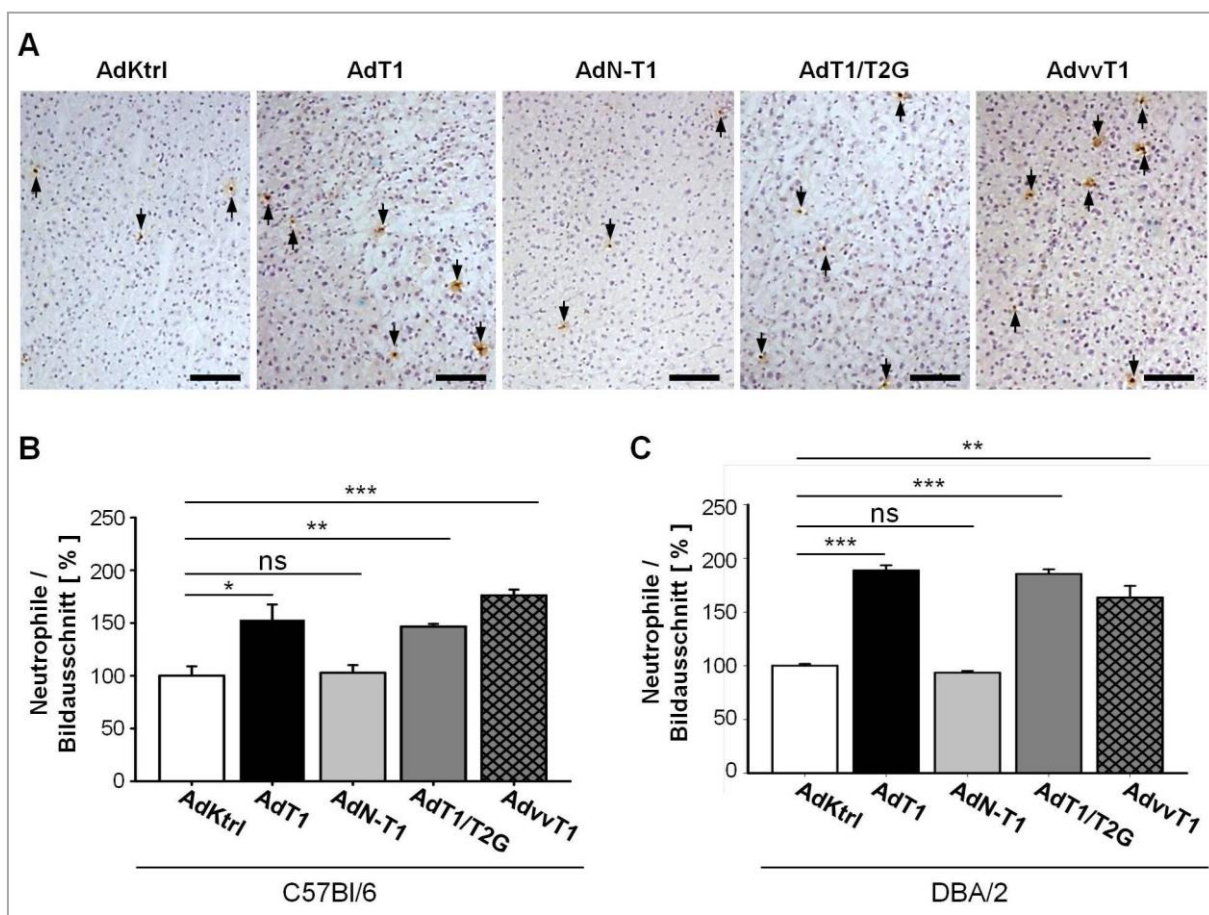


Abb. 28: Der TIMP-1-induzierte Neutrophilenanstieg in der Leber wird durch die *Signaling-Funktion* vermittelt. C57Bl/6-Mäuse (n=4) oder DBA/2-Mäuse (n=3) wurden mit AdKtrl, AdT1, AdN-T1, AdT1/T2G oder AdvvT1 transduziert und 3 Tage nach Virusinjektion geopfert. (A) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Ly6G-Färbung auf Leber-Cryoschnitten. Pfeile zeigen auf Neutrophile. Balken, 100 µm. (B, C) Quantifizierung der Neutrophilen im Lebergewebe von C57Bl/6-Mäusen (B) bzw. DBA/2-Mäusen (C). Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardfehler Ly6G-positiver Zellen pro Bildausschnitt.

Diese Beobachtung legt nahe, dass auch die TIMP-1-induzierten Veränderungen der Leber-Neutrophilen über CD63 vermittelt werden. Um dies zu zeigen, wurden Neutrophile im Lebergewebe von CD63-*knock out*-Mäusen quantifiziert. In Mäusen mit normalen TIMP-1-Spiegeln hatte die Abwesenheit von CD63 keinen Einfluss auf Leber-Neutrophile. Tatsächlich wurde aber der TIMP-1-induzierte Neutrophilenanstieg auch in der Leber durch den CD63-*knock out* komplett blockiert (Abb. 29).

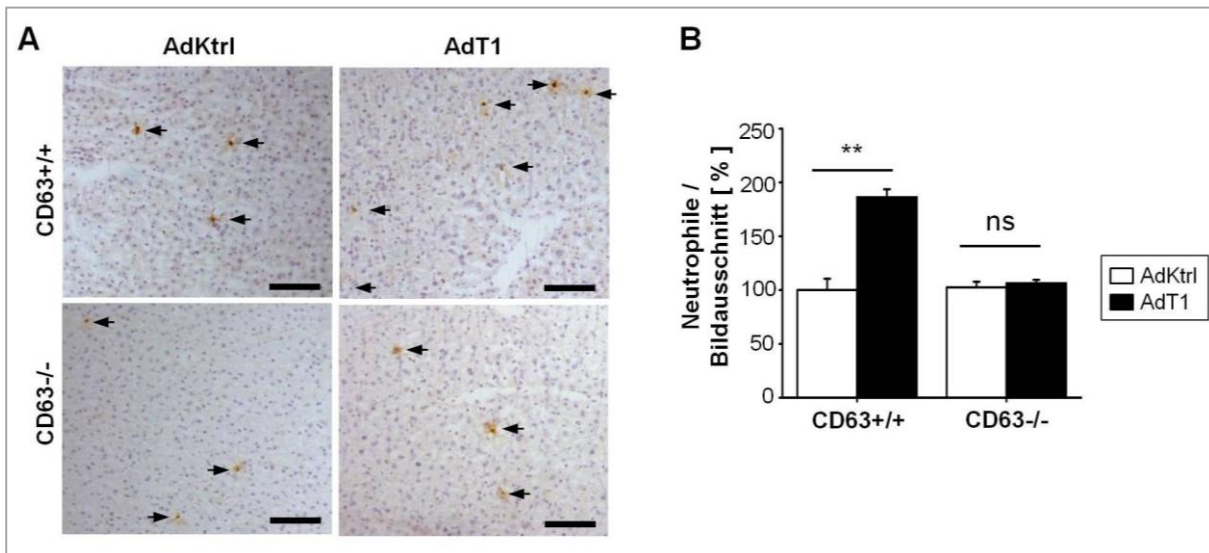


Abb. 29: Der TIMP-1-induzierte Neutrophilenanstieg in der Leber ist abhängig von CD63. CD63-*knock out*-Mäuse (CD63^{-/-}) und Wildtyp-Geschwister (CD63^{+/+}) wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und 3 Tage nach Virusinjektion geopfert. (A) Repräsentative Bilder der immunhistochemischen Ly6G-Färbung auf Leber-Cryoschnitten. Pfeile zeigen auf Neutrophile. Balken, 100 µm. (B) Quantifizierung der Neutrophilen im Lebergewebe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler Ly6G-positiver Zellen pro Bildausschnitt aus 4 Tieren pro Gruppe.

1.6.2 Der zeitliche Verlauf des Neutrophilen-Anstiegs im Blut und in der Leber ist unterschiedlich

In allen bisherigen Experimenten korrelierte die Neutrophilie im Blut mit erhöhten Neutrophilen-Zahlen im Lebergewebe. Es wäre daher möglich, dass der Anstieg der Leber-Neutrophilen nicht auf eine aktive Rekrutierung zurückzuführen ist, sondern auf eine passive Akkumulation von Neutrophilen aus der Zirkulation, beispielsweise zu deren Beseitigung durch Kupfferzellen (Day und Link, 2012). In diesem Fall würde man erwarten, dass die Neutrophilenakkumulation in der Leber im Vergleich zum Anstieg im Blut zeitlich verzögert auftritt. Um das zu untersuchen, wurden auch Leber-Neutrophile im zeitlichen Verlauf ab systemischer Erhöhung der TIMP-1-Spiegel quantifiziert. Wie unter Abschnitt III.1.1.2 beschrieben, waren signifikant erhöhte Blut-Neutrophile ab Tag 3 nach adenoviraler Transduktion zu beobachten und deren Zahl blieb im Verlauf der nächsten Tage annähernd konstant (Abb. 7 A). Interessanterweise wurden in der Leber bereits 24 h nach Virusinfektion mehr Neutrophile in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln beobachtet. Dieser Anstieg schien über die Zeit größer zu werden. So führten hohe TIMP-1-Spiegel nach 6 Tagen zu einem mehr als 5-fachen Anstieg an Neutrophilen in der Leber (Abb. 30), während im Blut konstant eine maximal 2-fache Induktion zu beobachten war (Abb. 7 A). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die TIMP-1-induzierte Neutrophilen-Rekrutierung in die Leber nicht allein durch vermehrt anfallende seneszente Neutrophile aus der Zirkulation erklärt werden kann.

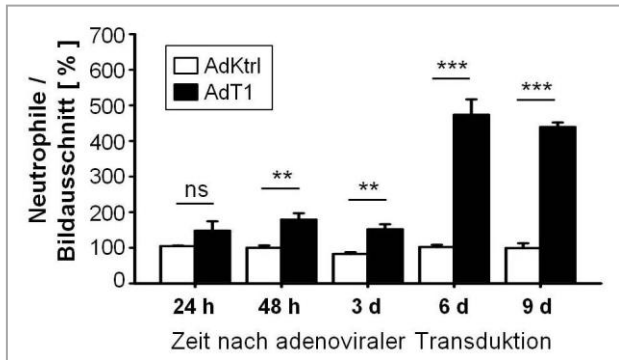


Abb. 30: Zeitlicher Verlauf des TIMP-1-induzierten Neutrophilen-Anstiegs in der Leber. DBA/2-Mäuse wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Virus-Infektion geopfert. Leber-Neutrophile wurden mittels Ly6G-IHC auf Leber-Cryoschnitten quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 4 Tieren pro Gruppe.

1.7 Die Rolle von CXCR4 bei der TIMP-1-vermittelten Induktion von Neutrophilie

Aus Arbeiten von Dr. Bastian Seubert ging hervor, dass die systemische Applikation des synthetischen CXCR4-Inhibitors AMD3100 zur vollständigen Blockade des TIMP-1-induzierten Neutrophilen-Anstiegs in der Leber führt (Seubert et al., 2015). Um dies zu bestätigen, wurde in Zusammenarbeit mit Barbara Grünwald und Haissi Cui Mäusen ein CXCR4-inhibitorischer Antikörper (anti-CXCR4) gespritzt. Dies führte zur vollständigen Aufhebung des TIMP-1-induzierten hepatischen Neutrophilen-Anstiegs, hatte aber keinen Einfluss auf Leber-Neutrophile in Kontrollmäusen (Abb. 31 A). Interessanterweise wurde auch im Blut eine deutliche Reduktion, jedoch keine vollständige Blockade der TIMP-1-induzierten Neutrophilie beobachtet (Abb. 31 B).

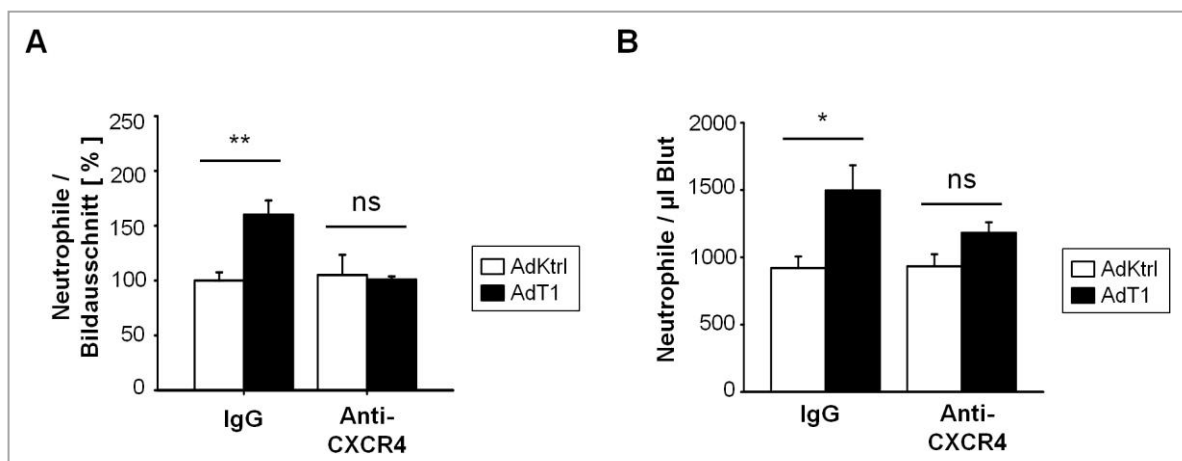


Abb. 31: Systemische CXCR4-Inhibition hemmt die TIMP-1-induzierte Neutrophilie in Leber und Blut. DBA/2-Mäusen wurde 24 h vor adenoviraler Transduktion ein CXCR4-inhibitorischer Antikörper (Klon 12G5) bzw. IgG-Isotyp-Antikörper verabreicht. 3 Tage nach AdV-Injektion wurden die Mäuse geopfert. (A) Immunhistochemische Quantifizierung von Neutrophilen im Lebergewebe. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 4 Tieren. (B) Absolute Quantifizierung von Blut-Neutrophilen mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler aus 6 Tieren je Gruppe.

ERGEBNISSE

Die SDF-1/CXCR4-Achse scheint also neben der Neutrophilen-Rekrutierung in die Leber auch für die Induktion von Neutrophilie im Blut eine regulatorische Rolle zu spielen. Da hohe systemische TIMP-1-Spiegel keinen Einfluss auf SDF-1-Spiegel im Plasma (Seubert et al.) oder im KM (Abb. 21 B) hatten, die die Veränderung der Blut-Neutrophilenzahlen erklären könnten, wurde untersucht, ob TIMP-1 die Neutrophilen-Sensitivität gegenüber diesem Zytokin beeinflusst, indem die Expression des CXCR4-Rezeptors auf der Zelloberfläche verändert wird. Es wurden also CXCR4-Oberflächenspiegel auf Blut-Neutrophilen, sowie auf reifen KM-Neutrophilen und Neutrophilen-Vorläufern aus AdKtrl- und AdT1-transduzierten Mäusen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Wie erwartet, hatten in allen Tieren unreife Neutrophile die höchste CXCR4-Oberflächenexpression, während Blut-Neutrophile nur geringe CXCR4-Mengen aufwiesen. Hohe TIMP-1-Spiegel schienen aber in keiner dieser Populationen einen Einfluss auf CXCR4-Spiegel zu haben (Abb. 32). Inwieweit die SDF-1/CXCR4-Achse für Effekte von TIMP-1 auf die Neutrophilenhomöostase eine Rolle spielt, konnte demnach im Rahmen dieser Studie nicht abschließend geklärt werden.

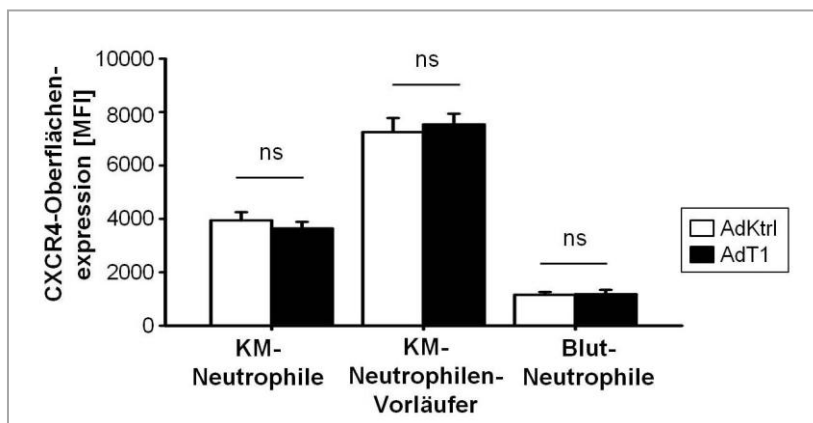


Abb. 32: TIMP-1 hat keinen Einfluss auf CXCR4-Oberflächenspiegel von Neutrophilen.

C57Bl/6-Mäuse wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und 3 Tage später geopfert. CXCR4-Oberflächenspiegel auf Blut- und KM-Neutrophilen ($Ly6G^{hi}$) bzw. Neutrophilenvorläufern ($Ly6G^{int}$) wurden mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler der mittleren Fluoreszenzintensität abzüglich der Fluoreszenzintensität IgG-gefärbter Kontrollen aus jeweils 5 Tieren.

2 Effekte hoher systemischer TIMP-1-Spiegel auf weitere Leukozyten-Populationen

2.1 TIMP-1 hat keinen Einfluss auf B- und T-Lymphozyten im Blut, führt aber zu Veränderungen bei Monozyten und NK-Zellen

Um ein umfassenderes Bild der Effekte von TIMP-1 auf die Regulation der Leukozytenhomöostase zu erlangen, wurden neben Neutrophilen auch die wichtigsten anderen Immunzellpopulationen in Mäusen mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. So wurden anhand der Oberflächenexpression von CD11b myeloide (CD11b⁺) und lymphoide (CD11b⁻) Zellen unterschieden. NK-Zellen, die sowohl CD11b-positive, als auch CD11b-negative Subpopulationen enthalten, wurden zuvor anhand des NK-Zellmarkers CD49b identifiziert. Innerhalb der lymphoiden Population wurden B-Lymphozyten anhand des Pan-B-Zellmarkers CD19 und T-Lymphozyten anhand der Expression von CD3 charakterisiert. CD11b-positive, Ly6G-negative CD49b-negative Zellen stellen Monozyten dar. Repräsentative FACS-Plots inkl. der einzelnen *Gates* sind in Abb. 33 dargestellt.

