



Fakultät für Medizin
Technische Universität München

**TIMP-1 vermittelt Signalaktivitäten in Immunzellen
über die Rezeptoren CD63 und CD74**

Benjamin Oliver Schoeps

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. *rer. nat.*)

genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Jürgen Ruland

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Achim Krüger
2. Prof. Dr. Dietmar Zehn
3. Prof. Dr. Ludger Klein

Die Dissertation wurde am 28.02.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 03.01.2023 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Inhaltsverzeichnis	II
Zusammenfassung	V
<i>Abstract</i>	VI
1. Einleitung	1
1.1. <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1</i>	1
1.1.1. TIMP-1 ist ein multifunktionales Protein mit einem vielseitigen Interaktom	1
1.1.2. <i>Invariant Chain</i> (CD74) als potentieller TIMP-1 Rezeptor.....	6
1.1.3. TIMP-1: Ein Entzündungsfaktor.....	7
1.2. Neutrophile Granulozyten: Zentrale Regulatoren der Entzündungsantwort.....	8
1.2.1. <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>	9
1.3. Das Pankreaskarzinom	10
1.3.1. Das KPC Mausmodell.....	11
1.3.2. TIMP-1 in PDAC.....	12
1.3.3. Neutrophile in PDAC.....	13
1.4. Ziel dieser Arbeit.....	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Material	16
2.1.1. Chemikalien	16
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3. Geräte.....	19
2.1.4. Lösungen und Puffer.....	20
2.1.5. Primer.....	22
2.1.6. Plasmide.....	23
2.1.7. Antikörper	23
2.1.8. Rekombinante Proteine.....	25
2.1.9. Verwendete Kits.....	26
2.1.10. Software	26
2.2. Patientenproben.....	27
2.2.1. Verwendete Gewebe	27
2.2.2. Klinische Daten und Patientenkohorte.....	27
2.3. Tierexperimente	29
2.3.1. Verwendete Versuchstiere	29
2.3.2. Probennahme.....	30
2.4. Histologische Methoden.....	30
2.4.1. Paraffineinbettung von Organen.....	30
2.4.2. Herstellung, Färbung und Analyse von Paraffinschnitten	30

Inhaltsverzeichnis

2.4.3.	Klassifikation der Tumore	31
2.4.4.	Kaplan-Meier Analyse der KPC Tiere.....	31
2.5.	Methoden der Zellkultur.....	32
2.5.1.	Isolation von Neutrophilen Granulozyten aus Spenderblut	32
2.5.2.	Stimulation von Neutrophilen Granulozyten zur Analyse von NETs	32
2.5.3.	<i>Priming</i> von Neutrophilen Granulozyten.....	33
2.5.4.	Stimulation der Neutrophilen Granulozyten und anschließende Proteinisolation zur Signalwegsanalyse.....	33
2.5.5.	Verwendete Zelllinien.....	33
2.5.6.	Kultivierung der Zelllinien	34
2.5.7.	Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer	35
2.5.8.	Stimulation der Namalwa Zellen und anschließende Proteinisolation zur Signalwegsanalyse	35
2.5.9.	Generierung von CD74 <i>knockdown</i> Zellen.....	35
2.6.	Molekularbiologische Methoden.....	36
2.6.1.	Färbung von <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>	36
2.6.2.	Detektion von NETs im Überstand.....	36
2.6.3.	Durchflusszytometrie.....	37
2.6.4.	<i>Dot Blot Assay</i>	37
2.6.5.	RNA Isolierung aus Zellen	38
2.6.6.	RNA Konzentrationsbestimmung und Kontrolle der Integrität.....	38
2.6.7.	Reverse Transkription.....	38
2.6.8.	Genexpressionsanalyse mittels TaqMan-Messung	39
2.6.9.	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Kit	40
2.6.10.	SDS Gelelektrophorese und Western Blot.....	40
2.6.11.	ELISA	41
2.6.12.	MMP-9 Aktivitätsassay	42
2.7.	Automatisierte Auswertung der NET-Bildung mittels CellProfiler.....	43
2.8.	<i>In silico</i> Analyse von Transkriptom-Daten	43
2.9.	Statistische Analysen	43
2.10.	Zulassung der klinischen und tierexperimentellen Studien.....	44
3.	Ergebnisse.....	45
3.1.	Effekte von TIMP-1 auf die Bildung von NETs.....	45
3.1.1.	Pathophysiologische TIMP-1-Spiegel induzieren die NET-Bildung	45
3.1.2.	TIMP-1 aktiviert die NET-Bildung über die C-terminale Domäne.....	48
3.1.3.	TIMP-1 bindet an CD63 von Neutrophilen	49
3.1.4.	Die TIMP-1/CD63 Interaktion löst NETs aus	50
3.1.5.	<i>Priming</i> von Neutrophilen erhöht die CD63 Expression und die TIMP-1-induzierte NET-Bildung	51

Inhaltsverzeichnis

3.1.6.	Die TIMP-1/CD63 Interaktion aktiviert den ERK Signalweg in Neutrophilen	52
3.1.7.	TIMP-1 induziert NETs über den ERK Signalweg	54
3.1.8.	TIMP-1 induziert die NET-Bildung in KPC Mäusen	54
3.1.9.	TIMP-1 und NETs beeinflussen das Überleben von Mäusen mit Pankreastumoren	56
3.1.10.	TIMP-1 ist mit der NET-Bildung in PDAC Patienten assoziiert	56
3.1.11.	TIMP-1 und NETs sind prognostische Marker in PDAC Patienten	59
3.2.	CD74 ist ein funktioneller Rezeptor von TIMP-1	63
3.2.1.	Die Interaktion von TIMP-1 mit CD74 aktiviert ZAP-70 in B-Lymphomzellen	63
3.2.2.	TIMP-1 induziert die ZAP-70 Phosphorylierung über seine N-terminale Domäne	66
4.	Diskussion	68
4.1.	TIMP-1 und <i>Neutrophil Extracellular Traps</i>	68
4.1.1.	Das Zytokin TIMP-1 induziert die Bildung von NETs über CD63	68
4.1.2.	TIMP-1 induziert NETs in PDAC	71
4.1.3.	TIMP-1 / NETs als prognostischer Biomarker in PDAC Patienten	73
4.2.	CD74: Ein neuer TIMP-1 Rezeptor auf Immunzellen	75
4.2.1.	Identifikation einer <i>Moonlighting</i> Funktion von TIMP-1	75
4.2.2.	TIMP-1 als neuer Ligand für CD74	77
4.2.3.	Die TIMP-1/CD74 Interaktion aktiviert ZAP-70 in B-Lymphomzellen	79
4.3.	Ausblick	80
5.	Abkürzungsverzeichnis	81
6.	Abbildungsverzeichnis	83
7.	Tabellenverzeichnis	85
8.	Literaturverzeichnis	86
	Danksagung	104
	Anhang	106
	Lebenslauf	106
	Publikationsverzeichnis	107

Zusammenfassung

Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) ist ein multifunktionales Protein, das über seine N-terminale Domäne Metalloproteinasen (MPs) hemmen kann und über die Interaktion seiner C-terminalen Domäne mit dem Tetraspanin CD63 intrazelluläre Signalwege aktiviert. Klinische Beobachtungen zeigen, dass erhöhte Spiegel von TIMP-1 in entzündlichen Erkrankungen vorhanden sind und mit einer schlechten Prognose korrelieren. Dieser Zusammenhang zwischen TIMP-1 und Entzündungen legt nahe, dass TIMP-1 einen Effekt auf Immunzellen, zentrale Regulatoren der Entzündungsantwort, hat. Dennoch sind direkte Effekte von TIMP-1 auf Immunzellen bisher kaum untersucht. In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass TIMP-1 über die Interaktion mit Rezeptoren auf Immunzellen intrazelluläre Signalwege reguliert und so die Aktivität dieser Zellen beeinflusst. Hierfür wurden sowohl primäre humane Neutrophile Granulozyten, die häufigste Immunzellpopulation in menschlichem Blut, als auch die CD74-positive B-Lymphomzelllinie Namalwa mit rekombinanten humanen TIMP-1 Varianten stimuliert. Anschließend wurde die Aktivierung von *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK) bzw. *Zeta-Chain-Associated Protein Kinase-70* (ZAP-70) in diesen Zellen analysiert. Des Weiteren wurde der Einfluss von TIMP-1 auf die Ausbildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) untersucht. Um den molekularen Mechanismus zu identifizieren, über den TIMP-1 auf Neutrophile wirkt, wurde die Bindung von TIMP-1 an CD63 auf diesen Zellen analysiert und diese Interaktion in den *in vitro* Versuchen durch CD63-blockierende Antikörper, sowie ein synthetisches antagonistisches Peptid, blockiert. Zusätzlich wurde ein Zusammenhang zwischen der TIMP-1 Expression und der NET-Bildung im Kontext des pankreatischen duktales Adenokarzinoms (PDAC), eine der tödlichsten Krebserkrankungen, untersucht. Hierfür wurden Blut und Gewebeproben von an PDAC erkrankten Patienten und Mäusen analysiert. Um den Beitrag von TIMP-1 und NETs zur Tumorprogression aufzudecken, wurde das Überleben von PDAC Mäusen in Abhängigkeit von TIMP-1 oder NETs untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass TIMP-1 die Ausbildung von NETs durch Neutrophile Granulozyten fördert. Diese Funktion wird über eine Interaktion der C-terminalen Domäne von TIMP-1 mit CD63 und eine anschließende Aktivierung des ERK Signalweges vermittelt. Bezogen auf die pathophysiologische Relevanz dieses Mechanismus konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 im Kontext des PDAC NETs im Tumorgewebe induziert und dass sich sowohl eine TIMP-1 Expression, als auch eine NET Bildung negativ auf das Überleben von Mäusen mit PDAC auswirken. Der prognostische Wert einer Kombination der Blutspiegel von TIMP-1 und NET-Markern konnte bei PDAC Patienten beschrieben werden. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 eine völlig neue molekulare Funktion besitzt, da es über Interaktion seiner N-terminalen Domäne mit CD74 die ZAP-70 Phosphorylierung in B-Lymphomzellen induziert. Diese Entdeckungen identifizieren TIMP-1 als immunregulatorisches Protein, das zu den *Moonlighting* Proteinen gezählt werden kann, da es verschiedene molekulare Funktionen über ein und dieselbe Domäne ausüben kann.

Abstract

Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) is a multifunctional protein, which inhibits metalloproteinases (MPs) *via* its N-terminal domain and activates intracellular signaling pathways upon interaction of its C-terminal domain with the tetraspanin CD63. Clinical observations show that high levels of TIMP-1 are found in inflammatory diseases and correlate with poor prognosis. This link between TIMP-1 and inflammatory diseases suggests an effect of TIMP-1 on immune cells, which are key regulators of an inflammatory response. Still, direct effects of TIMP-1 on immune cells are hardly known. In this study, it was hypothesized that TIMP-1, *via* interaction with receptors on immune cells, regulates intracellular signaling pathways, thereby impacting on the activity of these cells. Primary human neutrophil granulocytes, the most prominent immune cell population in the blood, as well as the CD74-positive B-lymphoma cell line Namalwa, were stimulated with recombinant human TIMP-1 variants. In these cells, activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) or zeta-chain-associated protein kinase-70 (ZAP-70) was analyzed, respectively. In addition, the impact of TIMP-1 on formation of neutrophil extracellular traps (NETs) was studied. To identify the molecular mechanism how TIMP-1 impacts on neutrophils, binding of TIMP-1 to CD63 on these cells was analyzed and this interaction was blocked *in vitro* employing CD63-blocking antibodies as well as a synthetic antagonistic peptide. Furthermore, a link between TIMP-1 expression and NET formation was studied in the context of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC), one of the deadliest cancers. For this, blood as well as tissue samples of PDAC patients and PDAC-bearing mice were analyzed. To unravel the impact of TIMP-1 and NETs on tumor progression, survival of PDAC-bearing mice in relation to presence of TIMP-1 or NETs was studied. This study shows that TIMP-1 triggers the formation of NETs by neutrophil granulocytes. This function was mediated *via* interaction of the C-terminal domain of TIMP-1 with CD63 and subsequent activation of ERK signaling. In addition, it was found that TIMP-1 triggers NET formation in tumor tissues in the context of PDAC and that TIMP-1, as well as NETs, significantly compromise the survival of PDAC-bearing mice. The prognostic value of combining blood levels of TIMP-1 and NET-markers was described in PDAC patients. Furthermore, a completely novel molecular function of TIMP-1 was discovered, as it induced ZAP-70 phosphorylation in B-lymphoma cells *via* interaction of its N-terminal domain with CD74. These discoveries identify TIMP-1 as immunoregulatory protein, capable of triggering different molecular functions with one and the same domain and thus belonging to the moonlighting proteins.

1. Einleitung

1.1. *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1*

Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) ist ein 28 kDa großes, glykosyliertes und sezerniertes Protein, das seinen Namen aufgrund der Fähigkeit Metalloproteinasen (MPs) zu hemmen, erhalten hat (Cawston *et al.*, 1981). Es ist das erste beschriebene Mitglied der TIMP Familie, die TIMP-1 bis TIMP-4 umfasst (Brew *et al.*, 2000). Die Fähigkeit MPs zu hemmen verleiht TIMPs eine zentrale Rolle bei der Regulation des Umbaus der extrazellulären Matrix, da dieser Umbau maßgeblich durch die proteolytische Aktivität von MPs beeinflusst wird (Arpino *et al.*, 2015). 1985, sechs Jahre nachdem TIMP-1 als natürlicher Kollagenase-Inhibitor entdeckt wurde (Welgus *et al.*, 1979), konnte eine weitere Eigenschaft von TIMP-1 aufgedeckt werden. Es stellte sich heraus, dass TIMP-1 identisch mit dem kurz zuvor identifizierten Protein *Erythroid-Potentiating Activity* (EPA) ist (Docherty *et al.*, 1985; Gasson *et al.*, 1985), und stimulierend auf erythroide Vorläuferzellen wirkt (Gasson *et al.*, 1985). Allerdings blieben die molekularen Grundlagen der Fähigkeit von TIMP-1 stimulierend auf Zellen zu wirken, lange unerforscht und die namensgebende MP-inhibitorische Eigenschaft von TIMP-1 stand für längere Zeit im Zentrum des wissenschaftlichen Interesses. Erst 27 Jahre nach Entdeckung von TIMP-1 wurden erste molekulare Eigenschaften identifiziert (Jung *et al.*, 2006), die die lange vorherrschende Meinung, TIMP-1 sei vor allem ein Proteaseinhibitor, infrage stellten.

1.1.1. TIMP-1 ist ein multifunktionales Protein mit einem vielseitigen Interaktom

Die Molekülstruktur von TIMP-1 ist aus zwei Domänen aufgebaut, einer N-terminalen und einer C-terminalen Domäne (Murphy *et al.*, 1991). Beide Domänen werden jeweils durch drei Disulfidbrücken stabilisiert (**Abb. 1.1**) (Hayakawa, 1994). Die für TIMP-1 namensgebende MP-inhibierende Funktion liegt innerhalb seiner N-terminalen Domäne (Murphy *et al.*, 1991). Diese erstreckt sich vom N-Terminus bis zu Aminosäure 124 und ist durch zwei Glutaminsäuren von der ersten Disulfidbrücke der C-terminalen Domäne getrennt (Murphy *et al.*, 1991) (**Abb. 1.1**). Die Expression der N-terminalen Domäne von TIMP-1 führt zu einem stabil gefalteten Protein (N-TIMP-1), das seine antiproteolytische Funktion behält (Murphy *et al.*, 1991).

1. Einleitung

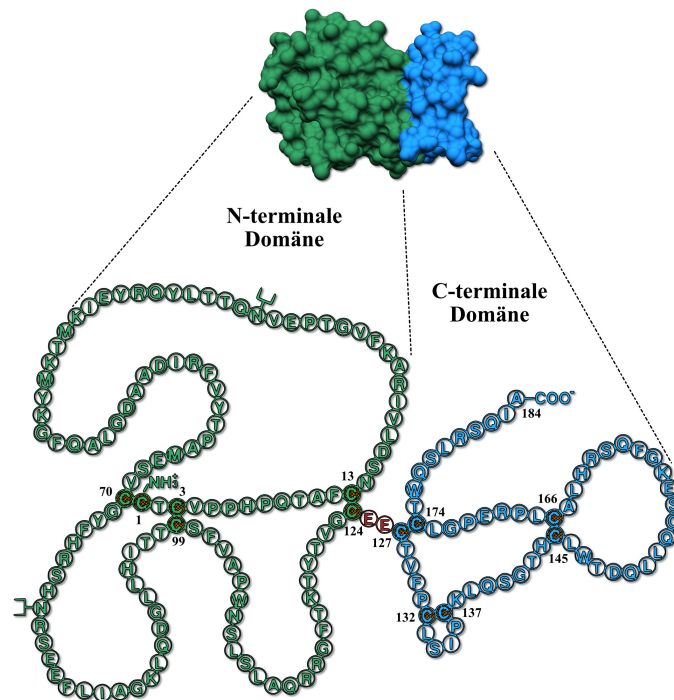


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Molekülstruktur von TIMP-1. Dargestellt sind die Oberflächenstruktur (oben), sowie die Peptidkette (unten) von humanem TIMP-1. Die N-terminale Domäne ist in grün, die C-terminale Domäne in blau, sowie der *Linker* aus Glutaminsäuren in rot abgebildet. Die Disulfidbrücken (C-C) sind rot hinterlegt. Veränderte Abbildung nach (Hayakawa, 1994).

Das Vorhandensein der beiden physikalisch trennbaren Domänen wurde als Grundlage der Multifunktionalität von TIMP-1 beschrieben (Grünwald *et al.*, 2019), denn beide Domänen besitzen jeweils individuelle Interaktionspartner (**Abb. 1.2**). So hemmt TIMP-1 MPs über seine N-terminale Domäne (Murphy *et al.*, 1991), wohingegen die Bindung an CD63 über die C-terminale Domäne vermittelt wird (Jung *et al.*, 2006). Zur funktionellen Interaktion mit anderen Interaktionspartnern, wie z.B. *A Disintegrin and Metalloproteinase Domain-Containing Protein 10* (ADAM10), werden hingegen beide Domänen von TIMP-1 benötigt (Rapti *et al.*, 2008). Die subzelluläre Lokalisation der Interaktionspartner von TIMP-1 ist vielseitig, das Interaktom von TIMP-1 besteht sowohl aus sezernierten Proteinen, als auch aus Membranproteinen (Grünwald *et al.*, 2019). Die Tatsache, dass jede Domäne individuelle Interaktionspartner besitzt (**Abb. 1.2**), ermöglicht die Zuweisung von spezifischen Funktionen zu der einen oder anderen Domäne. Alle bisher bekannten Zytokinfunktionen sind, im Gegensatz zur MP-Inhibition, über C-terminale Interaktionen vermittelt (Murphy *et al.*, 1991; Itoh und Nagase, 1995; Jung *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2009) (**Abb. 1.2**). Dies führte zur Annahme, dass sich die beiden Funktionen, MP Inhibition und *Signaling*, jeweils den beiden physikalisch trennbaren Domänen zuordnen lassen (Grünwald *et al.*, 2019).

1. Einleitung

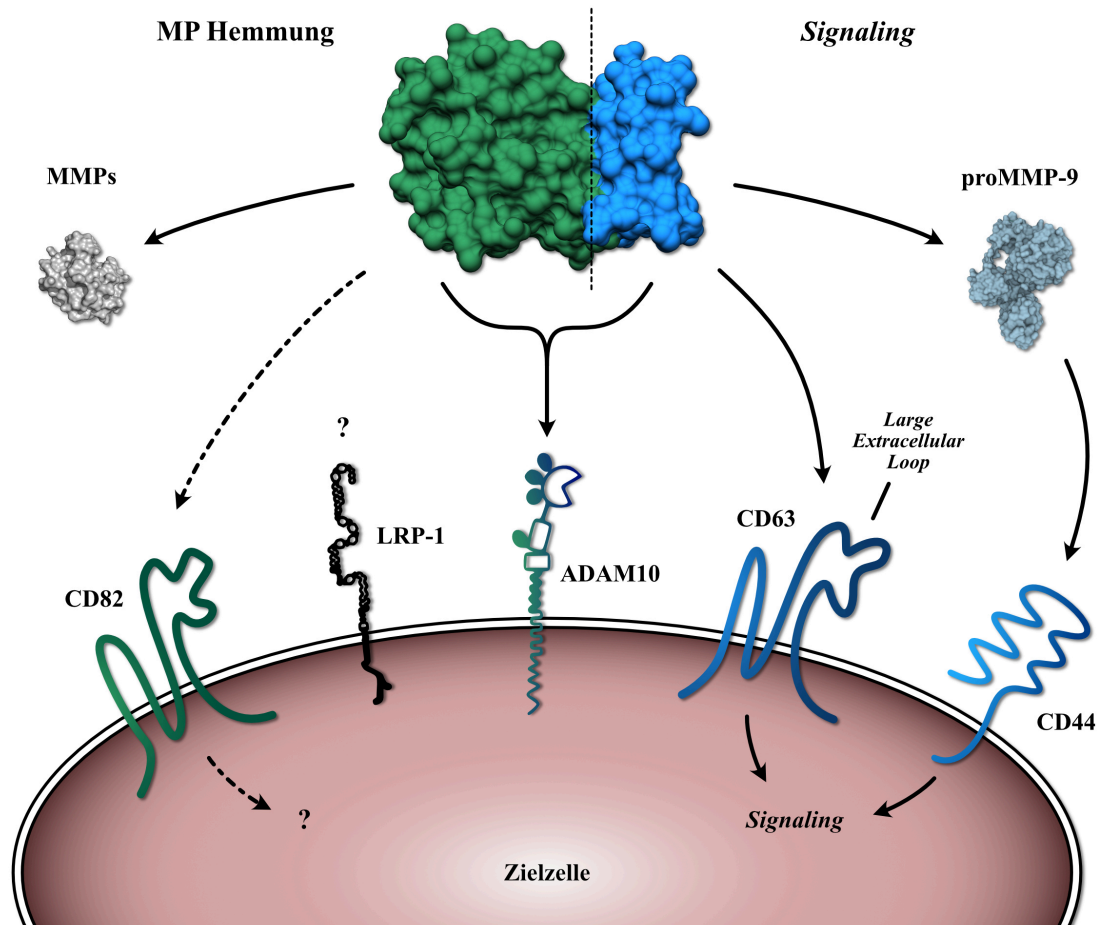


Abbildung 1.2: TIMP-1 ist ein multifunktionales Protein mit einem vielseitigen Interaktom. Die N-terminale Domäne von TIMP-1 (grün) hemmt Metalloproteinasen (MPs), während die C-terminale Domäne (blau) *Signaling*-Funktion besitzt. Die N-terminale Domäne von TIMP-1 interagiert auch mit CD82, jedoch sind bisher keine Signalwege bekannt, die durch diese Interaktion beeinflusst werden. Welche Domäne von TIMP-1 zur Interaktion mit LRP-1 benötigt wird, ist bisher nicht bekannt. Zur Hemmung von ADAM-10 sind beide Domänen von TIMP-1 notwendig. Die Interaktion der C-terminalen Domäne von TIMP-1 mit CD63 oder proMMP-9 führt zur Aktivierung intrazellulärer Signalwege, wobei TIMP-1 über proMMP-9 an CD44 bindet. Abkürzungen: MMP, *Matrix Metalloproteinase*; LRP-1, *Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein-1*; ADAM10, *A Disintegrin and Metalloproteinase 10*. Die der Abbildung zugrunde liegenden Informationen wurden entnommen aus (Murphy *et al.*, 1991; Bodden *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 2006; Rapti *et al.*, 2008; Lambert *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2017; Verzeaux *et al.*, 2017).

1.1.1.1. Klassische MP-inhibitorische Funktion von TIMP-1

Zentral für die MP-Bindung sind die fünf N-terminalen Aminosäuren Cys¹-Thr-Cys-Val-Pro⁵, die einen „Kamm“ auf der Oberfläche von TIMP-1 bilden, sowie der CD-loop und die Reste Met⁶⁶-Glu-Ser-Val-Cys⁷⁰ in TIMP-1 (Brew und Nagase, 2010). Bei der Hemmung von MPs durch TIMP-1 ragt der gebildete „Kamm“ so ins aktive Zentrum der MPs, dass Cys¹ von TIMP-1 direkt über dem katalytischen Zn²⁺ der

1. Einleitung

MPs liegt (Gomis-Rüth *et al.*, 1997; Brew und Nagase, 2010). Dies führt zur Verdrängung des für die Hydrolyse der Peptidbindung notwendigen Wassermoleküls und damit zur Hemmung der MP (Brew und Nagase, 2010). Die Entdeckung eines im Gewebe exprimierten MP-Inhibitors führte zur Frage der physiologischen Bedeutung eines solchen Inhibitors (Cawston *et al.*, 1981). Durch Inhibition von MPs, die wiederum ein breites Substratspektrum besitzen, kann TIMP-1 auf vielen verschiedenen Ebenen zelluläre Effekte bewirken (Grünwald *et al.*, 2019). So stellte sich heraus, dass TIMP-1 eine zentrale Rolle bei Umbauprozessen der extrazellulären Matrix (EZM) spielt, da es durch Hemmung von MPs das Gleichgewicht zwischen Gewebeabbau und -aufbau reguliert (Arpino *et al.*, 2015). Dies ist bei physiologischen Bedingungen wie Wundheilungsprozessen von großer Bedeutung, aber auch bei pathologischen Prozessen wie der Metastasierung von Tumorzellen (Grünwald *et al.*, 2019). Um in das umgebende Gewebe einwandern zu können, müssen Tumorzellen die extrazelluläre Matrix abbauen, was durch die Expression von MPs gesteuert werden kann (Egeblad und Werb, 2002). Da TIMP-1 hemmend auf MPs wirkt, ist man lange Zeit davon ausgegangen, dass TIMP-1 eine protektive Funktion im Krebskontext besitzt (Grünwald *et al.*, 2019). Allerdings zeigen klinische Daten, dass hohe TIMP-1-Spiegel mit einer schlechten Prognose in nahezu allen Krebserkrankungen assoziiert sind (Eckfeld *et al.*, 2019). Dieses Paradoxon weist darauf hin, dass die Rolle von TIMP-1 in Krankheiten weitaus komplexer ist, und dass möglicherweise weitere TIMP-1-induzierte Effekte eine Rolle spielen.

1.1.1.2. Das Zytokin TIMP-1

Im Gegensatz zur anti-proteolytischen Aktivität, über die TIMP-1 nur indirekt auf die Funktionsweise von Zellen einwirkt, indem es z.B. die Spaltung von Rezeptoren oder Zytokinen durch MPs reguliert (Ries, 2014), kann TIMP-1 über seine zytokinische Funktion direkt Signalwege in Zellen aktivieren und so deren Phänotyp beeinflussen (Ries, 2014). Verglichen mit den anti-proteolytischen Funktionen sind die physiologischen Auswirkungen dieser zytokinischen Funktion bisher nur wenig untersucht.

Erste Hinweise, dass TIMP-1 direkt zelluläre Effekte bewirkt gab es bereits 1985, als gezeigt wurde, dass TIMP-1 identisch mit EPA ist (Docherty *et al.*, 1985) und spezifisch das Wachstum von erythroiden Vorläuferzellen stimuliert (Gasson *et al.*, 1985). Nachfolgende Studien zeigten, dass TIMP-1 die Steroidsynthese 10-fach, wenn es einen Komplex mit Procathepsin L eingeht sogar mehr als 200-fach, verstärken kann (Boujrad *et al.*, 1995). Interessanterweise war dieser Effekt bereits mit 30 bis 100 ng/ml TIMP-1 auslösbar (Boujrad *et al.*, 1995), und damit bei 10-fach geringeren Konzentrationen als zur Hemmung von *Matrix Metalloproteinase-1* benötigt (Roswit *et al.*, 1992). Erste Nachweise, dass TIMP-1 MP-Inhibition unabhängige Effekte auf Zellen auslösen kann, lieferten Studien mit alkyliertem und reduziertem TIMP-1, das keine MP-inhibitorische Funktion mehr besitzt (Hayakawa *et al.*, 1994). Dieses TIMP-1 war jedoch immer noch in der Lage, die Zellproliferation einer Burkitt Lymphom Zelllinie zu induzieren (Hayakawa *et al.*, 1994). In den folgenden Jahren stellte sich heraus, dass TIMP-1 intrazelluläre Signalwege aktivieren kann, die unter anderem über *Rat Sarcoma Viral Oncogene*

1. Einleitung

Homolog (RAS) (Wang *et al.*, 2002), *Mitogen-Activated Protein* (MAP) Kinase (Yamashita *et al.*, 1996) und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)/Proteinkinase B (AKT) (Boulday *et al.*, 2004) vermittelt werden. Diese Ergebnisse legten nahe, dass TIMP-1 zytokinische Funktionen ausüben kann, allerdings wurde ein zellulärer Rezeptor für TIMP-1 nicht gefunden.