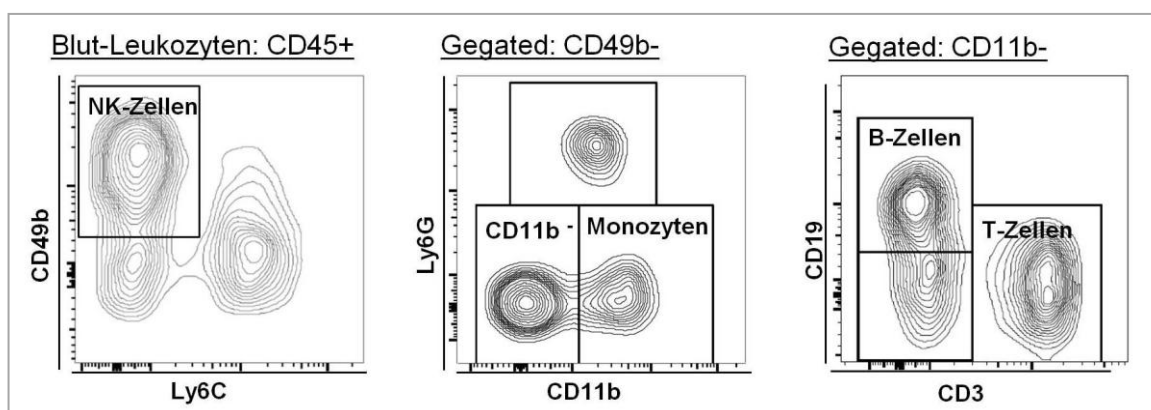


Abb. 33: Gating verschiedener Leukozyten-Populationen im Blut. NK-Zellen wurden anhand der Expression von CD49b von anderen Leukozyten unterschieden (links). CD49b-negative Zellen wurden in lymphoide (CD11b⁻) und myeloide Zellen (CD11b⁺) unterteilt. Myeloide Ly6G-negative Zellen wurden als Monozyten erachtet (Mitte). Innerhalb der lymphoiden Zellen wurden B-Zellen anhand der Expression von CD19 und T-Zellen anhand der Expression von CD3 identifiziert (rechts).

Inwieweit TIMP-1 Effekte auf die Homöostase dieser weiteren Leukozyten-Populationen im Blut hat, wurde zu unterschiedlichen Zeiten nach adenoviraler Erhöhung systemischer TIMP-1-Spiegel untersucht. Die absolute Quantifizierung von B- und T-Lymphozyten ergab keine signifikanten Unterschiede (Abb. 34 A, B). Lediglich 48 h nach Erhöhung der TIMP-1-Spiegel wurden in AdT1-Mäusen signifikant niedrigere B-Zellen beobachtet (Abb. 34 A). Betrachtet man aber den gesamten Zeitverlauf, so fällt auf, dass die Werte in AdT1-Mäusen annähernd konstant bleiben und zu diesem Zeitpunkt in der Kontrollgruppe ein Anstieg an B-Zellen zu verzeichnen war. Hohe TIMP-1-Spiegel scheinen also keinen Einfluss auf die Zahl zirkulierender B- und T-Zellen zu haben. Im Gegensatz dazu

ERGEBNISSE

wurden in AdT1-transduzierten Mäusen ab Tag 3 nach Virusinjektion signifikant erhöhte NK-Zellzahlen beobachtet, wenngleich diese im zeitlichen Verlauf in beiden Gruppen stärkeren Schwankungen unterlagen als andere Leukozyten-Populationen (Abb. 34 C). Interessant war auch die Quantifizierung von Monozyten. Hier schienen hohe TIMP-1-Spiegel in den ersten Tagen keinen Einfluss zu haben. An Tag 5 und 6 war aber auch die Zahl zirkulierender Monozyten in AdT1-Mäusen signifikant erhöht, sank allerdings innerhalb von 9 Tagen wieder fast auf das in Kontrollmäusen beobachtete Niveau (Abb. 34 D). Diese Daten zeigen, dass hohe TIMP-1-Spiegel auch zu Schwankungen in anderen Leukozyten-Populationen führen. Der konstante und zeitlich stabile Anstieg Neutrophiler Granulozyten wurde aber für keinen weiteren Zelltyp beobachtet.

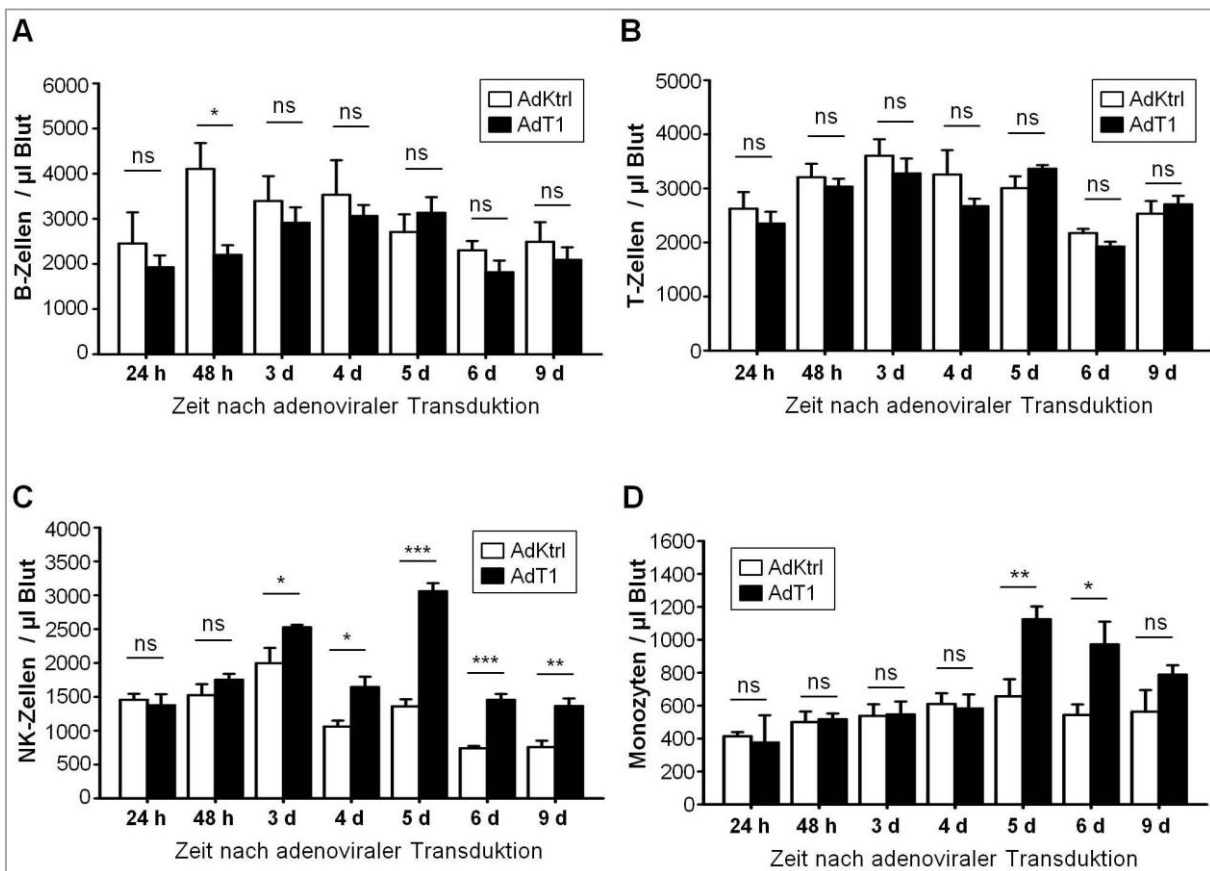


Abb. 34: Quantifizierung weiterer Leukozyten-Populationen im Blut. DBA/2-Mäuse wurden mit AdKtrl bzw. AdT1 transduziert und zu den dargestellten Zeitpunkten nach Virusinjektion geopfert. B-Lymphozyten (A), T-Lymphozyten (B), NK-Zellen (C) und Monozyten (D) im Blut wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardfehler aus 4 (AdKtrl) bzw. 5 (AdT1) Tieren.

2.2 Megakaryozyten sind angereichert im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln

Eine weitere Auffälligkeit in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln ergab die mikroskopische Betrachtung von KM-Schnitten nach unterschiedlichen immunhistochemischen Färbungen. Hier war

ein vermehrtes Vorkommen großer Zellen mit einer für Megakaryozyten typischen gelappten Kernmorphologie auffällig. Um zu überprüfen, ob TIMP-1 tatsächlich einen Einfluss auf diese Thrombozyten-Vorläuferzellen hat, wurden KM-Schnitte histochemisch mit Hämalaun und Eosin (HE) gefärbt (Abb. 35 A, B), um Megakaryozyten pro Bildausschnitt zu quantifizieren. Tatsächlich wurden im KM AdT1-transduzierter Mäuse signifikant mehr Megakaryozyten beobachtet als in Kontrollmäusen (Abb. 35 B, C).

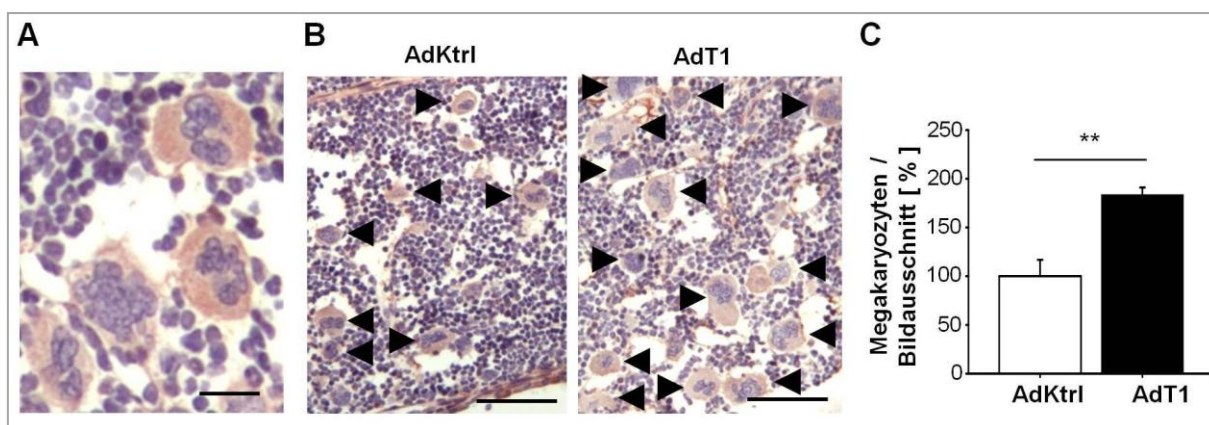


Abb. 35: TIMP-1 führt zum Anstieg von Megakaryozyten im KM. DBA/2-Mäuse wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und 3 Tage später geopfert. Megakaryozyten wurden anhand ihrer Morphologie auf HE-gefärbten KM-Schnitten quantifiziert. (A) Vergrößerte Abbildung von Megakaryozyten. Balken, 25 μ m. (B) Repräsentative Bilder von KM-Schnitten einer AdKtrl- und AdT1-transduzierten Maus. Balken, 100 μ m; Pfeile zeigen auf Megakaryozyten. (C) Quantifizierung der Megakaryozyten im KM AdKtrl- und AdT1-transduzierter Mäuse. Gezeigt sind Mittelwert und Standardfehler aus je 6 Tieren.

IV. DISKUSSION

1 TIMP-1 als Neutrophilie-fördernder Faktor

Die Homöostase Neutrophiler Granulozyten unterliegt einer fein abgestimmten Regulation auf verschiedenen Ebenen, und Dysbalancen in beide Richtungen sind assoziiert mit einer Vielzahl von Krankheiten. Patienten mit zu geringen Neutrophilenzahlen fehlt der durch diese Zellen vermittelte Schutz gegen eingedrungene Pathogene, wie aus der hohen Empfänglichkeit und dem dramatischen Verlauf von Infektionskrankheiten in Neutropenie-Patienten deutlich wird (Strydom und Rankin, 2013). Andererseits können die aggressiven, aber nicht sehr spezifisch wirkenden Waffensysteme der Neutrophilen wie Proteasen, ROS und andere hochreaktive Moleküle zur massiven Schädigung des Gewebes führen. Es ist daher nicht verwunderlich, dass in einer Reihe Entzündungs-assoziiierter Krankheiten hohe Neutrophilen-Zahlen mit einem schlimmeren Krankheitsverlauf und schlechter Prognose für den Patienten assoziiert sind (Carbone et al., 2013; Donskov, 2013; Németh und Mócsai, 2012). Aus diesem Grund ist es von großem klinischem Interesse, die Regulationsmechanismen der Neutrophilen-Homöostase unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu verstehen, um geeignete Therapien zu entwickeln.

Im Rahmen dieser Studie konnten hohe systemische TIMP-1-Spiegel als neuer Faktor identifiziert werden, der Neutrophilie in Mäusen induziert. Interessanterweise ist TIMP-1 selbst im Zusammenhang mit einer Reihe inflammatorischer Krankheiten wie Fibrose (Hernandez-Gea und Friedman, 2011), Arteriosklerose (Lijnen, 2002), Sepsis (Hästbacka et al., 2014; Lauhio et al., 2011) und Krebs (Bunatova et al., 2012) beschrieben, bei denen hohe TIMP-1-Spiegel als schlechter prognostischer Marker gelten. In dieser Studie wurde gezeigt, dass hohe systemische TIMP-1-Spiegel die Neutrophilen-Produktion im KM fördern, was in der erhöhten Anzahl zirkulierender Neutrophiler im peripheren Blut resultiert. Die direkt durch TIMP-1 induzierte Neutrophilie könnte eine bisher unbekannte Erklärung für die in der Klinik zu beobachtende Assoziation von TIMP-1 mit inflammatorischen Erkrankungen liefern. Hierbei gilt es allerdings zu bedenken, dass die Studie in Mäusen durchgeführt wurde, bei denen Blut-Neutrophilenzahlen generell niedriger sind als im Menschen und auch nicht die häufigste Leukozyten-Subpopulation darstellen (von Vietinghoff und Ley, 2008). Die Untersuchung in Mäusen mit unterschiedlichem genetischen Hintergrund und Immunstatus, die sich unter anderem auch hinsichtlich der Blut-Neutrophilenzahlen sowie des Neutrophilen-Lymphozytenverhältnisses unterscheiden (Abb. 7C, Vietinghoff und Ley, 2008) zeigen, dass der beschriebene Effekt zumindest nicht Stamm-spezifisch ist. Ob ein direkter Effekt hoher TIMP-1-Spiegel auf Blut-Neutrophile auch im Menschen vorliegt, muss noch gezeigt werden. Auch wenn bisher keine klinische Studie eine direkte Korrelation von TIMP-1-Plasmaspiegeln und Blut-

Neutrophilenzahlen untersuchte, wurde erhöhte Neutrophilen-Aktivierung in eben den Gruppen von Sepsis-Patienten beschrieben, die auch erhöhte TIMP-1-Plasmaspiegel aufweisen (Wang et al., 2014). Darüber hinaus spricht die Beobachtung hoher TIMP-1-Spiegel in einer Vielzahl von Krankheiten, die mit Neutrophilie assoziiert sind, dafür, dass TIMP-1 auch die Neutrophilen-Homöostase im Menschen beeinflussen könnte. Interessant ist auch, dass die TIMP-1-Expression unter anderem durch virale Proteine stimuliert wird (Lin et al., 2015; Uchijima et al., 1994). Dass daraus resultierende erhöhte TIMP-1-Spiegel zur vermehrten Neutrophilen-Freisetzung im Organismus führen, könnte möglicherweise einen immunologischen Vorteil für den Organismus bei der Abwehr solcher Viren darstellen. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant, zu untersuchen, ob und in welcher Form TIMP-1 die physiologische Funktion oder Aktivierung von Neutrophilen beeinflusst.

Die Homöostase zirkulierender Neutrophiler wird aufrechterhalten durch ein Gleichgewicht aus Proliferation und Differenzierung myeloider Neutrophilen-Vorläufer im KM, der Retention oder Freisetzung in die Blutbahn, sowie deren Rekrutierung ins Gewebe oder Beseitigung durch Apoptose und anschließender Phagozytose (Christopher und Link, 2007). Eine verringerte Apoptose-Rate, wie sie für Neutrophile als Reaktion auf verschiedene inflammatorische Zytokine beschrieben ist (Luo und Loison, 2008), konnte als Ursache der TIMP-1-induzierten Neutrophilie ausgeschlossen werden. Ebenso schien eine direkte Mobilisierung reifer Neutrophiler aus dem KM-Speicher unwahrscheinlich, da weder eine Reduktion dieses Reservoirs über die Zeit, noch eine chemotaktische oder mobilisierende Wirkung von TIMP-1 auf KM-Neutrophile zu beobachten war. Die hier beschriebene TIMP-1-induzierte Neutrophilie trat nicht sofort mit Erhöhung systemischer TIMP-1-Spiegel ein, sondern mit einer Verzögerung von 3 Tagen, was ebenfalls gegen eine sofortige Mobilisierung reifer Neutrophiler aus dem KM oder anderer Speicherorgane spricht. Typische Neutrophilen-mobilisierende Faktoren wie G-CSF oder IL-8 induzieren innerhalb von Minuten bis wenigen Stunden einen Anstieg der Blut-Neutrophilenzahlen (Jagels und Hugli, 1992; Ulich et al., 1988). Ein solcher wurde für TIMP-1 weder nach adenoviraler Transduktion, die wenige Stunden nach Virusinjektion zu systemisch erhöhten TIMP-1-Spiegeln führte (Abb. 6), noch durch Injektion von rekombinantem TIMP-1, das innerhalb von Minuten im Plasma nachweisbar war (Abb. 11 A), beobachtet. Stattdessen war die Zahl der Blut-Neutrophilen erst 3 Tage nach Erhöhung der TIMP-1-Spiegel signifikant erhöht. Dieser zeitliche Verlauf entspricht dem anderer Studien, in denen aus proliferierenden KM-Vorläufern neu generierte Neutrophile 60 Stunden (Basu et al., 2002) bzw. 3 Tage (Hong et al., 2012) nach Verlassen der mitotischen Differenzierungsstadien im Blut zu finden waren. Tatsächlich belegte die Quantifizierung BrdU-positiver - und somit seit Erhöhung der TIMP-1-Spiegel neu generierter - Neutrophiler im Blut, dass die TIMP-1-induzierte Neutrophilie auf eine vermehrte Produktion aus proliferierenden Neutrophilen-Vorläufern im KM zurückzuführen war (Abb. 17).

2 TIMP-1 als Regulator hämatopoetischer Prozesse

Als Ursache der TIMP-1-induzierten Neutrophilie konnte also in dieser Studie eine erhöhte Granulopoese-Rate identifiziert werden. Zum einen war die Zahl unreifer Neutrophilen-Vorläufer mit intermediärer Ly6G-Oberflächenexpression im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln erhöht. Zum anderen wurde in diesen Mäusen eine gesteigerte mRNA-Expression von Genen gemessen, die typischerweise in einem bestimmten Differenzierungsstadium während der Granulopoese transkribiert werden, nicht aber in reifen Neutrophilen oder anderen Leukozyten-Populationen (Fiedler und Brunner, 2012; Theilgaard-Mönch et al., 2005). Da die Genexpressionsanalysen in Lysaten aus Komplet-KM, also einer Mischung aller darin enthaltener Zelltypen durchgeführt wurden, könnte der mRNA-Anstieg sowohl aus einer erhöhten Expression pro Zelle, als auch aus einer vermehrten Anzahl an Zellen im entsprechenden Reifungsstadium resultieren. Unter Berücksichtigung der Akkumulation von Neutrophilen-Vorläufern erscheint aber letzteres wahrscheinlicher.

Obwohl im Rahmen dieser Studie keine detaillierte Morphologie-basierte Zuordnung der Ly6G^{int}-Population zu einem bestimmten Differenzierungsstadium der Granulopoese durchgeführt wurde, dürfte sie - basierend auf der Analyse von Oberflächenmarkern - hauptsächlich Zellen im Promyelozyten-, Myelozyten- und Metamyelozyten-Stadium enthalten (Satake et al., 2012). Diese Differenzierungs-Stadien sind vom Übergang der mitotischen in die post-mitotische Phase der Granulopoese gekennzeichnet (Theilgaard-Mönch et al., 2005). Tatsächlich bestätigte die Verabreichung eines einzelnen BrdU-Pulses, dass Ly6G^{int}-Vorläufer noch zur Teilung fähig sind, und der beobachtete Anteil proliferierender Zellen entsprach etwa dem für eine Mischung aus Promyelozyten, Myelozyten und Metamyelozyten zu erwartenden Wert (Theilgaard-Mönch et al., 2005; Abb. 18). Theoretisch könnte die Akkumulation der Ly6G^{int}-Vorläufer in Mäusen mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln durch vermehrte Proliferation der Zellen in diesem Differenzierungsstadium verursacht werden. Pro-proliferative Effekte von TIMP-1 wurden für mehrere Zelltypen beschrieben, darunter Tumorzellen (Botta et al., 2013; Kim et al., 2012; Stetler-Stevenson, 2008), Erythrozyten-Vorläufer (Gauwerky et al., 1980) und mesenchymale Stammzellen (Egea et al., 2012). Allerdings ergab die BrdU-Markierung gerade proliferierender KM-Zellen in dieser Studie, dass der Anteil sich teilender Ly6G^{int}-Zellen in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln dem in Kontrollmäusen gleich, was gegen einen direkten pro-proliferativen Effekt von TIMP-1 auf Neutrophilen-Vorläufer spricht. Dies war im Einklang mit der Beobachtung, dass die generelle Zellularität des KMs in AdT1-Mäusen nicht merklich erhöht war. Und auch *in vitro* hatte rTIMP-1 keinen pro-proliferativen Effekt auf undifferenzierte 32Dcl3-Zellen (Abb. 18 C). Eine direkte Expansion unreifer Neutrophiler scheint also nicht für die TIMP-1-induzierte vermehrte Granulopoese verantwortlich zu sein.

Stattdessen könnte TIMP-1 die Differenzierung früherer hämatopoetischer Zellen zu diesen Neutrophilen-Vorläufern begünstigen. Tatsächlich reichte die Gegenwart von rTIMP-1 aus, um die G-CSF-induzierte Differenzierung von 32Dcl3-Zellen zu Neutrophilen zu fördern bzw. zu beschleunigen. In diesem Zusammenhang ist auch die Beobachtung interessant, dass hohe TIMP-1-Spiegel keinen Einfluss auf B- und T-Lymphozyten zu haben scheinen, während die Zahl zirkulierender Monozyten zumindest vorübergehend erhöht war. Nach dem klassischen Modell der Hämatopoese erfolgt die Differenzierung sämtlicher Blutzell-Linien einer hierarchischen Struktur, in der pluripotente hämatopoetische Vorläuferzellen sich durch zunehmende Differenzierung und Spezifizierung nach und nach auf eine bestimmte Leukozyten-Linie festlegen (*lineage commitment*, Iwasaki und Akashi, 2007). Die genaue Struktur dieser Differenzierungs-Hierarchie ist noch nicht abschließend geklärt. Das klassische Modell postuliert eine frühe definitive Entscheidung zwischen der myeloiden und der lymphoiden Linie (Abb. 36 A), und begründet sich auf der Isolierung hämatopoetischer Vorläuferzellen, die entweder in der Lage sind, in alle lymphoiden Linien zu differenzieren, nicht aber in myeloide (Kondo et al., 1997) oder umgekehrt (Akashi et al., 2000). Neuere Erkenntnisse lassen darüber hinaus eine komplexere, weniger starre Struktur vermuten, in der es neben einem rein myeloiden Vorläufer (MyRP, *myeloid-restricted progenitor*) ein Vorläuferzell-Stadium (LMPP, *lymphomyeloid pluripotent progenitor*) gibt, aus dem neben Lymphozyten unter bestimmten Bedingungen noch Granulozyten und Monozyten, nicht aber Erythrozyten und Platelets hervorgehen können (Abb. 36 B; Nimmo et al., 2015). In beiden Modellen folgen Monozyten und Granulozyten lange der gleichen Linie bis zu einem gemeinsamen Vorläufer, dem *granulocyte monocyte progenitor* (GMP, Abb. 36; Iwasaki und Akashi, 2007). TIMP-1 könnte also die Differenzierung früherer hämatopoetischer Zellen in Richtung dieses gemeinsamen GMP-Vorläufers begünstigen, aus dem dann sowohl Neutrophile als auch Monozyten entstehen und (ggf. zeitlich verzögert) ins Blut freigesetzt werden. Bezieht man die beobachtete Zunahme von Megakaryozyten mit ein, könnte TIMP-1 nach dem in Abb. 36 B dargestellten Modell auch die Entstehung von MyRPs gegenüber LMPPs begünstigen. Auf welcher Hierarchie-Ebene der Hämatopoese hohe TIMP-1-Spiegel wirken, und wie diese zur hier beobachteten Förderung der Neutrophilen-Differenzierung führen, muss im Detail noch geklärt werden.

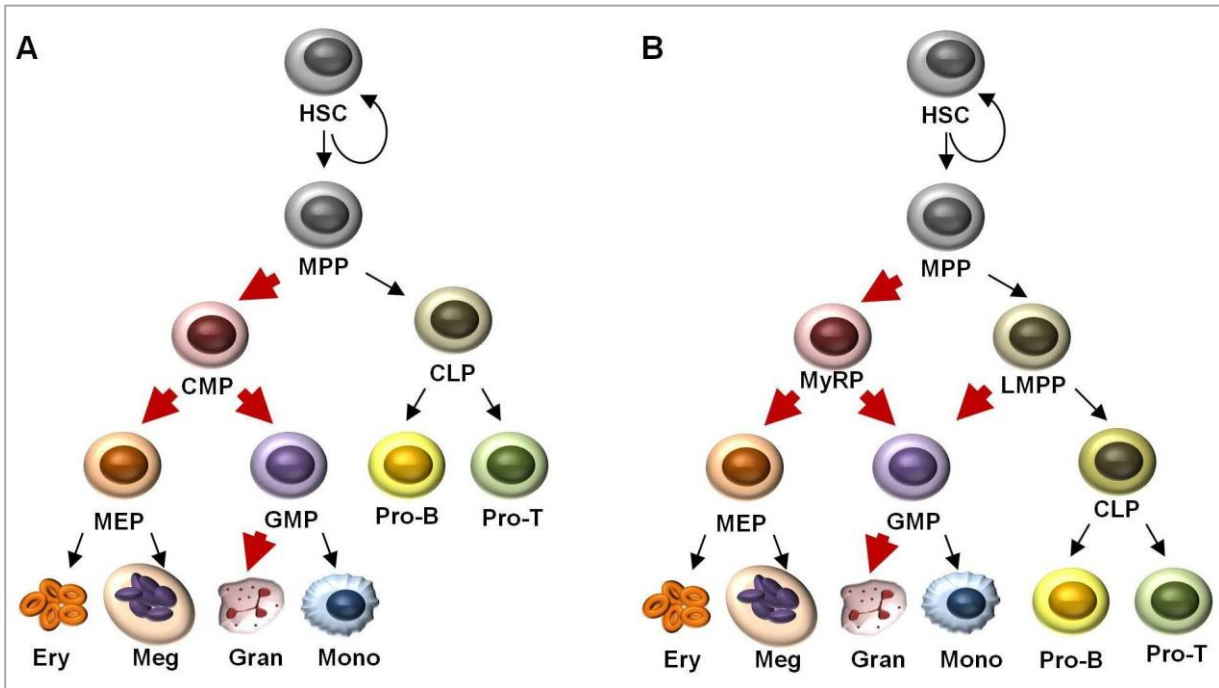


Abb. 36: Mögliche Einflüsse von TIMP-1 in der Hierarchie hämatopoetischer Zelldifferenzierung. Alle Blut-Zelllinien entstehen durch fortschreitende Spezifizierung und Differenzierung aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC), die durch asymmetrische Zellteilung zur Selbsterneuerung und zur Bildung multipotenter Vorläufer (MPP) in der Lage sind. Möglicherweise durch TIMP-1 begünstigte Differenzierungsschritte sind durch dicke rote Pfeile hervorgehoben. **(A)** Klassisches Modell der Hämatopoese: Ausgehend von MPPs findet früh die Festlegung auf myeloide (CMP, gemeinsamer myeloider Vorläufer) oder lymphoide (CLP, gemeinsamer lymphoider Vorläufer) Linien statt. Innerhalb der myeloiden Linie folgt dann die Entscheidung zwischen einem gemeinsamen Vorläufer für Megakaryozyten, die schließlich Thrombozyten ins Blut freisetzen, und Erythrozyten (MEP), oder einem gemeinsamen Vorläufer für Granulozyten und Monozyten (GMP). Aus dem gemeinsamen lymphoiden Vorläufer (CLP) differenzieren B- und T-Zellvorläufer, die in KM oder Milz zu reifen Lymphozyten werden. **(B)** Die Entdeckung pluripotenter Zellen, die nur die Fähigkeit verloren haben, zu Erythrozyten und Megakaryozyten zu differenzieren, führte zur Etablierung des sogenannten *Myeloid Bypass*-Modells, in dem eine frühe Entscheidung zwischen strikt myeloiden Vorläufern (MyRP) und lymphomyeloiden Vorläufern (LMPPs) stattfindet. Während MyRPs zu allen myeloiden, nicht aber in lymphoide Linien differenzieren können, können aus LMPPs Leukozyten sowohl der myeloiden, als auch der lymphoiden Linien entstehen. Schemata modifiziert nach (Iwasaki und Akashi, 2007; Nimmo et al., 2015)

Die in dieser Studie beobachtete TIMP-1-abhängige Phosphorylierung von STAT-3 in 32Dcl3-Zellen gibt einen ersten Anhaltspunkt für mögliche intrazelluläre *downstream*-Signalwege in myeloiden Vorläufern, die die vermehrte Neutrophilen-Differenzierung erklären könnten. *Signal transducer and activator of transcription-3* (STAT-3) ist der zentrale Signalvermittler *downstream* des G-CSF-Rezeptors (Ward et al., 2000) und spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Granulopoese und Neutrophilen-Homöostase unter verschiedenen Bedingungen (Lee et al., 2002; McLemore et al., 2001; Panopoulos et al., 2006). Interessanterweise induziert STAT-3 direkt die Transkriptionsfaktoren C/EBP- α und C/EBP- β . C/EBP- β ist ein zentraler Regulator für die G-CSF-induzierte Expansion des Neutrophilen-Pools unter Notfallbedingungen (Zhang et al., 2010), und

C/EBP- α ist essentiell für die G-CSF-induzierte Differenzierung von 32Dcl3-Zellen (Numata et al., 2005), möglicherweise, indem es den Schalter von G-CSF-getriebener Proliferation auf Differenzierung umlegt (Porse et al., 2001; Theilgaard-Mönch et al., 2005). TIMP-1 könnte also über STAT-3-*Signaling* durch Induktion dieser Transkriptionsfaktoren die terminale Differenzierung von 32Dcl3-Zellen und den Übergang in post-mitotische Stadien beschleunigen. Dazu passt die hier gemachte Beobachtung, dass TIMP-1 allein zwar ausreichte, um die Expression von C/EBP α und C/EBP β zu erhöhen und in Anwesenheit von G-CSF die Differenzierung von 32Dcl3-Zellen zu fördern, selbst aber nicht in der Lage war, das Überleben und die Proliferation der Zellen über mehrere Tage hinweg zu gewährleisten. Auch durch andere Arbeitsgruppen wurde beschrieben, dass die Überexpression von TIMP-1 in 32D-Zellen zur verringerten Proliferation dieser Zellen führt (Rossi et al., 2011). TIMP-1 könnte somit G-CSF-vermittelte Differenzierungssignale verstärken und dadurch die terminale Neutrophilen-Reifung beschleunigen.

Darüber hinaus ist es aber nicht unwahrscheinlich, dass auch frühere hämatopoetische Ereignisse durch hohe TIMP-1-Spiegel reguliert werden, die nicht ausschließlich die Neutrophilen-Homöostase, sondern auch andere myeloide Zellen betreffen. Dazu passt die hier beschriebene erhöhte Zahl von Megakaryozyten im KM von Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln, da die Entscheidung hämatopoetischer Vorläufer zwischen der Megakaryozyten-Erythrozyten-Linie (MEP) und der Granulozyten-Monozyten-Linie (GMP) vergleichsweise früh erfolgt (Abb. 36; Iwasaki und Akashi, 2007; Nimmo et al., 2015). Wie in dieser Studie gezeigt, waren KM-Zellen aus Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln vermehrt in der Lage, Kolonien zu bilden (Abb. 16 C). Auch andere Studien zeigen, dass TIMP-1 an der homöostatischen Regulation hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen beteiligt ist. So ist das Stammzellkompartiment in TIMP-1-*knock-out*-Mäusen funktionell beeinträchtigt, was zu einer generell erniedrigten KM-Zellularität führt, auch wenn dies unter physiologischen Bedingungen keine Auswirkungen auf Blut-Leukozytenzahlen zu haben scheint (Rossi et al., 2011). Auch die Rekonstitution des KMs durch HSPCs nach letaler Bestrahlung und KM-Transfer wurde durch TIMP-1 gefördert (Wilk et al., 2013). Erst kürzlich wurde beschrieben, dass Inkubation mit rTIMP-1 direkt die Expansion sehr früher humaner hämatopoetischer Vorläufer fördert (Rossi et al., 2015). Inwieweit hohe TIMP-1-Spiegel sich auf die Hämatopoese weiterer Blut-Zellpopulationen auswirken, muss in künftigen Studien noch im Detail geklärt werden. Bisherige Ergebnisse lassen aber vermuten, dass TIMP-1 sowohl die terminale Neutrophilen-Differenzierung beschleunigen, als auch frühere hämatopoetische Ereignisse regulieren könnte, die gemeinsam zur beobachteten TIMP-1-induzierten Granulopoese und Neutrophilie führen (Abb. 36).

3 Mechanismus der TIMP-1-induzierten Granulopoese: Protease-Inhibition versus direktes Signaling über CD63

Inzwischen ist allgemein anerkannt, dass Proteasen wichtige Regulatoren hämatopoetischer Prozesse sind, die die Aktivität hämatopoetischer Zellen maßgeblich beeinflussen und zur vermehrten Leukozyten-Freisetzung (Leukozytose) führen können (Opdenakker et al., 1998). HSCs sitzen in speziellen KM-Nischen, in denen Proliferation und Differenzierung maßgeblich durch Interaktion mit ihrer zellulären und extrazellulären Umgebung reguliert werden. Insbesondere die Metalloproteinasen MMP-2, MMP-8, MMP-9 und MT1-MMP fördern durch Proteolyse Hämatopoese-regulierender Signal- und Adhäsionsmoleküle die Aktivierung und Mobilisierung von HSPCs in diesen Nischen (Klein et al., 2015). So führte die Freisetzung von MMP-8 (Steinl et al., 2013) und MMP-9 (Pruijt et al., 1999, 2002) zur Mobilisierung von HSCs, und MMP-9-vermittelte Proteolyse der SDF-1/CXCR4-Interaktion ist ein wichtiger Regulator der Retention von HSPCs und gespeicherten Neutrophilen(-Vorläufern) im KM (Jin et al., 2008).

Auf den ersten Blick erscheint es daher kontra-intuitiv, dass TIMP-1 als Inhibitor dieser MMPs Leukozyten-Differenzierung und -Freisetzung aus dem KM verstärkt. Tatsächlich war die Protease-inhibitorische N-terminale Domäne von TIMP-1 alleine nicht in der Lage, Granulopoese zu fördern und Neutrophilie zu induzieren, sondern führte eher zu einer leichten Reduktion zirkulierender Neutrophiler (Abb. 22). N-TIMP-1 reicht aus, die meisten durch TIMP-1 gehemmten MMPs zu inhibieren (Brew und Nagase, 2010; Murphy et al., 1991), nicht aber ADAM-10 (Rapti et al., 2008). Interessanterweise ist ADAM-10 als Regulator von Differenzierungsentscheidungen zwischen myeloiden und lymphoiden Linien beschrieben (Gibb et al., 2011). Darüber hinaus führt der konditionelle *knock out* von ADAM-10 in nicht-hämatopoetischen Zellen zu erhöhten Plasma-Spiegeln von G-CSF und der abnormen Expansion myeloider Zellen (Weber et al., 2013; Yoda et al., 2011). Die Hemmung von ADAM-10 musste somit als möglicher Mechanismus der TIMP-1-induzierten Granulopoese in Betracht gezogen werden. Allerdings wurden in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln keine erhöhten G-CSF-Spiegel beobachtet. Noch entscheidender war die Beobachtung, dass die Expression der TIMP-1-Varianten vvTIMP-1 und TIMP-1/T2G, die nachweislich keine Inhibition von ADAM-10 vermitteln (unveröffentlichte Daten von Tanja Wirsch), ausreichend waren, um die Effekte auf Granulopoese und Neutrophilie hervorzurufen. Vor allem aber führte die Ablation von CD63 zur vollständigen Aufhebung dieser Effekte, obwohl unter diesen Bedingungen ADAM-10 durch TIMP-1 inhibiert werden sollte. Ob die Hemmung von ADAM-10 durch erhöhte TIMP-1-Spiegel zu späteren Zeitpunkten zusätzliche regulatorische Effekte auf die Hämatopoese hat, kann nicht ausgeschlossen werden. Immerhin führte der konditionelle ADAM-10-*knock out* in der bereits erwähnten Studie erst nach 6 Wochen zu einem signifikanten Neutrophilen-Anstieg (Weber

et al., 2013). Für die hier beschriebenen Effekte von TIMP-1 auf die Neutrophilen-Homöostase innerhalb von 3 Tagen scheint die Protease-inhibitorische Funktion aber nicht verantwortlich zu sein. Im Gegensatz dazu reichte die Expression von TIMP-1-*Signaling*-Varianten mit intakter C-terminaler Domäne, aber fehlender Fähigkeit zur Protease-Inhibition aus, um Granulopoese und Neutrophilie zu induzieren. Trotz vergleichbarer Plasmaspiegel - dies wurde mittels ELISA überprüft - waren die Effekte der *Signaling*-Varianten auf die Neutrophilen-Homöostase sogar stärker als die von Wildtyp-TIMP-1. Die fehlende Fähigkeit dieser Mutanten, mit Proteasen zu interagieren, könnte dazu führen, dass eine größere Menge TIMP-1 zur Interaktion mit Rezeptoren und Signalübertragung zur Verfügung steht. Die Sichtweise, dass MMPs als Inhibitoren der TIMP-1-Signalübertragung fungieren, wurde vor kurzem vorgestellt (Moore und Crocker, 2012), und könnte eine Erklärung für die im Rahmen dieser Studie gemachten Beobachtungen liefern.