1.1.1.3. CD63 ist ein zellulärer Rezeptor von TIMP-1

Erst 2006 konnte CD63 als erster Rezeptor von TIMP-1 identifiziert werden (Jung *et al.*, 2006). CD63 ist bis heute der am besten beschriebene Rezeptor von TIMP-1. Es gehört zur Klasse der Tetraspanine, deren Mitglieder vier Transmembrandomänen besitzen, sowie eine kleine und eine große extrazelluläre Schleife (*Large Extracellular Loop*, LEL) (Hemler, 2005) (**Abb. 1.2**). Tetraspanine kommen auf der Zelloberfläche in sogenannten *Tetraspanin Webs* vor und interagieren mit Integrinen (Levy und Shoham, 2005). Die Interaktion von TIMP-1 mit dem LEL von CD63 erfolgt über die letzten neun Aminosäuren der C-terminalen Domäne von TIMP-1 (Warner *et al.*, 2020). Diese Interaktion von TIMP-1 mit CD63 führt zur Konformationsänderung von Integrin $\beta 1$ und zur Aktivierung von *Extracellular Signal-Regulated Kinase* (ERK) (Jung *et al.*, 2006). Da CD63 ubiquitär exprimiert wird (Sincock *et al.*, 1997; Schröder *et al.*, 2009), kann TIMP-1 Effekte auf verschiedene Zellen bewirken. So wurde bereits gezeigt, dass die TIMP-1/CD63 Interaktion die Proliferation von Tumorzellen über den ERK Signalweg stimuliert (Xia *et al.*, 2012), mesenchymale Stammzellen reguliert (Egea *et al.*, 2012), und die Migration und Adhäsion von hämatopoietischen Stamm- und Vorläuferzellen induziert (Wilk *et al.*, 2013). Physiologische Konsequenzen der TIMP-1/CD63 Interaktion beinhalten z.B. die Induktion der Granulopoese in Mäusen, was zu einer Neutrophilie führt (Kobuch *et al.*, 2015). Im Krebskontext wurde außerdem herausgefunden, dass TIMP-1 über die CD63/PI3K/AKT/Hypoxie-induzierter Faktor (HIF)-Signalwegsachse zu einer pro-tumorigenen Erhöhung der *microRNA* miR-210 in Lungenkrebszellen führt (Cui *et al.*, 2015). In Pankreaskrebs induziert TIMP-1 durch CD63 eine prä-metastatische Nische in der Leber, was eine effiziente Metastasierung von Tumorzellen ermöglicht (Grünwald *et al.*, 2016). TIMP-1 kann also, unabhängig von seiner MP-inhibitorischen Funktion, über Interaktion mit dem Rezeptor CD63 zelluläre Veränderungen bewirken und besitzt damit zentrale Eigenschaften eines Zytokins (Ries, 2014). Zusätzlich zur Interaktion mit CD63 ist TIMP-1 außerdem in der Lage, mit seiner C-terminalen Domäne an proMMP-9 zu binden (Bodden *et al.*, 1994) und so CD44-abhängige Signalwege zu aktivieren (Lambert *et al.*, 2009) (**Abb. 1.2**). Ein weiterer interessanter Interaktionspartner von TIMP-1 ist CD82 (Zhang *et al.*, 2017), das ebenfalls zur Gruppe der Tetraspanine gehört (Hemler, 2005). Ähnlich wie CD63 bindet CD82 TIMP-1 über den LEL, allerdings ist diese Interaktion über die N-terminale Domäne von TIMP-1 vermittelt (Zhang *et al.*, 2017) und es sind bisher keine Signalwege identifiziert worden, die durch eine solche Interaktion aktiviert werden. Daher wurden alle bisher bekannten zytokinischen Funktionen von TIMP-1 dessen C-terminalen Domäne zugeordnet (Bodden *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2009; **Abb. 1.2**).

1. Einleitung

1.1.2. *Invariant Chain* (CD74) als potentieller TIMP-1 Rezeptor

In den letzten Jahren sind verschiedenste neue Interaktionspartner von TIMP-1 identifiziert worden. So wurde in einem Konferenzabstract auch *Invariant Chain* (CD74) als neuer Interaktionspartner von TIMP-1 vorgeschlagen (Moreira *et al.*, 2015). CD74 soll nach Bindung an TIMP-1 die Internalisierung von TIMP-1 auslösen und den AKT Signalweg induzieren (Moreira *et al.*, 2015). Allerdings fehlten bisher jegliche experimentellen Nachweise für eine solche Interaktion und die involvierten Domänen von TIMP-1 waren bisher nicht bekannt.

Das Transmembranprotein CD74 durchdringt die Plasmamembran einmal, wobei die N-terminale Domäne von CD74 ins Zytosol zeigt (Schröder, 2016). Beim Menschen sind vier Isoformen bekannt, die durch alternatives Splicing (p33 und p41) und die Verwendung von alternativen Startcodons (p35 und p43) entstehen (Schröder, 2016). Kurz nach der Synthese bilden sich Homotrimere von CD74, indem sich die luminalen Aminosäuren 163 bis 183 aneinanderlagern (Bijlmakers *et al.*, 1994). Diese Trimere bilden anschließend einen nonameren Komplex, indem sie MHC Klasse II α und β Ketten im ER binden und anschließend deren Faltung, Zusammenbau und Transport unterstützen (Roche *et al.*, 1991; Schröder, 2016). Die CLIP (*Class II-Associated Li Chain Peptide*) Region in CD74 besetzt hierbei die Peptidbindungsstelle auf den MHC Klasse II Molekülen (Matza *et al.*, 2003) (**Abb. 1.3**) und spielt so eine zentrale Rolle bei der Antigenpräsentation (Stockinger *et al.*, 1989). Somit ist CD74 hauptsächlich auf antigenpräsentierenden Immunzellen wie B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen zu finden, es wird unter inflammatorischen Bedingungen jedoch auch von anderen Zellen exprimiert (Schröder, 2016). Zusätzlich zu dieser Funktion kann auch MHC-freies CD74 an der Zelloberfläche von Immunzellen gefunden werden (Koch *et al.*, 1982), wo es als Rezeptor für *Macrophage Migration Inhibitory Factor* (MIF) fungiert (Leng *et al.*, 2003) (**Abb. 1.3**). MIF Homotrimere binden ein CD74 Homotrimer (Meza-Romero *et al.*, 2016) und führen zur Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalwege, wie z.B. dem *Zeta-Chain-Associated Protein Kinase-70* (ZAP-70) Signalweg in B-Lymphomzellen (Klasen *et al.*, 2014), was unter anderem das Überleben von B-Zellen fördert (Gore *et al.*, 2008). Die Aktivierung von CD74 durch MIF kann mit dem bioaktiven Peptid C36V_L CDR1 (C36L1), das auf Immunoglobulin *Complementary Determining Regions* (CDRs) basiert, blockiert werden (Figueiredo *et al.*, 2018). Bisher war MIF der einzige bekannte Ligand von CD74 und es war nicht bekannt, ob CD74 auf Immunzellen als funktioneller Rezeptor von TIMP-1 fungieren könnte.

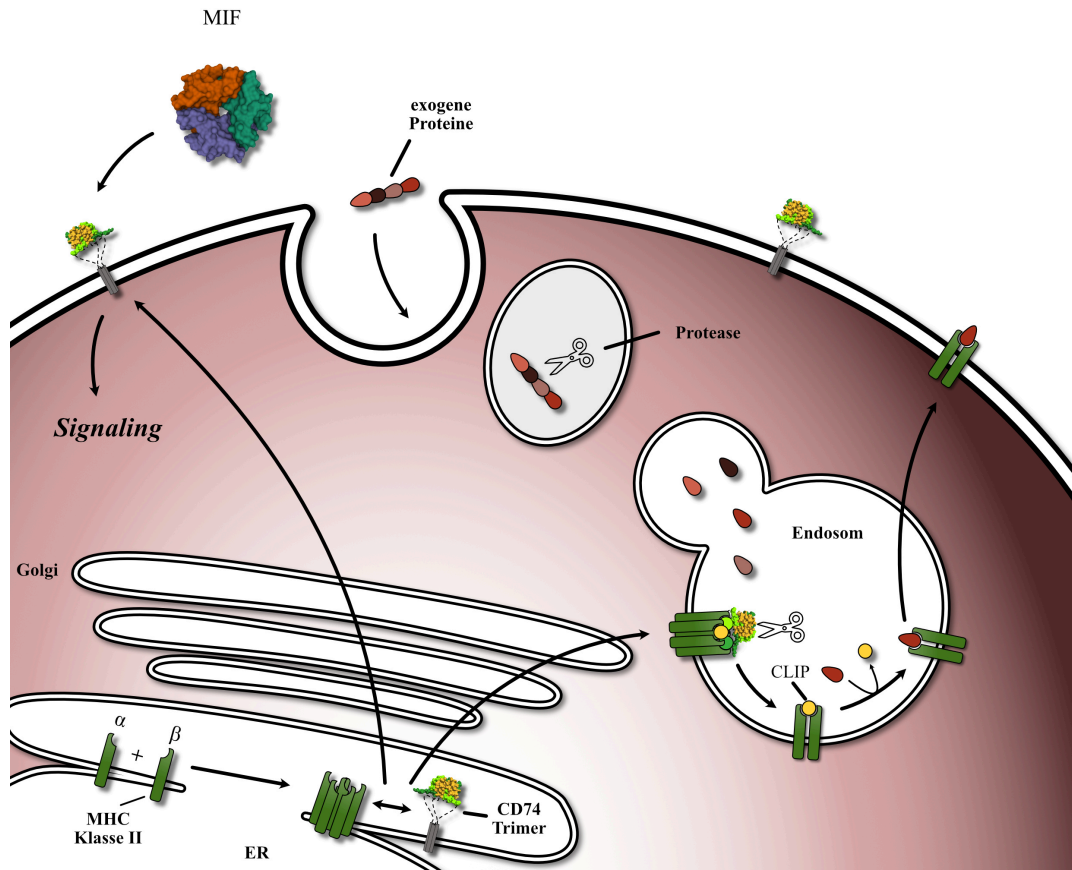


Abbildung 1.3: Funktionen von CD74. CD74 Homotrimer binden im ER an MHC Klasse II Proteine und bilden einen nonameren Komplex. So kann die korrekte Faltung und der Transport von MHC Klasse II Molekülen durch CD74 gesteuert werden. Anschließend wandert der nonamere Komplex in Endosomen, in welchen CD74 abgebaut und das CLIP Peptid gegen Peptide von exogenen Proteinen getauscht wird. Diese werden dann an der Zelloberfläche präsentiert. Außerdem kann CD74 direkt an die Zellmembran rekrutiert werden, wo es als Rezeptor für MIF dient. Abkürzungen: ER, Endoplasmatisches Retikulum; MIF, *Macrophage Migration Inhibitory Factor*; CLIP, *Class II-Associated Li Chain Peptide*. Abbildung angelehnt an (Neefjes *et al.*, 2011; Schröder, 2016).

1.1.3. TIMP-1: Ein Entzündungsfaktor

Entzündungen sind komplexe Vorgänge, die genau reguliert werden müssen, um Schaden am Körper zu vermeiden (Eming *et al.*, 2017). MPs sind zentrale Steuerungsmoleküle von inflammatorischen Prozessen, da sie unter anderem Zytokine und Chemokine prozessieren und physikalische Barrieren abbauen (Manicone und McGuire, 2008). Unter vielen entzündlichen Bedingungen ist die MP Expression daher erhöht (Manicone und McGuire, 2008). Auch TIMP-1 ist unter verschiedenen entzündlichen Bedingungen induziert (Grünwald *et al.*, 2016; Nukarinen *et al.*, 2016; Knight *et al.*, 2019). So können im Blut TIMP-1-Konzentrationen von über 1000 ng/ml gemessen werden (Sivula *et al.*, 2015; Grünwald *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu klassischen Zytokinen, die in pikomolaren Konzentrationen im Plasma vorkommen (Stenken und Poschenrieder, 2015), befinden sich die

1. Einleitung

Plasmaspiegel von TIMP-1 damit im nanomolaren Bereich (1000 ng/ml \cong 47 nM). Hervorzuheben sind hier vor allem entzündliche Veränderungen wie Krebs (Grünwald *et al.*, 2016) oder Sepsis (Sivula *et al.*, 2015), bei denen die TIMP-1 Expression stark erhöht und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Lorente *et al.*, 2014; Eckfeld *et al.*, 2019). Die erhöhte Expression von TIMP-1 in Entzündungen wurde ursprünglich hauptsächlich im Zusammenhang mit der MP-hemmenden Funktion von TIMP-1 diskutiert (McKaig *et al.*, 2003; Sivula *et al.*, 2015). Es häuften sich allerdings Hinweise, dass TIMP-1 auch einen direkten Effekt auf Immunzellen haben kann, vor allem auf Neutrophile Granulozyten und B-Zellen (Hayakawa *et al.*, 1994; Guedez *et al.*, 1998; Chromek *et al.*, 2004). So kann TIMP-1, unabhängig von der MP-inhibitorischen Funktion, die Proliferation (Hayakawa *et al.*, 1994) von B-Lymphomzellen steigern und deren programmierten Zelltod unterdrücken (Guedez *et al.*, 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 über Interaktion mit CD63 sowohl die Granulopoese induziert (Kobuch *et al.*, 2015), als auch indirekt die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten in die Leber verstärkt (Grünwald *et al.*, 2016). TIMP-1 beeinflusst zusätzlich den *Respiratory Burst*, die Migration durch die Basalmembran und das Überleben von Neutrophilen Granulozyten (Chromek *et al.*, 2004). TIMP-1 scheint also eine Rolle bei zentralen Prozessen der Entzündungsreaktion zu spielen: Der Generierung von Immunzellen im Knochenmark, deren Rekrutierung ins Gewebe, sowie der Regulation deren Aktivität. Allerdings sind die molekularen Mechanismen, wie TIMP-1 die Aktivität von Immunzellen beeinflusst, bisher nicht bekannt.

1.2. Neutrophile Granulozyten: Zentrale Regulatoren der Entzündungsantwort

Neutrophile Granulozyten sind ein zentrales Element des angeborenen Immunsystems und bilden den Großteil der im Körper vorhandenen Leukozyten (Coffelt *et al.*, 2016). Sie werden typischerweise als erste Immunzellen zur Entzündungsstelle rekrutiert und bilden dort die erste Abwehr gegen eindringende Pathogene (Kolaczkowska und Kubes, 2013). Neutrophile können Pathogene durch drei zentrale Mechanismen bekämpfen: Phagozytose, Degranulation und Bildung von *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) (Kolaczkowska und Kubes, 2013). Bei der Phagozytose werden Pathogene von den Neutrophilen aufgenommen und anschließend durch antibakterielle Substanzen, die sich in den intrazellulären Granula befinden, abgetötet (Kolaczkowska und Kubes, 2013). Diese Granula können allerdings auch in dem Prozess der Degranulation mit der Zellmembran verschmelzen und ihren Inhalt so in den extrazellulären Raum freigeben, damit extrazellulär vorhandene Pathogene abgetötet werden können (Kolaczkowska und Kubes, 2013). Bei diesem Prozess gelangen Markermoleküle für bestimmte Granula an die Zelloberfläche, was eine Einteilung der Neutrophilen anhand ihres Aktivitätszustandes erlaubt (Kuijpers *et al.*, 1991). So weisen aktivierte, degranulierte Neutrophile eine erhöhte Oberflächenexpression von CD63 auf (Kuijpers *et al.*, 1991), das normalerweise hauptsächlich intrazellulär auf azurophilen Granula zu finden ist (Kuijpers *et al.*, 1991). CD63, das sich auf der Oberfläche von Neutrophilen befindet, kann wiederum die Aktivität von Neutrophilen beeinflussen,

1. Einleitung

indem es die Adhäsion von Neutrophilen reguliert (Skubitz *et al.*, 1996). Bei der Degranulation werden nicht nur antibakterielle Moleküle freigesetzt, sondern auch pro-inflammatorische Stoffe, die es den Neutrophilen erlauben die Entzündungsantwort zu modulieren (Kolaczowska und Kubes, 2013). In den letzten Jahren wurde deutlich, dass die Funktion von Neutrophilen weit über die bloße Abwehr von Pathogenen hinausgeht (Castanheira und Kubes, 2019). So spielen sie bei sterilen Entzündungen und der Gewebereparatur eine zentrale Rolle (Castanheira und Kubes, 2019). Hervorzuheben ist die komplexe Rolle von Neutrophilen im Krebskontext, wo sie sowohl tumorfördernd als auch tumorunterdrückend sein können (Coffelt *et al.*, 2016).

1.2.1. *Neutrophil Extracellular Traps*

Untersuchungen zur Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten führten 1996 zu einer interessanten Entdeckung: Die Stimulation dieser Zellen mit dem potenten Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) führt zu deren Zelltod (Takei *et al.*, 1996). Dieser Zelltod konnte weder Nekrose noch Apoptose zugeordnet werden und war gekennzeichnet durch die Freisetzung von DNA in den extrazellulären Raum (Takei *et al.*, 1996). Acht Jahre später stellte sich heraus, dass diese DNA-Strukturen in der Lage sind, Bakterien einzufangen und auch *in vivo* zu beobachten sind (Brinkmann *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Tatsache wurden die DNA-Strukturen *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) benannt (Brinkmann *et al.*, 2004). In den folgenden Jahren wurden molekulare Mechanismen identifiziert, die zur Ausbildung von NETs führen. So konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase* (MEK)-ERK Signalweges zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führt (Hakkim *et al.*, 2011), die wiederum Neutrophile Elastase (NE) aktivieren und zur Translokation von NE in den Zellkern führen (Papayannopoulos *et al.*, 2010; Metzler *et al.*, 2014). Dort werden Histone von NE gespalten, was zur Chromatindekondensation führt und durch darauffolgende Bindung von Myeloperoxidase (MPO) an Chromatin verstärkt wird (Papayannopoulos *et al.*, 2010). Die Chromatindekondensation wird außerdem über die Aktivierung von *Peptidyl Arginine Deiminase 4* (PAD4) induziert, die die Citrullinierung von Histonen H3 (citH3) und H4 katalysiert (Wang *et al.*, 2004). PAD4-defiziente Mäuse sind damit nicht in der Lage, NETs auszubilden (Li *et al.*, 2010; Hemmers *et al.*, 2011). Auslöser der NET-Bildung reichen von künstlichen Stoffen, wie PMA und Calcium Ionophoren (Kenny *et al.*, 2017), über Pathogene wie Bakterien und Pilze (Branzk *et al.*, 2014; Kenny *et al.*, 2017), bis hin zu physiologischen Faktoren, wie Zytokinen (Weckbach *et al.*, 2019). Weiterhin ist bekannt, dass die Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF)- α (Hazeldine *et al.*, 2014), Interferon (IFN)- γ (Martinelli *et al.*, 2004) und *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) (Yousefi *et al.*, 2009) Neutrophile voraktivieren können, wodurch diese auf eine darauffolgende Stimulation mit verstärkter NET-Bildung reagieren. Die aktivierten Signalwege, die zur Ausbildung von NETs führen, unterscheiden sich zwischen den Stimuli (Papayannopoulos, 2018). Untersuchungen zur physiologischen Relevanz von NETs führten in den letzten Jahren zu der

1. Einleitung

Erkenntnis, dass NETs nicht nur eine protektive Wirkung haben, sondern auch schädliche Auswirkungen haben können (Yipp und Kubes, 2013). So führt eine Übermäßige NET-Bildung in chronischen und akuten Entzündungen zu Gewebeschäden (Castanheira und Kubes, 2019) und kann zur Bildung von Thrombosen beitragen (Hisada *et al.*, 2019). Obwohl die Rolle von NETs in verschiedenen Krankheiten im Fokus der Forschung der letzten Jahre stand, sind die molekularen Mechanismen, die zur Ausbildung von NETs in Krankheiten führen, bisher nur wenig untersucht.

1.3. Das Pankreaskarzinom

Das Pankreas (Bauchspeicheldrüse) ist ein im Oberbauch liegendes Drüsenorgan, das sowohl exokrine als auch endokrine Funktionen besitzt (Lüllmann-Rauch, 2009). Das exokrine Gewebe bildet den größten Teil des Organs und produziert Verdauungsenzyme, die in den Dünndarm abgegeben werden, wogegen das endokrine Gewebe Insulin und Glukagon ins Blut abgibt (Lüllmann-Rauch, 2009). Es sind verschiedene Neoplasien des Pankreas bekannt, die anhand des jeweiligen zelltypspezifischen Ursprungs unterschieden werden können (Robbins, 2013). So gehen fast alle Pankreaskarzinome aus den Epithelzellen der großen und kleinen Gänge hervor (Lüllmann-Rauch, 2009). Diese duktaalen Adenokarzinome stellen ein erhebliches Gesundheitsproblem dar (Kleeff *et al.*, 2016). Es wird davon ausgegangen, dass duktaale Adenokarzinome des Pankreas (*Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*, PDAC) noch innerhalb dieses Jahrzehnts zweithäufigste Ursache für krebsbedingte Mortalität in den USA werden (Rahib *et al.*, 2014). Die Todeszahlen für PDAC erhöhen sich demnach drastisch und werden nur von Lungenkrebs übertroffen (Rahib *et al.*, 2014). Das 5-Jahres-Überleben bei Pankreaskrebs liegt bei unter 7% und hat sich innerhalb der letzten Jahrzehnte kaum verbessert (Siegel *et al.*, 2015; Kleeff *et al.*, 2016). Dies liegt vor allem daran, dass PDAC sehr spät diagnostiziert wird und sich bereits zum Zeitpunkt der Diagnose oft Metastasen gebildet haben (Kleeff *et al.*, 2016).

Wie auch andere Krebsarten entsteht PDAC in einem mehrstufigen Prozess, der mit einer Akkumulation von Krebs-assoziierten Mutationen einhergeht (Robbins, 2013). Man geht davon aus, dass es in frühen Stadien zu einer aktivierenden Punktmutation im *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog 2* (*KRAS2*) Gen kommt, die bereits in frühen Vorläuferläsionen gefunden wird (Maitra und Hruban, 2008). Die häufigste Vorläuferläsion, aus der später PDAC entsteht, ist die pankreatische intraepitheliale Neoplasie (PanIN) (Robbins, 2013; Kleeff *et al.*, 2016). Inaktivierende Mutationen in Tumorsuppressorgenen, unter anderem *Tumor Protein p53* (*TP53*), folgen und führen schließlich zur Ausbildung des PDAC (Maitra und Hruban, 2008; Iacobuzio-Donahue und Herman, 2014) (**Abb. 1.4**).

1. Einleitung

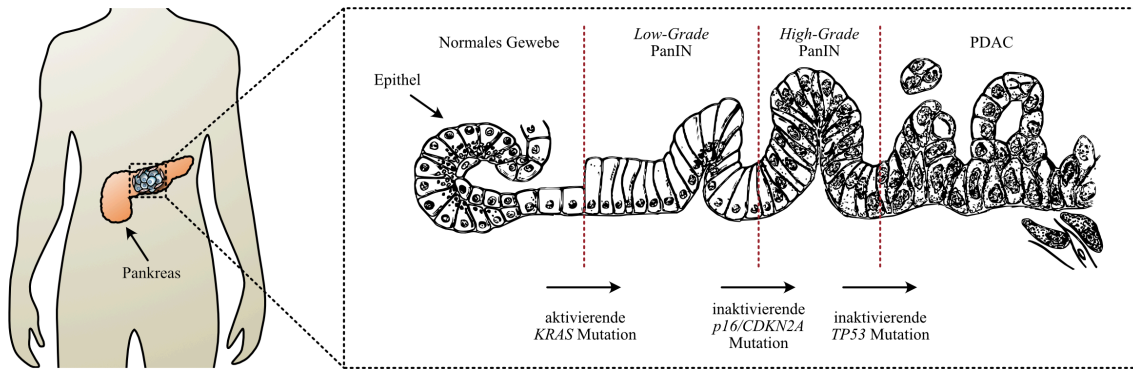


Abbildung 1.4: Entwicklung des PDAC. Während der Entstehung des PDAC kommt es zu schrittweisen Veränderungen im Gewebe. Durch aktivierende Mutationen im *KRAS* Gen kommt es zur Bildung von *low-grade* PanINs, inaktivierende Mutationen im *p16/CDKN2A* Gen führen dann zu *high-grade* PanINs. In den späten PanIN Stadien kommt es zu Mutationen im *TP53* Gen, was schließlich zur Bildung des PDAC führt. Abkürzungen: PanIN, pankreatische intraepitheliale Neoplasie; PDAC, *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*; *KRAS*, *Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*; *TP53*, *Tumor Protein p53*; *CDKN2A*, *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A*. Adaptiert nach (Maitra und Hruban, 2008).

1.3.1. Das KPC Mausmodell

Um die komplexen Abläufe während der Tumorentstehung untersuchen zu können, sind geeignete *in vivo* Modelle essentiell (Olive und Tuveson, 2006). Genetisch veränderte Mausmodelle sind hierbei besonders geeignet, da sie die spontane Tumorentstehung und die Tumorentwicklung gut abbilden (Olive und Tuveson, 2006). Da in über 90 % der Pankreaskarzinome eine aktivierende Punktmutation im *KRAS* Gen, sowie in ungefähr 75 % Punktmutationen im *TP53* Gen vorhanden sind (Hingorani *et al.*, 2005), stellen Mutationen in diesen beiden Genen geeignete *Driver*-Mutationen dar (Abb. 1.4), um PDAC in Mäusen hervorzurufen (Hingorani *et al.*, 2005). Beim gut beschriebenen KPC Mausmodell (*Pdx-1^{+Cre}; Kras^{+LSL-G12D}; Trp53^{+LSL-R172H}*) sind genau diese beiden Gene manipuliert worden (Hingorani *et al.*, 2005). Die Punktmutation G12D im *KRAS* Gen ist in vielen PDAC Patienten zu finden (Hingorani *et al.*, 2003). Sie bewirkt eine lokale Änderung der Konformation des KRAS Proteins (Vatansver *et al.*, 2019), und damit einen dauerhaft aktiven Zustand (Hingorani *et al.*, 2003). Expression von *Kras^{G12D}* im Pankreas von Mäusen führt zur spontanen Bildung von PanINs (Hingorani *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu dieser aktivierenden Mutation im *Kras* Gen handelt es sich bei der *Trp53^{R172H}* Mutation um eine inaktivierende Mutation, die die DNA Bindungskapazität von p53 abschwächt (Cho *et al.*, 1994). Es ist zudem sehr wahrscheinlich, dass die *Trp53^{R172H}* Mutation zusätzlich eine *gain of function* Eigenschaft besitzt (Olive *et al.*, 2004), da *Trp53^{-/-}* Mäuse ein anderes Tumorspektrum aufweisen als *Trp53^{-R172H}* Mäuse (Olive *et al.*, 2004). Die spezifische Expression von *Kras^{G12D}* und *Trp53^{R172H}* im Pankreas von Mäusen führt zur Entwicklung eines metastatischen PDAC, der einen aggressiveren Phänotyp aufweist als die alleinige Mutation von *Kras^{G12D}* und die Progression von PDAC in Patienten besser abbildet

1. Einleitung

(Hingorani *et al.*, 2005). Um zu gewährleisten, dass die beiden mutierten Gene nur im Pankreas exprimiert werden, wurde eine *Lox-STOP-Lox* (LSL)-Kassette in den murinen *Kras* Lokus stromaufwärts des modifizierten Exon 1 eingefügt (Hingorani *et al.*, 2003), bzw. in Intron 1 des modifizierten murinen *Trp53* Gens (Olive *et al.*, 2004). Nur bei Vorhandensein der Cre Rekombinase, die unter Kontrolle des pankreasspezifischen *Pancreatic and Duodenal Homeobox 1* (*Pdx1*)-Promotor exprimiert wird, werden die STOP-Kassetten entfernt und es kommt zur Expression der mutierten Gene (Hingorani *et al.*, 2003).

1.3.2. TIMP-1 in PDAC

Beim Pankreaskrebs sind erhöhte systemische TIMP-1-Spiegel messbar (Mroczko *et al.*, 2009; Joergensen *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2011; Poruk *et al.*, 2013; Grünwald *et al.*, 2016) und PDAC Patienten mit hohen TIMP-1-Spiegeln haben eine schlechtere Prognose (Mroczko *et al.*, 2009). Es wurde gezeigt, dass TIMP-1 sowohl von Tumorzellen, als auch von stromalen Zellen produziert wird (Grünwald *et al.*, 2016; Lee *et al.*, 2019), wobei eine verstärkte TIMP-1 Expression bereits bei den PanIN Vorläuferläsionen zu finden ist (Grünwald *et al.*, 2016; D'Costa *et al.*, 2017). Diese frühe Expression von TIMP-1 ermöglicht die Ausbildung einer prämetastatischen Nische in der Leber, die durch eine TIMP-1-bedingte Aktivierung von hepatischen Sternzellen bewirkt wird (Grünwald *et al.*, 2016). Diese Aktivierung wird über die Zytokinfunktion von TIMP-1 vermittelt, indem es an CD63 auf hepatischen Sternzellen bindet und zur Sekretion von *Stromal Cell-Derived Factor-1* (SDF-1) und einer anschließenden Einwanderung von Neutrophilen in die Leber führt (Grünwald *et al.*, 2016). Abgesehen von der pro-metastatischen Funktion von TIMP-1 sind auch direkte Effekte von TIMP-1 auf Pankreastumorzellen beschrieben worden. So schwächt TIMP-1 die Effekte von Strahlung und Chemotherapie auf Pankreastumorzellen ab (D'Costa *et al.*, 2017), induziert die Zellteilung in *Kras*^{G12D}-transformierten Tumorzellen (Botta *et al.*, 2013) und bewirkt verstärktes Tumorwachstum *in vivo* (D'Costa *et al.*, 2017) (**Abb. 1.5**). Im Gegensatz zu diesen Effekten von TIMP-1 auf Pankreastumorzellen sind Effekte von TIMP-1 auf stromale Zellen wie Immunzellen im Pankreastumor bisher kaum untersucht (**Abb. 1.5**).