Interessanterweise wurde TIMP-1 fast zeitgleich zu seiner Entdeckung als Gelatinase-Inhibitor auch als *erythroid potentiating activity* (EPA) beschrieben (Docherty et al., 1985), einem Faktor, der die Expansion humaner Erythrozyten-Vorläufer stimuliert (Gauwerky et al., 1980). Später wurde gezeigt, dass dieser Effekt unabhängig von der Protease-inhibitorischen Funktion vermittelt wird (Chesler et al., 1995). Diese Studien sind auf einer Linie mit der hier gemachten Beobachtung, dass TIMP-1 durch seine direkte *Signaling*-Funktion auf hämatopoetische Prozesse wirkt.

Wie in dieser Studie gezeigt, erforderte die durch TIMP-1 geförderte Granulopoese die Anwesenheit des TIMP-1-Rezeptors CD63. *In vivo* führte der CD63-*knock out* zur vollständigen Aufhebung der TIMP-1-induzierten Akkumulation Ly6G^{int}-exprimierender Neutrophilen-Vorläufer sowie der veränderten Expression Granulopoese-assoziiierter Gene. In Kontrollmäusen hatte allerdings die Ablation von CD63 selbst keinerlei Einfluss auf die Neutrophilen-Homöostase. Dies bestätigte die Ergebnisse anderer Studien zum Phänotyp der CD63-*knock out*-Mäuse (Schröder et al., 2009), und weist darauf hin, dass normale TIMP-1-Spiegel und deren Interaktion mit CD63 keinen essentiellen Einfluss auf die Neutrophilen-Homöostase haben.

Ob *in vivo* eine Interaktion von TIMP-1 mit CD63 direkt auf hämatopoetischen Vorläuferzellen stattfindet, oder ob stromale Zellen als Mediatoren die Granulopoese-fördernden Effekte vermitteln, muss im Detail noch geklärt werden. Dazu könnten beispielsweise reziproke KM-Transfer-Experimente mit CD63-positiven hämatopoetischen Zellen in *knock out*-Mäusen und CD63-ablatierten hämatopoetischen Stammzellen in CD63-kompetenten Mäusen durchgeführt werden. Die Beobachtung, dass rTIMP-1 ausreichte, um die Differenzierung von 32Dcl3-Zellen *in vitro* - also in Abwesenheit stromaler Zellen - zu fördern, und dass der CD63 *knock down* in diesen Myeloblasten zur Aufhebung des Effekts führte, legt aber eine direkte Wirkung von TIMP-1 auf hämatopoetische Zellen nahe. Auch das unveränderte Zytokin-Milieu in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln spricht eher gegen zusätzliche Mediatoren der TIMP-1-geförderten Granulopoese. Dazu passt auch, dass

Neutrophilen-Vorläufer verglichen mit reifen Neutrophilen hohe CD63-Spiegel auf der Zelloberfläche exprimierten (Abb. 25 A). Außerdem ist CD63 als TIMP-1-Rezeptor auf der Oberfläche CD34-positiver hämatopoetischer Vorläufer beschrieben, wo er deren Adhäsion innerhalb der KM-Umgebung durch β 1-Integrin reguliert (Wilk et al., 2013).

Aber auch die Membran primärer Neutrophilen-Granulae enthält große Mengen CD63, die nach Stimulation schnell an die Oberfläche reifer Neutrophiler transferiert werden können (Cham et al., 1994), und CD63 reguliert die Verpackung weiterer Proteine in diesen Granulae (Källquist et al., 2008). Es ist daher nicht auszuschließen, dass TIMP-1 durch Interaktion mit CD63 nicht nur quantitativ auf die Granulopoese wirkt, sondern auch zu qualitativen Unterschieden der dabei entstehenden Neutrophilen führt. Demnach könnten unter hohen TIMP-1-Spiegeln entstandene Neutrophile funktionelle Unterschiede in der Granulae-Zusammensetzung und -Freisetzung aufweisen.

Auch bei späteren Schritten der Neutrophilen-Aktivierung spielt CD63 eine wichtige Rolle. So interagiert CD63 in reifen Neutrophilen mit Mac-1 und CD62L und reguliert dadurch deren Adhäsion ans Endothel (Skubitz et al., 1996). Darüber hinaus ist CD63 bei der Aktivierung von Endothelzellen selbst unter inflammatorischen Bedingungen beteiligt. Als Bestandteil der Weibel-Pallade-Körperchen (Vischer und Wagner, 1993) fungiert es als essentieller Co-Faktor beim Transport von P-Selektin auf die Endothel-Oberfläche, was wiederum die Leukozyten-Rekrutierung ins Gewebe initialisiert (Doyle et al., 2011; Poeter et al., 2014). Auch auf apoptotischen Neutrophilen wird CD63 selektiv hochreguliert und könnte als Erkennungsmerkmal apoptotischer Neutrophiler durch Makrophagen dienen (Beinert et al., 2000). Es ist daher keinesfalls auszuschließen, dass TIMP-1-*Signaling* über CD63 neben den beschriebenen Effekten auf Neutrophilen-Reifung und Freisetzung sich auch auf spätere Prozesse wie der Neutrophilen-Rekrutierung ins Gewebe und deren Aktivierung auswirkt.

4 Vergleich der TIMP-1-induzierten Neutrophilie in Blut und Leber

In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass hohe systemische TIMP-1-Spiegel nicht nur zu erhöhten Neutrophilenzahlen im Blut, sondern auch im Lebergewebe führen. Hepatische Neutrophilen-Infiltration ist funktionell an der Progression einer Reihe akuter und chronischer Lebererkrankungen beteiligt, darunter Sepsis (Kolaczowska et al., 2015; Molnar et al., 1997) und Alkohol- (Bautista, 1997) oder Virus-induzierter Hepatitis (Takai et al., 2005). Obwohl die Hemmung der Neutrophilen-Rekrutierung als vielversprechender therapeutischer Ansatz in diesen Krankheiten diskutiert wird (Brown und Treacher, 2009; Korkmaz et al., 2010), ist noch relativ wenig über

Mechanismen ihrer Rekrutierung, Aktivierung und Funktion in der Leber bekannt (McDonald und Kubes, 2012).

Die hier beobachtete TIMP-1-induzierte hepatische Neutrophilie war - wie die vermehrte Granulopoese und der Neutrophilen-Anstieg im Blut - unabhängig von der Protease-inhibitorischen Funktion und erforderte eine intakte C-terminale Domäne und die Gegenwart von CD63. Es wäre daher möglich, dass die erhöhte Anzahl hepatischer Neutrophiler eine Akkumulation seneszenter Neutrophiler aus dem Blut darstellt, die zur Beseitigung durch Kupfferzellen ins Lebergewebe rekrutiert wurden (Christopher und Link, 2007). Allerdings spricht der zeitliche Verlauf des Neutrophilen-Anstiegs, der in der Leber bereits kurz nach Erhöhung der TIMP-1-Spiegel zu verzeichnen war, im Blut aber erst an Tag 3, gegen diese Hypothese. Eine unspezifische Neutrophilen-Antwort auf die Akkumulation viraler Partikel und infizierter Zellen in der Leber als Ursache der Neutrophilen-Infiltration scheint ebenfalls unwahrscheinlich, da Infektion mit Kontrollvektor und TIMP-1-Varianten (N-TIMP-1, N-TIMP-1/T2G) keine hepatische Neutrophilie auslösten. Nicht auszuschließen wäre, dass die TIMP-1-induzierte Neutrophilenakkumulation in der Leber ausschlaggebend für die Regulation der Granulopoese-Rate im KM ist. Ein solcher *Feedback*-Mechanismus wurde für seneszente Leber-Neutrophile beschrieben, deren Phagozytose durch Kupfferzellen und Makrophagen die IL23-Sekretion durch diese Zellen reduzierte. Dies führt wiederum zur verminderten Sekretion von IL-17, eines wichtigen Regulators der G-CSF-Sekretion durch stromale Zellen, durch T-Zellen, NK-Zellen und DCs (Hong et al., 2012; Stark et al., 2005). Allerdings wurde in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln keinerlei Veränderung der beteiligten Zytokine gemessen. Außerdem wurde eine TIMP-1-abhängige Neutrophilie auch in immunsupprimierten Mäusen beobachtet, was gegen eine Beteiligung des adaptiven Immunsystems, insbesondere von T-Zellen, am Mechanismus der TIMP-1-induzierten Granulopoese spricht. Auch die Beobachtung, dass rTIMP-1 *in vitro* - also in Abwesenheit stromaler Zellen oder weiterer Leukozyten - in der Lage war, die Differenzierung von 32Dcl3-Zellen zu fördern, spricht für einen direkten Effekt von TIMP-1 auf hämatopoetische Vorläufer, wie im vorangehenden Abschnitt bereits ausführlicher diskutiert wurde.

Bemerkenswerterweise waren andere Organe wie Lunge oder Milz nicht von der TIMP-1-induzierten Neutrophilie betroffen. Dies könnte natürlich daran liegen, dass bei der adenoviral vermittelten TIMP-1-Überexpression in Mäusen vor allem Hepatozyten transduziert werden, und die TIMP-1-Expression somit größtenteils in der Leber stattfindet (Zhu et al., 1997). Allerdings wurde ein direkter chemotaktischer Effekt von TIMP-1 auf Neutrophile in dieser Studie ausgeschlossen, und die TIMP-1-induzierte Neutrophilen-Rekrutierung in die Leber wurde auch in Modellen beobachtet, in denen TIMP-1 von subkutan sitzenden Primärtumoren sezerniert wurde (Seubert et al., 2015).

DISKUSSION

In DBA/2- und FVB/N-Mäusen induzierten hohe systemische TIMP-1-Spiegel einen Leber-spezifischen Anstieg von SDF-1, und systemische Inhibition von CXCR4 blockierte den TIMP-1-abhängigen hepatischen Neutrophilen-Anstieg vollständig (Seubert et al., 2015). Dies führte zunächst zu der Annahme, dass Neutrophile in Mäusen mit hohen TIMP-1-Spiegeln über die SDF-1 / CXCR4-Achse in die Leber rekrutiert würden. Allerdings stellt die Beobachtung, dass TIMP-1 in Lebern von C57Bl/6-Mäusen keinen Anstieg von SDF-1 induziert (Daten von Ria Spallek, Masterarbeit), dennoch aber zu erhöhten hepatischen Neutrophilen-Zahlen führt, diesen Mechanismus in Frage. Dennoch wurde der TIMP-1-induzierte Neutrophilen-Anstieg in der Leber vollständig durch systemische Inhibition des SDF-1-Rezeptors CXCR4 blockiert (Abb. 31 A; Seubert et al., 2015,). Auch die TIMP-1-induzierte Neutrophilie im Blut wurde durch systemische CXCR4-Inhibition deutlich reduziert (Abb. 31 B), obwohl Mäuse mit hohen TIMP-1-Spiegeln keine veränderten SDF-1-Spiegel im Plasma oder KM aufwiesen. Zwar erfassen die hier angewandten Antikörper-basierten Methoden zum Nachweis von SDF-1 nur quantitative Unterschiede des Gesamtproteins, nicht aber zum Beispiel Aktivitäts-steigernde oder -verringende proteolytische Prozessierungen des SDF-1-Moleküls (Jin et al., 2008; De La Luz Sierra et al., 2004; Peng et al., 2012). Da die Effekte von TIMP-1 aber über seine *Signaling*-Funktion und CD63 vermittelt wurden, lag eine durch TIMP-1 veränderte proteolytische Prozessierung von SDF-1 als Effektor zunächst nicht auf der Hand. Interessanterweise wurde CD63 bereits als Regulator der CXCR4-Oberflächenexpression durch Exozytose beschrieben (Yoshida et al., 2011, 2009). Somit war die Hypothese naheliegend, dass TIMP-1 über CD63 die Sensitivität von Neutrophilen und Neutrophilen-Vorläufern gegenüber SDF-1 durch Regulation der CXCR4-Oberflächenspiegel beeinflussen könnte. Verringertes CXCR4-*Signaling* führt zum Austritt hämatopoetischer Stammzellen aus dem Ruhezustand (Sugiyama et al., 2006; Tzeng et al., 2011), sowie zur Freisetzung von Neutrophilen und Neutrophilen-Vorläufern aus dem KM (Eash et al., 2009, 2010). Andererseits wird durch veränderte CXCR4-Oberflächenexpression auf zirkulierenden und Gewebs-Neutrophilen deren Rekrutierung und Aktivierung, sowie Beseitigung durch Phagozytose reguliert (Furze und Rankin, 2008; Yamada et al., 2011). Durch Veränderungen der CXCR4-Oberflächenspiegel durch TIMP-1 könnte also sowohl die erhöhte Neutrophilen-Produktion und Freisetzung, also auch die Rekrutierung in die Leber erklärt werden. Im Rahmen dieser Studie wurden erste Experimente in diese Richtung durchgeführt. Ein quantitativer Vergleich der CXCR4-Oberflächenexpression sowohl in Blut-, als auch KM-Neutrophilen, sowie deren Vorläufern ergab insgesamt keine Unterschiede in Mäusen mit hohen systemischen TIMP-1-Spiegeln. Allerdings müsste in weiteren Experimenten geklärt werden, ob möglicherweise Subpopulationen betroffen sind. Auch experimentell bedingte Veränderungen der CXCR4-Spiegel bei der Isolation oder weiteren Behandlung der Zellen sind nicht auszuschließen (Nagase et al., 2002). Außerdem würde ein qualitativer Vergleich hepatischer Neutrophiler weiteren Aufschluss darüber geben, ob es sich dabei

um eine Akkumulation seneszenten oder apoptotischer Zellen handelt, ob deren Beseitigung durch Phagozyten möglicherweise durch TIMP-1 verändert wird, oder ob eine aktive Rekrutierung in die Leber - möglicherweise unter Beteiligung weiterer Zytokine - stattfindet.

Die Tatsache, dass die TIMP-1-induzierte Neutrophilie neben der Leber keine weiteren für Neutrophilen-Infiltration typischen Organe wie die Lunge oder Milz betrifft, könnte auch durch die besondere Beschaffenheit des Lebergewebes begründet sein. Wie in Abschnitt I.1.1.1 ausführlicher beschrieben, variieren die Mechanismen der Neutrophilen-Rekrutierung in dieses Organ je nach Situation und unterscheiden sich von für andere Organe typischen Adhäsionskaskaden (McDonald und Kubes, 2012).

Da gerade die Leber von einer Vielzahl Entzündungs-assoziiierter Pathologien wie chronischer Hepatitis, Fibrose, Sepsis, sowie Tumorbildung und Metastasierung betroffen ist, bei denen hohe TIMP-1-Spiegel als schlechter prognostischer Marker gelten (Boeker et al., 2002; Bunatova et al., 2012; Zhu et al., 2012), wäre es interessant, den Zusammenhang zwischen durch TIMP-1 geförderter Granulopoese und Neutrophilie und der Neutrophilen-Akkumulation in diesem Organ genauer zu untersuchen. Zu bedenken ist in diesem Zusammenhang sicherlich auch, dass das wichtigste hämatopoetische Organ während der Embryonalentwicklung nicht das KM, sondern die Leber ist (Martin und Bhatia, 2005), dass Leber-Endothelzellen die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen auch im adulten Organismus steuern können (Cardier und Barberá-Guillem, 1997), sowie die inzwischen mehrfach beschriebenen *feedback*-Mechanismen zwischen Leber und KM (Hong et al., 2012; Stark et al., 2005).

Insgesamt konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass TIMP-1-*Signaling* über CD63 zur vermehrten Granulopoese im KM, sowie zur Induktion von Neutrophilie im Blut und auch in der Leber führt. Weitere Studien sind notwendig, um zu verstehen, inwieweit die erwähnten Organe dabei interagieren, und welche funktionelle Bedeutung die beschriebenen Effekte auf die Neutrophilen-Homöostase unter physiologischen und auch pathologischen Bedingungen haben. Dies könnte möglicherweise entscheidend zum Verständnis zahlreicher klinischer Befunde beitragen und erklären, warum hohe TIMP-1-Spiegel so häufig zusammen mit Entzündungsreaktionen auftreten und dabei mit schlechter Prognose für Patienten assoziiert sind.

LITERATURVERZEICHNIS

- Ai, J., Druhan, L.J., Hunter, M.G., Loveland, M.J., und Avalos, B.R. (2008). LRG-accelerated differentiation defines unique G-CSFR signaling pathways downstream of PU.1 and C/EBP ϵ that modulate neutrophil activation. *J Leukoc Biol* 83, 1277–1285.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., und Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404, 193–197.
- Basu, S., Hodgson, G., Katz, M., und Dunn, A.R. (2002). Evaluation of role of G-CSF in the production, survival, and release of neutrophils from bone marrow into circulation. *Blood* 100, 854–861.
- Bautista, A.P. (1997). Chronic alcohol intoxication induces hepatic injury through enhanced macrophage inflammatory protein-2 production and intercellular adhesion molecule-1 expression in the liver. *Hepatology* 25, 335–342.
- Beinert, T., Münzing, S., Possinger, K., und Krombach, F. (2000). Increased expression of the tetraspanins CD53 and CD63 on apoptotic human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 67, 369–373.
- Bodey, G.P., Buckley, M., Sathe, Y.S., und Freireich, E.J. (1966). Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann. Intern. Med.* 64, 328–340.
- Boeker, K.H.W., Haberkorn, C.I., Michels, D., Flemming, P., Manns, M.P., und Lichtinghagen, R. (2002). Diagnostic potential of circulating TIMP-1 and MMP-2 as markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Clin. Chim. Acta* 316, 71–81.
- Borregaard, N. (2010). Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity* 33, 657–670.
- Borregaard, N., Sørensen, O.E., und Theilgaard-Mönch, K. (2007). Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 28, 340–345.
- Botta, G.P., Reichert, M., Reginato, M.J., Heeg, S., Rustgi, A.K., and Lelkes, P.I. (2013). ERK2-regulated TIMP1 Induces Hyperproliferation of K-RasG12D-Transformed Pancreatic Ductal Cells. *Neoplasia* 15, 359–372.
- Brew, K., und Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1803, 55–71.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., und Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303, 1532–1535.
- Brown, K.A., und Treacher, D.F. (2009). Neutrophils as Potential Therapeutic Targets in Sepsis. *Discovery Medicine* 6, 118–122.
- Brown, K.A., Brain, S.D., Pearson, J.D., Edgeworth, J.D., Lewis, S.M., und Treacher, D.F. (2006). Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet* 368, 157–169.
- Bunatova, K., Pesta, M., Kulda, V., Topolcan, O., Vrzalova, J., Sutnar, A., Treska, V., Pecen, L., und Liska, V. (2012). Plasma TIMP1 level is a prognostic factor in patients with liver metastases. *Anticancer Res.* 32, 4601–4606.