1. Einleitung

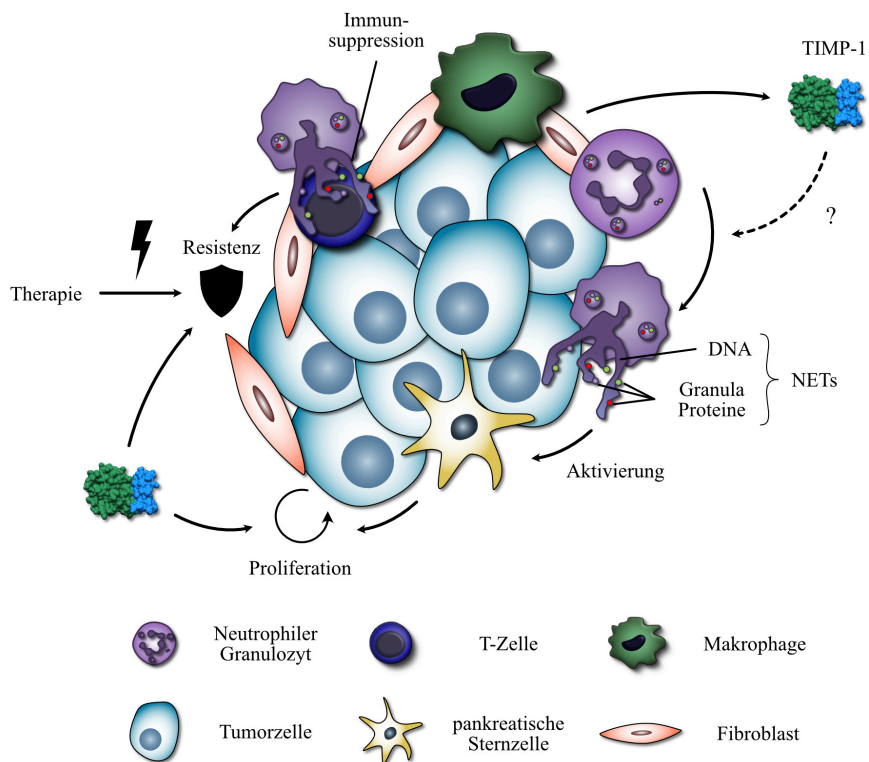


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der Effekte von TIMP-1 und NETs auf PDAC Tumorzellen.

TIMP-1 ist in erhöhten Mengen in der Tumorumgebung vorhanden und kann zur Proliferation und Therapieresistenz von PDAC Zellen beitragen. NETs führen ebenfalls zur Resistenzbildung und können zur Immunsuppression in der PDAC Umgebung beitragen. Außerdem führen NETs zur Aktivierung von pankreatischen Sternzellen, die wiederum die Proliferation von Tumorzellen fördern. Der Einfluss von TIMP-1 auf die Ausbildung von NETs ist bisher nicht bekannt. Die der Abbildung zugrunde liegenden Informationen wurden entnommen aus (Botta *et al.*, 2013; Grünwald *et al.*, 2016; D'Costa *et al.*, 2017; Miller-Ocuin *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2020)

1.3.3. Neutrophile in PDAC

Die Einwanderung von Immunzellen in Tumore und die damit einhergehende Entzündungsreaktion spielen bei der Entwicklung von Krebserkrankungen eine zentrale Rolle (Grivennikov *et al.*, 2010). Im Kontext von PDAC kommt es häufig zu einer massiven Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in das Tumorgewebe, die mit einem kürzeren Überleben der Patienten assoziiert ist (Ino *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2018). Ein Zusammenhang zwischen der Anzahl von Neutrophilen und der Prognose von PDAC Patienten konnte auch im Blut festgestellt werden, da ein erhöhtes Neutrophilen/Lymphozyten-Verhältnis mit einem kürzeren Überleben von PDAC Patienten assoziiert ist (Cheng *et al.*, 2015; Suzuki *et al.*, 2016; Piciocchi *et al.*, 2017; Ventriglia *et al.*, 2018). Obwohl die Rolle von Neutrophilen im Krebskontext sehr komplex ist und sowohl tumorfördernde, als auch tumorhemmende Funktionen

1. Einleitung

beschrieben worden sind (Coffelt *et al.*, 2016), legen diese klinischen Daten nahe, dass Neutrophile insgesamt eher eine protumorigene Wirkung im PDAC besitzen. Tatsächlich wurde bereits beschrieben, dass Neutrophile das Ablösen (Gaida *et al.*, 2012) und die Invasion (Gaida *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2019) von Pankreastumorzellen *in vitro* erhöhen können. In den letzten Jahren stellte sich zudem heraus, dass Neutrophile über die Bildung von NETs die Tumorprogression vorantreiben können. Vor allem die prometastatische Funktion von NETs stand hierbei im Fokus, die durch „Einfangen“ von Tumorzellen in der Zirkulation die Metastasierung verstärken (Cools-Lartigue *et al.*, 2013). Im Pankreastumorkontext konnten bereits NETs im Blut von Mäusen gefunden werden (Hisada *et al.*, 2019). Außerdem ist die Menge von NETs im Pankreastumor mit dem Überleben von PDAC Patienten assoziiert, wobei Patienten mit viel NETs eine schlechtere Prognose aufweisen (Jin *et al.*, 2019). Zusätzlich zur prometastatischen Funktion wurde bereits herausgefunden, dass NETs das Pankreastumorwachstum über die Aktivierung von pankreatischen Sternzellen verstärken (Miller-Ocuin *et al.*, 2019) und zur Immunsuppression und Resistenz gegenüber einer *Checkpoint Blockade*-Therapie in Pankreaskrebs führen (Zhang *et al.*, 2020) (**Abb. 1.5**). Obwohl bereits gezeigt wurde, dass Pankreastumorzellen die Bildung von NETs induzieren können (Abdol Razak *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2019), sind bisher keine tumorsezernierten Faktoren bekannt, die direkt die NET-Bildung in PDAC auslösen.

1.4. Ziel dieser Arbeit

Das multifunktionale Protein TIMP-1 ist bei vielen entzündlichen Erkrankungen verstärkt exprimiert und dabei bereits vielfach als im Blut messbarer negativer prognostischer Marker beschrieben. Jedoch ist ein möglicher funktioneller Beitrag von TIMP-1 zu entzündlichen Prozessen bislang weitgehend unbekannt. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob TIMP-1 einen direkten Effekt auf die Aktivierung von Immunzellen besitzt. Hierbei standen Neutrophile Granulozyten im Fokus, da diese die häufigste Immunzellpopulation im menschlichen Körper bilden und eine zentrale Rolle bei der Ausbildung von Entzündungen spielen. Neutrophile Granulozyten sollten mit TIMP-1 stimuliert werden und anschließend sollte die Ausbildung von NETs, sowie die intrazelluläre Aktivierung von ERK, untersucht werden. Die molekularen Mechanismen einer Aktivierung von Neutrophilen durch TIMP-1 sollten durch Verwendung von TIMP-1 Varianten und CD63-blockierenden Antikörpern aufgedeckt werden. Um den Zusammenhang zwischen TIMP-1 und NETs *in vivo* zu untersuchen, sollte die entzündliche Umgebung des PDAC analysiert werden, in der sowohl hohe Mengen an TIMP-1 als auch an Neutrophilen vorkommen. Blut- und IHC Gewebeproben vom spontanen PDAC-Mausmodell KPC und von PDAC Patienten wurden daher auf TIMP-1 und NETs hin untersucht. Um die Relevanz beider Faktoren im Kontext des PDAC festzustellen, sollte die NET-Bildung bzw. die TIMP-1 Expression in KPC Mäusen genetisch depletiert werden und das Überleben der Mäuse evaluiert werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt dieser Arbeit war die Translation der gewonnenen Erkenntnisse in die Klinik. Hierfür sollten die im Blut von PDAC Patienten bestimmten Spiegel von TIMP-1 und NET-Markern mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung in Zusammenhang gebracht werden und ein möglicher prognostischer Nutzen mit dem bekannten Biomarker *Carbohydrate Antigen 19-9* (CA19-9) verglichen werden. Zusätzlich zu den Untersuchungen von TIMP-1-vermittelten Effekten auf Neutrophile sollte der Frage nachgegangen werden, ob TIMP-1 möglicherweise über die Interaktion mit dem Rezeptor CD74 intrazelluläre Signalwege in Immunzellen aktivieren kann. Hierfür sollte die CD74-positive B-Lymphomzelllinie Namalwa mit TIMP-1 stimuliert und anschließend die Aktivierung von ZAP-70 analysiert werden. Um die beobachteten Effekte einer der beiden Domänen von TIMP-1 zuzuordnen und auf die Expression von CD74 durch die Lymphomzellen zurückzuführen, sollten einerseits TIMP-1 Varianten eingesetzt und andererseits die Expression von CD74 mittels shRNA reduziert werden. Die Untersuchung der Effekte von TIMP-1 auf Immunzellen, sowie die Identifikation der zugrunde liegenden Mechanismen, sollten das Verständnis der komplexen molekularen Funktionen von TIMP-1 verbessern und die physiologische Relevanz der Multifunktionalität von TIMP-1 beleuchten.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Firmensitz, Land
Agarose	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Absolve	PerkinElmer, Inc., Waltham, USA
p-Aminophenylmercuric Acetate (APMA)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
CD74-blockierendes Peptid (C36L1; KSSQSVFYSSNNKNYLA-NH2)	peptides&elephants GmbH, Hennigsdorf, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Cl-amidine (PAD Inhibitor)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
DMSO	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
dNTP Mix (100 mM), 25x	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Ethanol 70 % (EtOH 70 %)	Apotheker des Klinikums Rechts der Isar
Ethanol 98 % (EtOH abs.)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd 37 % (w/v)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
FS-6 substrate solution	BACHEM AG, Bubendorf, Schweiz
Glutaraldehyd 50 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Incidin perfekt	Ecolab, Wien, Österreich
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
L-Arginin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
L-Asparagin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
LEL Peptid (#33R-10413)	Fitzgerald Industries, Acton, USA
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2. Material und Methoden

Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Page Ruler vorgefärbte Proteinleiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PeqGreen DNA und RNA Farbstoff	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Pferdeserum (Gibco <i>Horse Serum</i>)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, 50x	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pierce™ ECL substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Polybren (Hexadimetribromid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
PolymorphPrep	Progen, Heidelberg, Deutschland
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Inhibitorcocktail Plus (Proteaseinhibitor, 100x)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Puromycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Roti®-Mount FluorCare (Eindeckmedium)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RT <i>Random Primers</i> (10x)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
RT Puffer (10x)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Saures Hämalun nach Meyer	Apotheke des Klinikums Rechts der Isar
SYBR <i>green</i>	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
SYPRO Ruby Protein-Blot Färbemittel	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>SYTOX™ Orange Nucleic Stain</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan (Tris)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Triton X-100	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Trizol-Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypan <i>Blue Solution</i> (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Tween20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
U0126 (MEK Inhibitor)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 sind die im Labor verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgeführt.

2. Material und Methoden

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Hersteller, Firmensitz, Land
Alufolie	Fora, Radolfzell, Deutschland
Biosphere Filter Tips (0,5-20 µl, 2-20 µl, 2-200 µl, 1250 µl)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Corning Costar 96-well <i>black plates</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Deckgläser rund (12 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Deckgläser (24 x 50 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
EDTA Monovetten (50 S-Monovetten)	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Entsorgungsbeutel	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Filter (0,45 µm)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Sterican Kanülen (20 G, 27 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Nitrozellulosemembran	Amersham Bioscience, Piscataway, USA
Objektträger (Superfrost Plus Adhesion Microscope Slides)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
PAP-Pen / Dako Pen	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Platten, 6-well, 12-well, 24-well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Platten, 96-well	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Platten, 96-well, schwarz (nunclon delta-treated)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Schraubgefäße/Kryotubes (2 ml)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Skalpell	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Spritzen (1 ml, 2 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ungestopfte Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Verschlussfolie, 96-well Platte	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2. Material und Methoden

Zellschaber (Cell Scraper M)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
------------------------------	--

2.1.3. Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Firma, Stadt, Land	exakte Bezeichnung
<i>Blotting</i> System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	Trans-Blot® Turbo Transfer System
Elektrophorese Netzgerät	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	Power Pac 300
ELISA Waschgerät	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	MODEL 1575 ImmunoWash
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland	Axio Imager M2
Gel/Membran Dokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	ChemiDoc™ imaging system
<i>Dot Blot</i> -Apparatur	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	BioDot® microfiltration apparatus
Durchflusszytometer	Sony Biotechnology Inc., Weybridge, Vereinigtes Königreich	SA3800 Spectral Analyzer
Gelkammer mit Zubehör	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	Mini Sub Cell GT
Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland	Inkubationshaube TH15
Konfokalmikroskop	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	TCS SP8 confocal microscope
Mikroskop (Zellkultur)	Carl Zeiss, Halbergmoos, Deutschland	Axiovert 25
Mikrowelle	Siemens, München, Deutschland	HF66020
Nanodrop	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, Deutschland	NanoDrop One C
Neubauer Zählkammer	Assistent, Sondheim, Deutschland	Neubauer improved
PCR <i>Cycler</i>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland	Mastercycler
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland	pH 3110

2. Material und Methoden

Real-Time PCR Gerät	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, Deutschland	StepOnePlus Real-Time PCR System
Sterilbank	Heraeus Sepatech, Düsseldorf, Deutschland	HeraSafe
Tecan Reader	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz	TECAN Spark 10M plate reader
Thermomixer	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland	Thermomixer Comfort
Tischzentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, Deutschland	Heraeus Fresco 17 Centrifuge
Tischzentrifuge	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland	Centrifuge 5415 R
Ultraschall Wasserbad	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG	Sonorex Dogotec
Vortex	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland	MS2 Minishaker
Waage	PCE Instruments, Meschede, Deutschland	LSM 2000
Wasserbad	JULABO GmbH, Seelbach, Deutschland	E-PA/KÜ
Wasserbad (Zellkultur)	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland	WNB 14
Zellkultur-Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, Deutschland	HeraCell 150i
Zentrifuge (Zellkultur)	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, Deutschland	Multifuge X Pro Series Centrifuge

2.1.4. Lösungen und Puffer

Im Folgenden sind die Lösungen und Puffer aufgeführt, die bei dieser Arbeit verwendet wurden. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen und Puffer mit ddH₂O angesetzt.

Blocklösung für Immunhistochemie 5 % (w/v) *Horse Serum* in PBS
denaturiert bei 70°C für 30 min

Blocklösung für Western Blot 5 % (w/v) BSA in TBST

2. Material und Methoden

Blottingpuffer	0,3 % (w/v) Tris 1,12 % (w/v) Glycin 10 % (v/v) Methanol
<i>Dot Blot Assay Buffer</i>	1x TBS
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycine 1 % (w/v) SDS
FACS Puffer	PBS + 1 % <i>Fetal Calf Serum</i> (FCS) + 2 mM EDTA
Fixierlösung für Organe	54 ml 37 % Formaldehyd mit 1x PBS auf 1 Liter auffüllen
Laemmli Puffer	0,2 M (w/v) Tris 0,03 % (w/v) SDS 0,07 % (w/v) Glycerin 0,002 % (w/v) Bromphenolblau 0,05 % (v/v) β -Mercaptoethanol
Nicht-denaturierender Zellysepuffer:	20 mM Tris HCl pH 8,0 137 mM NaCl 1 % Triton X-100 2 mM EDTA
PBST:	PBS pH 7,4 0,02 % Tween-20
RIPA Lysepuffer	50 mM Tris/HCl pH 7,4 150 mM NaCl 0,25 % SDS 1 % NP-40 1 mM EDTA Proteaseinhibitor (1x) Phosphataseinhibitor (1x)

2. Material und Methoden

RNA Ladepuffer	0,5 % (w/v) Bromphenolblau 20 mM H ₂ O ₂ 20 % (v/v) Glycerin
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris pH 6,8
TAE Puffer (1x)	40 mM Tris-Base 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA
TBS	500 mM Tris-Base 1,5 M NaCl pH-Wert auf 7,6 einstellen
TBST	1x TBS 0,1 % (v/v) Tween 20
TNC Puffer	50 mM Tris/HCl pH 7,5 10 mM CaCl ₂ 150 mM NaCl 0,05 % (w/v) Brij35

2.1.5. Primer

Tabelle 4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer zu entnehmen.

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer

Zielgen	Primer-Name	Primersequenz	Probe
CD74	CD74_Fwd	ggtgtgaccaagcaggatct	#84
CD74	CD74_Rev	tggcaggatgttgaagacc	#84

2. Material und Methoden

2.1.6. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind Tabelle 5 zu entnehmen.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Verwendung	Bezugsquelle
pLKO.1/shCD74 #1 (TRCN0000008636) Zielsequenz: CGCGACCTTATCTCCAACAAT	Transferplasmid, CD74 <i>knockdown</i>	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pLKO.1/shCD74 #2 (TRCN0000008635) Zielsequenz: CCACACAGCTACAGCTTTCTT	Transferplasmid, CD74 <i>knockdown</i>	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pLKO.1/shCD74 #3 (TRCN0000008639) Zielsequenz: GACCATAGACTGGAAGGTCTT	Transferplasmid, CD74 <i>knockdown</i>	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pLKO.1/shNT Negativkontrolle, hat kein bekanntes humanes oder murines Gen als Ziel	Transferplasmid, non- targeting Kontrolle	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pMD.GP	Verpackungsplasmid, kodiert für gag und pol	Klinikum rechts der Isar, München
pRSV-rev	Verpackungsplasmid, kodiert für rev	Klinikum rechts der Isar, München
pMD.G	Verpackungsplasmid, kodiert für env aus VSVG	Klinikum rechts der Isar, München

2.1.7. Antikörper

In Tabelle 6 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper, in Tabelle 7 die verwendeten Sekundärantikörper, die eingesetzte Verdünnung, sowie die Bestellnummer und die Bezugsquelle aufgeführt.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Antigen	Anwendung	Verwendete Verdünnung	Bestellnummer	Bezugsquelle
CD63	<i>Dot Blot</i>	1:1000	#sc-5275	Santa Cruz Biotechnology
CD63	Durchflusszytometrie (PE-Cy7)	1:50	#25-0639-42	Thermo Fisher Scientific
CD63	<i>In vitro</i> Blockade der TIMP-1/CD63 Interaktion	5 µg/ml	#sc-5275	Santa Cruz Biotechnology
CD74	Durchflusszytometrie (FITC)	1:50	#11-0748-42	Thermo Fisher Scientific
CD74	Western Blot	1:1000	#sc-20082	Santa Cruz Biotechnology
Citrulliniertes Histone H3	Immunhistochemie/ Immunzytochemie	1:200	#ab5103	Abcam
dsDNA	ELISA	1:2000	#ab27156	Abcam
GAPDH	Western Blot	1:1000	#97166	Cell Signaling Technology
IgG Kontrolle	<i>In vitro</i> Blockade der TIMP-1/CD63 Interaktion	5 µg/ml	#sc-3877	Santa Cruz Biotechnology
Myeloperoxidase	ELISA	5 µg/ml	#AF3667	R&D Systems
Myeloperoxidase	Immunhistochemie/ Immunzytochemie	1:200	#AF3667	R&D Systems
Neutrophile Elastase	Immunzytochemie	1:200	#ab21595	Abcam
P-p44/42 MAPK / ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	Western Blot	1:1000	#5301	Cell Signaling Technology
P-ZAP-70 (Tyr319)	Western Blot	1:1000	#2701S	Cell Signaling Technology
TIMP-1	Immunhistochemie/ Immunzytochemie	15 µg/ml	#MAB970	R&D Systems

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Anwendung	Antigen	Kopplung	Verwendete Verdünnung	Bestellnummer	Bezugsquelle
ELISA	Maus-IgG	HRP	1:3000	#31432	Thermo Fisher Scientific
Immunhistochemie/ Immuncytochemie	Kaninchen-IgG	AlexaFluor546	1:500	#A10040	Thermo Fisher Scientific
Immunhistochemie/ Immuncytochemie	Maus-IgG	DyLight650	1:500	#SA5-10169	Thermo Fisher Scientific
Immunhistochemie/ Immuncytochemie	Ziegen-IgG	DyLight650	1:500	#SA5-10089	Thermo Fisher Scientific
Immunhistochemie/ Immuncytochemie	Ziegen-IgG	FITC	1:500	#sc-2024	Santa Cruz Biotechnology
Western Blot	Kaninchen-IgG	HRP	1:5000	#31462	Thermo Fisher Scientific
Western Blot	Maus-IgG	HRP	1:5000	#31432	Thermo Fisher Scientific

2.1.8. Rekombinante Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine sind in Tabelle 8 aufgeführt. Rekombinantes humanes TIMP-1 und N-TIMP-1 wurden von M.Sc. Daniel Häußler (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) in einem endotoxinfreien Zellkultursystem in HEK293F Zellen produziert und anschließend unter Verwendung eines *Äktapure Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)-Systems gereinigt.

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten rekombinanten Proteine

Rekombinantes Protein	Bestellnummer	Bezugsquelle
GM-CSF	#130-093-868	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Humanes Serumalbumin	#A9731-1G	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
IFN- γ	#570202	Biologend, San Diego, USA
<i>Micrococcal Nuclease</i> (MNase)	#88216	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
MMP-9	-	Ghislain Opendakker, KU Leuven, Belgien
N-TIMP-1	-	Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland

2. Material und Methoden

TIMP-1	-	Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
TNF- α	#570104	Biologend, San Diego, USA

2.1.9. Verwendete Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Kits

Anwendung	Bezeichnung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Bestimmung der Proteinkonzentration	Pierce™ BCA Protein Assay Kit	#23225	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
ELISA	DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2	#DY008	R&D Systems, Minneapolis, USA
Fluoreszenzmarkierung TIMP-1	Alexa Fluor® 488 Microscale Protein Labeling Kit	#A30006	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RT-qPCR	FastStart high fidelity PCR System, dNTPack	#4738284001	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
RT-qPCR	FastStart Universal Probe Master (Rox)	#4913949001	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
RT-qPCR	Eukaryotic 18S rRNA Endogenous Control	#4310893E	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Reverse Transkription	High-Capacity Reverse Transcription Kit	#4368814	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

2.1.10. Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software ist in Tabelle 10 aufgeführt. Für die Darstellung der Molekülstrukturen von TIMP-1 (PDB ID: 1UEA, (Gomis-Rüth *et al.*, 1997)), CD74 (PDB ID: 1HIE, (Jasanoff *et al.*, 1998)), MIF (PDB ID: 1MIF, (Sun *et al.*, 1996)), proMMP-9 (PDB ID: 1L6J, (Elkins *et al.*, 2002)) und TNF- α (PDB ID: 1TNF, (Eck und Sprang, 1989)) wurden die Programme UCSF Chimera (Pettersen *et al.*, 2004), Mol* Viewer (Sehnal *et al.*, 2021) und die RCSB Protein Data Bank (PDB) verwendet.

Tabelle 10: Übersicht über die verwendete Software

Software, Version	Hersteller, Land
Affinity Designer 1.10.3	Serif, Großbritannien
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland
Citavi 6	Swiss Academic Software, Schweiz
FlowJo Software 10.8.0	Tree Star Inc., USA
GraphPad Prism 9.3.0	Graphpad Software Inc, USA
ImageLab Software 5.2.1	BioRad Laboratories Inc., USA
Imaris 9.3.1	Oxford Instruments, Vereinigtes Königreich
Microsoft Office 2016	Microsoft, USA
Mol* Viewer	RCSB PDB, USA
R Software 2.13.0	R Foundation for Statistical Computing, Österreich
SPSS version 24.0	IBM, USA
StepOne Software v.2.3	Applied Biosystems, Deutschland
UCSF Chimera 1.16	UCSF, USA

2.2. Patientenproben

2.2.1. Verwendete Gewebe

Blutproben von gesunden Spendern und PDAC Patienten wurden in einem EDTA-Röhrchen gesammelt und umgehend durch vorsichtiges Invertieren gemischt. Die Blutproben wurden anschließend für 15 min bei 2000 x g und 15°C zentrifugiert, das Plasma wurde abgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80°C bis zur weiteren Analyse. Gewebeproben von PDAC Patienten (fixiert in Formalin und eingebettet in Paraffin) aus dem Klinikum rechts der Isar, München, wurden von der Gewebebank (MTBIO) zur Verfügung gestellt. Zur Bestimmung der *Cancer Antigen 19-9* (CA19-9)-Spiegel wurde Blut in Serumröhrchen entnommen und anschließend vom Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Klinikum rechts der Isar, München, gemäß standardisierter Verfahren untersucht.

2.2.2. Klinische Daten und Patientenkohorte

Diese Studie wurde vom Ethik-Komitee der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München genehmigt (#403/17S). Als klinischer Endpunkt bei der Überlebensanalyse wurde das 1-Jahres-Überleben festgelegt. Alle eingeschlossenen Patienten waren frei von bakteriellen Infektionen zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Die TIMP-1 und NET Plasmaspiegel waren nicht auf Unterschiede in der Behandlung der Patienten zurückzuführen, da beide Parameter sich nicht signifikant zwischen vor

2. Material und Methoden

der Blutentnahme bereits behandelten (*pretreated*) und bis zur Blutentnahme unbehandelten (*treatment-naive*) Patienten unterschieden (**Abb. 2.1 A und B**).

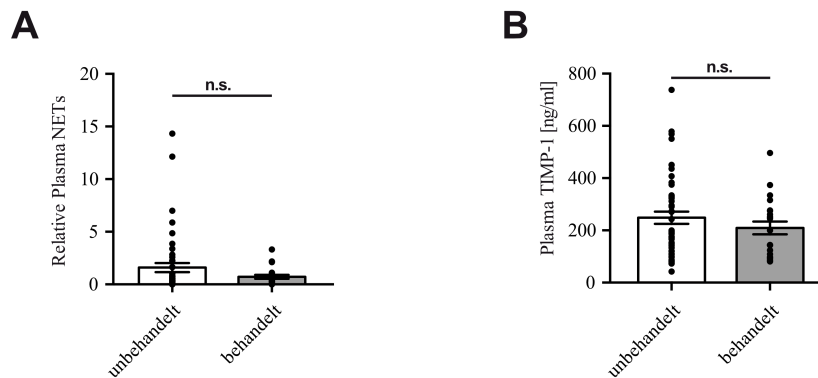


Abbildung 2.1: Charakterisierung der Patientenkohorte. Die Plasmaspiegel von NETs (A) und TIMP-1 (B) unterscheiden sich nicht zwischen behandelten und unbehandelten Patienten. Abkürzungen: n.s. = nicht signifikant. Übernommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

Weitere Informationen über die Patientenkohorte sind Tabelle 11 zu entnehmen. Das Alter der Patienten lag zwischen 42 und 88 Jahren (Median 70 Jahre).

Tabelle 11: Informationen über die Patientenkohorte.

	Anzahl	Prozent
Gesamtzahl der Patienten	68	100,0
Weiblich	39	57,4
Männlich	29	42,6
UICC stage, 8. Edition		
IA	4	5,9
IB	1	1,5
IIA	2	2,9
IIB	26	38,2
III	11	16,2
IV	24	35,3
PDAC Behandlung		
Keine Vorbehandlung	47	69,1
Resektion, keine Chemotherapie	8	11,8
Resektion plus adjuvante Chemotherapie	20	29,4
Chemotherapie, keine Resektion	19	27,9
Vorbehandelte Patienten (Chemotherapie)	21	30,9
Resektion plus neoadjuvante Chemotherapie	5	7,4
Resektion plus neoadjuvante und adjuvante Chemotherapie	7	10,3
Chemotherapie, keine Resektion	9	13,2

2.3. Tierexperimente

Um den Einfluss von TIMP-1 auf die NET-Bildung *in vivo* zu untersuchen, sowie den Einfluss beider Faktoren auf die PDAC Progression, wurden genetisch manipulierte Mäuse gezüchtet und untersucht.

2.3.1. Verwendete Versuchstiere

Weibliche und männliche Mäuse wurden unter *Specific-Pathogen-Free* (SPF)-Standardbedingungen im Tierstall des Zentrums für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar gehalten. Die Pflege der Tiere erfolgte durch speziell geschultes Personal.

2.3.1.1. Mäuse aus eigener Zucht

Als Mausmodell für PDAC diente das bereits gut beschriebene KPC-Mausmodell ($Pdx-I^{+/Cre}$; $Kras^{+/LSL-G12D}$; $Trp53^{+/LSL-R172H}$) (Hingorani *et al.*, 2005). Diese Mäuse weisen die aktivierende Punktmutation G12D im Onkogen *Kras*, sowie eine *gain of function* Punktmutation (R172H) (Olive *et al.*, 2004) im Tumorsuppressorgen *Trp53*, auf. Die Mutationen wurden in den endogenen *Kras* bzw. *Trp53* Genlokus eingefügt (Hingorani *et al.*, 2005). Um eine konditionale Expression zu ermöglichen, wurde eine *Lox-STOP-Lox* (LSL)-Kassette in den murinen *Kras* Locus stromaufwärts des modifizierten Exon 1 (Hingorani *et al.*, 2003), bzw. in Intron 1 des modifizierten murinen *Trp53* Gens (Olive *et al.*, 2004) eingefügt. Die Expression der Cre Rekombinase wird durch den pankreasspezifischen *Pdx1*-Promotor reguliert (Hingorani *et al.*, 2003) und damit werden die beiden Mutationen nur im Pankreas exprimiert, wo sie zur spontanen Ausbildung von Karzinomen führen. Da die beiden Mutationen jeweils nur ein Allel betreffen, erfolgt die Expression der jeweiligen Punktmutation in Gegenwart des wildtyp Allels und Gewebe ohne Cre Expression bleiben funktionell heterozygot (Hingorani *et al.*, 2005). Die bei der Zucht der KPC Linie anfallenden Mäuse, die keine $Pdx-I^{+/Cre}$, sondern nur $Kras^{+/LSL-G12D}$ und/oder $Trp53^{+/LSL-R172H}$ -Mutationen, nur eine $Pdx-I^{+/Cre}$ oder aber gar keine Mutation trugen, wurden als Kontrolltiere verwendet.

2.3.1.2. Mäuse von kommerziellen Anbietern

Um den Einfluss von TIMP-1 und NETs in PDAC zu untersuchen, wurden die beschriebenen KPC Mäuse mit TIMP-1-defizienten (C57BL/6.129S4-*Timp-1*^{tm1Pds/J}) (Soloway *et al.*, 1996), bezogen von *The Jackson Laboratory*, Maine, USA) bzw. PAD4-defizienten (B6.Cg-*Padi4*^{tm1.1Kmw/J}) (Hemmers *et al.*, 2011), bezogen von *The Jackson Laboratory*, Maine, USA) Mäusen gekreuzt.