- Buonaguro, L., Tagliamonte, M., Petrizzo, A., Damiano, E., Tornesello, M.L., und Buonaguro, F.M. (2015). Cellular prognostic markers in hepatocellular carcinoma. *Future Oncology* *11*, 1591–1598.
- Le Cabec, V., Cowland, J.B., Calafat, J., und Borregaard, N. (1996). Targeting of proteins to granule subsets is determined by timing and not by sorting: The specific granule protein NGAL is localized to azurophilic granules when expressed in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 6454–6457.
- Carbone, F., Nencioni, A., Mach, F., Vuilleumier, N., und Montecucco, F. (2013). Pathophysiological role of neutrophils in acute myocardial infarction. *Thromb. Haemost.* *110*, 501–514.
- Cardier, J.E., und Barberá-Guillem, E. (1997). Extramedullary hematopoiesis in the adult mouse liver is associated with specific hepatic sinusoidal endothelial cells. *Hepatology* *26*, 165–175.
- Cham, B.P., Gerrard, J.M., und Bainton, D.F. (1994). Granulophysin is located in the membrane of azurophilic granules in human neutrophils and mobilizes to the plasma membrane following cell stimulation. *Am. J. Pathol.* *144*, 1369–1380.
- Chesler, L., Golde, D.W., Bersch, N., und Johnson, M.D. (1995). Metalloproteinase inhibition and erythroid potentiation are independent activities of tissue inhibitor of metalloproteinases-1. *Blood* *86*, 4506–4515.
- Chirco, R., Liu, X.-W., Jung, K.-K., und Kim, H.-R.C. (2006). Novel functions of TIMPs in cell signaling. *Cancer Metastasis Rev.* *25*, 99–113.
- Christopher, M.J., und Link, D.C. (2007). Regulation of neutrophil homeostasis. *Curr. Opin. Hematol.* *14*, 3–8.
- Cowland, J.B., und Borregaard, N. (1999). The individual regulation of granule protein mRNA levels during neutrophil maturation explains the heterogeneity of neutrophil granules. *J. Leukoc. Biol.* *66*, 989–995.
- Daley, J.M., Thomay, A.A., Connolly, M.D., Reichner, J.S., und Albina, J.E. (2008). Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J. Leukoc. Biol.* *83*, 64–70.
- Day, R.B., und Link, D.C. (2012). Regulation of neutrophil trafficking from the bone marrow. *Cell. Mol. Life Sci.* *69*, 1415–1423.
- Docherty, A.J.P., Lyons, A., Smith, B.J., Wright, E.M., Stephens, P.E., Harris, T.J.R., Murphy, G., und Reynolds, J.J. (1985). Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* *318*, 66–69.
- Donskov, F. (2013). Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. *Semin. Cancer Biol.* *23*, 200–207.
- Doyle, E.L., Ridger, V., Ferraro, F., Turmaine, M., Saftig, P., und Cutler, D.F. (2011). CD63 is an essential cofactor to leukocyte recruitment by endothelial P-selectin. *Blood* *118*, 4265–4273.
- Eash, K.J., Means, J.M., White, D.W., und Link, D.C. (2009). CXCR4 is a key regulator of neutrophil release from the bone marrow under basal and stress granulopoiesis conditions. *Blood* *113*, 4711–4719.
- Eash, K.J., Greenbaum, A.M., Gopalan, P.K., und Link, D.C. (2010). CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow. *Journal of Clinical Investigation* *120*, 2423–2431.

LITERATURVERZEICHNIS

Egea, V., Zahler, S., Rieth, N., Neth, P., Popp, T., Kehe, K., Jochum, M., und Ries, C. (2012). Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ β -catenin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, E309–E316.

Eken, C., Gasser, O., Zenhausern, G., Oehri, I., Hess, C., und Schifferli, J.A. (2008). Polymorphonuclear neutrophil-derived ectosomes interfere with the maturation of monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* *180*, 817–824.

Faurschou, M., und Borregaard, N. (2003). Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* *5*, 1317–1327.

Fiedler, K., und Brunner, C. (2012). The role of transcription factors in the guidance of granulopoiesis. *Am J Blood Res* *2*, 57–65.

Filardy, A.A., Pires, D.R., Nunes, M.P., Takiya, C.M., Freire-de-Lima, C.G., Ribeiro-Gomes, F.L., und DosReis, G.A. (2010). Proinflammatory Clearance of Apoptotic Neutrophils Induces an IL-12^{low}IL-10^{high} Regulatory Phenotype in Macrophages. *J Immunol* *185*, 2044–2050.

Fox, S., Leitch, A.E., Duffin, R., Haslett, C., und Rossi, A.G. (2010). Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease. *J Innate Immun* *2*, 216–227.

Furze, R.C., und Rankin, S.M. (2008). Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology* *125*, 281–288.

Gauwerky, C.E., Lusic, A.J., und Golde, D.W. (1980). Erythroid-potentiating activity: characterization and target cells. *Exp. Hematol.* *8 Suppl 8*, 117–127.

Gibb, D.R., Saleem, S.J., Kang, D.-J., Subler, M.A., und Conrad, D.H. (2011). ADAM10 overexpression shifts lympho- and myelopoiesis by dysregulating site 2/site 3 cleavage products of Notch. *J. Immunol.* *186*, 4244–4252.

van Gisbergen, K.P.J.M., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T.B.H., und van Kooyk, Y. (2005). Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *J Exp Med* *201*, 1281–1292.

Guchhait, P., Tosi, M.F., Smith, C.W., und Chakaraborty, A. (2003). The murine myeloid cell line 32Dcl3 as a model system for studying neutrophil functions. *Journal of Immunological Methods* *283*, 195–204.

Hamze, A.B., Wei, S., Bahudhanapati, H., Kota, S., Acharya, K.R., und Brew, K. (2007). Constraining specificity in the N-domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1; gelatinase-selective inhibitors. *Protein Sci.* *16*, 1905–1913.

Hästbacka, J., Linko, R., Tervahartiala, T., Varpula, T., Hovilehto, S., Parviainen, I., Vaara, S.T., Sorsa, T., und Pettilä, V. (2014). Serum MMP-8 and TIMP-1 in critically ill patients with acute respiratory failure: TIMP-1 is associated with increased 90-day mortality. *Anesth. Analg.* *118*, 790–798.

Hernandez-Gea, V., und Friedman, S.L. (2011). Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* *6*, 425–456.

Hirahashi, J., Mekala, D., Van Ziffle, J., Xiao, L., Saffaripour, S., Wagner, D.D., Shapiro, S.D., Lowell, C., und Mayadas, T.N. (2006). Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. *Immunity* *25*, 271–283.

- Hong, C., Kidani, Y., A-Gonzalez, N., Phung, T., Ito, A., Rong, X., Ericson, K., Mikkola, H., Beaven, S.W., Miller, L.S., et al. (2012). Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 337–347.
- Iwasaki, H., und Akashi, K. (2007). Myeloid Lineage Commitment from the Hematopoietic Stem Cell. *Immunity* *26*, 726–740.
- Jagels, M.A., und Hugli, T.E. (1992). Neutrophil chemotactic factors promote leukocytosis. A common mechanism for cellular recruitment from bone marrow. *J. Immunol.* *148*, 1119–1128.
- Jainchill, J.L., Aaronson, S.A., und Todaro, G.J. (1969). Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol.* *4*, 549–553.
- Jin, F., Zhai, Q., Qiu, L., Meng, H., Zou, D., Wang, Y., Li, Q., Yu, Z., Han, J., Li, Q., et al. (2008). Degradation of BM SDF-1 by MMP-9: the role in G-CSF-induced hematopoietic stem/progenitor cell mobilization. *Bone Marrow Transplant* *42*, 581–588.
- Jung, K.-K., Liu, X.-W., Chirco, R., Fridman, R., und Kim, H.-R.C. (2006). Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J.* *25*, 3934–3942.
- Källquist, L., Hansson, M., Persson, A.-M., Janssen, H., Calafat, J., Tapper, H., und Olsson, I. (2008). The tetraspanin CD63 is involved in granule targeting of neutrophil elastase. *Blood* *112*, 3444–3454.
- Kapsoritakis, A.N., Kapsoritaki, A.I., Davidi, I.P., Lotis, V.D., Manolakis, A.C., Mylonis, P.I., Theodoridou, A.T., Germenis, A.E., und Potamianos, S.P. (2008). Imbalance of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) – 1 and – 4 serum levels, in patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterology* *8*, 55.
- Kaufmann, S.H.E. (2008). Immunology's foundation: the 100-year anniversary of the Nobel Prize to Paul Ehrlich and Elie Metchnikoff. *Nat Immunol* *9*, 705–712.
- Khokha, R., Murthy, A., und Weiss, A. (2013). Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 649–665.
- Kim, Y., Remacle, A.G., Chernov, A.V., Liu, H., Shubayev, I., Lai, C., Dolkas, J., Shiryayev, S.A., Golubkov, V.S., Mizisin, A.P., et al. (2012). The MMP-9/TIMP-1 Axis Controls the Status of Differentiation and Function of Myelin-Forming Schwann Cells in Nerve Regeneration. *PLoS ONE* *7*, e33664.
- Kitamura, T., Qian, B.-Z., und Pollard, J.W. (2015). Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol* *15*, 73–86.
- Klein, G., Schmal, O., und Aicher, W.K. (2015). Matrix metalloproteinases in stem cell mobilization. *Matrix Biology* *44–46*, 175–183.
- Köhler, A., De Filippo, K., Hasenberg, M., van den Brandt, C., Nye, E., Hosking, M.P., Lane, T.E., Männ, L., Ransohoff, R.M., Hauser, A.E., et al. (2011). G-CSF-mediated thrombopoietin release triggers neutrophil motility and mobilization from bone marrow via induction of Cxcr2 ligands. *Blood* *117*, 4349–4357.
- Kolaczowska, E., Jenne, C.N., Surewaard, B.G.J., Thanabalasuriar, A., Lee, W.-Y., Sanz, M.-J., Mowen, K., Opdenakker, G., und Kubes, P. (2015). Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. *Nat Commun* *6*.

LITERATURVERZEICHNIS

- Kondo, M., Weissman, I.L., und Akashi, K. (1997). Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell* 91, 661–672.
- Korkmaz, B., Horwitz, M.S., Jenne, D.E., und Gauthier, F. (2010). Neutrophil Elastase, Proteinase 3, and Cathepsin G as Therapeutic Targets in Human Diseases. *Pharmacol Rev* 62, 726–759.
- Kumar, V., und Sharma, A. (2010). Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int. Immunopharmacol.* 10, 1325–1334.
- Lauhio, A., Hästbacka, J., Pettilä, V., Tervahartiala, T., Karlsson, S., Varpula, T., Varpula, M., Ruokonen, E., Sorsa, T., und Kolho, E. (2011). Serum MMP-8, -9 and TIMP-1 in sepsis: high serum levels of MMP-8 and TIMP-1 are associated with fatal outcome in a multicentre, prospective cohort study. Hypothetical impact of tetracyclines. *Pharmacol. Res.* 64, 590–594.
- Lee, A., Whyte, M.K., und Haslett, C. (1993). Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. *J. Leukoc. Biol.* 54, 283–288.
- Lee, C., Raz, R., Gimeno, R., Gertner, R., Wistinghausen, B., Takeshita, K., DePinho, R.A., und Levy, D.E. (2002). STAT3 is a negative regulator of granulopoiesis but is not required for G-CSF-dependent differentiation. *Immunity* 17, 63–72.
- Lee, S.-J., Yoo, H.J., Bae, Y.S., Kim, H.-J., und Lee, S.-T. (2003). TIMP-1 inhibits apoptosis in breast carcinoma cells via a pathway involving pertussis toxin-sensitive G protein and c-Src. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1196–1201.
- Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., und Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7, 678–689.
- Lieschke, G.J., Grail, D., Hodgson, G., Metcalf, D., Stanley, E., Cheers, C., Fowler, K.J., Basu, S., Zhan, Y.F., und Dunn, A.R. (1994). Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. *Blood* 84, 1737–1746.
- Lijnen, H.R. (2002). Extracellular proteolysis in the development and progression of atherosclerosis. *Biochem. Soc. Trans.* 30, 163–167.
- Lin, S.-J., Wu, S.-W., Chou, Y.-C., Lin, J.-H., Huang, Y.-C., Chen, M.-R., Ma, N., und Tsai, C.-H. (2015). Novel expression and regulation of TIMP-1 in Epstein Barr virus-infected cells and its impact on cell survival. *Virology* 481, 24–33.
- Livak, K.J., und Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402–408.
- Luo, H.R., und Loison, F. (2008). Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. *Am. J. Hematol.* 83, 288–295.
- Lutz, C.M., Linder, C.C., und Davisson, M.T. (2012). Chapter 1.3 - Strains, Stocks and Mutant Mice. In *The Laboratory Mouse (Second Edition)*, H.J. Hedrich, ed. (Boston: Academic Press), pp. 37–56.
- De La Luz Sierra, M., Yang, F., Narazaki, M., Salvucci, O., Davis, D., Yarchoan, R., Zhang, H.H., Fales, H., und Tosato, G. (2004). Differential processing of stromal-derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood* 103, 2452–2459.

- Maffia, P.C., Zittermann, S.E., Scimone, M.L., Tateosian, N., Amiano, N., Guerrieri, D., Lutzky, V., Rosso, D., Romeo, H.E., Garcia, V.E., et al. (2007). Neutrophil Elastase Converts Human Immature Dendritic Cells into Transforming Growth Factor- β 1-Secreting Cells and Reduces Allostimulatory Ability. *Am J Pathol* *171*, 928–937.
- Mantovani, A., Cassatella, M.A., Costantini, C., und Jaillon, S. (2011). Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* *11*, 519–531.
- Martin, M.A., und Bhatia, M. (2005). Analysis of the human fetal liver hematopoietic microenvironment. *Stem Cells Dev.* *14*, 493–504.
- Mason, S.D., und Joyce, J.A. (2011). Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol.* *21*, 228–237.
- Mayadas, T.N., Cullere, X., und Lowell, C.A. (2014). The Multifaceted Functions of Neutrophils. *Annu Rev Pathol* *9*, 181–218.
- McCracken, J.M., und Allen, L.-A.H. (2014). Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease. *J Cell Death* *7*, 15–23.
- McDonald, B., und Kubes, P. (2012). Neutrophils and intravascular immunity in the liver during infection and sterile inflammation. *Toxicol Pathol* *40*, 157–165.
- McDonald, B., McAvoy, E.F., Lam, F., Gill, V., de la Motte, C., Savani, R.C., und Kubes, P. (2008). Interaction of CD44 and hyaluronan is the dominant mechanism for neutrophil sequestration in inflamed liver sinusoids. *J. Exp. Med.* *205*, 915–927.
- McDonald, B., Pittman, K., Menezes, G.B., Hirota, S.A., Slaba, I., Waterhouse, C.C.M., Beck, P.L., Muruve, D.A., und Kubes, P. (2010). Intravascular Danger Signals Guide Neutrophils to Sites of Sterile Inflammation. *Science* *330*, 362–366.
- McLemore, M.L., Grewal, S., Liu, F., Archambault, A., Poursine-Laurent, J., Haug, J., und Link, D.C. (2001). STAT-3 Activation Is Required for Normal G-CSF-Dependent Proliferation and Granulocytic Differentiation. *Immunity* *14*, 193–204.
- Megiovanni, A.M., Sanchez, F., Robledo-Sarmiento, M., Morel, C., Gluckman, J.C., und Boudaly, S. (2006). Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J Leukoc Biol* *79*, 977–988.
- Mócsai, A. (2013). Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med* *210*, 1283–1299.
- Molnar, R.G., Wang, P., Ayala, A., Ganey, P.E., Roth, R.A., und Chaudry, I.H. (1997). The role of neutrophils in producing hepatocellular dysfunction during the hyperdynamic stage of sepsis in rats. *J. Surg. Res.* *73*, 117–122.
- Moore, C.S., und Crocker, S.J. (2012). An alternate perspective on the roles of TIMPs and MMPs in pathology. *Am. J. Pathol.* *180*, 12–16.
- Murphy, G. (2011). Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biology* *12*, 233.
- Murphy, E., Roux-Lombard, P., Rooney, T., Fitzgerald, O., Dayer, J.-M., und Bresnihan, B. (2009). Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and periarticular bone loss in early rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* *28*, 285–291.