2. Material und Methoden

2.3.2. Probennahme

Mäuse, die tumorbedingte ethische Abbruchkriterien erreicht hatten, wurden mittels einer Überdosis Isofluran getötet. Es folgte eine Blutentnahme aus der Bauchvene (*Vena cava inferior*) mit einer EDTA-gespülten Spritze. Das Blut wurde anschließend bei 500 x g bei 4°C für 5 min zentrifugiert, das Plasma abgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Repräsentative Stücke des Pankreas wurden in Schraubgefäßen ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert. Für die histologische Analyse wurden repräsentative Bereiche des Pankreas zudem für 48 h bei 4°C in Fixierlösung inkubiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

2.4. Histologische Methoden

2.4.1. Paraffineinbettung von Organen

Die Entwässerung der Proben, sowie die Einbettung der Organe in Paraffin wurden unter Standardbedingungen vom Institut für Pathologie der Technischen Universität München durchgeführt.

2.4.2. Herstellung, Färbung und Analyse von Paraffinschnitten

2 µm oder 15 µm Paraffin-Serienschnitte von PDAC Patienten oder KPC Mäusen wurden mit einem Automatik-Mikrotom hergestellt und anschließend mittels Hematoxylin-Eosin (H&E)-Färbung untersucht. Die H&E-Färbung wurde an entparaffinierten Schnitten unter Verwendung von Mayer's Haemalaun und Eosin nach einem standardisierten Protokoll durchgeführt. Die H&E-Färbung und die Herstellung der Serienschnitte erfolgte durch das Institut für Pathologie, Technische Universität München. Zur Färbung von NETs wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und rehydriert. Es folgten eine Antigendemaskierung in einem 0,01 M Citratpuffer in der Mikrowelle bei 600 Watt für zweimal 6 min, das Waschen in ddH₂O und PBS, sowie die Permeabilisierung in 0,5 % Triton X-100 in PBS für 5 min. Das Gewebestück wurde anschließend mit PBS gewaschen, einem *PAP-pen* umrundet und in Blocklösung für 1 h bei RT inkubiert. Nun wurden die Schnitte mit Primärantikörpern gegen humane/murine Myeloperoxidase, humanes/murines citrulliniertes Histon H3, und ggf. gegen humanes TIMP-1 über Nacht bei 37°C inkubiert. Es folgten drei Waschschritte in PBS-T und drei Waschschritte in PBS, sowie eine Inkubation mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern für 1 h bei RT im Dunkeln. Die DNA wurde anschließend mittels 50 µg/ml DAPI für 15 min bei RT im Dunkeln gefärbt. Daraufhin wurden die Schnitte mit Eindeckmedium eingedeckt und am TCS SP8 konfokalen Mikroskop oder am Axio Imager M2 analysiert. Um die Fläche von NETs in Bereiche mit hohen oder niedrigen TIMP-1-Spiegeln zu analysieren, wurden NETs als Kolo-kalisation von MPO, citH3 und DNA definiert und deren Fläche anschließend in Bereichen mit TIMP-1 Signal unter bzw. über einem bestimmten Schwellenwert verglichen (Schwellenwert zur Unterscheidung zwischen TIMP-

2. Material und Methoden

I^{high} und $\text{TIMP-1}^{\text{low}} = 20$). Diese Analyse wurde mittels Imaris 9.3.1 durchgeführt. Für die Analyse der murinen KPC Schnitte wurden das Vorhandensein von Neutrophilen (MPO-positive Zellen) und NET-positiven Neutrophilen (MPO und citH3 positiv) manuell ermittelt und der Mittelwert für jede Maus aus mindestens drei unterschiedlichen, repräsentativen Bildern gebildet.

2.4.3. Klassifikation der Tumore

Die Klassifikation der Tumore der KPC Tiere erfolgte anhand von Hematoxylin-Eosin (H&E) gefärbten Tumorschnitten. Das Grading wurde von einer erfahrenen Pathologin (PD Dr. Katja Steiger, Institut für Pathologie, Technische Universität München) gemäß aktueller Klassifikationsvereinbarungen (Hruban *et al.*, 2006) verblindet durchgeführt. Um einen Vergleich zwischen den verschiedenen tumor erkrankten Mäusen zu ermöglichen, wurden nur KPC Mäuse mit Tumor-Grading G2 und G3, also mit fortgeschrittenen PDAC Tumoren, für die weitere Analyse verwendet (**Abb. 2.2**).

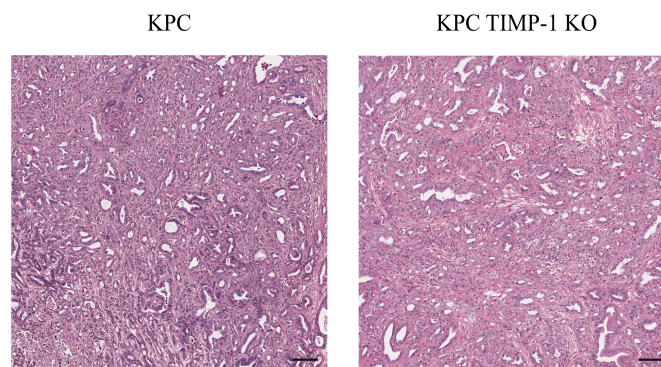


Abbildung 2.2: Repräsentative H&E Färbung von Pankreastumorgewebe aus KPC Mäusen mit fortgeschrittenem PDAC. Maßstabsbalken: 100 μm . Die Bilder wurden von PD Dr. Katja Steiger (Institut für Pathologie, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Übernommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

2.4.4. Kaplan-Meier Analyse der KPC Tiere

Zur Untersuchung des Überlebens der Mäuse wurden die Tiere anhand der Richtlinien des Tierversuchsantrags beurteilt und Mäuse, die tumorbedingte ethische Abbruchkriterien erreicht haben, wurden erlöst. Das erreichte Alter dieser Mäuse (in Wochen) wurde als Überlebenszeit festgelegt und in der Kaplan-Meier Analyse wurden diese Tiere als tot (Ereignis eingetreten) vermerkt. KPC Mäuse, die wegen nicht tumorbedingten ethischen Abbruchkriterien erlöst werden mussten, wurden ebenfalls in die Kaplan-Meier Analyse eingeschlossen, jedoch als lebend (Ereignis nicht eingetreten) vermerkt und zensiert.

2.5. Methoden der Zellkultur

2.5.1. Isolation von Neutrophilen Granulozyten aus Spenderblut

Neutrophile Granulozyten wurden aus humanem Spenderblut isoliert, analog zu einem Protokoll von Wilhelmsen *et al.* (Wilhelmsen *et al.*, 2013). Hierfür wurden 5 ml EDTA Blut vorsichtig über 5 ml PolymorphPrep Lösung in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen geschichtet und anschließend bei 450 x g für 30 min bei 20°C zentrifugiert, wobei die Brems- und Beschleunigungsgeschwindigkeiten der Zentrifuge auf das Minimum eingestellt wurden. Anschließend wurden die Plasma- und obere Leukozytenschicht, die *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) beinhaltet, abgesaugt und verworfen. Die verbleibende Neutrophilenschicht von bis zu fünf 15 ml Zentrifugenröhrchen wurde anschließend mittels einer 2 ml serologischen Pipette vorsichtig abgenommen, in 30 ml PBS gegeben und auf 50 ml Gesamtvolumen mit PBS aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 450 x g und 20°C. Daraufhin wurde das Zellpellet in 9 ml eiskaltem ddH₂O vorsichtig resuspendiert, um die verbliebenen Erythrozyten zu entfernen, und sofort 1 ml 10x PBS hinzugegeben, um den Lyseprozess abzustoppen. Das Volumen wurde mit PBS auf 20 ml erhöht und die Zellen bei 250 x g und 20°C für 5 min zentrifugiert. Die Neutrophilen wurden anschließend mit 10 ml PBS gewaschen und in 10 ml RPMI-1640 Medium resuspendiert, gezählt und auf eine Konzentration von 1×10^6 Zellen eingestellt.

2.5.2. Stimulation von Neutrophilen Granulozyten zur Analyse von NETs

5×10^5 Neutrophile Granulozyten wurden auf sterilen Deckgläsern in 24-well Platten ausgesät und für 1 h bei 37°C inkubiert, um die Adhäsion zu ermöglichen. Anschließend wurden die Neutrophilen, falls nicht anders beschrieben, mit 500 ng/ml rekombinanten humanem TIMP-1, equimolaren Mengen an N-TIMP-1, oder den angegebenen Konzentrationen von PMA inkubiert. Die Stimulationen erfolgten in RPMI-1640 mit 0,3 % rekombinanten humanem Serumalbumin (HSA), falls nicht anders angegeben, für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂. Für Inhibitionsexperimente wurden Neutrophile mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD63, einem Isotyp-Kontrollantikörper, dem PAD4 Inhibitor Cl-amidine oder dem MEK Inhibitor U0126 für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Dieser Vorinkubation folgte eine Stimulation mit TIMP-1. Um die Interaktion zwischen TIMP-1 und CD63 zu blockieren, wurden bei bestimmten Versuchen außerdem 500 ng/ml TIMP-1 mit 21,74 nM eines synthetischen Peptides, das die Aminosäuren 152-201 der großen extrazellulären Schleife von CD63 nachbildet, für 30 min bei 37°C und 5 % CO₂ in RPMI-1640 mit 0,3 % HSA inkubiert. Das Verhältnis von TIMP-1 zu LEL betrug damit ungefähr 1:1. Nach dieser Vorinkubation wurden die Neutrophilen Granulozyten dann mit der TIMP-1/Peptidmischung für 4 h bei 37°C und 5 % CO₂ stimuliert. Für Stimulationen in Gegenwart von Plasma der Neutrophilenspender wurde dieses isoliert und für 15 min bei 5000 x g zentrifugiert. Nachdem die

2. Material und Methoden

Neutrophilen ausgesät worden sind, wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit dem entsprechenden Plasma, mit oder ohne Zugabe von 500 ng/ml TIMP-1, behandelt.

2.5.3. Priming von Neutrophilen Granulozyten

Nachdem die Neutrophilen Granulozyten ausgesät worden sind, wurde das Medium mit *Priming*-Medium ersetzt. Dieses bestand aus RPMI-1640 mit 0,3 % HSA und entweder 10 ng/ml rekombinantem humanem TNF- α , 50 units/ml IFN- γ oder 25 ng/ml GM-CSF. Nach 15-minütiger Inkubation in diesem Medium wurde entweder die Oberflächenexpression von CD63 bestimmt, oder die Neutrophilen wurden für 4 h wie beschrieben mit TIMP-1 stimuliert und anschließend die NET-Bildung gemessen.

2.5.4. Stimulation der Neutrophilen Granulozyten und anschließende Proteinisolation zur Signalwegsanalyse

3×10^6 Neutrophile wurden in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Adhäsion der Neutrophilen zu ermöglichen. Es folgte eine Stimulation der Neutrophilen für 10 min 37°C und 5 % CO₂, in RPMI-1640 mit 0,3% HSA und 500 ng/ml TIMP-1 oder equimolaren Mengen an N-TIMP-1. Bei den Inhibitionsexperimenten ging der Stimulation eine Inkubation mit monoklonalen Antikörpern gegen CD63, Isotyp-Kontrollantikörpern oder dem Inhibitor U0126 für 30 min bei 37°C und 5% CO₂ voraus. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und 40 μ l RIPA Zellysepuffer pro Schale hinzugegeben. Die Zellen wurden abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und auf Eis gestellt. Es folgte eine dreimalige Ultraschallbehandlung für 10 s, mit jeweils 10 s Pausen auf Eis. Anschließend wurden die Proteinlysate für insgesamt 30 min alle 5 min für 30 s gevortext. Die Proteinproben wurden dann bis zur weiteren Analyse bei – 80°C gelagert.

2.5.5. Verwendete Zelllinien

HEK293T

HEK293T-Zellen sind aus HEK293-Zellen hervorgegangen, in die das Gen für das SV40 *large* T-Antigen eingebracht wurde (DuBridge *et al.*, 1987). Die sogenannten human embryonic kidney (HEK) 293-Zellen wurden aus humanem embryonalem Nierengewebe gewonnen und anschließend mit Fragmenten des Adenovirus Typ 5 Genoms transformiert (Graham *et al.*, 1977). Die Expression des SV40 *large* T-Antigens ist Voraussetzung für die Produktion von Plasmiden, die einen SV40 Replikationsursprung tragen, weshalb sie für die Produktion der lentiviralen Vektoren in dieser Arbeit herangezogen wurden.

LX-2

Die hepatische Sternzelllinie LX-2 entstand aus spontaner Immortalisierung von primären humanen hepatischen Sternzellen in serumfreiem Medium (Xu *et al.*, 2005).

Namalwa

Die humane Burkitt-Lymphom Zelllinie Namalwa wurde aus der Tumormasse eines Jungen mit Burkitt-Lymphom isoliert (Klein *et al.*, 1972).

2.5.6. Kultivierung der Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden routinemäßig dreimal pro Woche durch Katja Honert (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) passagiert, um einen gleichmäßigen Wachstumszyklus zu erhalten. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Brutschränken bei 37°C und 5% CO₂. Folgende Kulturmedien wurden verwendet:

HEK293T: DMEM mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 10 mM HEPES, 2,7 mM L-Asparagin und 0,66 mM L-Arginin

LX-2: DMEM mit 2 % FCS, 1 % Glutamin und 2 % Penicillin/Streptomycin

Namalwa: RPMI-1640 mit 7,5 % FCS

Die zur Kultivierung der Zellen verwendeten Lösungen sowie deren Bezugsquelle sind in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Zellkulturlösungen

Lösung	Bezugsquelle
<i>Dulbeccos modified eagle medium</i> (DMEM)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
<i>Fetal Calf Serum</i> (FCS)	CellSystems, St. Katharinen, Deutschland
Gibco Opti-Mem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hepes	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MEM 10x	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
RPMI-1640	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (0,02% (w/v) EDTA, 0,05% (w/v) Trypsin, pH 7,4)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.5.7. Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer

Zur Zählung der Zellen wurden 100 µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau gemischt und hiervon 10 µl in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden die Zellen in vier Großquadraten unter dem Mikroskop ausgezählt und mittels folgender Formel die Zellzahl in der Suspension bestimmt:

$$\text{Zellzahl pro ml Zellsuspension} = \frac{\text{Summe der Zellen in den vier Großquadraten}}{2} \times \frac{10^4}{\text{ml}}$$

$$\text{Absolute Zellzahl} = \text{Zellzahl pro ml Zellsuspension} \times \text{Volumen der Zellsuspension}$$

2.5.8. Stimulation der Namalwa Zellen und anschließende Proteinisolation zur Signalwegsanalyse

Die Namalwa Zellen wurden vor der Stimulation für 24 h in serumfreiem Medium mit 0,1 % BSA kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 10 min pathophysiologischen TIMP-1-Spiegeln ausgesetzt (500 ng/ml), equimolaren Mengen an N-TIMP-1 (392 ng/ml), oder 100 ng/ml MIF. Um mit der TIMP-1/CD74 Interaktion zu interferieren, wurden die Zellen mit 200 µM des CD74-blockierenden Peptids C36L1 (Figueiredo *et al.*, 2018) für 6 h inkubiert, bevor sie für 10 min mit TIMP-1 stimuliert wurden. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und 40 µl RIPA Zellysepuffer pro Schale hinzugegeben. Die Zellen wurden abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß übertragen und auf Eis gestellt. Es folgte eine dreimalige Ultraschallbehandlung für jeweils 10 s, mit jeweils 10 s Pausen auf Eis. Die Proteinproben wurden dann bis zur weiteren Analyse bei – 80°C gelagert.

2.5.9. Generierung von CD74 knockdown Zellen

Einen Tag vor der Kotransfektion wurden 5 x 10⁶ HEK293T Zellen in 10 cm Schalen ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium gewechselt und die Kotransfektion mit den lentiviralen Transferplasmiden, zusammen mit den lentiviralen Verpackungsplasmiden, durchgeführt. Die hierfür verwendeten Plasmide sind Tabelle 5 zu entnehmen. Ein Plasmid mit shRNA, die keine bekanntes humanes oder murines Gen als Ziel hat (shNT) diente als Kontrolle. Für die Kotransfektion wurden 36 µl *Lipofectamine 2000* mit 1,5 ml OptiMEM Medium gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden das jeweilige Transferplasmid und das benötigte Gemisch aus Verpackungsplasmiden ebenfalls in 1,5 ml OptiMEM pipettiert. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium von den HEK293T Zellen abgenommen und durch 5 ml OptiMEM mit 10% FCS ersetzt. Nun wurde die DNA-*Lipofectamine 2000*-Mischung tropfenweise auf die HEK293T Zellen gegeben. 6 h später wurde das Medium

2. Material und Methoden

abgesaugt und mit 10 ml frischem HEK293T Medium ersetzt. Nach zwei Tagen wurde der Überstand abgenommen und mit einem 0,45 µm Filter filtriert. Die lentiviralen Partikel wurden anschließend bei – 80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Zielzellen (Namalwa) wurden mit den lentiviralen Partikeln in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren infiziert und die anschließende Selektion mit 10 µg/ml Puromycin durchgeführt. Die Selektion war abgeschlossen, wenn alle Zellen der nicht infizierten Kontrolle vollständig gestorben waren.

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. Färbung von *Neutrophil Extracellular Traps*

Zur Färbung von NETs mit Antikörpern wurden die primären Neutrophilen nach deren Stimulation mit 4 % Formaldehyd für 1 h bei RT fixiert, zweimal mit PBS gewaschen, anschließend mit 0,5 % Triton X-100 für 10 min gewaschen und dann für 30 min in 1 % BSA, 2 % FCS in PBS und für 30 min in 5 % *Horse Serum* in PBS geblockt. Anschließend wurden die Neutrophilen mit Antikörpern gegen Myeloperoxidase und Neutrophile Elastase bzw. citrulliniertem Histone H3 über Nacht bei 4°C inkubiert. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBS und die anschließende Färbung mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundäantikörpern und DAPI (50 µg/ml) für 40 min bei RT im Dunkeln. Die verwendeten Antikörper sind Tabelle 6 und Tabelle 7 zu entnehmen. Anschließend wurden die Glasplättchen mit jeweils 4 µl Eindeckmedium auf einem Objektträger eingedeckt und nach dem Trocknen mit dem TCS SP8 konfokalen Mikroskop oder dem Axio Imager M2 untersucht.

Zur Färbung der DNA-positiven Fläche als Marker für die NET-Bildung wurden die Neutrophilen nach Stimulation für 20 min mit 4 % Formaldehyd bei RT fixiert, anschließend mit PBS gewaschen und mit 50 µg/ml DAPI und 5 µM *SYTOX™ Orange Nucleic Stain* für 20 min bei RT im Dunkeln gefärbt. Anschließend wurden die Glasplättchen mit jeweils 4 µl Eindeckmedium auf einem Objektträger eingedeckt und nach dem Trocknen mit dem Axio Imager M2 untersucht. Es wurden 5 Bilder pro *well* mit einem 20x Objektiv und einer Belichtungszeit von 40 ms aufgenommen. Anschließend wurde die NET-Bildung mit Hilfe des Programmes CellProfiler automatisiert ausgewertet.

2.6.2. Detektion von NETs im Überstand

Um die NET-Bildung im Überstand der Neutrophilen nachzuweisen, wurden 2 x 10⁶ Neutrophile pro *well* einer 24-*well* Platte ausgesät und für 1 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, um die Adhäsion der Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurden die Neutrophilen wie beschrieben stimuliert und die zellfreie DNA im Überstand, angelehnt an ein Protokoll von Hazeldine *et al.* (Hazeldine *et al.*, 2014), bestimmt. Hierfür wurden, nach der vierstündigen Stimulation, 1 U/ml *micrococcal nuclease* (MNase) und 1 µM *SYTOX Orange* zu den Zellen gegeben und diese für 10 min bei RT inkubiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und bei 300 x g für 5 min zentrifugiert, um die verbleibenden Zellen

2. Material und Methoden

zu entfernen. Die DNA-Menge im Überstand wurde dann mit Hilfe des Fluorometers (Anregung: 535 nm, Emission: 580 nm) bestimmt. Die Hintergrundfluoreszenz, bestimmt durch Zugabe von *SYTOX Orange* zu Stimulationsmedium ohne Zellen, wurde anschließend von allen Proben abgezogen.

2.6.3. Durchflusszytometrie

Die Analyse der Oberflächenexpression von CD63 auf Neutrophilen, sowie die Bindung von TIMP-1 an Neutrophile, erfolgten mittels Durchflusszytometrie. Hierfür wurden 5×10^5 Neutrophile in einer *96-well v-bottom* Platte in RPMI-1640 mit 0,3 % HSA ausgesät. 100 µg TIMP-1 wurden mittels *Alexa Fluor® 488 Microscale Protein Labeling Kit* entsprechend den Herstellerangaben fluoreszenzmarkiert. Anschließend wurden 0,75 µl des resultierenden Eluats (150 µl) zu den Zellen gegeben und für 30 min bei 37°C im Dunklen inkubiert. Es folgten ein Waschschrift mit PBS und eine Zentrifugation bei RT und 500 x g für 5 min. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 4°C im Dunkeln mit fluoreszenzmarkierten anti-CD63 Antikörpern inkubiert. Nach dieser Färbung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, anschließend in FACS Puffer mit 1 % NaN_3 resuspendiert und im SA3800 Spectral Analyzer untersucht. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels FlowJo Software, wobei Zellbruchstücke von der Analyse ausgeschlossen wurden.

2.6.4. Dot Blot Assay

Die Interaktion zwischen TIMP-1 und CD63 von humanen Neutrophilen wurde unter Verwendung eines chemilumineszenten *Dot Blot Assay* von M.Sc. Celina Eckfeld (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) analysiert. Hierfür wurde eine Nitrozellulosemembran mit 6,7 µg rekombinatem TIMP-1, gelöst in Assay Puffer, oder nur Assay Puffer (Negativkontrolle), unter Verwendung des *BioDot® microfiltration apparatus* den Herstellerangaben gemäß inkubiert. Die Membranen wurden anschließend mit 5 % BSA in TBST geblockt und bei 4°C über Nacht mit 20 µg/ml Zellysat von primären humanen Neutrophilen inkubiert. Dieses wurde hergestellt, indem Neutrophile mit nicht-denaturierendem Zellysepuffer lysiert wurden. Nach der Übernachtinkubation wurden die Membranen zweimal mit TBST gewaschen und anschließend mit Antikörpern gegen humanes CD63 inkubiert, bis die Antikörperlösung vollständig durch die Membran gezogen worden ist. Es folgten zwei Waschschriffe mit TBST und eine Inkubation mit HRP-konjugiertem anti-Maus Sekundärantikörper, bis die Antikörperflüssigkeit komplett durch die Membran gewandert war. Anschließend wurden die Membranen dreimal mit TBST gewaschen und mit Hilfe des *ChemiDoc™ imaging system* analysiert. Die Intensität des Signals (*Dot*) wurde mittels ImageLab Software bestimmt.

2.6.5. RNA Isolierung aus Zellen

Um RNA aus den Zellen zu gewinnen, wurden 2×10^6 Zellen zweimal durch Zugabe von kaltem PBS und anschließende Zentrifugation bei $450 \times g$ für 3 min gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml Trizol aufgenommen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation für 5 min bei RT wurden 100 μ l Chloroform zugegeben und anschließend für 15 s mit Hilfe eines Vortexers gründlich gemischt. Es folgte eine Inkubation für 3 min bei RT, mit anschließender Zentrifugation bei 4°C für 15 min mit 13000 rpm (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). 250 μ l Isopropanol wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die obere, farblose Phase wurde nach Zentrifugation abgenommen, zum Isopropanol gegeben und unter Verwendung eines Vortexers gemischt. Nach der darauffolgenden Inkubation bei RT für 10 min folgte eine Zentrifugation bei 4°C für 10 min mit 13000 rpm (Centrifuge 5415 R, Eppendorf). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurde 1 ml 80% Ethanol dazugegeben und das Pellet bei 4°C für 5 min mit 7600 rpm (Centrifuge 5415 R, Eppendorf) zentrifugiert. Das Ethanol wurde verworfen, das Pellet für 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 30 μ l nukleasefreiem Wasser aufgenommen, wobei das Volumen abhängig von der Pelletgröße gewählt wurde. Um das Pellet vollständig zu lösen, wurde es über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.6.6. RNA Konzentrationsbestimmung und Kontrolle der Integrität

Die isolierte RNA wurde für 10 min auf 65°C erhitzt, danach sofort auf Eis gestellt und anschließend 1:100 in nukleasefreiem, sterilem H_2O verdünnt. Im folgenden Schritt wurde die RNA-Konzentration mit dem Nanodrop bestimmt und die RNA auf eine Konzentration von 100 ng/ μ l eingestellt, 5 μ l dieser RNA mit 5 μ l 2x RNA Ladepuffer gemischt und anschließend in einem 1% Agarose TAE-Gel, zur Überprüfung der Integrität, aufgetrennt (30 min bei 100 V). Das Gel wurde hierfür in einem mit Absolve (2%) gereinigten Gel-Schlitten gegossen und mit *SYBR green* (2,5 μ l pro 50 ml Gel) versetzt. Nachdem die RNA im Gel getrennt wurde, erfolgte eine Analyse der Integrität im ChemiDoc Gel/Membran Dokumentationssystem.

2.6.7. Reverse Transkription

Um einen Abbau der RNA zu vermeiden, wurden die folgenden Schritte alle auf Eis durchgeführt: 10 μ l der auf 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ eingestellten RNA wurden in einem 0,2 ml PCR-Tube vorgelegt. Anschließend wurde ein Mastermix für die reverse Transkription, wie in Tabelle 13 beschrieben, angesetzt.

Tabelle 13: Reaktionsansatz reverse Transkription

Reagens	Volumen pro Reaktion
10x RT Puffer	2,0 µl
25x dNTP Mix (100 mM)	0,8 µl
10x RT <i>Random Primers</i>	2,0 µl
<i>MultiScribe</i> Reverse Transkriptase	1,0 µl
RNase Inhibitor	1,0 µl
Nukleasefreies H ₂ O	3,2 µl
Gesamtvolumen pro Reaktion	10 µl

Von diesem Mastermix wurden je 10 µl zur vorgelegten RNA pipettiert. Diese wurde anschließend in die PCR Maschine überführt und das in Tabelle 14 beschriebene Programm gestartet.

Tabelle 14: Gewähltes Programm für die reverse Transkription.

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	25	37	85	4
Zeit	10 min	120 min	5 s	∞

2.6.8. Genexpressionsanalyse mittels TaqMan-Messung

Zur Analyse der Expression von CD74 wurden zunächst die zu untersuchenden cDNAs mit nukleasefreiem Wasser verdünnt. Hierbei wurden sowohl eine 1:100 Verdünnung (5 µl cDNA + 495 µl H₂O), als auch eine 1:500 Verdünnung (100 µl der 1:100 Verdünnung + 400 µl H₂O) hergestellt. Für den 18S Standard wurden dann je 10 µl der 1:500 Verdünnungen in einer 96-well Platte in Triplikaten vorgelegt und ein Mastermix zur Messung der 18S rRNA, wie in Tabelle 15 beschrieben, hergestellt.

Tabelle 15: Reaktionsansatz für die Analyse der 18S rRNA

Reagens	Volumen pro Reaktion
<i>Primer – Probe</i> Mix	1,25 µl
MasterMix (Roche)	12,5 µl
Nucleasefreies H ₂ O	1,25 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Für die zu messenden Proben wurden je 10 µl der 1:100 Verdünnung in der 96-well Platte in Triplikaten vorgelegt und ein Mastermix, zur Messung des Zielgens, wie in Tabelle 16 beschrieben, vorbereitet.

Tabelle 16: Reaktionsansatz für die Analyse der CD74 Expression

Reagens	Volumen pro Reaktion
<i>Primer 1</i> (gggtgaccaagcaggatct)	0,25 µl
<i>Primer 2</i> (tggcaggatgtgaagacc)	0,25 µl
<i>Probe</i> (#84) (10 µM)	0,25 µl
MasterMix (Roche)	12,5 µl
Nucleasefreies H ₂ O	1,75 µl
Gesamtvolumen	15 µl

Anschließend wurden 15 µl des fertigen Mastermix in das dazugehörige Proben-*well* gegeben, die Platte mit Abdeckfolie verschlossen und kurz zentrifugiert. Es folgte die Messung am StepOnePlus Real-Time PCR Gerät gemäß dem in Tabelle 17 beschriebenen Schema.

Tabelle 17: Programmierung des RT-qPCR Gerätes

Zyklenzahl	Temperatur	Dauer
40	50 °C	2 min
	95 °C	10 min
	95 °C	15 s
	60 °C	1 min

2.6.9. Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA Kit

Die Konzentration der isolierten Proteine wurde unter Verwendung des *Pierce™ BCA Protein Assay Reagents* bestimmt. Hierfür wurden die Proteinproben 1:25 mit ddH₂O verdünnt und 10 µl in einer 96-*well* Platte vorgelegt. Zusätzlich wurde ein BSA-Standard folgender Konzentrationen erstellt, um später eine Eichgerade anfertigen zu können und damit die Proteinkonzentrationen der Proben zu berechnen: 0 mg/ml, 0,0625 mg/ml, 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml. Von diesem Standard wurden auch 10 µl in die *wells* der 96-*well* Platte gegeben. Zu den Proben wurden nun 200 µl einer zuvor erstellten BCA-Lösung (BCA-Reagenz 1 und BCA-Reagenz 2, Verhältnis 50:1) gegeben. Danach folgte eine Inkubation bei 37°C für 30 min. Alle Proben wurden in Duplikaten gemessen. Die Farbreaktion wurde photometrisch erfasst (Absorption bei 562 nm).