LITERATURVERZEICHNIS

- Murphy, G., Houbrechts, A., Cockett, M.I., Williamson, R.A., O'Shea, M., und Docherty, A.J.P. (1991). The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30, 8097–8102.
- Nagase, H., Miyamasu, M., Yamaguchi, M., Imanishi, M., Tsuno, N.H., Matsushima, K., Yamamoto, K., Morita, Y., und Hirai, K. (2002). Cytokine-mediated regulation of CXCR4 expression in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 71, 711–717.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173–182.
- Németh, T., und Mócsai, A. (2012). The role of neutrophils in autoimmune diseases. *Immunology Letters* 143, 9–19.
- Nimmo, R.A., May, G.E., und Enver, T. (2015). Primed and ready: understanding lineage commitment through single cell analysis. *Trends in Cell Biology* 25, 459–467.
- Numata, A., Shimoda, K., Kamezaki, K., Haro, T., Kakumitsu, H., Shide, K., Kato, K., Miyamoto, T., Yamashita, Y., Oshima, Y., et al. (2005). Signal transducers and activators of transcription 3 augments the transcriptional activity of CCAAT/enhancer-binding protein alpha in granulocyte colony-stimulating factor signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 12621–12629.
- Opendakker, G., Fibbe, W.E., und Van Damme, J. (1998). The molecular basis of leukocytosis. *Immunology Today* 19, 182–189.
- Panopoulos, A.D., Zhang, L., Snow, J.W., Jones, D.M., Smith, A.M., Kasmi, K.C.E., Liu, F., Goldsmith, M.A., Link, D.C., Murray, P.J., et al. (2006). STAT3 governs distinct pathways in emergency granulopoiesis and mature neutrophils. *Blood* 108, 3682–3690.
- Peng, H., Wu, Y., Duan, Z., Ciborowski, P., und Zheng, J.C. (2012). Proteolytic processing of SDF-1 α by matrix metalloproteinase-2 impairs CXCR4 signaling and reduces neural progenitor cell migration. *Protein Cell* 3, 875–882.
- Poeter, M., Brandherm, I., Rossaint, J., Rosso, G., Shahin, V., Skryabin, B.V., Zarbock, A., Gerke, V., und Rescher, U. (2014). Annexin A8 controls leukocyte recruitment to activated endothelial cells via cell surface delivery of CD63. *Nat Commun* 5, 3738.
- Pols, M.S., und Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental Cell Research* 315, 1584–1592.
- Porse, B.T., Pedersen, T.Å., Xu, X., Lindberg, B., Wewer, U.M., Friis-Hansen, L., und Nerlov, C. (2001). E2F Repression by C/EBP α Is Required for Adipogenesis and Granulopoiesis In Vivo. *Cell* 107, 247–258.
- Pruijt, J.F.M., Fibbe, W.E., Laterveer, L., Pieters, R.A., Lindley, I.J.D., Paemen, L., Masure, S., Willemze, R., und Opendakker, G. (1999). Prevention of interleukin-8-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells in rhesus monkeys by inhibitory antibodies against the Metalloproteinase gelatinase B (MMP-9). *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10863–10868.
- Pruijt, J.F.M., Verzaal, P., Os, R. van, Kruijff, E.-J.F.M. de, Schie, M.L.J. van, Mantovani, A., Vecchi, A., Lindley, I.J.D., Willemze, R., Starckx, S., et al. (2002). Neutrophils are indispensable for hematopoietic stem cell mobilization induced by interleukin-8 in mice. *PNAS* 99, 6228–6233.

- Puga, I., Cols, M., Barra, C.M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., Comerma, L., Chorny, A., Shan, M., Xu, W., et al. (2012). B cell-helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nat Immunol* *13*, 170–180.
- Rapti, M., Atkinson, S.J., Lee, M.-H., Trim, A., Moss, M., und Murphy, G. (2008). The isolated N-terminal domains of TIMP-1 and TIMP-3 are insufficient for ADAM10 inhibition. *Biochem. J.* *411*, 433–439.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W.A., Toth, E.M., Arnstein, P., und Gardner, M.B. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* *33*, 1027–1033.
- Reeves, E.P., Lu, H., Jacobs, H.L., Messina, C.G.M., Bolsover, S., Gabella, G., Potma, E.O., Warley, A., Roes, J., und Segal, A.W. (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* *416*, 291–297.
- Ries, C. (2014). Cytokine functions of TIMP-1. *Cell. Mol. Life Sci.* *71*, 659–672.
- Rossi, L., Ergen, A.V., und Goodell, M.A. (2011). TIMP-1 deficiency subverts cell-cycle dynamics in murine long-term HSCs. *Blood* *117*, 6479–6488.
- Rossi, L., Forte, D., Migliardi, G., Salvestrini, V., Buzzi, M., Ricciardi, M.R., Licchetta, R., Tafuri, A., Bicciato, S., Cavo, M., et al. (2015). The Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Increases the Clonogenic Efficiency of Human Hematopoietic Progenitor Cells Through CD63/PI3K/AKT Signaling. *Exp. Hematol.*
- Satake, S., Hirai, H., Hayashi, Y., Shime, N., Tamura, A., Yao, H., Yoshioka, S., Miura, Y., Inaba, T., Fujita, N., et al. (2012). C/EBP β is involved in the amplification of early granulocyte precursors during candidemia-induced “emergency” granulopoiesis. *J. Immunol.* *189*, 4546–4555.
- Schröder, J., Lüllmann-Rauch, R., Himmerkus, N., Pleines, I., Nieswandt, B., Orinska, Z., Koch-Nolte, F., Schröder, B., Bleich, M., und Saftig, P. (2009). Deficiency of the tetraspanin CD63 associated with kidney pathology but normal lysosomal function. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 1083–1094.
- Schrötzlmair, F., Kopitz, C., Halbgewachs, B., Lu, F., Algül, H., Brünner, N., Gänsbacher, B., und Krüger, A. (2010). Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by host-derived urokinase-type plasminogen activator. *J. Cell. Mol. Med.* *14*, 2760–2770.
- Schwaller, J., Schneider, P., Mhaweck-Fauceglia, P., McKee, T., Myit, S., Matthes, T., Tschopp, J., Donze, O., Gal, F.-A.L., und Huard, B. (2007). Neutrophil-derived APRIL concentrated in tumor lesions by proteoglycans correlates with human B-cell lymphoma aggressiveness. *Blood* *109*, 331–338.
- Segal, A.W. (2005). How Neutrophils Kill Microbes. *Annu Rev Immunol* *23*, 197–223.
- Semerad, C.L., Liu, F., Gregory, A.D., Stumpf, K., und Link, D.C. (2002). G-CSF is an essential regulator of neutrophil trafficking from the bone marrow to the blood. *Immunity* *17*, 413–423.
- Sengeløv, H., Kjeldsen, L., und Borregaard, N. (1993). Control of exocytosis in early neutrophil activation. *J. Immunol.* *150*, 1535–1543.
- Seubert, B., Grünwald, B., Kobuch, J., Cui, H., Schelter, F., Schaten, S., Siveke, J.T., Lim, N.H., Nagase, H., Simonavicius, N., et al. (2015). Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice. *Hepatology* *61*, 238–248.

LITERATURVERZEICHNIS

Sionov, R.V., Fridlender, Z.G., und Granot, Z. (2014). The Multifaceted Roles Neutrophils Play in the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron.*

Skubitz, K.M., Campbell, K.D., Iida, J., und Skubitz, A.P. (1996). CD63 associates with tyrosine kinase activity and CD11/CD18, and transmits an activation signal in neutrophils. *J. Immunol.* *157*, 3617–3626.

Spicer, J.D., McDonald, B., Cools-Lartigue, J.J., Chow, S.C., Giannias, B., Kubes, P., und Ferri, L.E. (2012). Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells. *Cancer Res.* *72*, 3919–3927.

Stark, M.A., Huo, Y., Burcin, T.L., Morris, M.A., Olson, T.S., und Ley, K. (2005). Phagocytosis of apoptotic neutrophils regulates granulopoiesis via IL-23 and IL-17. *Immunity* *22*, 285–294.

Steinl, C., Essl, M., Schreiber, T.D., Geiger, K., Prokop, L., Stevanović, S., Pötz, O., Abele, H., Wessels, J.T., Aicher, W.K., et al. (2013). Release of matrix metalloproteinase-8 during physiological trafficking and induced mobilization of human hematopoietic stem cells. *Stem Cells Dev.* *22*, 1307–1318.

Stetler-Stevenson, W.G. (2008). Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* *1*, re6.

Strydom, N., und Rankin, S.M. (2013). Regulation of circulating neutrophil numbers under homeostasis and in disease. *J Innate Immun* *5*, 304–314.

Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M., und Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. *Immunity* *25*, 977–988.

Summers, C., Rankin, S.M., Condliffe, A.M., Singh, N., Peters, A.M., und Chilvers, E.R. (2010). Neutrophil kinetics in health and disease. *Trends Immunol* *31*, 318–324.

Takai, S., Kimura, K., Nagaki, M., Satake, S., Kakimi, K., und Moriwaki, H. (2005). Blockade of neutrophil elastase attenuates severe liver injury in hepatitis B transgenic mice. *J. Virol.* *79*, 15142–15150.

Theilgaard-Mönch, K., Jacobsen, L.C., Borup, R., Rasmussen, T., Bjerregaard, M.D., Nielsen, F.C., Cowland, J.B., und Borregaard, N. (2005). The transcriptional program of terminal granulocytic differentiation. *Blood* *105*, 1785–1796.

Tzeng, Y.-S., Li, H., Kang, Y.-L., Chen, W.-C., Cheng, W.-C., und Lai, D.-M. (2011). Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood* *117*, 429–439.

Uchijima, M., Sato, H., Fujii, M., und Seiki, M. (1994). Tax proteins of human T-cell leukemia virus type 1 and 2 induce expression of the gene encoding erythroid-potentiating activity (tissue inhibitor of metalloproteinases-1, TIMP-1). *J. Biol. Chem.* *269*, 14946–14950.

Ulich, T.R., del Castillo, J., und Souza, L. (1988). Kinetics and mechanisms of recombinant human granulocyte-colony stimulating factor-induced neutrophilia. *Am J Pathol* *133*, 630–638.

Valtieri, M., Tweardy, D.J., Caracciolo, D., Johnson, K., Mavilio, F., Altmann, S., Santoli, D., und Rovera, G. (1987). Cytokine-dependent granulocytic differentiation. Regulation of proliferative and differentiative responses in a murine progenitor cell line. *J Immunol* *138*, 3829–3835.

- Vento, S., und Cainelli, F. (2003). Infections in patients with cancer undergoing chemotherapy: aetiology, prevention, and treatment. *Lancet Oncol.* 4, 595–604.
- von Vietinghoff, S., und Ley, K. (2008). Homeostatic regulation of blood neutrophil counts. *J. Immunol.* 181, 5183–5188.
- Vischer, U.M., und Wagner, D.D. (1993). CD63 is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* 82, 1184–1191.
- Wang, M., Zhang, Q., Zhao, X., Dong, G., und Li, C. (2014). Diagnostic and prognostic value of neutrophil gelatinase-associated lipocalin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 for sepsis in the Emergency Department: an observational study. *Crit Care* 18.
- Ward, A.C., Touw, I., und Yoshimura, A. (2000). The Jak-Stat pathway in normal and perturbed hematopoiesis. *Blood* 95, 19–29.
- Warner, R. (2013). Analysis Of The Structure And Function Of A Timp-1/cd63 Complex And Its Relationship To An Mt1-Mmp/cd63 Complex. Wayne State University Dissertations.
- Weber, S., Wetzels, S., Prox, J., Lehmann, T., Schneppenheim, J., Donners, M., und Saftig, P. (2013). Regulation of adult hematopoiesis by the α disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 442, 234–241.
- Wilk, C.M., Schildberg, F.A., Lauterbach, M.A., Cadeddu, R.-P., Fröbel, J., Westphal, V., Tolba, R.H., Hell, S.W., Czibere, A., Bruns, I., et al. (2013). The tissue inhibitor of metalloproteinases-1 improves migration and adhesion of hematopoietic stem and progenitor cells. *Exp. Hematol.* 41, 823–831.e2.
- Woolley, D.E., Roberts, D.R., und Evanson, J.M. (1975). Inhibition of human collagenase activity by a small molecular weight serum protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 747–754.
- Wright, H.L., Moots, R.J., und Edwards, S.W. (2014). The multifactorial role of neutrophils in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 10, 593–601.
- Würtz, S.O., Schrohl, A.-S., Mouridsen, H., und Brünner, N. (2008). TIMP-1 as a tumor marker in breast cancer--an update. *Acta Oncol* 47, 580–590.
- Yamada, M., Kubo, H., Kobayashi, S., Ishizawa, K., He, M., Suzuki, T., Fujino, N., Kunishima, H., Hatta, M., Nishimaki, K., et al. (2011). The increase in surface CXCR4 expression on lung extravascular neutrophils and its effects on neutrophils during endotoxin-induced lung injury. *Cell Mol Immunol* 8, 305–314.
- Yoda, M., Kimura, T., Tohmonda, T., Uchikawa, S., Koba, T., Takito, J., Morioka, H., Matsumoto, M., Link, D.C., Chiba, K., et al. (2011). Dual functions of cell-autonomous and non-cell-autonomous ADAM10 activity in granulopoiesis. *Blood* 118, 6939–6942.
- Yoshida, N., Kitayama, D., Arima, M., Sakamoto, A., Inamine, A., Watanabe-Takano, H., Hatano, M., Koike, T., und Tokuhisa, T. (2011). CXCR4 expression on activated B cells is downregulated by CD63 and IL-21. *J. Immunol.* 186, 2800–2808.
- Yoshida, T., Ebina, H., und Koyanagi, Y. (2009). N-linked glycan-dependent interaction of CD63 with CXCR4 at the Golgi apparatus induces downregulation of CXCR4. *Microbiol. Immunol.* 53, 629–635.
- Zhang, H., Nguyen-Jackson, H., Panopoulos, A.D., Li, H.S., Murray, P.J., und Watowich, S.S. (2010). STAT3 controls myeloid progenitor growth during emergency granulopoiesis. *Blood* 116, 2462–2471.

LITERATURVERZEICHNIS

Zhou, J., Marten, N.W., Bergmann, C.C., Macklin, W.B., Hinton, D.R., und Stohlman, S.A. (2005). Expression of Matrix Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitor during Viral Encephalitis. *J. Virol.* 79, 4764–4773.

Zhu, C.L., Li, W.T., Li, Y., und Gao, R.T. (2012). Serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are correlated with liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B. *J Dig Dis* 13, 558–563.

Zhu, G., Nicolson, A.G., Zheng, X.X., Strom, T.B., und Sukhatme, V.P. (1997). Adenovirus-mediated beta-galactosidase gene delivery to the liver leads to protein deposition in kidney glomeruli. *Kidney Int.* 52, 992–999.

DANKSAGUNG

Die Fertigstellung dieser Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die Unterstützung zahlreicher Personen, denen ich an dieser Stelle ausdrücklich danken möchte.

Mein Dank gilt Prof. Achim Krüger für die Bereitstellung des interessanten Themas, sowie aller Rahmenbedingungen in seiner Arbeitsgruppe, die es mir ermöglichten, selbstständiges und eigenverantwortliches wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. Als besonders wertvolle Erfahrung empfand ich neben der Betreuung zahlreicher Studenten und dem Verfassen eigener wissenschaftlicher Publikationen die Möglichkeit, selbst einen Drittmittel- und einen Tierversuchsantrag zu schreiben, sowie die wiederholte Teilnahme und Datenpräsentation auf der Winterschool in Tiers.

Prof. Percy Knolle möchte ich danken für die Möglichkeiten und Rahmenbedingungen an seinem Institut, seine stete Hilfsbereitschaft und sein Engagement bei der Organisation verschiedener Seminare und *Retreats*, die ich durch die Möglichkeit zum wissenschaftlichen Austausch auch mit anderen Instituten, sowie aufgrund der freundlichen, positiven Atmosphäre immer als große Motivation empfunden habe.

Meinen Kollegen Haissi Cui, Barbara Grünwald, Dr. Susanne Schaten, Katja Honert, Dr. Sonja Berchtold und Klaus Mantwill danke ich ganz herzlich für die gute Zusammenarbeit, ihre Ratschläge in vielen wertvollen Diskussionen und bei methodisch-technischen Fragen, insbesondere aber für die große Hilfsbereitschaft, die nette Stimmung und die vielen lustigen Momente. Haissi Cui möchte ich außerdem nochmals für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts bedanken, die mir mit technischen Ratschlägen zur Seite standen, oder dafür gesorgt haben, dass Laborabläufe und Regulatorien gut funktionierten. Insbesondere bei Burgl Hammerschmidt möchte ich mich für ihre Hilfe und Geduld beim Einarbeiten in die Durchflusszytometrie und bei der Etablierung vieler in dieser Arbeit angewandter Protokolle bedanken. Eine große experimentelle Unterstützung waren auch meine Studenten Ria Spallek, Moni Frühschütz, Dennis Bleck, David Wylensik, Ramona Gerhards, Elisabeth Wurzer und Marc Wehmer, denen ich für ihren Einsatz, ihre Motivation und Hilfe danke.

Meinem Mentor Dr. Matthias Schiemann danke ich für seine stete Hilfsbereitschaft, seinen Input zum Projekt und insbesondere beim Korrekturlesen dieser Arbeit.

Einen besonders wichtigen Beitrag zu dieser Arbeit haben meine Freunde und meine Familie geleistet. Daher möchte ich mich insbesondere bei Jan-Daniel Cleven, Katy Schmohl und Marcel Janczik für die riesige moralische Unterstützung bedanken. Durch eure Geduld (nicht zuletzt mit dem Dschungel an Fachwörtern beim Korrekturlesen dieser Arbeit), die vielen vielen witzigen und tollen gemeinsamen Erlebnisse und Erinnerungen, aber auch die ehrliche Kritik und vor allem das

DANKSAGUNG

gegenseitige Vertrauen habt ihr mir immer wieder geholfen, ich selbst zu bleiben und Stresssituationen nicht zu ernst zu nehmen.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken für ihre grenzenlose Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Ihr habt mir nicht nur die Ausbildung und den beruflichen Werdegang bis hierher ermöglicht und mich bei allen wichtigen Entscheidungen unterstützt und beraten. Vor allem habt ihr mir durch eure Liebe, eure konstruktive Kritik und euer Vertrauen immer wieder geholfen, auch in schwierigen Situationen meine Prioritäten nicht aus den Augen zu verlieren, und mir die Kraft gegeben, mir selbst gegenüber ehrlich zu bleiben, an mich zu glauben und zu meiner Überzeugung zu stehen.

PUBLIKATIONEN

In Rahmen der Dissertation entstandene Publikationen:

Kobuch, J., Cui, H., Grünwald, B., Saftig, P., Knolle, P., Krüger, A. (2015) **TIMP-1 signaling via CD63 triggers granulopoiesis and neutrophilia in mice**. Haematologica 100 (8): 1005-13.

Seubert, B.*, Grünwald, B.*, Kobuch, J.*, Cui, H.*, Schelter, F., Schaten, S., Siveke, J.T., Lim, N.H., Nagase, H., Simonavicius, N., Heikenwalder, M., Reinheckel, T., Sleeman, J.P., Janssen, K.P., Knolle, P.A., Krüger, A. (2015) **TIMP-1 Creates a Pre-Metastatic Niche in the Liver through SDF-1/CXCR4-Dependent Neutrophil Recruitment in Mice**. Hepatology 61 (1): 238-48.

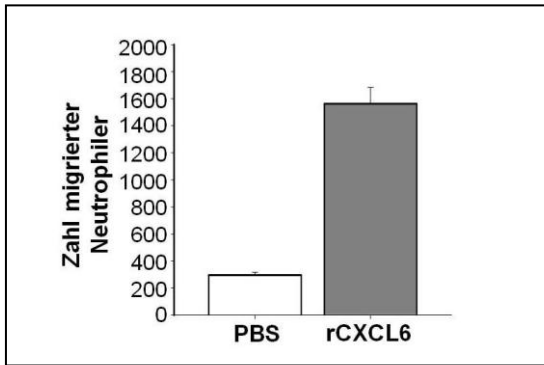
*Diese Autoren haben gleichermaßen beigetragen.