2.6.10. SDS Gelelektrophorese und Western Blot

Die Auftrennung der Proteine aus den zuvor erstellten Zelllysaten erfolgte mittels SDS Gelelektrophorese. Hierfür wurden 10 % oder 12,5 % SDS-Gele gemäß Tabelle 18 gegossen. Anschließend wurden gleiche Mengen an Protein in Laemmli Puffer resuspendiert und anschließend für 5 min auf 95°C erhitzt. Es folgte eine Zentrifugation für 13000 x g für 3 min bei 4°C und die Trennung

2. Material und Methoden

der Proteine per SDS Gelelektrophorese. Hierfür wurden 10 µg Proteine (Gesamtvolumen 20 µl) in die Taschen der vorbereiteten Gele pipettiert und für 10 min 70 V Spannung angelegt, gefolgt von 120 V für 90 min. Als Molekulargewichtsmarker wurden 4 µl eines vorgefärbten Protein-Markers (PageRuler, Thermo Fisher) verwendet.

Tabelle 18: Zusammensetzung von SDS Gelen

Bestandteile	<u>Trenngel</u> Mengenangaben für 2 Gele		<u>Sammelgel</u> Mengenangaben für 2 Gele
	10 %	12,5 %	
H ₂ O	10 ml	8,75 ml	6,1 ml
Polyacrylamid (40%, 29:1)	5 ml	6,25 ml	1,25 ml
1,5 M Tris, pH 8,6, 0,4 % SDS	5 ml	5 ml	2,5 ml
10 % (w/v) APS	115 µl	115 µl	100 µl
TEMED	30 µl	30 µl	10 µl

Nach Trennung der Proteine wurden diese, mit Hilfe eines *TransBlot® Turbo blotting system*, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurde für 30 min eine Spannung von 20 V angelegt. Zur Analyse des transferierten Gesamtproteins wurden die Membranen anschließend mit *SYPRO Ruby Protein Stain* gefärbt. Hierfür wurden die Membranen für 15 min in einer Lösung aus 10 % Methanol und 7 % Acetat inkubiert und anschließend viermal mit bidestilliertem Wasser für 5 min gewaschen. Danach folgte eine Inkubation in der *SYPRO Ruby Staining-Lösung* für 15 min im Dunkeln. Die Membran wurde anschließend viermal mit bidestilliertem Wasser für je 1 min gewaschen und die Fluoreszenzsignale der transferierten Proteine mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes analysiert. Eine Färbung der Membranen mittels Ponceau S erlaubte ein exaktes Schneiden der Membranen. Anschließend wurden die Membranen mit TBST gewaschen, bis die rote Färbung vollständig entfernt war und für 1 h mit TBST und 5 % BSA bei RT geblockt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C mit Primärantikörpern gegen P-p44/42 MAPK (P-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)), P-ZAP-70 (Tyr319), GAPDH, CD74 oder TIMP-1, verdünnt in TBST mit 5 % BSA. Anschließend wurden die Membranen dreimal mit TBST bei RT gewaschen und für 1 h bei RT mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper inkubiert. Es folgten ein dreimaliger Waschschrift mit TBST und die Visualisierung der Banden unter Verwendung des *Pierce™ ECL substrate* im *ChemiDoc™ imaging system*. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe der *ImageLab* Software.

2.6.11. ELISA

2.6.11.1. NET ELISA

Die Quantifizierung von NETs in humanem Plasma wurde mittels MPO-DNA ELISA, wie in der Literatur beschrieben (Caudrillier *et al.*, 2012), durchgeführt. Die notwendigen Reagenzien hierfür

2. Material und Methoden

stammten aus dem *DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2* (R&D Systems, Minneapolis, USA). Zunächst wurden 100 µl anti-MPO Antikörper (5 µg/ml in PBS) pro *well* einer 96-*well* Platte zugegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Die Plasmaproben wurden 1:5 in *reagent diluent* (1% BSA in ddH₂O) verdünnt und in Duplikaten zu den *wells* gegeben, wobei *wells* mit *reagent diluent* ohne Plasma als Hintergrundkontrolle dienten. Anschließend wurden die Proben für 2 h bei RT inkubiert und dreimal mit *reagent diluent* gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 100 µl anti-dsDNA Antikörpern pro *well* (1:2000 verdünnt in *reagent diluent*) für 2 h bei RT. Nach dreimaligem Waschen mit *reagent diluent* wurden pro *well* 100 µl HRP-konjugierte polyklonale anti-Maus Antikörper (1:3000 in *reagent diluent* verdünnt) hinzugegeben und für 20 min bei RT im Dunklen inkubiert. Schließlich wurden 50 µl *stop solution* (2N Schwefelsäure) zu jedem *well* hinzugegeben, vorsichtig durch Antippen der Platte gemischt und die Absorption bei 450 nm mit dem TECAN Spark 10M *plate reader* gemessen. Die Plasma NET-Spiegel wurden berechnet, indem die Absorption der Hintergrundmessungen von der Absorption der Proben abgezogen wurde und der Wert anschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert wurde (korrigierte Absorption bei 450 nm).

2.6.11.2. TIMP-1 ELISA

Die Plasma TIMP-1-Spiegel von gesunden Spendern oder PDAC Patienten wurden mit Hilfe des *DuoSet ELISA kit* entsprechend den Herstellerangaben bestimmt.

2.6.12. MMP-9 Aktivitätsassay

Die anti-proteolytische Aktivität von rekombinantem humanem (N-)TIMP-1 wurde mit Hilfe eines MMP-9 Aktivitätsassays durch M.Sc. Daniel Häußler (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) bestimmt. Hierfür wurden 1 µM rekombinantes humanes MMP-9 (bereitgestellt von Ghislain Oudenakker (KU Leuven, Leuven, Belgium)) durch Inkubation mit 1 mM APMA bei 37°C in TNC Puffer über Nacht aktiviert. Nach der Aktivierung wurden 5 nM MMP-9 mit verschiedenen Konzentrationen von TIMP-1 oder N-TIMP-1 in 2x TNC Puffer für 2 h bei 37°C vorinkubiert. Für die Messung der MMP-Aktivität wurden 50 µl dieser Lösung mit 50 µl 160 µM FS-6 Substratlösung in einer *black flat bottom 96-well* Platte inkubiert und die Fluoreszenz (Anregung: 320 nm, Emission: 405 nm, Bandbreite: 20 nm) in 5 min Intervallen für insgesamt 2 h in einem TECAN Spark 10M *plate reader* gemessen. Jede Probe wurde hierbei in Triplikaten gemessen. Zur Bestimmung der Inhibition von MMP-9 durch TIMP-1 wurde die initiale Steigung der Fluoreszenzkurve berechnet, indem eine lineare Regression der Fluoreszenzintensität gegenüber der Zeit zu Beginn der Reaktion erstellt wurde. Diese initiale Steigung wurde auf die initiale Steigung von nicht-inhibiertem MMP-9 normiert und anschließend wurde die erhaltene MMP-9

Aktivität gegenüber der TIMP-1- bzw. N-TIMP-1-Konzentration aufgetragen, um die antiproteolytische Aktivität zu bestimmen.

2.7. Automatisierte Auswertung der NET-Bildung mittels CellProfiler

Zur automatisierten Auswertung der Fluoreszenzbilder wurde die Software CellProfiler (Carpenter *et al.*, 2006) verwendet. Hierfür wurden die *SYTOX Orange* Aufnahmen zunächst in ein binäres Bildformat umgewandelt, indem für alle Bilder der gleiche Intensitäts-Schwellenwert (0,2) angewendet wurde. Die *SYTOX*-positive Fläche in jedem Bild wurde anschließend mit Hilfe der Funktion „*MeasureImageAreaOccupied*“ bestimmt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert von fünf Mikroskopiebildern aus einer biologischen Probe. Da es bei der Verwendung von humanem Plasma zu Schwankungen der Hintergrundintensität kam, wurde der Intensitäts-Schwellenwert bei diesen Proben mittels der *maximum correlation thresholding* (MCT)-Methode (Padmanabhan *et al.*, 2010) bestimmt.

2.8. *In silico* Analyse von Transkriptom-Daten

Die *in silico* Analyse von Transkriptom-Daten wurde von M.Sc. Chris Hermann (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) durchgeführt. Für die Zuordnung der Expression von TIMP-1 und NET-assoziierten Faktoren zu bestimmten Tumor oder Stroma Subtypen wurden bereits publizierte Transkriptom-Daten (Moffitt *et al.*, 2015) aus Pankreastumorgewebe von PDAC Patienten verwendet. Als NET-assoziierte Faktoren wurden diejenigen definiert, die bereits in PMA-induzierten NET Strukturen mittels MS/MS Analyse gefunden worden sind (Urban *et al.*, 2009). Die relativen *gene weights* von diesen Faktoren in stromalen (normal *vs.* aktiviert) und Tumorsubtypen (klassisch *vs.* basal-ähnlich) wurden aus der „*list of gene weights for each factor*“ von Moffitt *et al.* (Moffitt *et al.*, 2015) entnommen und in einer *heatmap* visualisiert.

2.9. Statistische Analysen

Für die statistischen Analysen wurde die Software SPSS verwendet. Die Normalverteilung der Daten wurde mittels Shapiro-Wilk-Test analysiert. Assoziationen zwischen quantitativen Variablen aus nicht normalverteilten Gruppen wurden mittels Spearman-Korrelation bestimmt. Normalverteilte Gruppen wurden mittels *Student's t*-Test für unabhängige Stichproben verglichen, falls die Gruppen nicht normalverteilt waren, wurde hingegen ein nichtparametrischer Mann-Whitney Test für unabhängige Variablen verwendet. Daten aus Durchflusszytometrie-Experimenten wurden auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit dem Kruskal-Wallis Test untersucht, da die Gruppen ungleiche Varianzen aufwiesen. Zur Identifikation eines optimalen *cut-off* Wertes der Plasma Werte von TIMP-1,

2. Material und Methoden

NETs oder CA19-9 kam eine *maximally selected log-rank* Statistik zum Einsatz, wobei diese mit Hilfe der R-funktion `maxstat.test` (Hothorn und Zeileis, 2008) unter Verwendung der Software R analysiert wurde. Zeitabhängige Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden mit Hilfe der Kaplan-Meier Methode bestimmt und der *log-rank test* (Mantel-Cox Test) wurde verwendet, um statistisch signifikante Unterschiede zwischen unabhängigen Untergruppen zu vergleichen. *Cox regression analysis* wurde angewendet, um das *hazard ratio* (HR) mit dem zugehörigen 95 % Konfidenzintervall zu bestimmen. Die Selektivität und Sensitivität der kategorischen prognostischen Indikatoren (TIMP-1^{high} vs. TIMP-1^{low}, NET^{high} vs. NET^{low}, CA19-9^{high} vs. CA19-9^{low}, TINE^{low} vs. TINE^{int} vs. TINE^{high}, TINECA 0 vs. TINECA 1 vs. TINECA 2 vs. TINECA 3) wurden mit der R-package „timeROC“ (Blanche *et al.*, 2013) in der Software R bestimmt. Hierbei wurden die *Areas Under the Curves* (AUCs) inklusive der zugehörigen 95% Konfidenzintervalle mit den „timeROC“- und „confint“-Funktionen berechnet und anschließend wurden die AUCs auf ihre statistische Signifikanz hin mit der „compare“-Funktion überprüft. *Receiver Operating Characteristic* (ROC) Kurven wurden mit Hilfe der „plot“-Funktion erstellt. Die Analyse der Daten mittels der Software R wurde von M.Sc. Chris Hermann (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) durchgeführt.

2.10. Zulassung der klinischen und tierexperimentellen Studien

Die durchgeführten Analysen wurden vom Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München, München, Deutschland, zugelassen (#1946/07, #409/16S, #395/17S). Die Patientenkohorte bestand aus Patienten, die zwischen 2011 und 2018 im Department für Chirurgie, Klinikum rechts der Isar, München, mit PDAC diagnostiziert wurden. Alle Patienten wurden über den Ablauf der Studie informiert und stimmten der Beteiligung an der Studie schriftlich zu, bevor sie in die Studie aufgenommen wurden. Die Diagnose PDAC wurde im Falle einer Operation histologisch bestätigt, oder, bei Patienten ohne Operation, mittels zytologischen oder klinischen/radiologischen Informationen, und damit nach den aktuell gültigen *state-of-the-art* Richtlinien. Alle Patientendaten wurden in einem pseudonymisierten Datenset gespeichert, das Rückschlüsse auf die Person verhindert. Alle Tierexperimente wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt und wurden gemäß dem Tierschutzgesetz des Freistaates Bayern durchgeführt.

3. Ergebnisse

Wesentliche Teile dieser Arbeit konnten bereits erfolgreich veröffentlicht werden (Schoeps *et al.*, 2021a; Schoeps *et al.*, 2021b). Der Verweis auf die entsprechende Publikation ist der jeweiligen Figurlegende zu entnehmen.

3.1. Effekte von TIMP-1 auf die Bildung von NETs

3.1.1. Pathophysiologische TIMP-1-Spiegel induzieren die NET-Bildung

Um zu untersuchen, welche Effekte TIMP-1 auf die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten besitzt, wurden humane Neutrophile aus Spenderblut isoliert und mit pathophysiologischen TIMP-1-Spiegeln inkubiert. Es stellte sich heraus, dass TIMP-1-stimulierte Neutrophile mit NE und MPO beladene DNA in ihre Umgebung freisetzen (**Abb. 3.1, A**), was auf die Bildung von NETs hinweist. Des Weiteren induzierte TIMP-1 die Citrullinierung von Histon H3 in Neutrophilen (**Abb. 3.1, B**).

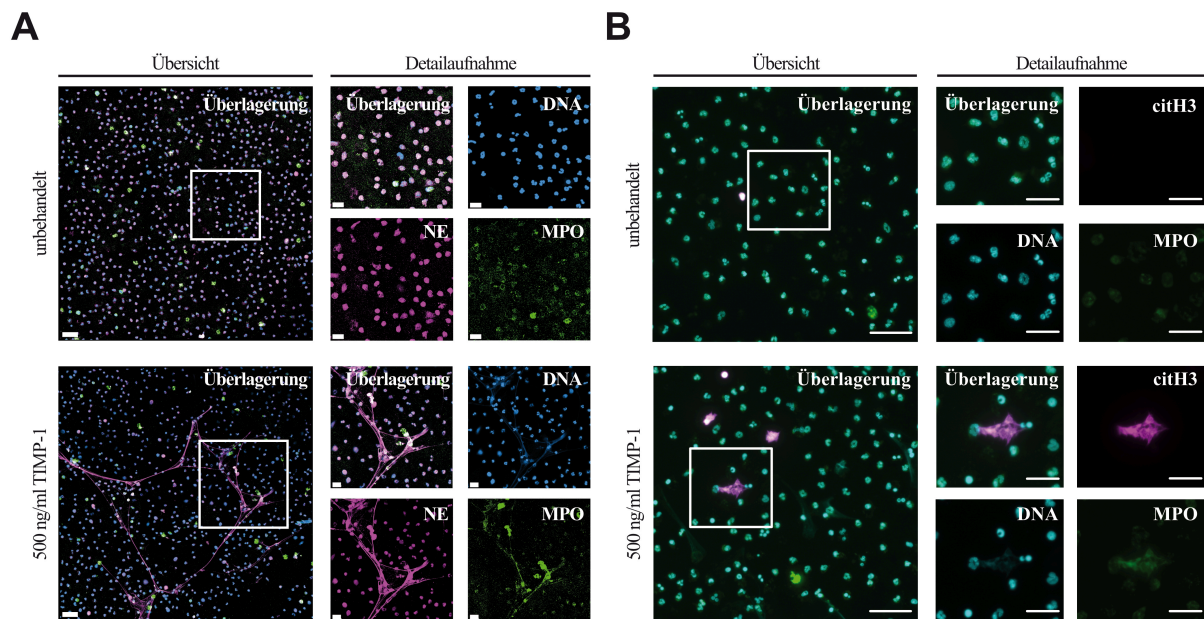
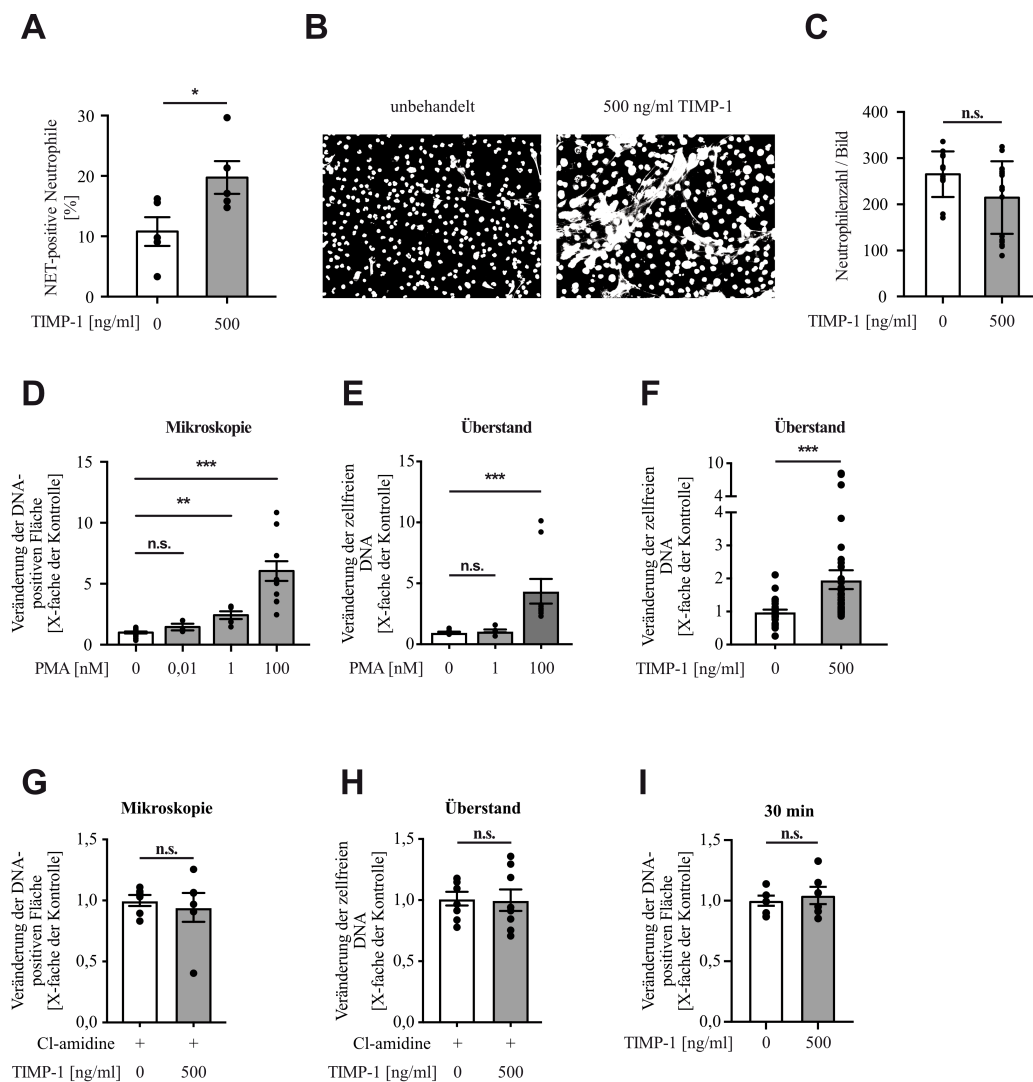


Abbildung 3.1: Mikroskopische Untersuchung der TIMP-1-induzierten NET-Bildung. Primäre humane Neutrophile wurden mit 500 ng/ml TIMP-1 stimuliert oder blieben unbehandelt. (A) Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen (konfokale Mikroskopie, 5-10 *Z-plane* Sektionen). Gefärbt wurden DNA (blau), NE (magenta) oder MPO (grün). Maßstabsbalken in Übersichtsbildern: 50 μm , in Detailaufnahmen: 20 μm . (B) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von Neutrophilen nach Färbung der DNA (blau), citH3 (magenta) oder MPO (grün). Maßstabsbalken in Übersichtsbildern: 50 μm , in Detailaufnahmen: 25 μm . Übernommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3. Ergebnisse

Es konnte beobachtet werden, dass nicht alle Neutrophile auf die Stimulation mit TIMP-1 mit der Bildung von NETs reagierten, da nur ca. 20% der Neutrophilen NET-positiv waren (**Abb. 3.2, A**). Für die Analyse einer größeren Anzahl an mikroskopischen Aufnahmen wurde die DNA-positive Fläche als Marker für die Bildung von NETs bestimmt und zwischen den Stimulationsbedingungen verglichen. Es zeigte sich, dass TIMP-1 zu einem Anstieg dieser DNA-positiven Fläche führte (**Abb. 3.2, B**), ohne dabei Einfluss auf die Anzahl der Neutrophilen pro Bildausschnitt zu nehmen (**Abb. 3.2, C**). Die NET-Bildung konnte, zusätzlich zur mikroskopbasierten Auswertung, durch Messung der aus den Zellen freigesetzten DNA im Überstand der Zellen bestimmt werden. Sowohl für die mikroskopbasierte Analyse, als auch für die Messung von NETs im Überstand, wurde eine Stimulation von Neutrophilen mittels PMA als Positivkontrolle herangezogen (**Abb. 3.2, D und E**). Auch im Überstand zeigte sich, dass TIMP-1 die Ausbildung von NETs signifikant induzierte (**Abb. 3.2, F**). In Gegenwart eines PAD4 Inhibitors (Cl-amidine) war TIMP-1 nicht in der Lage, NETs auszulösen (**Abb. 3.2, G und H**). Die Bildung von NETs war abhängig von der Inkubationzeit mit TIMP-1, wobei 4 h Inkubation zu einer Bildung von NETs führten (**Abb. 3.2, A, B und F**), nicht jedoch 30 min (**Abb. 3.2, I**).



3. Ergebnisse

Abbildung 3.2: Charakterisierung der TIMP-1-induzierten NET-Bildung. (A) Quantifizierung von NET-positiven Neutrophilen nach Stimulation mit TIMP-1 (n = 5). Als NET-positiv wurden Neutrophile gewertet, die DNA aus dem Kern freisetzen. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. (B) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von SYTOX Orange-gefärbten Neutrophilen nach TIMP-1 Stimulation. (C) Quantifizierung der Neutrophilenzahl nach Stimulation mit TIMP-1 (n = 18 Bilder). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. (D, G, I) Quantifizierung der DNA-positiven Fläche als Marker für NET-Bildung nach Stimulation mit TIMP-1. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. (D) Neutrophile wurden mit ansteigenden Konzentrationen von PMA stimuliert (c = 0,01 nM (n = 3), 1 nM (n = 6), 100 nM (n = 12)), oder blieben unbehandelt (n = 15). (G) Neutrophile wurden nach Inkubation mit Cl-amidine mit TIMP-1 stimuliert (n = 6) oder blieben unbehandelt (n = 6). (I) Neutrophile wurden für 30 min mit TIMP-1 stimuliert (n = 6) oder blieben unbehandelt (n = 6). (E, F, H) Quantifizierung der zellfreien DNA als Marker für NET-Bildung. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. (E) Neutrophile wurden mit ansteigenden Konzentrationen von PMA stimuliert (c = 0 nM (n = 14), 1 nM (n = 6), 100 nM (n = 9)). (F) Neutrophile wurden mit TIMP-1 stimuliert (n = 38) oder blieben unbehandelt (n = 35). (H) Neutrophile wurden mit Cl-amidine vorbehandelt und anschließend mit TIMP-1 stimuliert (n = 8) oder blieben ohne TIMP-1 Behandlung (n = 8). n.s., nicht signifikant; *, p \leq 0,05; **, p \leq 0,01; ***, p \leq 0,001. (A) bis (H) sind entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

Da TIMP-1 auch unter physiologischen Bedingungen, d.h. bei gesunden Individuen, im Plasma vorkommt, stellte sich die Frage, ob die TIMP-1-bedingte Bildung von NETs nur unter pathophysiologisch hohen TIMP-1-Spiegeln vorkommt. Um dies zu untersuchen, wurden Neutrophile mit unterschiedlichen TIMP-1-Konzentrationen stimuliert, beginnend mit physiologischen TIMP-1-Spiegeln, bestimmt aus 4 gesunden Probanden (Mittelwert \pm s.e.m. = 44,4 ng/ml \pm 15,6 ng/ml; n = 4), bis hin zu stark erhöhten TIMP-1-Spiegeln von 2000 ng/ml. Interessanterweise bewirkten nur Konzentrationen über den physiologisch vorkommenden TIMP-1-Spiegeln eine Ausbildung von NETs (**Abb. 3.3, A**). Da TIMP-1 im Plasma in Kontakt mit anderen Proteinen seines Interaktoms kommt, wie z.B. Metalloproteinasen, stellte sich außerdem die Frage, ob das Vorhandensein von anderen Plasmaproteinen einen Einfluss auf die Bildung von NETs durch TIMP-1 besitzt. Daher wurden Neutrophile in Gegenwart von spendereigenem Blutplasma mit TIMP-1 stimuliert und anschließend die NET-Bildung gemessen. Tatsächlich induzierten pathologisch hohe TIMP-1-Spiegel auch in Gegenwart von humanem Plasma die NET-Bildung (**Abb. 3.3, B**).

3. Ergebnisse

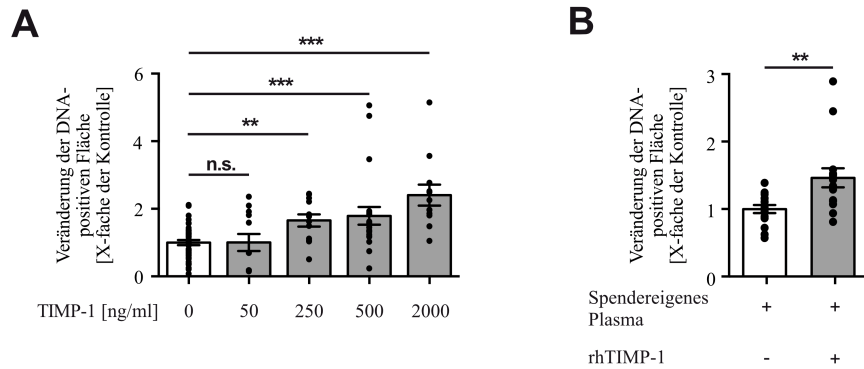


Abbildung 3.3: Pathophysiologische TIMP-1-Spiegel induzieren NETs. (A) Quantifizierung der DNA-positiven Fläche als Marker für NET-Bildung nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen an TIMP-1 ($c = 0$ ng/ml, $n = 42$; $c = 50$ ng/ml, $n = 12$; $c = 250$ ng/ml, $n = 12$; $c = 500$ ng/ml, $n = 21$; oder 2000 ng/ml, $n = 12$). (B) Quantifizierung der DNA-positiven Fläche als Marker für NET-Bildung in Gegenwart von spendereigenem Blutplasma, angereichert mit ($n = 15$) oder ohne ($n = 15$) rekombinantem humanem TIMP-1 (rhTIMP-1). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. n.s., nicht signifikant; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3.1.2. TIMP-1 aktiviert die NET-Bildung über die C-terminale Domäne

Da TIMP-1 ein multifunktionales Protein mit anti-proteolytischen und zytokinartigen Eigenschaften ist, stellte sich nun die Frage, welche dieser beiden Funktionen für die NET-Bildung verantwortlich ist. Um zu untersuchen, ob die NET-Bildung über die N-terminale anti-proteolytische Funktion von TIMP-1 bewirkt wird, wurden Neutrophile mit der rekombinant hergestellten N-terminalen Domäne von TIMP-1 (N-TIMP-1) stimuliert. Es zeigte sich, dass die N-terminale Domäne nicht zur Ausbildung der NET-Bildung führt (Abb. 3.4, A bis C), was für eine Relevanz der C-terminalen Domäne bei dieser Funktion spricht. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Murphy *et al.*, 1991), war N-TIMP-1 in der Lage, MPs zu hemmen (Abb. 3.4, D).