Weitere Publikationen:

Schelter, F., Kobuch, J., Moss, M.L., Becherer, J.D., Comoglio, P.M., Boccaccio, C., Krüger, A. (2010) **A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor**. J Biol Chem. 285(34):26335-40.

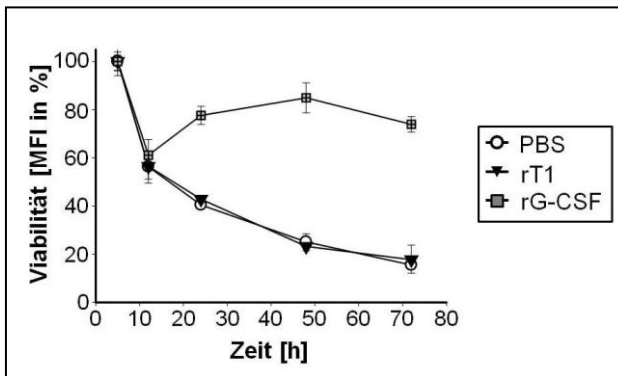
ANHANG

1 Chemotaktische Wirkung von rCXCL6 auf isolierte KM-Neutrophile.



Transwell-Migrationsassay mit isolierten KM-Neutrophilen. Reife KM-Neutrophile wurden mittels negativer MACS-Selektion isoliert. $3 \cdot 10^5$ Zellen wurden in Transwell-Inserts ausgesät. Die Inserts wurden in Medium mit 100 ng/ml rCXCL6 oder PBS gesetzt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurden migrierte Neutrophile im unteren *well* mittels Durchflusszytometrie quantifiziert.

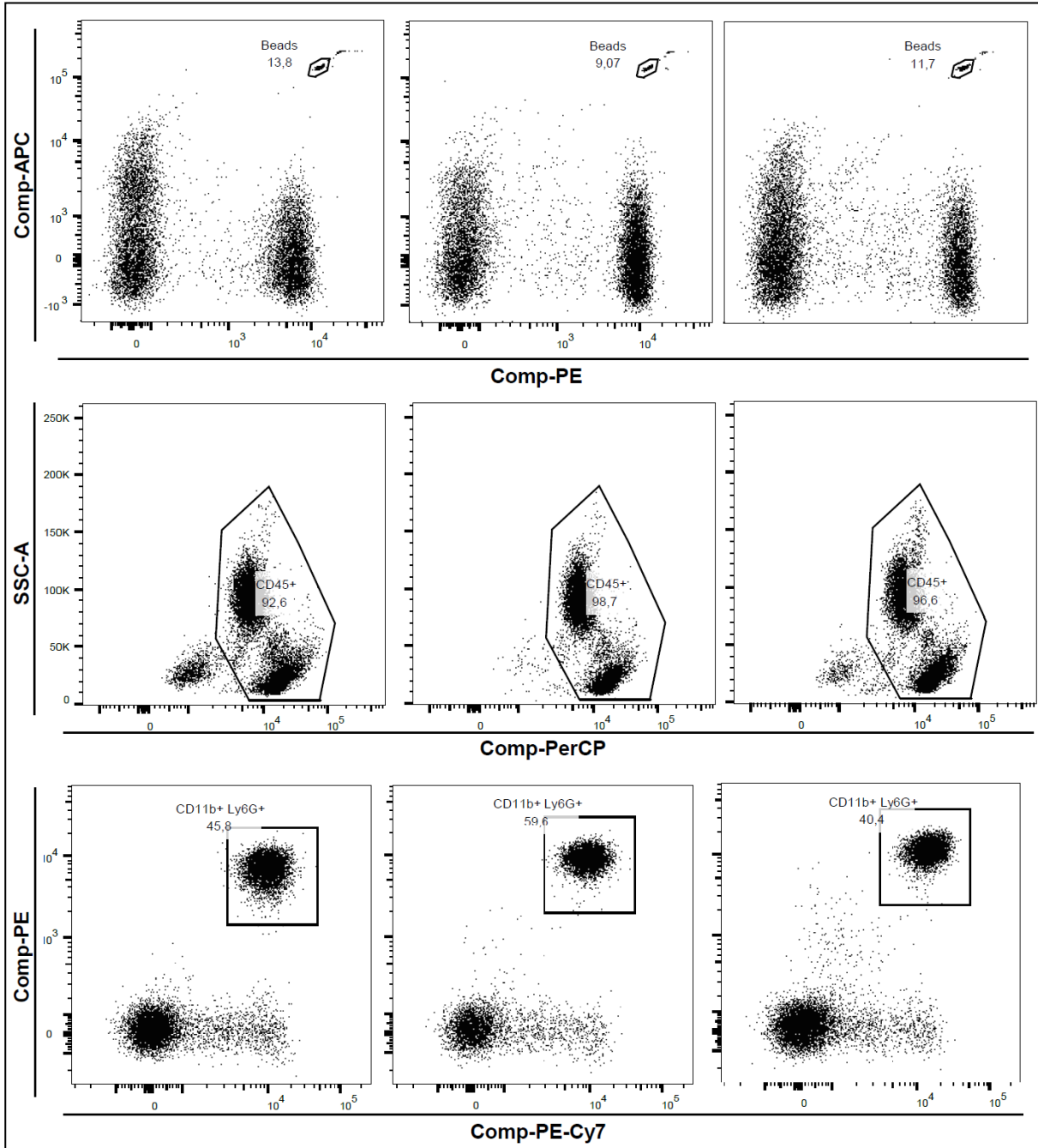
2 Überleben von 32Dcl3-Zellen in Abwesenheit von rIL-3.



G-CSF, aber nicht TIMP-1, führt zum Überleben von 32Dcl3-Zellen in Abwesenheit von IL-3. $1 \cdot 10^4$ 32Dcl3-Zellen wurden in Abwesenheit von IL-3 mit PBS, 1000 ng/ml rTIMP-1 oder 100 ng/ml rG-CSF inkubiert. Die Überlebensrate wurde zu den angegebenen Zeitpunkten anhand der metabolischen Umsetzung von AlamarBlue quantifiziert.

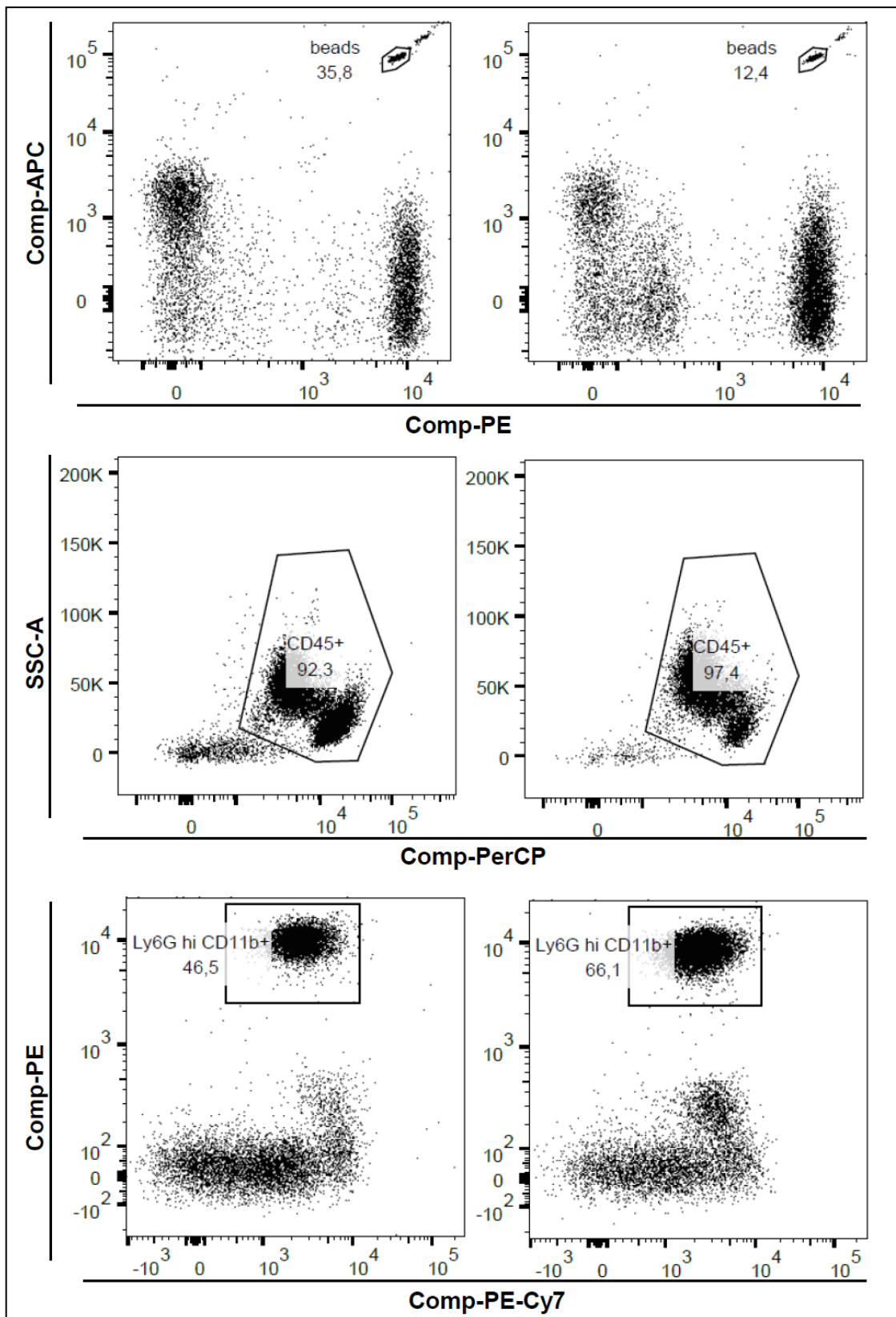
3 Repräsentative FACS-Plots von Blut-Proben

3.1 CD1^{nu/nu}-Mäuse mit HT1080-Tumoren



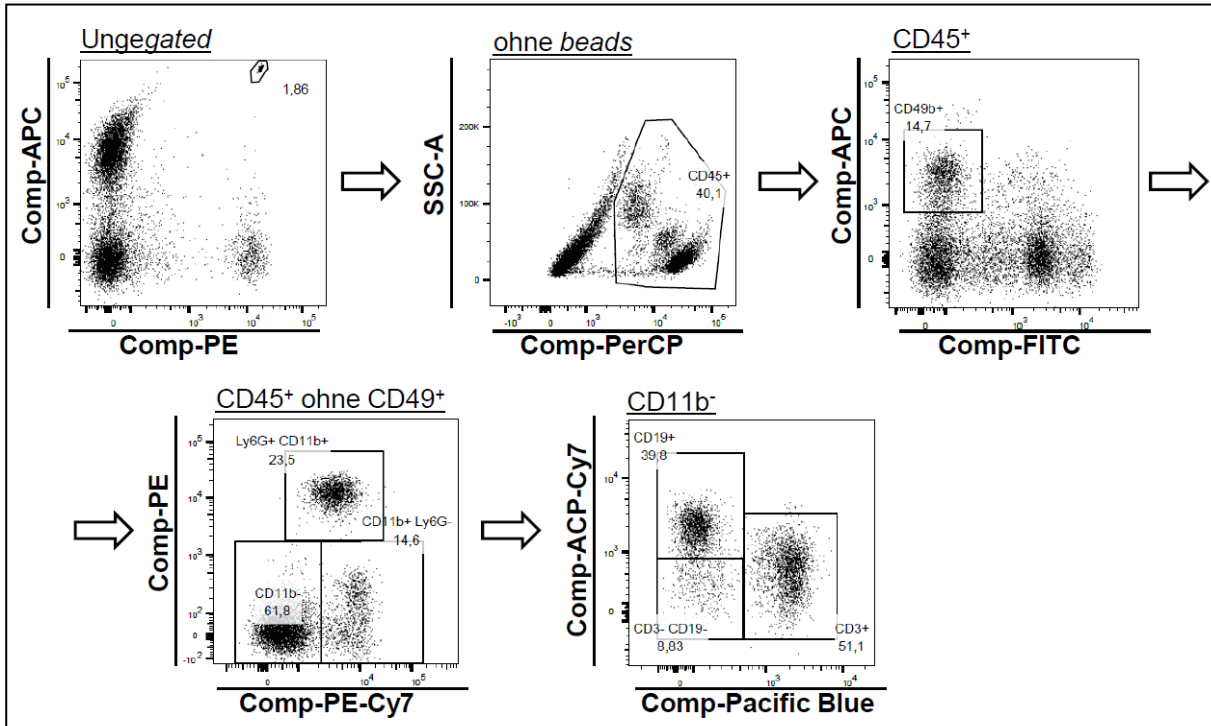
FACS-Plots von Blutproben aus CD1^{nu/nu}-Mäusen mit HT1080-Tumoren. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots für je eine Maus mit HT1080-wt (linke Spalte, 2,4 ng/ml T1-Plasmaprotein), -SF-T1 (mittlere Spalte, 91,6 ng/ml T1 Plasmaprotein) und -shT1-Tumor (rechte Spalte, 0,26 ng/ml T1-Plasmaprotein). Zunächst wurden die *beads* herausgated (oben), anschließend alle Leukozyten (CD45+, Mitte), innerhalb derer die Neutrophilen (CD11b+ Ly6G+, unten) gaged wurden. Zahlen neben den *gates* entsprechen dem relativen Anteil in %.

3.2 SCID-Mäuse mit NIH3T3-Tumoren



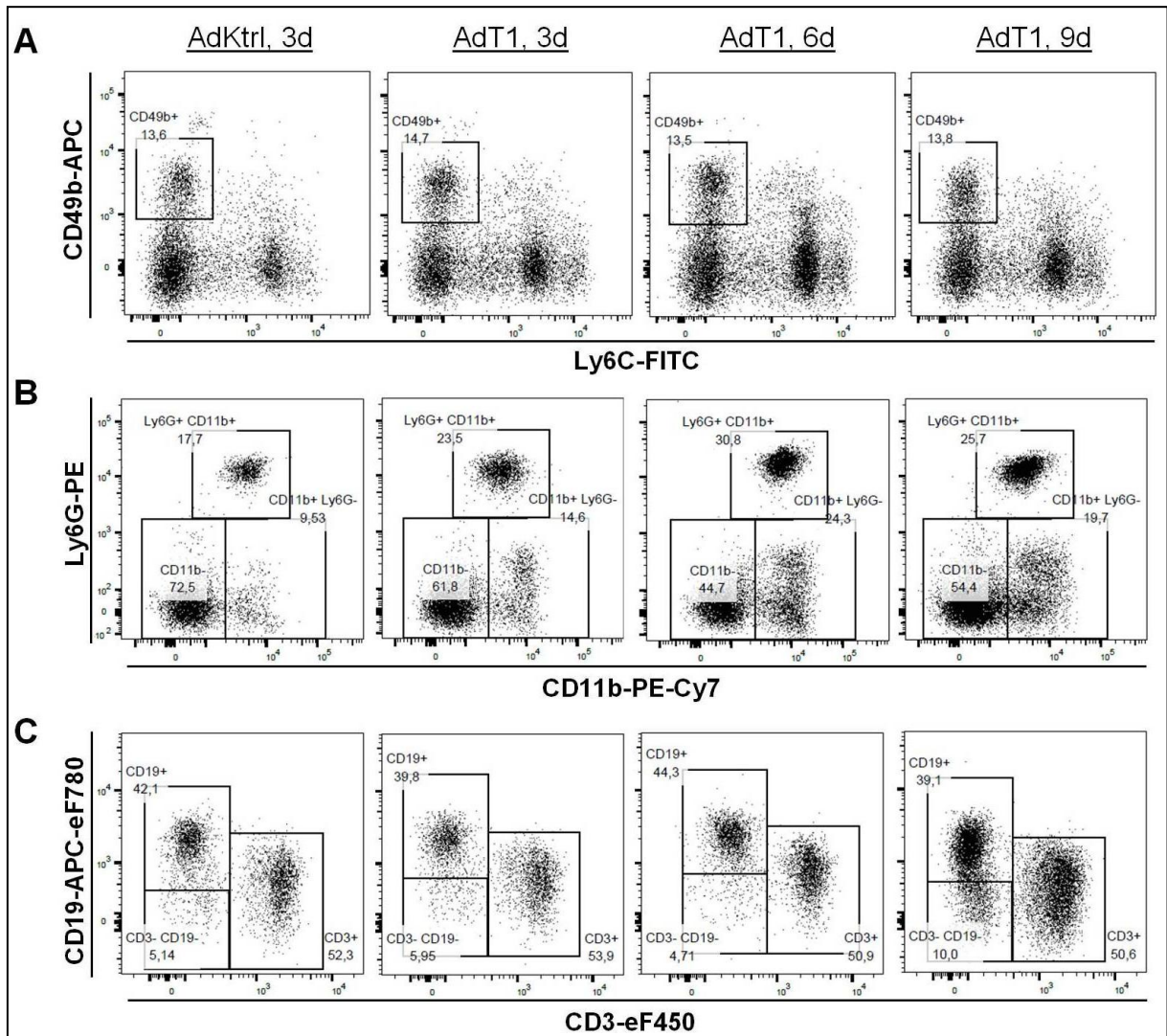
FACS-Plots von Blutproben aus SCID-Mäusen mit NIH3T3-Tumoren. Dargestellt sind repräsentative FACS-Plots für je eine Maus mit NIH-wt (linke Spalte, 3,7 ng/ml T1-Plasmaprotein) oder -SF-T1-Tumor (rechte Spalte, 808,6 ng/ml T1 Plasmaprotein). Die *gating*-Schritte (zunächst *beads*, dann Leukozyten und innerhalb derer die Neutrophilen) sind von oben nach unten dargestellt. Zahlen neben den *gates* entsprechen dem relativen Anteil in %.