3. Ergebnisse

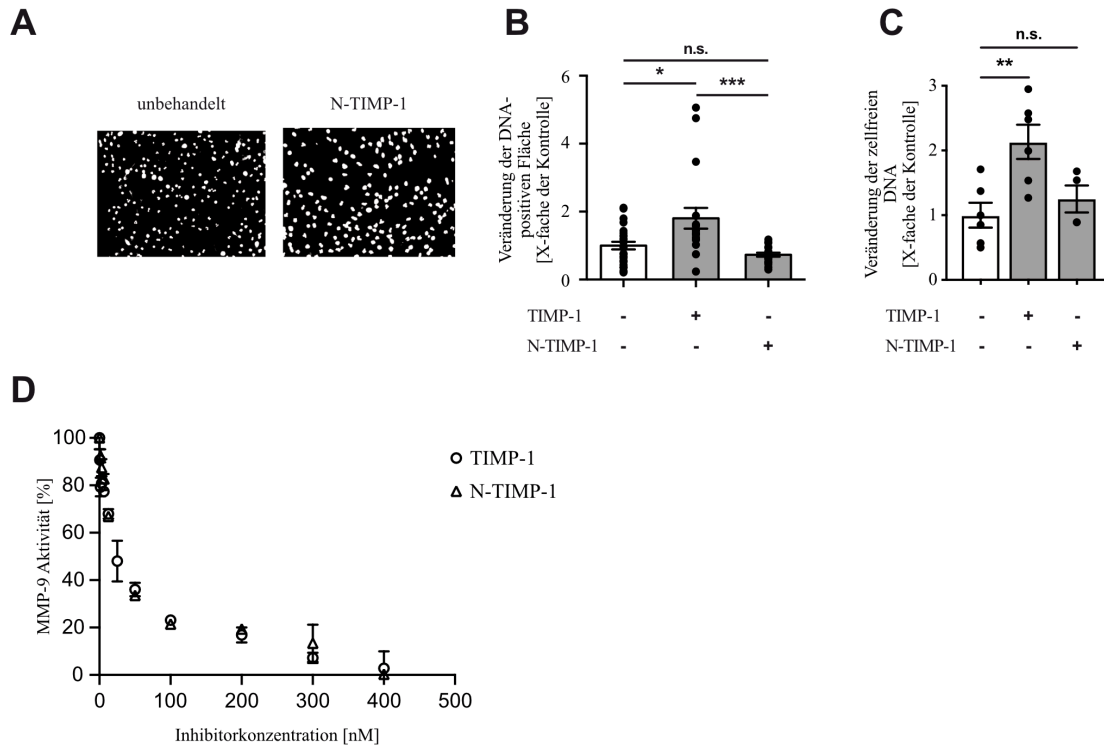


Abbildung 3.4: TIMP-1 induziert NETs über die C-terminale Domäne. (A) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von *SYTOX Orange*-gefärbten Neutrophilen nach N-TIMP-1 Stimulation. (B) Quantifizierung der DNA-positiven Fläche als Marker für NET-Bildung nach Stimulation mit TIMP-1 (n = 18), N-TIMP-1 (n = 18) oder von unbehandelten Neutrophilen (n = 24). (C) Quantifizierung der zellfreien DNA als Marker für NET-Bildung nach Stimulation mit TIMP-1 (n = 6), N-TIMP-1 (n = 4) oder von unbehandelten Neutrophilen (n = 6). (D) MMP Aktivitätsassay mit TIMP-1 und N-TIMP-1. Die Daten zum MMP Aktivitätsassay wurden von M.Sc. Daniel Häußler (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. n.s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$. (B) bis (D) wurden entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3.1.3. TIMP-1 bindet an CD63 von Neutrophilen

Die Tatsache, dass die N-terminale Domäne von TIMP-1 keine NET-Bildung auslöst sprach für die Möglichkeit, dass diese Funktion über eine Interaktion von TIMP-1 mit CD63 ausgelöst wird. Tatsächlich zeigte nur eine kleine Subpopulation von Neutrophilen eine hohe Oberflächenexpression von CD63 (Abb. 3.5, A), und genau diese Population zeigte wiederum die stärkste Bindung von TIMP-1 (Abb. 3.5, B und C). Zusätzlich korrelierte die TIMP-1-Bindung mit dem Vorhandensein von CD63 auf Neutrophilen (Abb. 3.5, B und C). Um die Interaktion zwischen TIMP-1 und CD63 von Neutrophilen zu bestätigen, wurde ein *Dot Blot Assay* durchgeführt. Tatsächlich konnte die direkte Bindung von TIMP-1 an CD63 aus Neutrophilen nachgewiesen werden (Abb. 3.5, D).

3. Ergebnisse

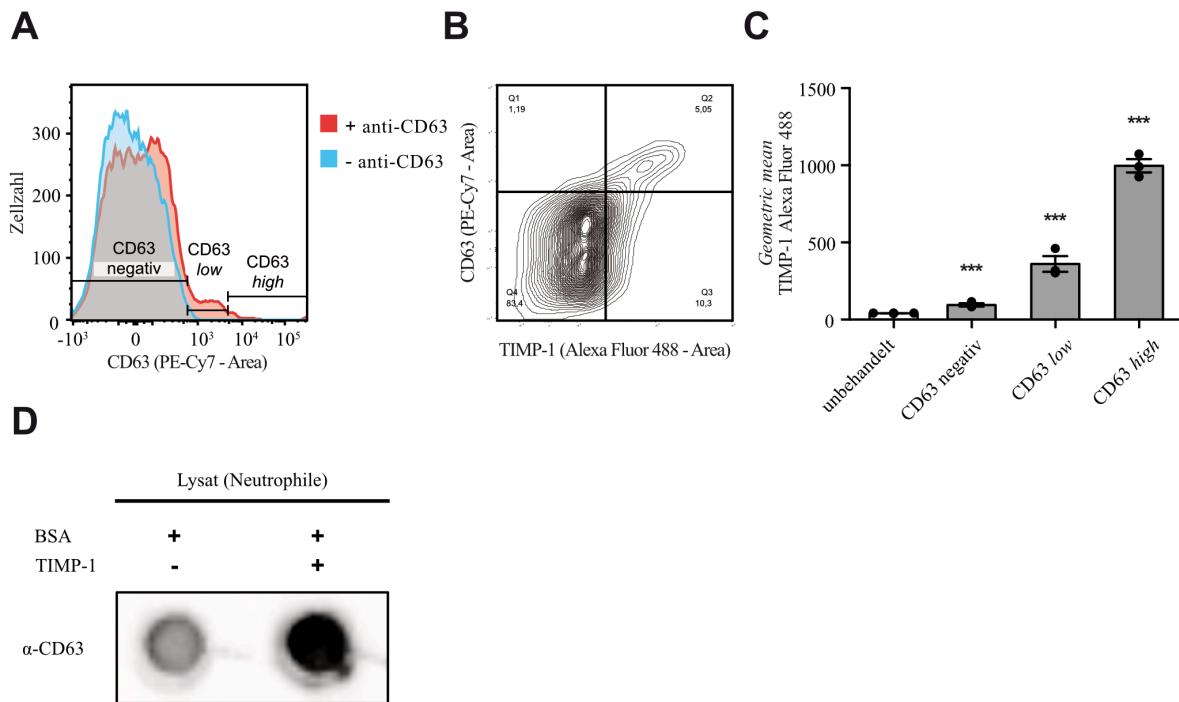


Abbildung 3.5: TIMP-1 bindet an CD63 von Neutrophilen. (A-C) Neutrophile wurden mit fluoreszenzmarkiertem TIMP-1 behandelt oder blieben unbehandelt. Es folgte eine Analyse der CD63 Oberflächenexpression und der TIMP-1-Bindung mittels Durchflusszytometrie. (C) Quantifizierung der Bindung von TIMP-1 an unterschiedliche Neutrophilenpopulationen. Gezeigt ist der *geometric mean* der TIMP-1-Alexa-Fluor 488 Bindung als Mittelwert \pm s.e.m. von drei unterschiedlichen Spendern. ***, $p \leq 0,001$. (D) Repräsentativer *Dot Blot* der die Bindung von endogenem CD63 aus humanen Neutrophilen an immobilisiertes TIMP-1 zeigt. Repräsentativ für Ergebnisse aus drei verschiedenen Spendern. Die Daten zum *Dot Blot* wurden von M.Sc. Celina Eckfeld (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3.1.4. Die TIMP-1/CD63 Interaktion löst NETs aus

Nun stellte sich die Frage, ob die Interaktion zwischen TIMP-1 und CD63 auch für die Ausbildung der NETs verantwortlich ist. Die Blockade von CD63 mit anti-CD63 Antikörpern, nicht jedoch eine Behandlung mit Isotyp-Kontrollantikörpern, verhinderte die TIMP-1-induzierte NET-Bildung, sowohl im Überstand auch als mikroskopisch (Abb. 3.6, A und B). Um die Rolle der Interaktion zwischen TIMP-1 und CD63 in einem komplementären Ansatz zu analysieren, wurde TIMP-1 mit einem synthetischen Peptid, bestehend aus den 50 Aminosäuren der großen extrazellulären Schleife von CD63 (LEL-Peptid), inkubiert, bevor TIMP-1 zu den Neutrophilen gegeben wurde. Dieser Ansatz verhinderte ebenso die TIMP-1-bedingte NET-Bildung (Abb. 3.6, C).

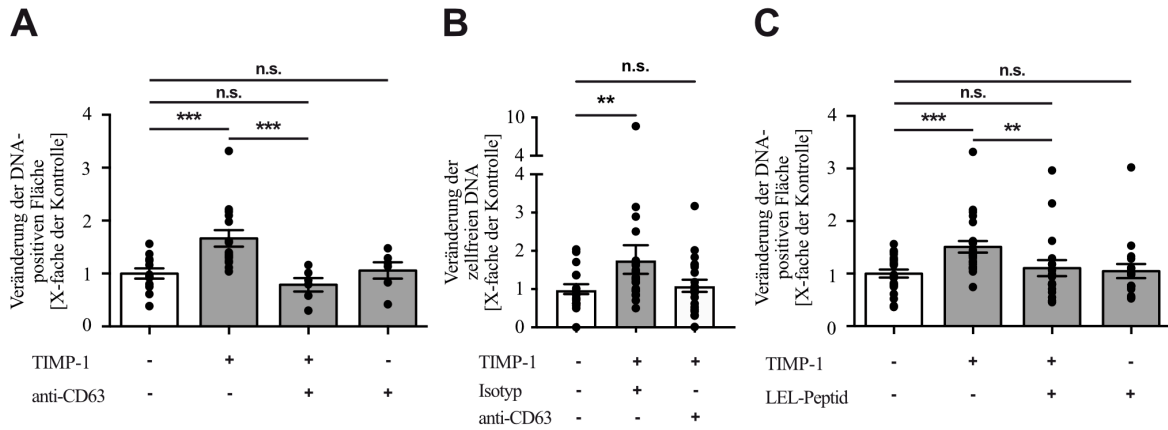


Abbildung 3.6: Die TIMP-1/CD63 Interaktion löst NETs aus. (A, C) Quantifizierung der DNA-positiven Fläche als Marker für NET-Bildung. (A) Neutrophile wurden mit TIMP-1 behandelt (n = 15) oder blieben unbehandelt (n = 12). Um die TIMP-1/CD63 Interaktion zu blocken wurden Neutrophile mit Antikörpern gegen CD63 vor Stimulation mit TIMP-1 inkubiert (n = 6) oder sie wurden nur mit Antikörpern gegen CD63 inkubiert (n = 6). (C) Neutrophile wurden mit TIMP-1 behandelt (n = 24), blieben unbehandelt (n = 21), wurden mit TIMP-1 stimuliert, das mit dem LEL-Peptid vorinkubiert wurde (n = 18) oder wurden nur mit dem LEL-Peptid behandelt (n = 18). (B) Quantifizierung der zellfreien DNA als Marker für NET-Bildung. Neutrophile wurden mit anti-CD63 Antikörpern (n = 21) oder Isotyp-Kontrollantikörpern (n = 21) vorbehandelt und wurden anschließend mit TIMP-1 stimuliert oder blieben komplett unbehandelt (n = 18). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. n.s., nicht signifikant; **, $p \leq 0,01$; ***, $p \leq 0,001$. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3.1.5. Priming von Neutrophilen erhöht die CD63 Expression und die TIMP-1-induzierte NET-Bildung

Die Zytokine TNF- α (Hazeldine *et al.*, 2014), IFN- γ (Martinelli *et al.*, 2004) und GM-CSF (Yousefi *et al.*, 2009) können Neutrophile voraktivieren und dadurch die anschließende NET-Bildung verstärken. Um zu untersuchen, ob diese vorkonditionierten (*primed*) Neutrophilen eine erhöhte CD63 Expression auf der Oberfläche aufweisen, wurden Neutrophile mit den genannten Zytokinen inkubiert und anschließend die CD63 Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei den untersuchten Zytokinen erhöhte nur TNF- α die CD63 Oberflächenexpression (Abb. 3.7, A). Eine darauffolgende Stimulation mit TIMP-1 führte nur beim *Priming* durch TNF- α zu einer verstärkten NET-Bildung (Abb. 3.7, B), was die Rolle von CD63 bei der TIMP-1-bedingten NET-Bildung nochmals hervorhebt. Die alleinige Inkubation von Neutrophilen mit TNF- α führte nicht zur verstärkten Bildung von NETs (Abb. 3.7, C).

3. Ergebnisse

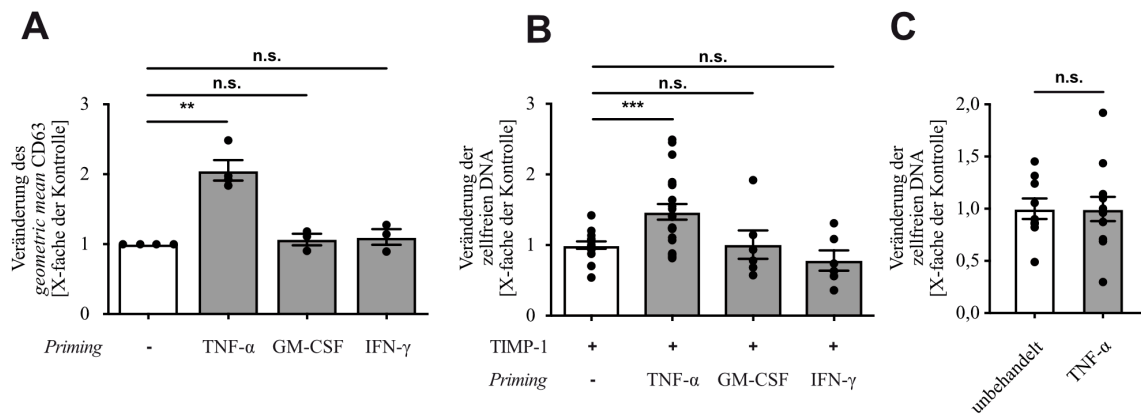


Abbildung 3.7: Priming von Neutrophilen erhöht die CD63 Expression und die TIMP-1-induzierte NET-Bildung. (A, B) Neutrophile wurden wie angegeben vorkonditioniert (*Priming*) und anschließend auf die CD63 Oberflächenexpression hin mittels Durchflusszytometrie untersucht (kein *Priming*, n = 4; TNF- α -primed, n = 4; GM-CSF-primed, n = 3; IFN- γ -primed, n = 3; A) oder anschließend mit TIMP-1 stimuliert und die NET-Bildung gemessen. (B) Die freigesetzte zellfreie DNA von unkonditionierten Neutrophilen (n = 18), TNF- α -konditionierten (n = 21), GM-CSF-konditionierten (n = 6) oder IFN- γ -konditionierten (n = 6) Neutrophilen wurde auf die unkonditionierte Kontrolle normiert. (C) Die freigesetzte zellfreie DNA als Marker für NET-Bildung wurde von unbehandelten (n = 9) oder TNF- α (n = 12) behandelten Neutrophilen bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. n.s., nicht signifikant; **, p \leq 0,01; ***, p \leq 0,001. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3.1.6. Die TIMP-1/CD63 Interaktion aktiviert den ERK Signalweg in Neutrophilen

Frühere Studien haben gezeigt, dass eine Interaktion von TIMP-1 mit CD63 zur Aktivierung von ERK in Tumorzellen führt (Jung *et al.*, 2006), einem wichtigen Regulator der NET-Bildung (Hakkim *et al.*, 2011). Um zu untersuchen, ob die TIMP-1/CD63 Interaktion auch in Neutrophilen zur Aktivierung von ERK führt, wurden Neutrophile mit TIMP-1 stimuliert und anschließend die Phosphorylierung von ERK analysiert. TIMP-1 führte zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK (Abb. 3.8, A). Diese Phosphorylierung wurde nicht durch die N-terminale Domäne von TIMP-1 ausgelöst (Abb. 3.8, A) und konnte durch Verwendung von anti-CD63 Antikörpern (Abb. 3.8, B, C) oder des synthetischen LEL-Peptides (Abb. 3.8, D) geblockt werden.

3. Ergebnisse

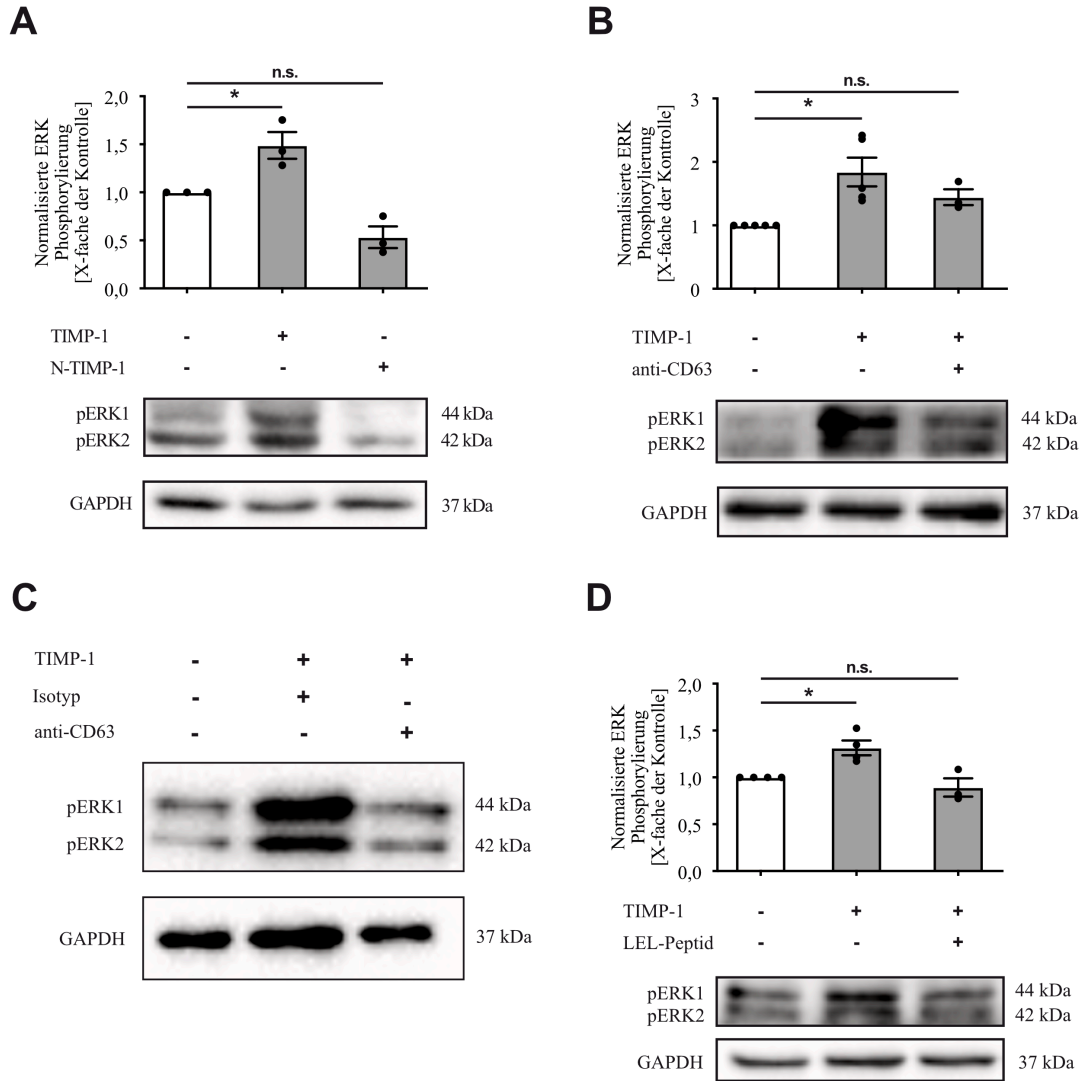


Abbildung 3.8: Die TIMP-1/CD63 Interaktion aktiviert den ERK Signalweg in Neutrophilen. (A, B, D) Densitometrische Analyse von Western Blots von Zelllysaten aus Neutrophilen, die wie angegeben stimuliert wurden. **(A)** Neutrophile wurden mit TIMP-1 (n = 3) oder N-TIMP-1 (n = 3) stimuliert, oder blieben unbehandelt (n = 3). **(B)** Neutrophile wurden mit TIMP-1 stimuliert (n = 5), wurden vor Stimulation mit TIMP-1 mit einem anti-CD63 Antikörper inkubiert (n = 3), oder blieben unbehandelt (n = 5). **(D)** Neutrophile wurden mit TIMP-1 stimuliert (n = 4), wurden mit TIMP-1 stimuliert, das mit dem LEL-Peptid inkubiert worden ist (n = 3), oder blieben unbehandelt (n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. **(C)** Repräsentativer Western Blot von Zelllysaten aus TIMP-1-stimulierten oder unstimulierten Neutrophilen, die zuvor mit anti-CD63 Antikörpern oder Isotyp-Kontrollantikörpern inkubiert worden sind. n.s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3. Ergebnisse

3.1.7. TIMP-1 induziert NETs über den ERK Signalweg

Um zu untersuchen, ob TIMP-1 über die Aktivierung von ERK zur NET-Bildung führt, wurden Neutrophile vor Stimulation mit TIMP-1 mit einem Inhibitor von MEK (U0126), der *upstream* Kinase von ERK, inkubiert. Sowohl die TIMP-1-bedingte ERK Phosphorylierung (**Abb. 3.9, A**), als auch die NET-Bildung (**Abb. 3.9, B und C**) wurden durch U0126 verhindert, was die Notwendigkeit des CD63/ERK Signalwegs für die TIMP-1-induzierte NET-Bildung unterstreicht.

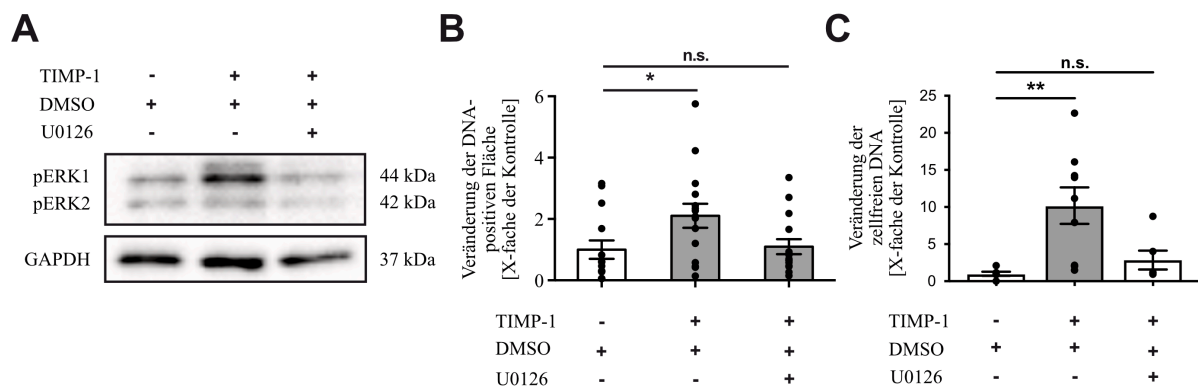


Abbildung 3.9: TIMP-1 induziert NETs über ERK Signaling. (A) Repräsentativer Western Blot von Zelllysaten aus TIMP-1-stimulierten oder unstimulierten Neutrophilen, die zuvor mit DMSO oder U0126 inkubiert worden sind. (B, C) Quantifizierung der DNA-positiven Fläche (B) oder der zellfreien DNA im Überstand von Neutrophilen (C) als Marker für NET-Bildung. (B) Neutrophile wurden mit TIMP-1 stimuliert (n = 15) oder blieben unbehandelt (n = 14), nachdem sie mit DMSO oder einem ERK Inhibitor (U0126, n = 15) inkubiert worden sind. (C) Neutrophile wurden nach Inkubation mit DMSO (n= 9) oder U0126 (n = 6) mit TIMP-1 stimuliert oder blieben unbehandelt (n = 6). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. n.s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$; **, $p \leq 0,01$. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3.1.8. TIMP-1 induziert die NET-Bildung in KPC Mäusen

Nach Aufklärung des prinzipiellen Mechanismus der TIMP-1-induzierten NET-Bildung wurde untersucht, ob es auch im Krankheitskontext des PDAC einen kausalen Zusammenhang zwischen TIMP-1 und NETs gibt. Hierfür wurde das PDAC-Mausmodell KPC herangezogen. Analysen von Pankreastumorgewebe zeigten eine Kollokalisierung von MPO, citrulliniertem H3 und DNA, was auf NET-Bildung hindeutet (**Abb. 3.10, A**). Des Weiteren korrelierte TIMP-1 im Plasma mit dem Vorhandensein von NETs im Tumor (**Abb. 3.10, B**), aber nicht mit der Anzahl von Neutrophilen (**Abb. 3.10, C**), was auf einen Zusammenhang zwischen TIMP-1 und der Aktivierung von Neutrophilen schließen lässt. Um den Einfluss von pathologischen, im Gegensatz zu physiologischen, TIMP-1-Spiegeln zu untersuchen, wurden die KPC Mäuse anhand ihrer Plasma TIMP-1-Spiegel in Mäuse mit

3. Ergebnisse

hohen und Mäuse mit niedrigen TIMP-1-Spiegeln eingeteilt. Als Grenze dienten hier die in gesunden Mäusen vorkommenden Plasma TIMP-1-Spiegel (gemessener Bereich in gesunden Mäusen: Zwischen 0,78 ng/ml und 2,19 ng/ml, n = 10). Es zeigte sich, dass Mäuse mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln mehr NETs im Tumor aufwiesen (Abb. 3.10, D). Das Alter zwischen KPC TIMP-1^{low} und KPC TIMP-1^{high} Mäusen unterschied sich nicht (Abb. 3.10, E). Eine Depletion von TIMP-1 in diesen Mäusen führte zu einer Reduktion der NET-Bildung (Abb. 3.10, D), was die Rolle von TIMP-1 bei der Ausbildung von NETs in diesem Kontext hervorhebt.

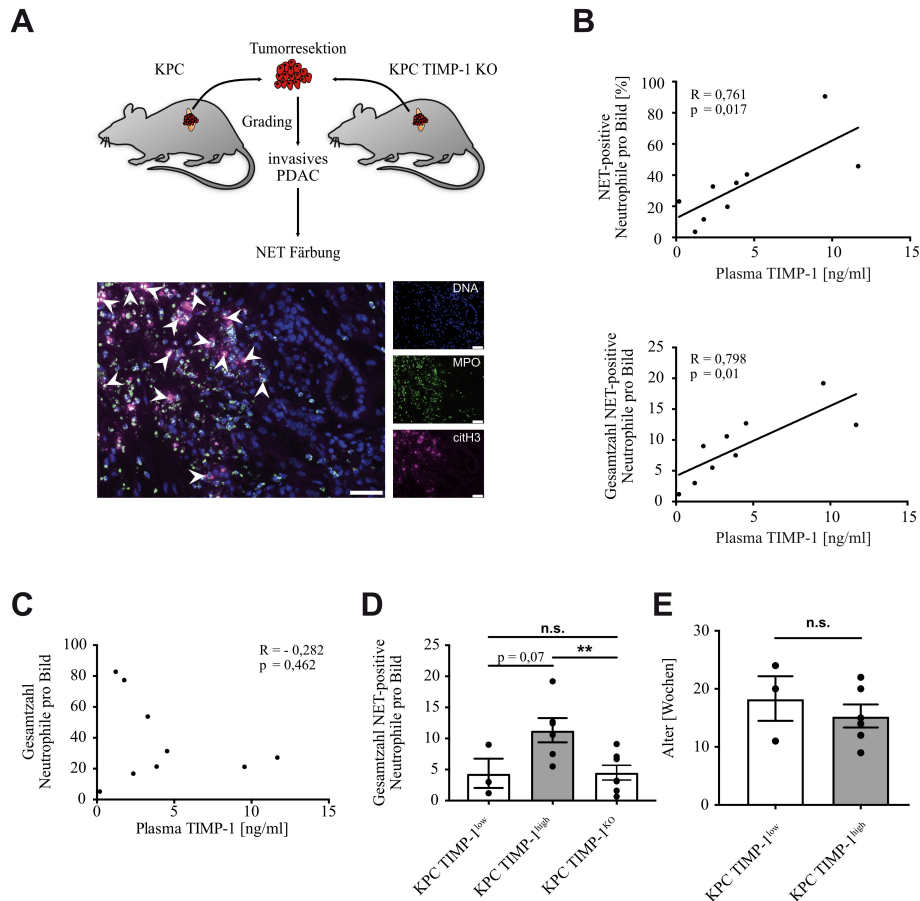


Abbildung 3.10: TIMP-1 induziert die NET-Bildung in KPC Mäusen. (A) Isolation von murinen Tumoren und NET-Färbung. Immunfluoreszenzaufnahmen von Pankreasgewebe aus KPC Mäusen. Angefärbt wurden DNA (blau), MPO (grün) und citH3 (magenta). Pfeilspitzen zeigen auf NET-bildende Neutrophile. Maßstabsbalken: 50 μ m. (B) Korrelation zwischen Plasma TIMP-1-Spiegeln und NETs in murinen Pankreastumoren (n = 9). (C) Korrelation zwischen Plasma TIMP-1-Spiegeln und Neutrophilen in murinen Pankreastumoren (n = 9). (D) Quantifizierung von NET-positiven Neutrophilen in TIMP-1^{high} (n = 6, TIMP-1 Plasmaspiegel über 2,19 ng/ml), TIMP-1^{low} (n = 3, TIMP-1 Plasmaspiegel unter 2,19 ng/ml) und TIMP-1 *knockout* (n = 7) KPC Mäusen. Neutrophile (MPO-positiv) und NET-bildende Neutrophile (MPO- und citH3-positiv) wurden manuell quantifiziert. Die Anzahl an NET-positiven Neutrophilen ist als Mittelwert \pm s.e.m. dargestellt. (E) Alter der Mäuse mit hohen (TIMP-1^{high}) bzw. niedrigen (TIMP-1^{low}) TIMP-1-Spiegeln. n.s., nicht signifikant; **, p \leq 0,01. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3. Ergebnisse

3.1.9. TIMP-1 und NETs beeinflussen das Überleben von Mäusen mit Pankreastumoren

Um zu untersuchen, wie sich die Ausbildung von NETs und das Vorhandensein von TIMP-1 auf die Prognose der KPC Mäuse auswirken, wurde das Überleben von KPC Mäusen in Abhängigkeit der TIMP-1 Expression bzw. der NET-Bildung untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl NET-defiziente, als auch TIMP-1-defiziente KPC Mäuse ein längeres Überleben als Wildtyp KPC Mäuse aufwiesen (**Abb. 3.11**), wobei kein Unterschied im Überleben zwischen TIMP-1-defizienten und NET-defizienten Mäusen feststellbar war (**Abb. 3.11**).