3.3 Gating-Strategie für verschiedene Blut-Leukozytenpopulationen



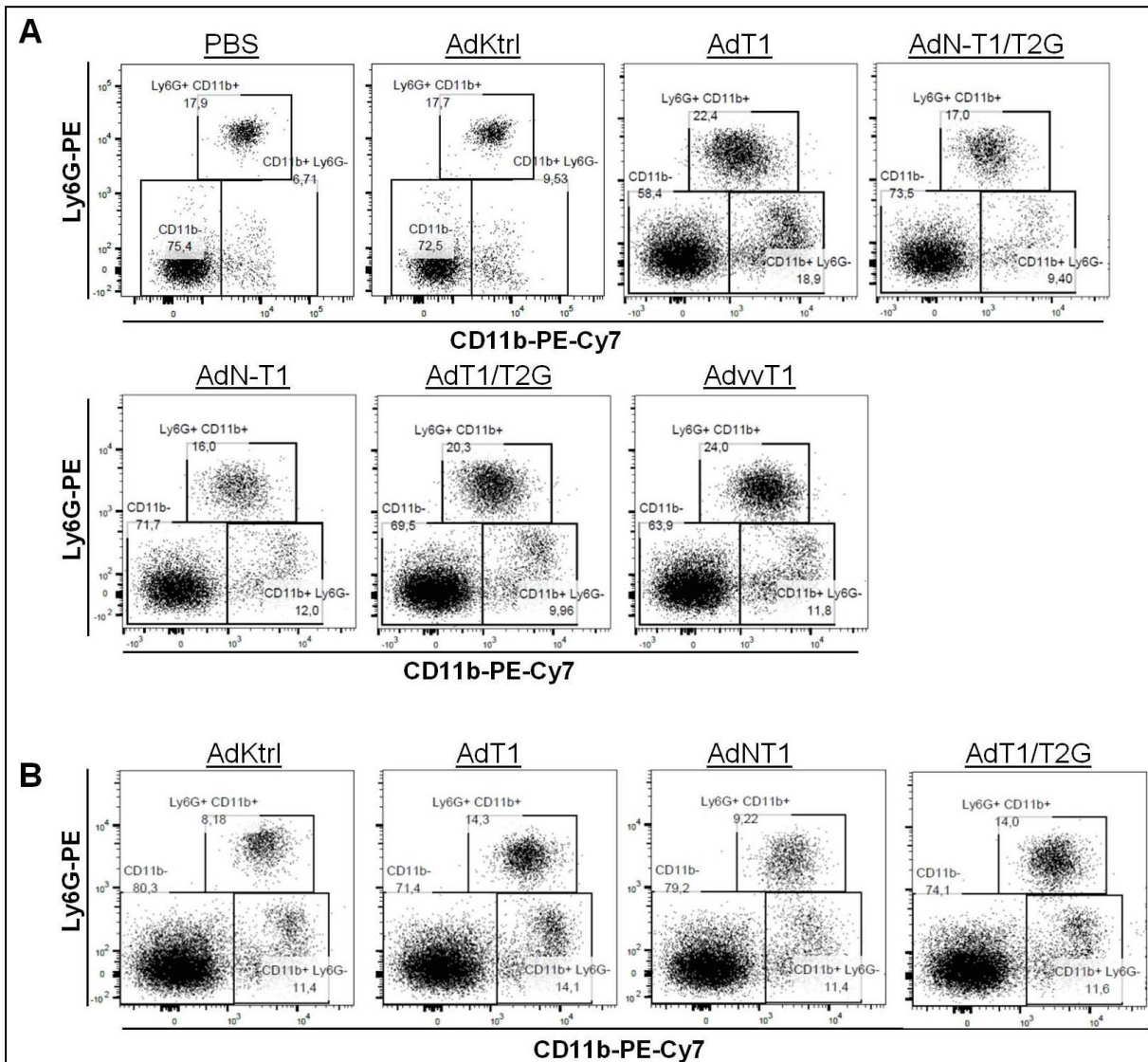
Gating-Strategie zur Unterscheidung und Quantifizierung unterschiedlicher Leukozyten-Populationen im Blut. Dargestellt ist die representative Probe einer DBA/2-Maus 3 Tage nach Transduktion mit AdT1. Zahlen neben/in den *gates* entsprechen dem relativen Anteil in %.

3.4 DBA/2-Mäuse zu verschiedenen Zeitpunkten nach AdT1-Transduktion



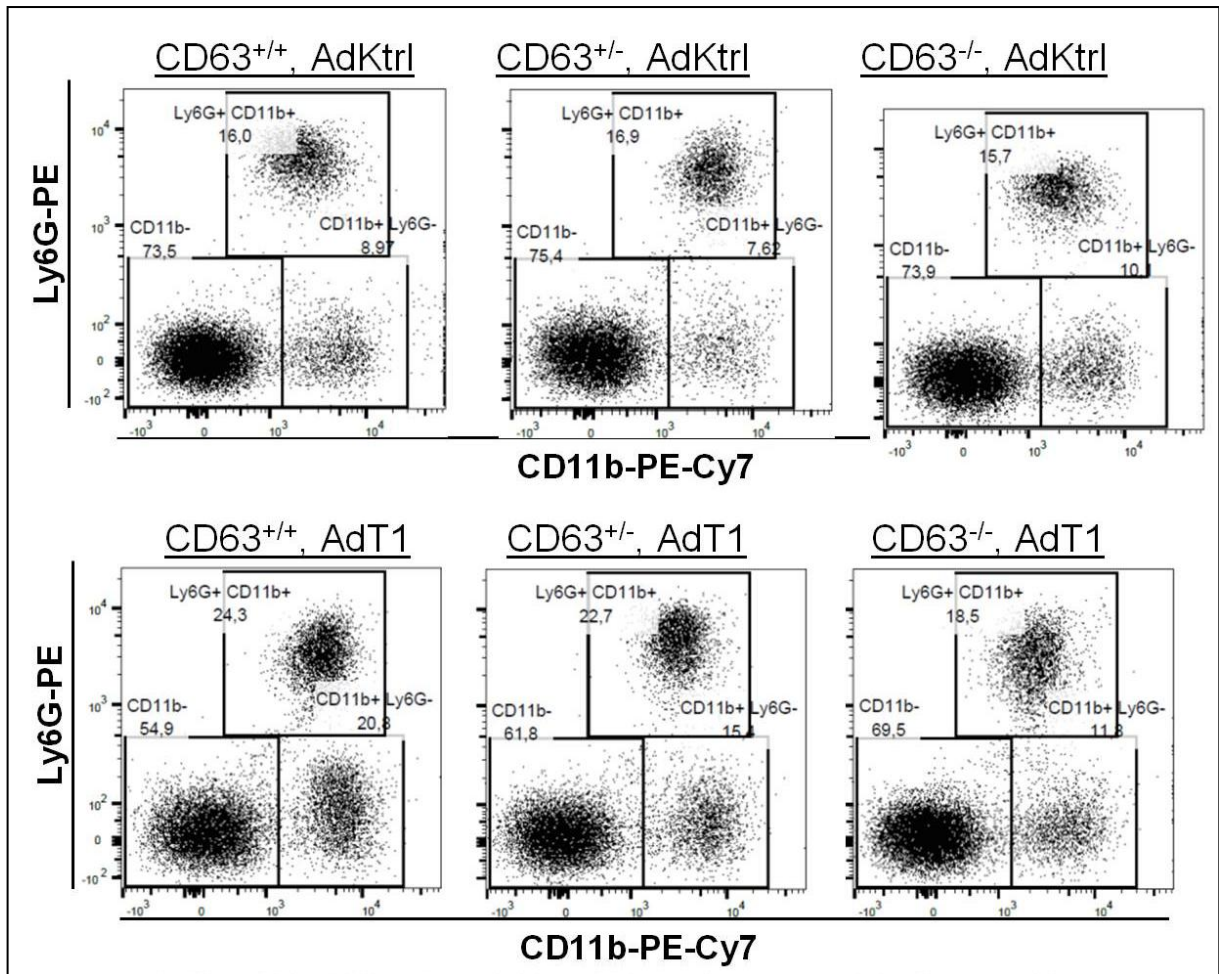
Repräsentative FACS-Plots von Blut aus DBA/2-Mäusen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach adenoviraler Transduktion. Repräsentative FACS-Plots incl. *gates* für NK-Zellen (CD49b+, A), Neutrophile und Monozyten (B) und B- und T-Zellen (C). Gezeigt sind repräsentative Blutproben einer AdKtr-transduzierten Maus 3 Tage nach Virusinjektion, sowie je einer AdT1-transduzierten Maus 3, 6 oder 9 Tage nach Virusinjektion. Zahlen neben den *gates* entsprechen dem relativen Anteil in %.

3.5 Mäuse mit adenoviral vermittelter Expression verschiedener TIMP-1-Varianten



Repräsentative Blut-Neutrophilen-Plots in verschiedenen Mausstämmen. (A) Auf CD45+ *gegate* Blutproben aus DBA/2-Mäusen 3 Tage nach Injektion von PBS oder dem jeweiligen adenoviralen Vektor. (B) Blutproben aus C57Bl/6-Mäusen 3 Tage nach Injektion der jeweiligen adenoviralen Vektoren. Zahlen neben/in den *gates* entsprechen dem relativen Anteil an Leukozyten (CD45+) in %.

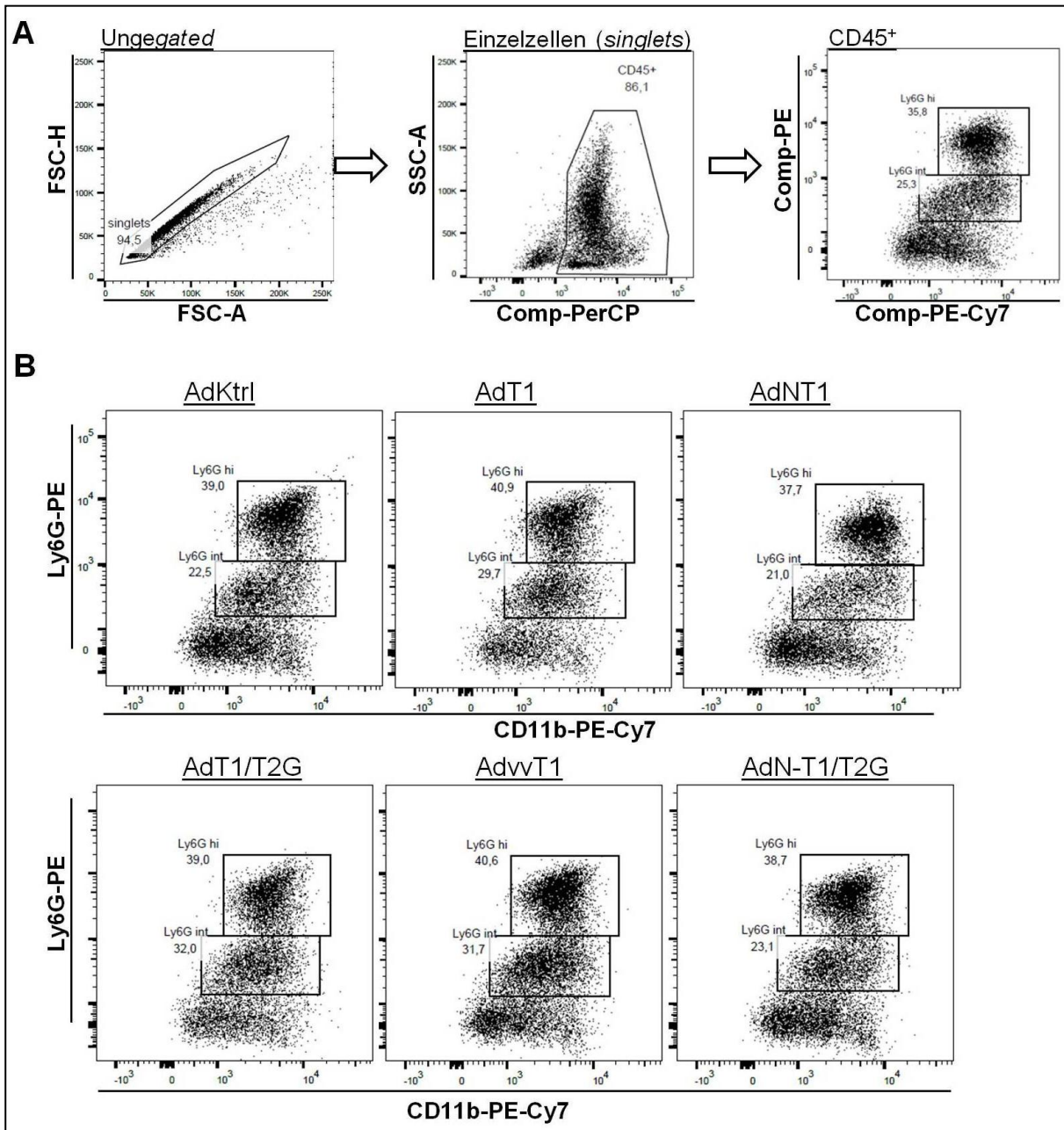
3.6 CD63-knock out-Mäuse nach AdT1-Transduktion



Repräsentative Plots von Blut-Neutrophilen in hetero- und homozygoten CD63-knock out-Mäusen. Dargestellt sind auf CD45+ *gatedete* Blut-Leukozyten je einer C56Bl/6-Wildtyp (links), sowie einer heterozygoten (Mitte) oder homozygoten CD63 knock out-Maus 3 Tage nach Injektion von AdKtrl (obere Reihe) oder AdT1 (untere Reihe). Zahlen neben/in den *gates* entsprechen dem relativen Anteil in %.

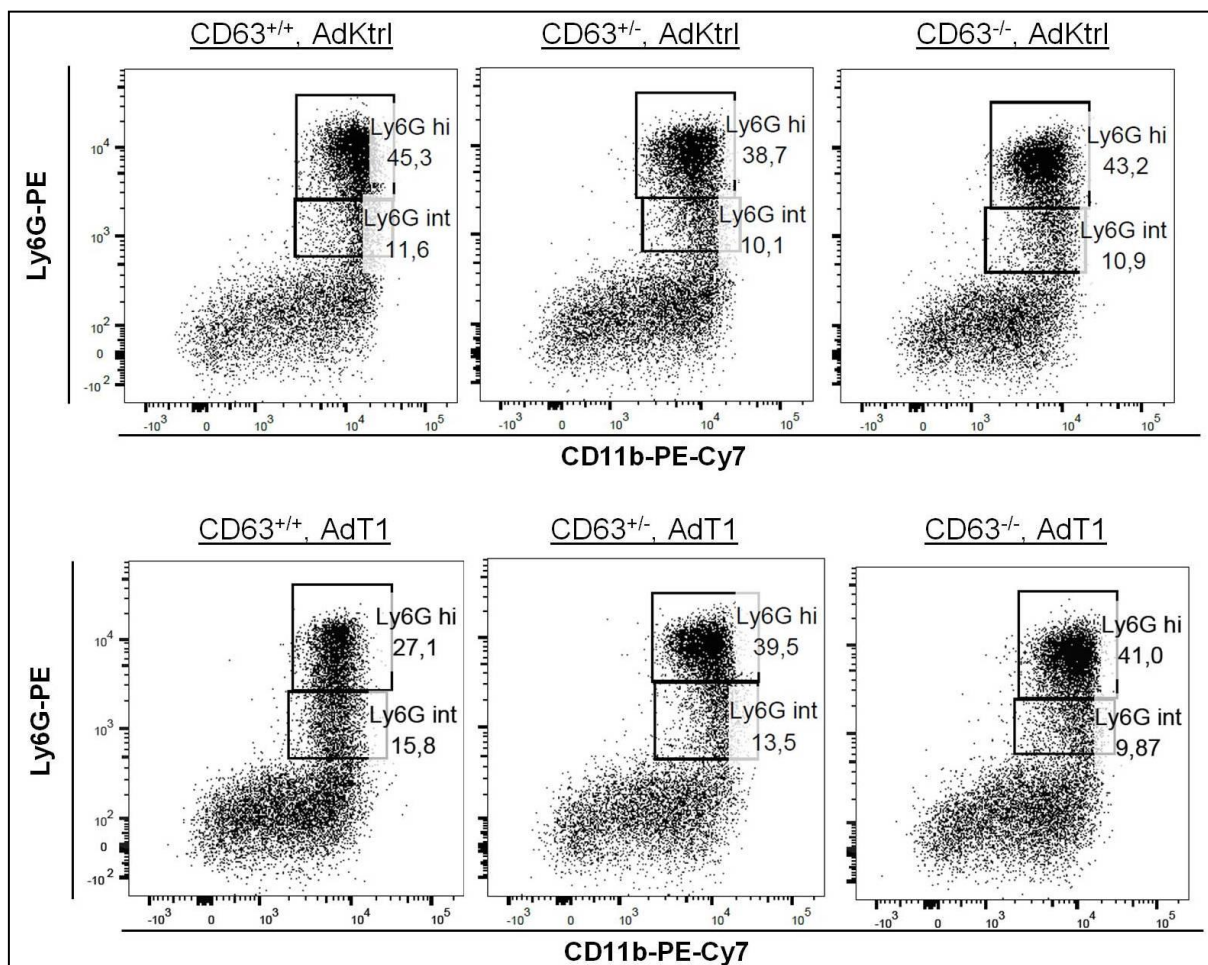
4 Repräsentative FACS-Plots zu KM-Proben

4.1 DBA/2-Mäuse nach Transduktion mit AdT1-Varianten



Gating und repräsentative FACS-Plots von KM aus DBA/2-Mäusen nach adenoviraler Transduktion. (A) *Gating*-Strategie zur relativen Quantifizierung von Neutrophilen-Vorläufern und reifer Neutrophiler. Zunächst wurden Einzelzellen (links) und KM-Leukozyten (CD45⁺, Mitte) *gated*. Innerhalb der KM-Leukozyten wurde der Anteil reifer (Ly6G^{high}) und unreifer (Ly6G^{int}) Neutrophiler bestimmt (rechts). (B) Repräsentative FACS-Plots incl. *gates* für reife und unreife Neutrophile in DBA/2-Mäusen 3 Tage nach Injektion des jeweiligen viralen Vektors. Zahlen neben den *gates* entsprechen dem relativen Anteil in %.

4.2 C57Bl/6-Mäuse nach Transduktion mit AdT1-Varianten



Repräsentative FACS-Plots von KM-Neutrophilen aus C56Bl/6-Mäusen. Wildtyp- (links), heterozygote (Mitte) und homozygote (rechts) CD63-knock out-Mäuse wurden mit AdKtrl oder AdT1 transduziert und 3 Tage später geopfert. Die *Gating*-Strategie entspricht der von DBA/2-Mäusen. Gezeigt sind die *gates* für reife (Ly6G^{hi}) und unreife (Ly6G^{int}) innerhalb der KM-Leukozyten. Zahlen neben den *gates* entsprechen dem relativen Anteil in %.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die bei der Fakultät für Medizin der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel: **Effekte von *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1* auf die Homöostase Neutrophiler Granulozyten** am Institut für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie unter der Anleitung und Betreuung durch Prof. Dr. Achim Krüger ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 6 Abs. 6 und 7 Satz 2 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuerinnen und Betreuer für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

Ich habe den angestrebten Doktorgrad **noch nicht** erworben und bin **nicht** in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung der TUM ist mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 28 (Nichtigkeit der Promotion) und § 29 (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

München, den

.....