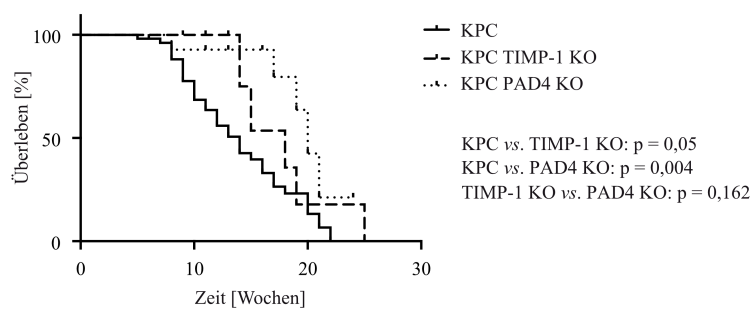


Abbildung 3.11: TIMP-1 und NETs beeinflussen das Überleben von Mäusen mit Pankreastumoren. Kaplan-Meier Überlebenskurve von KPC (n = 57), KPC-TIMP-1 KO (n = 18) und KPC-PAD4 KO (n = 14) Mäusen. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3.1.10. TIMP-1 ist mit der NET-Bildung in PDAC Patienten assoziiert

Da ein direkter Zusammenhang zwischen TIMP-1 und der Bildung von NETs in KPC Mäusen hergestellt werden konnte, stellte sich nun die Frage nach der klinischen Relevanz dieser Entdeckung. Eine mögliche Verbindung zwischen TIMP-1 und NETs in PDAC Patienten wurde mittels konfokaler Mikroskopie von Pankreastumorgewebe untersucht. Es zeigte sich, dass in Tumorbereichen mit erhöhten TIMP-1-Spiegeln mehr NETs zu finden waren (**Abb. 3.12, A**), wobei NET-negative Neutrophile hauptsächlich in Bereichen mit niedrigen TIMP-1-Spiegeln zu finden waren (**Abb. 3.12, B**).

3. Ergebnisse

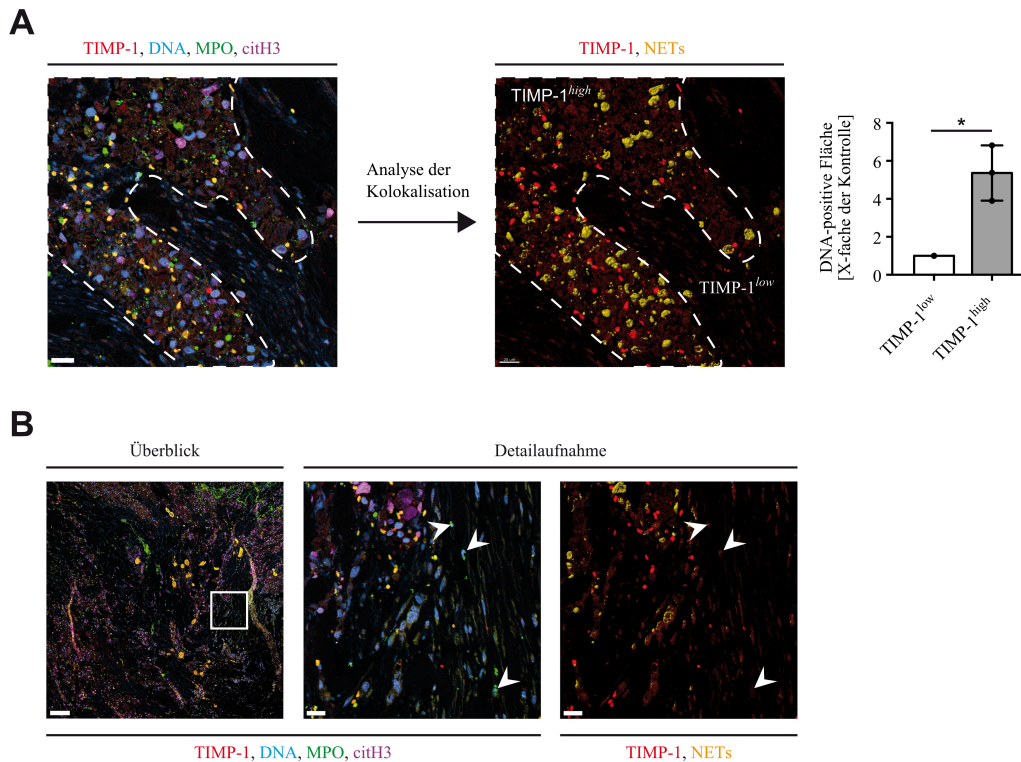


Abbildung 3.12: TIMP-1 ist mit der NET-Bildung in PDAC Tumoren assoziiert. (A, B) Repräsentative konfokale Mikroskopieaufnahmen von Immunfluoreszenzfärbungen von Pankreasgewebe aus einem PDAC Patienten. Gefärbt wurden DNA (blau), MPO (grün), citH3 (magenta) und TIMP-1 (rot). NETs wurden definiert als Kolokalisation von DNA, MPO und citH3 und die Oberfläche der NETs (gelb) wurde mit Hilfe der Imaris Software dargestellt. (A) Bereiche mit einer hohen TIMP-1 Expression (TIMP-1^{high}) sind in rot dargestellt und mit einer gestrichelten Linie umrandet. Die gesamte Oberfläche der NETs wurde mittels Imaris berechnet und zwischen Bereichen mit hoher TIMP-1 Expression (TIMP-1^{high}) und Bereichen mit niedriger TIMP-1 Expression (TIMP-1^{low}) verglichen. Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte, normalisiert auf Bereiche mit niedriger TIMP-1 Expression. Die Fehlerbalken geben die minimalen und maximalen Werte aus drei unterschiedlichen Bildern an. One-sample t test; *, $p \leq 0,05$. (B) Gezeigt sind ein Übersichtsbild, sowie eine Detailaufnahme (weißes Quadrat). Pfeilspitzen zeigen NET-negative Neutrophile in Bereichen mit niedriger TIMP-1 Expression. Maßstabsbalken: Übersicht, 150 μm ; Detailaufnahme, 20 μm . Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

Um zu untersuchen, ob die TIMP-1 Expression charakteristisch für Tumor- oder Stromabereiche in PDAC Tumoren ist, wurde ein publizierter Transkriptomdatensatz von PDAC Gewebe aus Patienten analysiert (Moffitt *et al.*, 2015). Es zeigte sich, dass die TIMP-1 Expression vor allem dem aktivierten Stroma im Primärtumor zugeordnet werden konnte (Abb. 3.13), einem Bereich, dem auch bereits publizierte NET-assoziierte Faktoren (Urban *et al.*, 2009) zugeordnet werden konnten (Abb. 3.13).

3. Ergebnisse

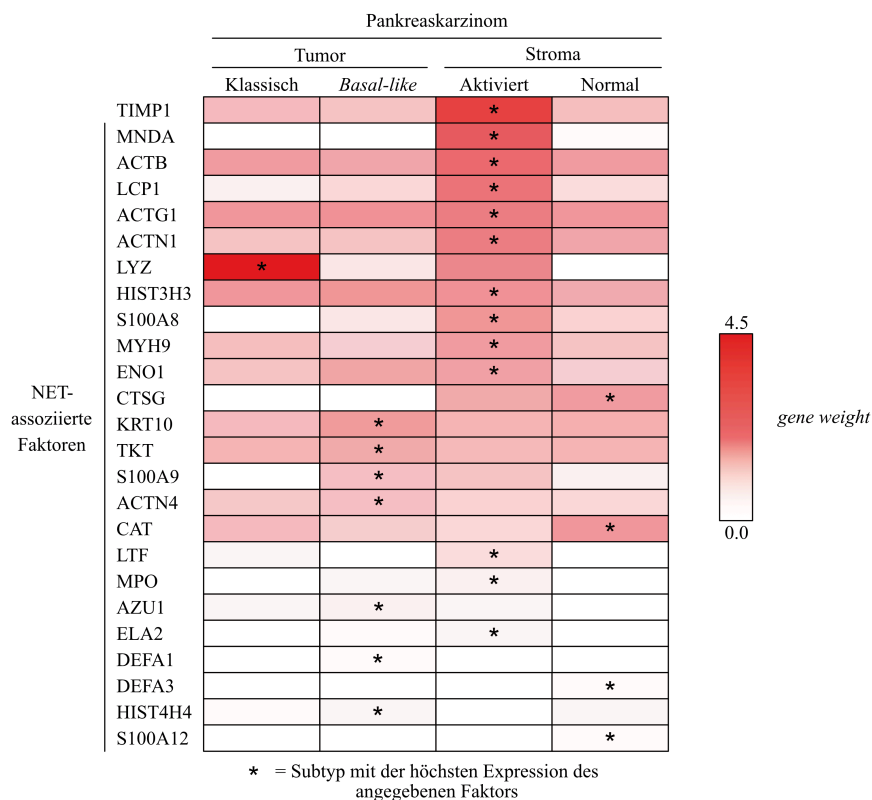


Abbildung 3.13: Assoziation von TIMP-1 mit NET Faktoren in PDAC Tumoren. Heatmap mit den relativen *gene weights* von TIMP-1 und NET-assoziierten Faktoren in verschiedenen Tumor und Stroma Subtypen in humanen Pankreastumoren. Der Subtyp mit dem höchsten *gene weight* des jeweiligen Faktors ist mit einem Stern (*) markiert. Die Daten wurden von M.Sc. Chris Hermann (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Abkürzungen: MNDA, *Myeloid Cell Nuclear Differentiation Antigen*; ACTB, *Actin Beta*; LCP1, *Lymphocyte Cytosolic Protein 1*; ACTG1, *Actin Gamma 1*; ACTN1, *Actinin Alpha 1*; LYZ, *Lysozyme*; HIST3H3, *Histone Cluster 3, H3*; S100A8, *S100 Calcium Binding Protein A8*; MYH9, *Myosin Heavy Chain 9*; ENO1, *Enolase 1*; CTSG, *Cathepsin G*; KRT10, *Keratin 10*; TKT, *Transketolase*; S100A9, *S100 Calcium Binding Protein A9*; ACTN4, *Actinin Alpha 4*; CAT, *Catalase*; LTF, *Lactotransferrin*; MPO, *Myeloperoxidase*; AZU1, *Azurocidin 1*; ELA2, *Elastase, Neutrophil Expressed*; DEFA1, *Defensin Alpha 1*; DEFA3, *Defensin Alpha 3*; HIST4H4, *Novel Transcript, Overlapping HIST4H4*; S100A12, *S100 Calcium Binding Protein A12*. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

Zudem korrelierten die Plasmaspiegel von TIMP-1 in PDAC Patienten mit den Plasmaspiegeln von NETs (Abb. 3.14, A) und Patienten mit hohen NET-Spiegeln hatten signifikant mehr TIMP-1 im Plasma (Abb. 3.14, B).

3. Ergebnisse

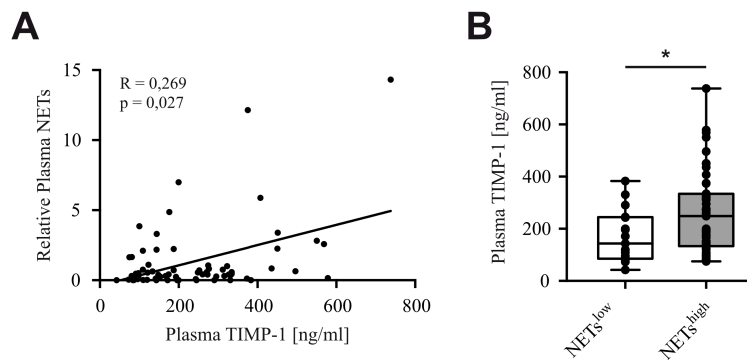


Abbildung 3.14: TIMP-1 und NETs korrelieren im Plasma von PDAC Patienten. (A) Korrelation der relativen Plasma NET-Spiegel mit den TIMP-1 Plasmaspiegeln von PDAC Patienten ($n = 68$). (B) Plasma TIMP-1-Spiegel von PDAC Patienten mit niedrigen NET-Spiegeln (NET^{low}, [$< 0,1225$ Plasma NETs (korrigierte Absorption bei 450 nm), $n = 17$]) und PDAC Patienten mit hohen NET-Spiegeln (NET^{high}, [$\geq 0,1225$ Plasma NETs (korrigierte Absorption bei 450 nm), $n = 51$]). Dargestellt sind der Median beider Gruppen, sowie die Messwerte von individuellen Patienten (Punkte) und die minimalen und maximalen Werte als Fehlerbalken. *, $p \leq 0,05$. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3.1.11. TIMP-1 und NETs sind prognostische Marker in PDAC Patienten

Die Tatsache, dass TIMP-1 und NETs Einfluss auf das Überleben der KPC Mäuse hatten, führte zur Frage der prognostischen Relevanz dieser beiden Marker in PDAC Patienten. Eine *two-cluster*-Analyse führte zur Einteilung von PDAC Patienten in Patienten mit hohen und Patienten mit niedrigen TIMP-1 bzw. NET Plasmaspiegeln. Patienten mit hohen TIMP-1 (TIMP-1^{high}) oder hohen NET Plasmaspiegeln (NET^{high}) hatten ein signifikant verkürztes Überleben im Vergleich zu Patienten mit niedrigen TIMP-1 (TIMP-1^{low}) oder NET (NET^{low}) Plasmaspiegeln (Abb. 3.15, A und B). Die Kombination beider Parameter verbesserte die prognostische Aussagekraft noch weiter, TIMP-1^{high}NET^{high} (TINE^{high}) Patienten hatten so ein mehr als 15-fach erhöhtes Risiko zu sterben als TIMP-1^{low}NET^{low} Patienten (Abb. 3.15, C). Da kein Unterschied im Überleben zwischen TIMP-1^{high}NET^{low} und TIMP-1^{low}NET^{high} Patienten zu beobachten war (Abb. 3.15, D), wurden diese Patienten einer Gruppe zugeordnet (TINE^{int}). Im Vergleich hierzu hatten Patienten mit erhöhten CA19-9-Spiegeln ein nur knapp 5-fach erhöhtes Risiko zu sterben als CA19-9^{low} Patienten (Abb. 3.15, E).

3. Ergebnisse

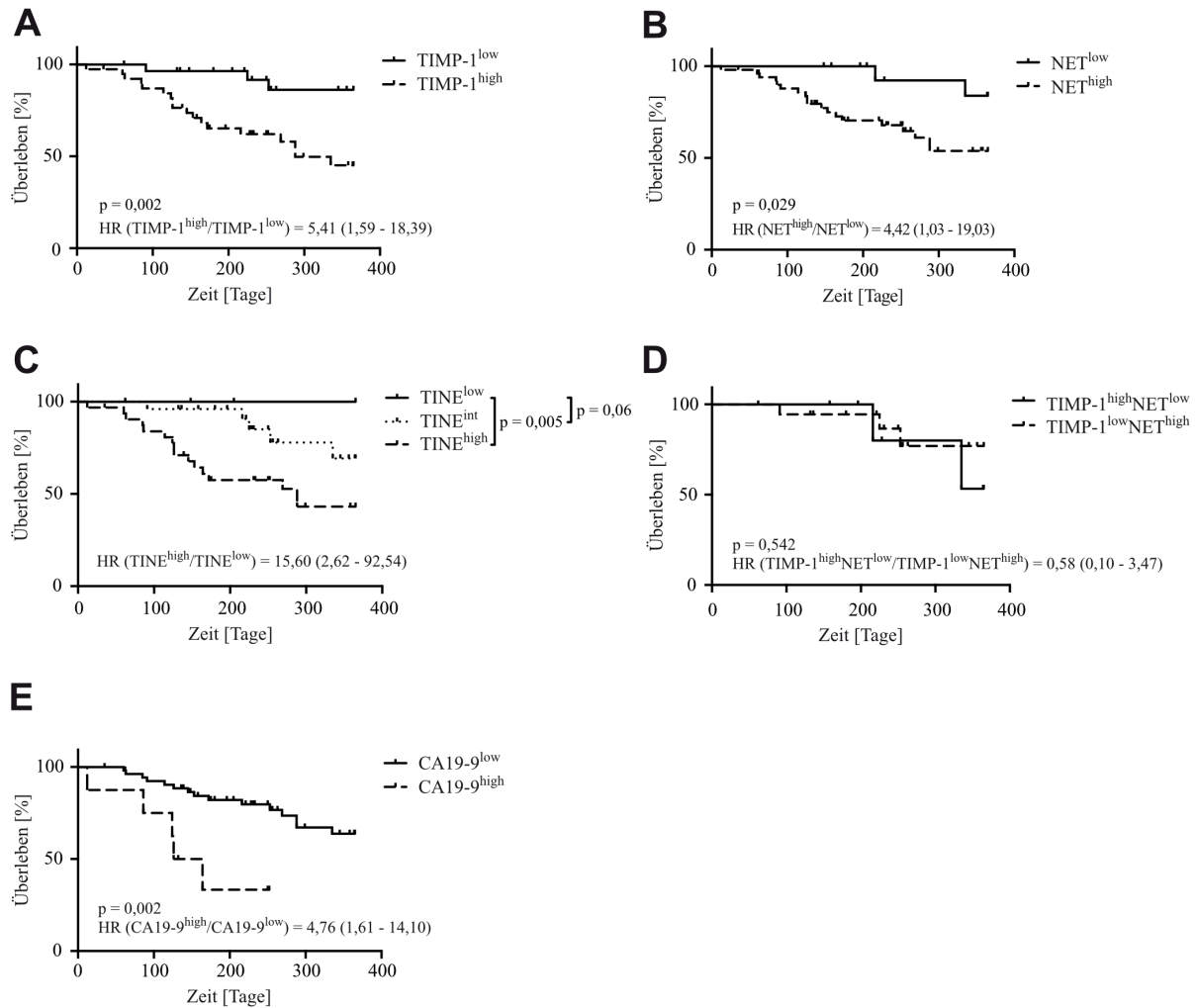


Abbildung 3.15: TIMP-1 und NETs sind prognostische Marker in PDAC Patienten. Kaplan-Meier Überlebenskurven von PDAC Patienten, eingeteilt nach deren Plasma TIMP-1 (A, C, E), Plasma NETs (B, C, D) oder Serum CA19-9-Spiegel (E). *Cut-off* Werte: Plasma TIMP-1, 174,42 ng/ml; Plasma NETs, 0,1225 korrigierte Absorption bei 450 nm; CA19-9, 1088 U/ml. Ein-Jahr-Überlebensraten der einzelnen Patientengruppen: TIMP-1^{low} (n = 29), 86,1 %, TIMP-1^{high} (n = 39), 45,2 %; NET^{low} (n = 17), 83,9 %; NET^{high} (n = 51), 53,9 %; TIMP-1^{high}NET^{low} (n = 19), 77,0 %; TIMP-1^{low}NET^{high} (n = 7), 53,3 %; TIMP-1^{low}NET^{low} (TINE^{low}, n = 9), 100 %; TIMP-1^{low}NET^{high} / TIMP-1^{high}NET^{low} (TINE^{int}, n = 26), 69,3 %; TIMP-1^{high}NET^{high} (TINE^{high}, n = 32), 43,1 %; CA19-9^{low} (n = 54), 63,8 %; CA19-9^{high} (n = 8), nicht definiert, Patienten in dieser Gruppe starben innerhalb eines Jahres. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

Die prognostischen Werte von TIMP-1, NETs und CA19-9 wurden zusätzlich mittels *ROC curve* Analyse untersucht. Es stellte sich heraus, dass TIMP-1, NETs, sowie deren Kombination eine hohe Sensitivität aber eine eher niedrige Spezifität für eine Vorhersage des Überlebens von PDAC Patienten aufwiesen (Abb. 3.16, A bis C). Im Gegensatz dazu zeigte CA19-9 eine hohe Spezifität aber eine eher geringe Sensitivität (Abb. 3.16, D).

3. Ergebnisse

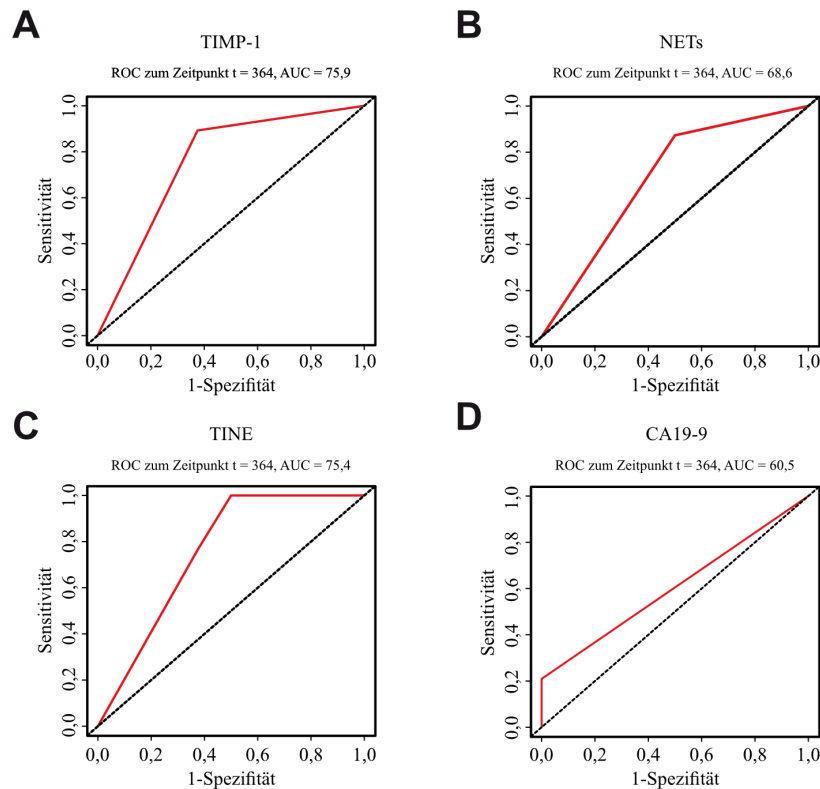


Abbildung 3.16: ROC curve Analyse von TIMP-1, NETs und CA19-9. ROC Kurven für Plasma TIMP-1 (A), NETs (B) und TINE (TIMP-1 / NET-Kombination) (C), sowie Serum CA19-9 (D). Die Daten wurden von M.Sc. Chris Hermann (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

Die Kombination beider Marker (TINE und CA19-9) resultierte in einer sensitiveren und spezifischeren Biomarkerkombination (TINECA, **Abb. 3.17, A**), die einen höheren prognostischen Wert als CA19-9 alleine aufwies (**Abb. 3.17, B**). Mit dieser Biomarkerkombination ließen sich vier prognostisch unterschiedliche Subpopulationen von PDAC Patienten auftrennen (**Abb. 3.17, C**).

3. Ergebnisse

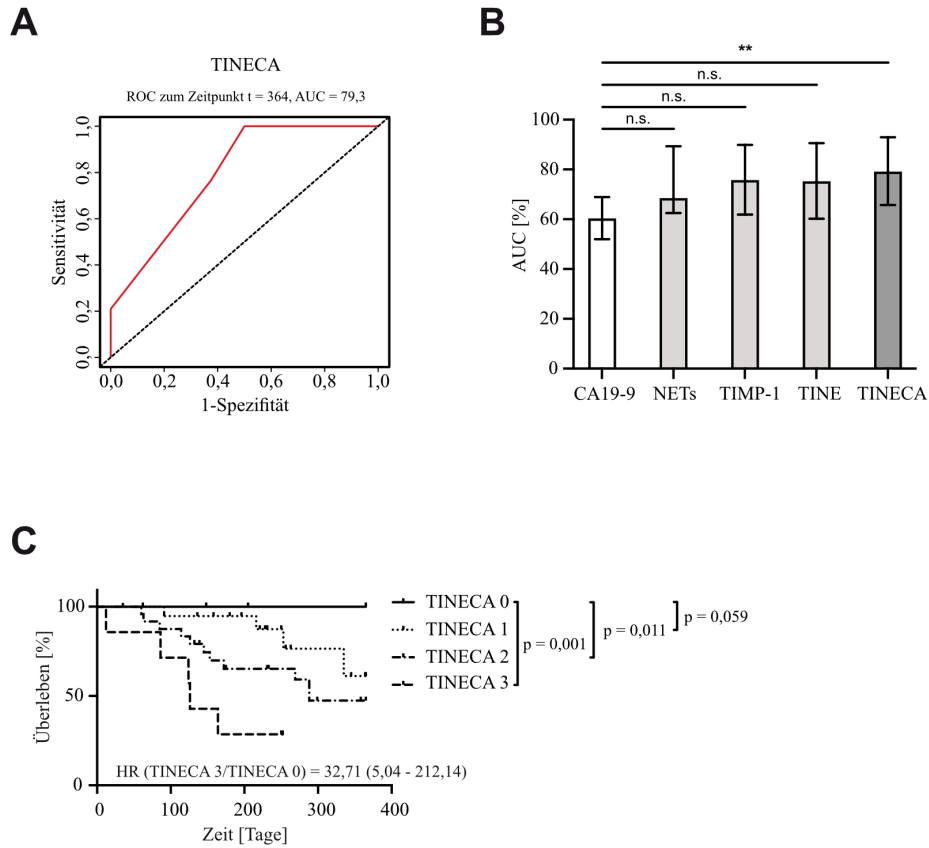


Abbildung 3.17: Die Kombination von TIMP-1, NETs und CA19-9 erhöht den prognostischen Wert. (A) ROC Kurve von TINECA (TIMP-1 / NET / CA19-9-Kombination). **(B)** Area Under the Curve (AUC) mit den zugehörigen 95 % Konfidenzintervallen von TIMP-1 (TIMP-1^{high} vs. TIMP-1^{low}), NETs (NET^{high} vs. NET^{low}), CA19-9 (CA19-9^{high} vs. CA19-9^{low}), sowie deren Kombinationen (TINE^{high} vs. TINE^{int} vs. TINE^{low}; TINECA 0 vs. TINECA 1 vs. TINECA 2 vs. TINECA 3). Die Daten zu **(A)** und **(B)** wurden von M.Sc. Chris Hermann (Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie, Technische Universität München) zur Verfügung gestellt. **(C)** Kaplan-Meier Überlebenskurven von PDAC Patienten, eingeteilt nach deren Plasma TIMP-1, Plasma NET und Serum CA19-9-Spiegel. *Cut-off* Werte: Plasma TIMP-1, 174,42 ng/ml; plasma NETs, 0,1225 korrigierte Absorption bei 450 nm; CA19-9, 1088 U/ml. Ein-Jahr-Überlebensraten der einzelnen Patientengruppen: TINECA 0 (keiner der Parameter ist über dem *cut-off* Wert, n = 10), 16,1 %; TINECA 1 (einer der Parameter ist über dem *cut-off* Wert, n = 20), 32,3 %; TINECA 2 (zwei der Parameter sind über dem *cut-off* Wert, n = 25), 40,3 %; TINECA 3 (drei der Parameter sind über dem *cut-off* Wert, n = 7), 11,3 %. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021b).

3.2. CD74 ist ein funktioneller Rezeptor von TIMP-1

3.2.1. Die Interaktion von TIMP-1 mit CD74 aktiviert ZAP-70 in B-Lymphomzellen

Um zu analysieren, ob TIMP-1 möglicherweise nicht nur über die Interaktion mit CD63, sondern auch über eine Bindung an CD74 Signalwege in Immunzellen aktivieren kann, wurde zunächst die Expression von CD74 in verschiedensten Zelltypen verglichen. Hierfür wurden CD74 Expressionsdaten aus dem *Human Protein Atlas* (HPA) ausgewertet. Es zeigte sich, dass CD74 vor allem in Immunzellen stark exprimiert wird, allen voran B-Zellen (**Abb. 3.18**). Für die Analyse von potentiellen Auswirkungen einer TIMP-1/CD74 Interaktion wurde daher die B-Lymphomzelllinie Namalwa herangezogen. Es zeigte sich, dass Namalwa Zellen, im Gegensatz zu LX-2 Zellen, CD74 Protein exprimierten (**Abb. 3.18**).

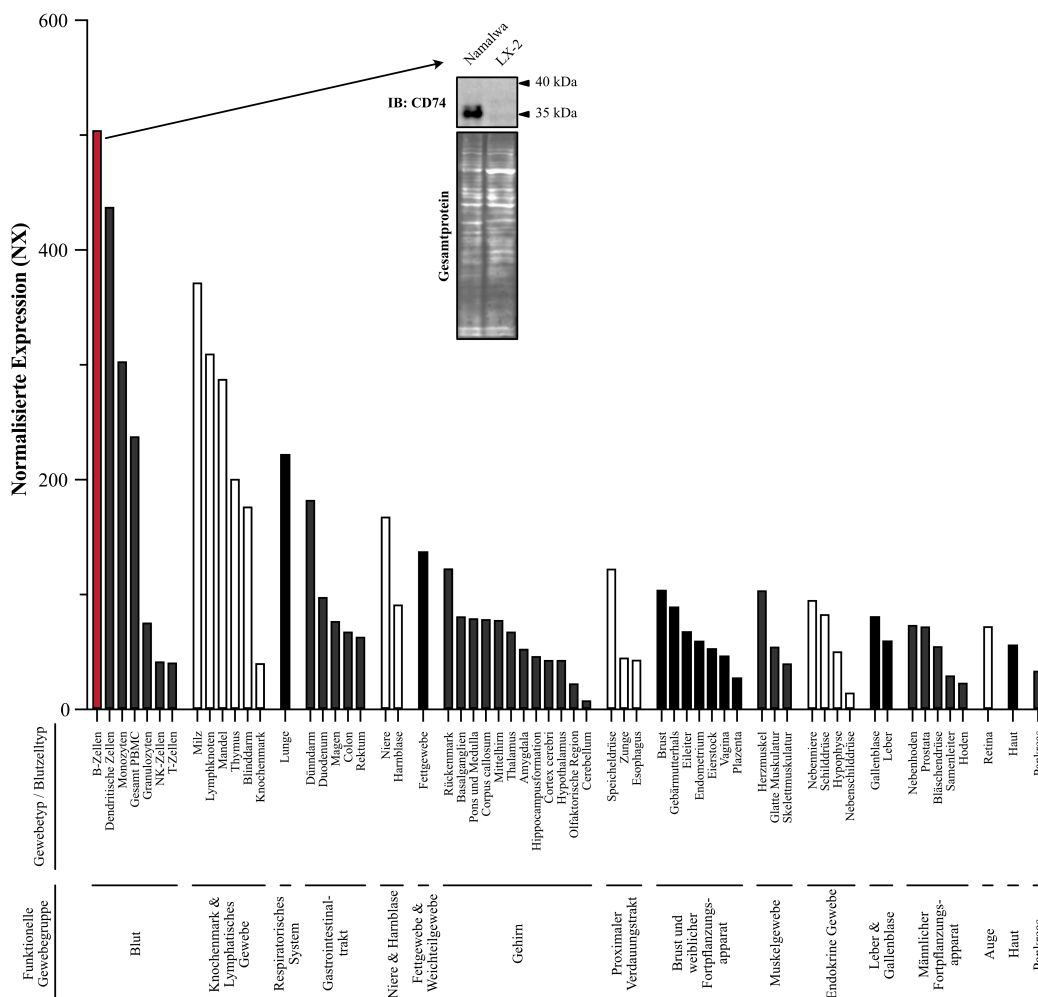


Abbildung 3.18: CD74 Expression in verschiedenen Geweben und Zellen. Normalisierte Expression von CD74 in verschiedenen Geweben und Zellen. Die Daten stammen aus dem *Human Protein Atlas* (HPA) (Uhlén *et al.*, 2015). Zusätzlich ist eine repräsentative Western Blot Analyse der CD74 Expression von B-Lymphomzellen (Namalwa) und hepatischen Sternzellen (LX-2), die keine endogene CD74 Expression aufwiesen, gezeigt. Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde unter Verwendung des *SYPRO Ruby Protein-Blot* Färbemittels analysiert. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021a).

3. Ergebnisse

Im nächsten Schritt wurden Namalwa Zellen mit rekombinatem humanem TIMP-1 stimuliert und anschließend die Phosphorylierung von ZAP-70 analysiert. Es zeigte sich, dass TIMP-1 zu einem signifikanten Anstieg der P-ZAP-70-Spiegel führte (**Abb. 3.19, A**). Dieser Anstieg war vergleichbar mit dem Effekt von MIF (**Abb. 3.19, A**) und war nicht auf eine Erhöhung der gesamt ZAP-70 Proteinspiegel zurückzuführen (**Abb. 3.19, B**).

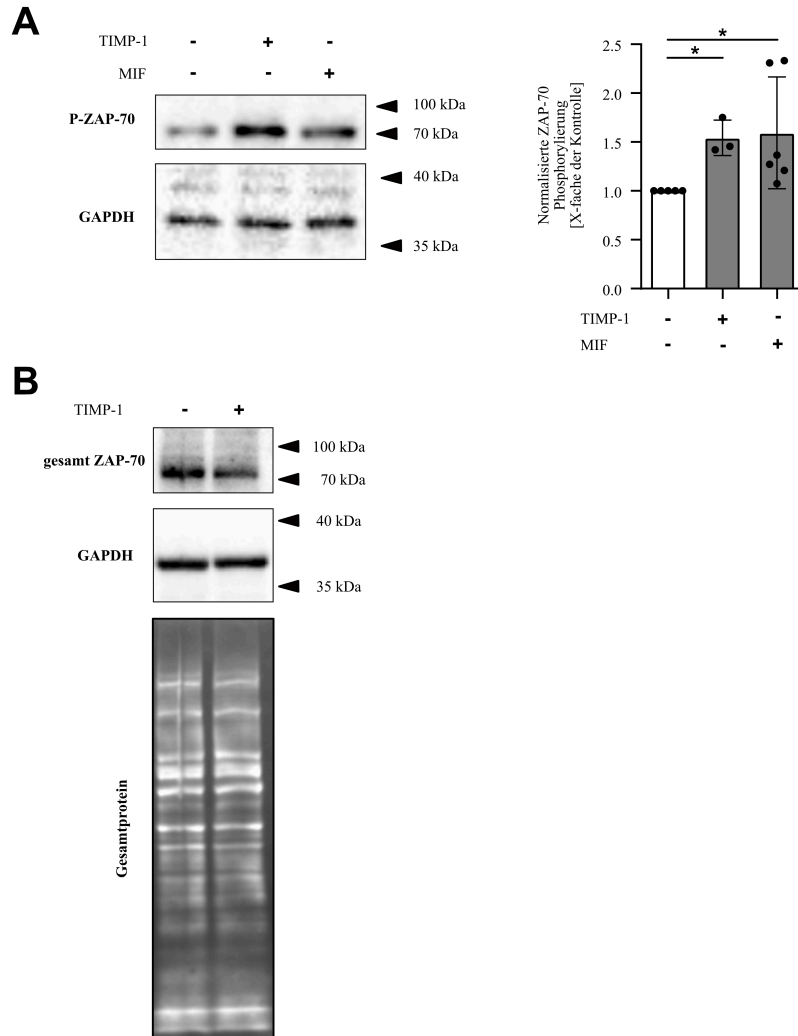


Abbildung 3.19: TIMP-1 induziert die ZAP-70 Phosphorylierung in Namalwa Zellen. Western Blot Analyse von Zelllysaten aus TIMP-1- oder MIF-stimulierten B-Lymphomzellen (Namalwa). (**A**) Densitometrische Analyse der Menge an phosphoryliertem ZAP-70, normiert auf GAPDH und die unbehandelte Kontrolle. Namalwa Zellen wurden mit TIMP-1 (n = 3) oder MIF (n = 6) stimuliert, oder blieben unbehandelt (n = 4). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. (**B**) Repräsentative Western Blot Analyse von TIMP-1-stimulierten Namalwa Zellen. Eine gleichmäßige Proteinbeladung wurde unter Verwendung des *SYPRO Ruby Protein-Blot* Färbemittels analysiert. n.s., nicht signifikant; *, $p \leq 0,05$. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021a).

3. Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob dieser Effekt über die Interaktion von TIMP-1 mit CD74 ausgelöst wurde, wurde die CD74 Expression in Namalwa Zellen mittels *knockdown* reduziert (**Abb. 3.20, A bis C**). Diese Interferenz mit der CD74 Expression führte zu einer kompletten Blockade sowohl der durch TIMP-1 bewirkten ZAP-70 Phosphorylierung, als auch der MIF Effekte (**Abb. 3.20, D**).

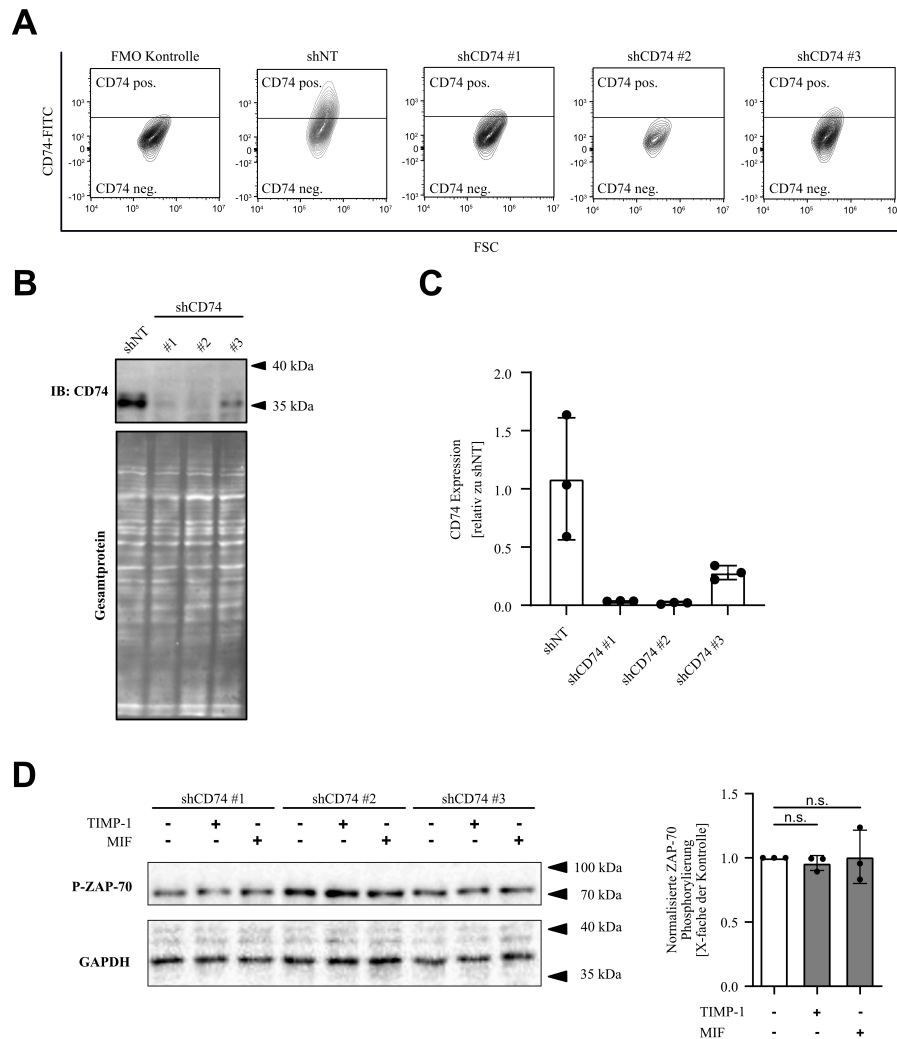


Abbildung 3.20: TIMP-1 induziert die ZAP-70 Phosphorylierung über CD74. (A) Repräsentative Durchflusszytometrieanalyse der CD74 Expression von drei verschiedenen CD74 *knockdown* B-Lymphomzelllinien (shCD74 #1, #2, #3) und den Kontrollzellen (shNT). (B) Repräsentative Western Blot Analyse der CD74 Expression in Zelllysaten der entsprechenden B-Lymphomzelllinien. (C) Repräsentative RT-qPCR Analyse der CD74 Expression der entsprechenden B-Lymphomzelllinien. Die 18S rRNA diente als interne Normalisierungskontrolle, die Ergebnisse sind normiert auf die shNT Kontrolle und repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei technischen Replikaten. (D) Western Blot Analyse und die zugehörige densitometrische Auswertung der ZAP-70 Phosphorylierung in den entsprechenden B-Lymphomzelllinien, nachdem diese wie angegeben stimuliert worden sind. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung. n.s., nicht signifikant. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021a).

3. Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob TIMP-1 und MIF möglicherweise über einen ähnlichen Interaktionsbereich mit CD74 interagieren, wurden Namalwa Zellen vor Stimulation mit TIMP-1 mit einem Peptid (C36L1) inkubiert, das die bekannte Bindestelle von MIF auf CD74 blockiert (Figueiredo *et al.*, 2018). Tatsächlich verhinderte das C36L1 Peptid die TIMP-1-induzierte ZAP-70 Phosphorylierung (**Abb. 3.21, A**), ohne dabei das Überleben der Zellen zu beeinflussen (**Abb. 3.21, B**).

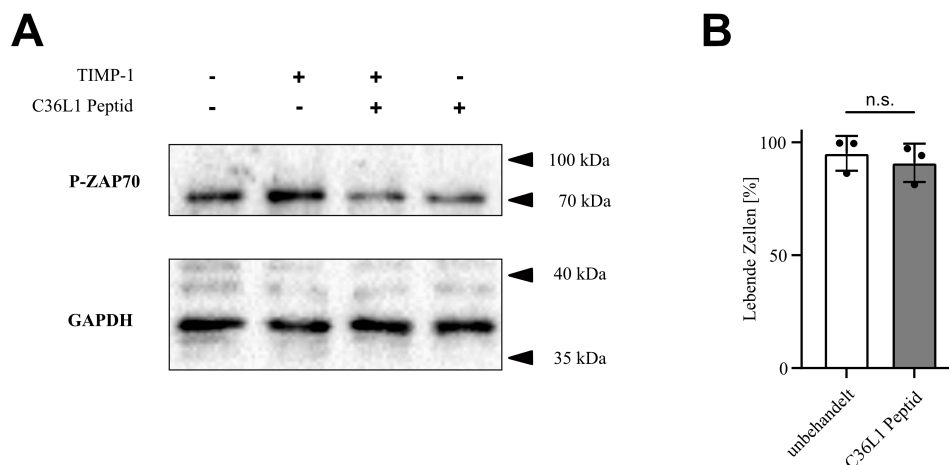


Abbildung 3.21: Das C36L1 Peptid blockiert die TIMP-1-induzierte ZAP-70 Phosphorylierung. (A) Repräsentative Western Blot Analyse der ZAP-70 Phosphorylierung in Zelllysaten der B-Lymphomzelllinie Namalwa. Die Zellen wurden mit TIMP-1 stimuliert, nachdem sie mit dem CD74-blockierenden C36L1 Peptid inkubiert worden sind. (B) Analyse der lebenden Namalwa Zellen (n = 3) mittels Durchflusszytometrie nach Inkubation mit dem C36L1 Peptid. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung. n.s., nicht signifikant. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021a).

3.2.2. TIMP-1 induziert die ZAP-70 Phosphorylierung über seine N-terminale Domäne

Da TIMP-1 ein multifunktionales Protein ist, das verschiedene Funktionen über seine N- bzw. C-terminale Domäne bewirkt, stellte sich nun die Frage, welche dieser beiden Domänen für die TIMP-1-vermittelte ZAP-70 Phosphorylierung verantwortlich ist. Um dies zu untersuchen, wurden Namalwa Zellen mit N-TIMP-1 stimuliert und anschließend die Phosphorylierung von ZAP-70 untersucht. Es stellte sich heraus, dass N-TIMP-1 in der Lage war, die ZAP-70 Phosphorylierung zu induzieren (**Abb. 3.22**).

3. Ergebnisse

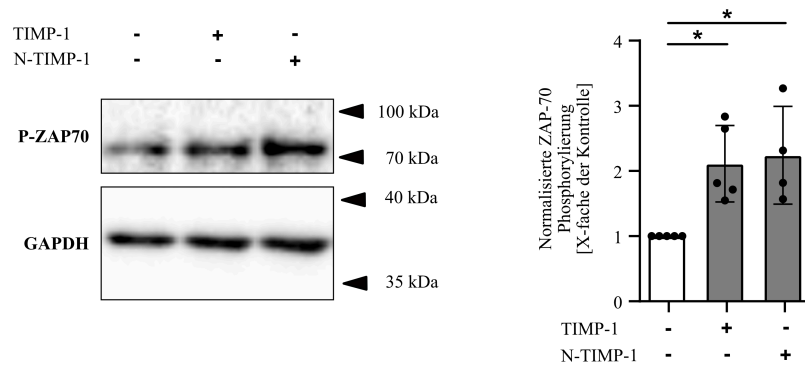


Abbildung 3.22: TIMP-1 induziert die ZAP-70 Phosphorylierung über seine N-terminale Domäne. Repräsentative Western Blot Analyse der ZAP-70 Phosphorylierung in Zelllysaten der B-Lymphomzelllinie Namalwa, sowie die densitometrische Auswertung. Die Zellen wurden mit TIMP-1 (n = 5) oder N-TIMP-1 (n = 4) stimuliert oder blieben unbehandelt (n = 5). Für die densitometrische Analyse der Menge an phosphoryliertem ZAP-70 wurden dessen Bandenintensitäten auf die entsprechende GAPDH Intensität und anschließend auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Die Ergebnisse repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung. *, $p \leq 0,05$. Entnommen und modifiziert aus (Schoeps *et al.*, 2021a).

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse stellen eine klare Verbindung zwischen der zytokinischen Eigenschaft von TIMP-1 und der Aktivierung von Immunzellen her. Hierbei konnten die genauen molekularen Mechanismen identifiziert werden, die für die TIMP-1-induzierten Effekte notwendig sind. So konnte CD63 als zellulärer TIMP-1-Rezeptor auf Neutrophilen ausgemacht werden, über den TIMP-1 die Bildung von NETs induziert. Außerdem konnte CD74 als funktioneller neuer TIMP-1 Rezeptor auf B-Lymphomzellen beschrieben werden. Die Tatsache, dass das TIMP-1/CD74 *Signaling* über die N-terminale Domäne von TIMP-1 vermittelt wird, ordnet der bisher ausschließlich als anti-proteolytisch beschriebenen N-terminalen Domäne eine völlig neue Qualität zu und eröffnet eine neue Sichtweise auf die Multifunktionalität von TIMP-1.

4.1. TIMP-1 und *Neutrophil Extracellular Traps*

4.1.1. Das Zytokin TIMP-1 induziert die Bildung von NETs über CD63

Die Beobachtung, dass TIMP-1 zur Ausbildung von NETs führte, passt zur bereits beschriebenen Neutrophilen-aktivierenden Funktion von TIMP-1. Es war bekannt, dass TIMP-1, in der gleichen Konzentration die auch zur Bildung von NETs führte (500 ng/ml), humane Granulozyten aktiviert, sie vor Apoptose schützt und deren Migration durch Membranen blockiert (Chromek *et al.*, 2004). Die Entdeckung, dass die Interaktion von TIMP-1 mit CD63 auf Neutrophilen zur Ausbildung von NETs führte, liefert nun erstmals einen molekularen Mechanismus, wie TIMP-1 proinflammatorische Effekte bewirken kann.

Verglichen mit dem potenten NET-Trigger PMA ist der Effekt von TIMP-1 auf die NET-Bildung allerdings um einiges schwächer. Dieser Beobachtung könnten zwei verschiedene Erklärungen zugrunde liegen. Erstens wäre es möglich, dass physiologische Faktoren wie Zytokine eine andere Art von NETs auslösen als synthetische Stoffe wie PMA. In der Tat ist bereits beschrieben worden, dass unterschiedliche Arten der NET-Bildung existieren. So können Neutrophile eine lytische NET-Bildung eingehen, bei der sie sterben und ihre DNA freisetzen, oder aber NETs freisetzen, ohne dabei zu sterben (nicht-lytische NET-Bildung) (Castanheira und Kubes, 2019). Unterschiedliche Stimuli können dabei verschiedenste Signalwege in Neutrophilen aktivieren und so auf unterschiedliche Weise zur Bildung von NETs führen (Kenny *et al.*, 2017; Papayannopoulos, 2018; Rosazza *et al.*, 2021). Ob die TIMP-1-induzierte NET-Bildung zum Sterben der Neutrophilen führt könnte in weiterführenden Studien untersucht werden.

Zusätzlich zur Art der NET-Bildung, die sich möglicherweise zwischen PMA und TIMP-1 unterscheidet, wäre es möglich, dass sich die Anzahl der aktivierten Neutrophilen stark zwischen TIMP-1 und PMA unterscheidet. In der Tat wurde bereits berichtet, dass PMA über 60 % der

4. Diskussion

Neutrophilen zur Ausbildung von NETs treibt (Kenny *et al.*, 2017), wohingegen nur rund 20 % der TIMP-1 behandelten Neutrophilen NET-positiv waren. Die Effekte von TIMP-1 lagen damit im Bereich von Midkine, einem anderen NET-induzierenden Zytokin (Weckbach *et al.*, 2019). Diese Beobachtung legte nahe, dass TIMP-1 nur eine Subpopulation von Neutrophilen aktiviert (Schoeps *et al.*, 2021b). Tatsächlich konnte in der hier vorliegenden Arbeit CD63 als Marker für TIMP-1-ansprechende Neutrophile identifiziert werden. Dies ist im Einklang mit früheren Studien, die gezeigt haben, dass die Bindung eines Liganden an CD63 die Aktivität von Neutrophilen beeinflusst, indem es die Adhäsion von Neutrophilen reguliert (Skubitz *et al.*, 1996). Da zum Zeitpunkt dieser Studie noch kein natürlicher Ligand von CD63 bekannt war, diente ein agonistischer anti-CD63 Antikörper als Surrogat-Ligand (Skubitz *et al.*, 1996). Die Entdeckung, dass TIMP-1 ein natürlicher Ligand für CD63 auf Neutrophilen war, ermöglicht daher neue Einblicke in die Funktion von CD63 bei der Regulation dieser Immunzellen. Ob CD63 einen generellen Marker für Neutrophile darstellt, die auf physiologische Stimuli mit der Bildung von NETs reagieren, oder ob dies auf die Interaktion mit TIMP-1 beschränkt bleibt, müssen nachfolgende Studien zeigen. Dies wäre von großem Interesse, da bisher keine molekularen Marker bekannt sind, mit denen NET-fähige Neutrophile identifiziert werden können (Castanheira und Kubes, 2019). Die Beobachtung, dass die Neutrophilenpopulation, die auf TIMP-1-Stimulation mit NET-Bildung reagierte, durch eine Vorbehandlung (*Priming*) mit TNF- α erhöht werden konnte, legt nahe, dass es sich bei dieser NET-bildenden Subpopulation um keine „starre“ Population handelt, sondern um Neutrophile in unterschiedlichen Aktivitätsstadien. Tatsächlich kommt CD63 bei unstimulierten Neutrophilen hauptsächlich intrazellulär auf azurophilen Granula vor, wird jedoch bei deren Aktivierung verstärkt auf der Oberfläche exprimiert (Kuijpers *et al.*, 1991). Durch eine solche „Voraktivierung“ könnte die Funktion von Neutrophilen kontextabhängig gesteuert werden und Neutrophile in entzündlichen Umgebungen, in denen z.B. viel TNF- α vorkommt, würden stärker auf TIMP-1 als Stimulus reagieren. So würde einerseits die unnötige Aktivierung von Neutrophilen reduziert, was Gewebeschäden vorbeugt, und andererseits eine potente Aktivierung in bestimmten Situationen gewährleistet. Denkbar wäre hier nicht nur der PDAC Kontext, in dem TNF- α eine zentrale Rolle bei der Tumorprogression innehat und sowohl von Makrophagen (Tu *et al.*, 2021) als auch von Tumorzellen (Egberts *et al.*, 2008) sezerniert wird, sondern auch bei nicht neoplastischen Erkrankungen wie Sepsis, die über TNF- α gesteuert werden (Cohen, 2002). Da TIMP-1 (Lorente *et al.*, 2014) und NETs (Mao *et al.*, 2021) ebenfalls bei diesen Erkrankungen erhöht sind, ist es möglich, dass die beschriebenen *Priming* Effekte auch *in vivo* eine Rolle spielen (**Abb. 4.1**).

4. Diskussion

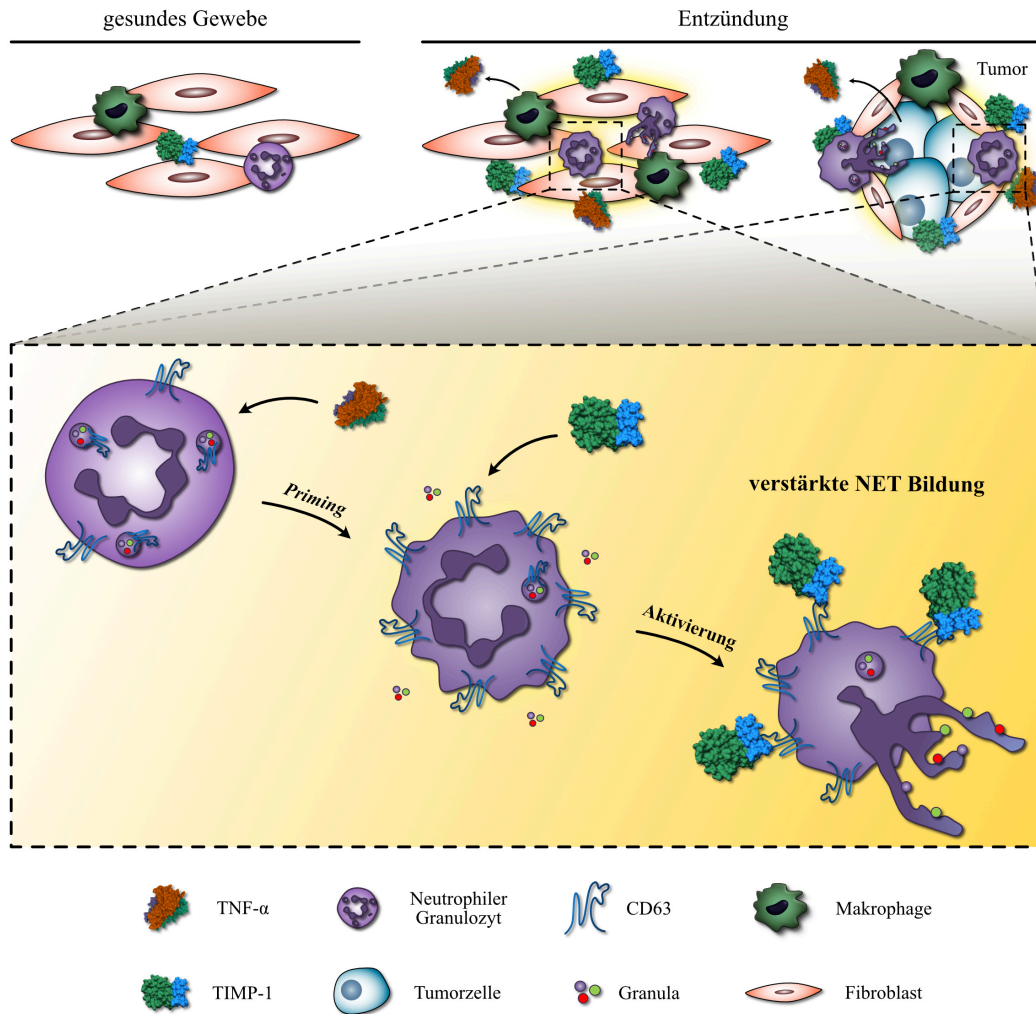


Abbildung 4.1: Hypothetisierter Ablauf des *Primings* und der Bildung von NETs in Entzündungen. In inflammatorischen Umgebungen, wie Entzündungen oder Tumoren, sind TIMP-1 und TNF- α in erhöhten Konzentrationen vorhanden. TNF- α könnte unter diesen Bedingungen zum *Priming* von Neutrophilen führen und so die Menge an CD63 an deren Oberfläche erhöhen. Dies würde das Ansprechen von Neutrophilen auf TIMP-1 verbessern und so zu einer verstärkten NET-Bildung führen. Die der Abbildung zugrunde liegenden Informationen wurden entnommen aus (Cohen, 2002; Egberts *et al.*, 2008; Lorente *et al.*, 2014; Grünwald *et al.*, 2016; Tu *et al.*, 2021).

Die Interaktion der C-terminalen Domäne von TIMP-1 mit CD63 führte zur Phosphorylierung von ERK, einem bereits bekannten Signalweg bei der Ausbildung von NETs (Hakkim *et al.*, 2011). Diese Beobachtung passt zu der Entdeckung, dass die Bindung von TIMP-1 an CD63 auf menschlichen Brustepithelzellen ERK aktiviert (Jung *et al.*, 2006), und ordnet der zytokinen Eigenschaft von TIMP-1 proinflammatorische Effekte zu.

4.1.2. TIMP-1 induziert NETs in PDAC

TIMP-1 induzierte die NET-Bildung in Konzentrationen, die im Plasma von PDAC Patienten vorhanden sind (Grünwald *et al.*, 2016), nicht jedoch in physiologischen Konzentrationen. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die TIMP-1-bedingte NET-Bildung nur in Situationen stattfindet, bei denen sehr hohe TIMP-1-Spiegel vorliegen, wie beispielsweise Entzündungen (Lorente *et al.*, 2014; Nukarinen *et al.*, 2016). Diese schwellenwertabhängige NET-Induktion (Schoeps *et al.*, 2021b) könnte physiologisch von zentraler Bedeutung sein, da TIMP-1, verglichen mit klassischen Zytokinen, die in pikomolaren Konzentrationen im Plasma vorkommen (Stenken und Poschenrieder, 2015), bereits bei gesunden Personen in relativ hohen Konzentrationen vorkommt (ca. 100 ng/ml (Hermann *et al.*, 2021)) und eine unnötige Aktivierung von Neutrophilen verhindert werden muss. Es ist anzunehmen, dass die TIMP-1-Konzentrationen im entzündeten Gewebe die Konzentrationen im Plasma übersteigen und dass es daher vor allem im Gewebe zur Ausbildung von TIMP-1-induzierten NETs kommt. Tatsächlich zeigten die Beobachtungen im Kontext von PDAC, dass TIMP-1 im Primärtumor, in dem es eine große Menge an Neutrophilen (Jin *et al.*, 2019) und TIMP-1 (Grünwald *et al.*, 2016) gibt, NETs induziert. Die Korrelation zwischen TIMP-1 und NETs im Tumor und Plasma von PDAC Patienten erlaubt jedoch keine Aussage darüber, ob die im Plasma gefundenen NETs auch wirklich im Blut entstanden sind oder ob diese in der Umgebung des Primärtumors induziert wurden und dann mit dem Blut in die Peripherie transportiert wurden. Dennoch ist die Beobachtung, dass TIMP-1 NETs bereits in Konzentrationen induzierte, die im Plasma messbar sind, bemerkenswert, da dies im Kontrast zu anderen Zytokinen steht, bei denen die Ausbildung von NETs bisher nur bei sehr hohen Konzentrationen, die weit über deren Plasmaspiegel liegen, nachgewiesen wurde (Keshari *et al.*, 2012).

Die Entdeckung, dass eine Depletion von TIMP-1 in KPC Mäusen sowohl zu einer Verringerung der NET-Bildung in Tumoren führte, als auch zu einem längeren Überleben dieser Mäuse, legt die Schlussfolgerung nahe, dass die TIMP-1-bedingte NET-Bildung eine tumorfördernde Rolle im PDAC Kontext spielt (Schoeps *et al.*, 2021b). Diese Hypothese wird weiterhin durch die Beobachtung gestützt, dass eine Depletion von PAD4 und damit von NETs, ebenfalls zu einem verlängerten Überleben der Mäuse führte. Da PAD4 hauptsächlich von Neutrophilen und Monozyten exprimiert wird (Vossenaar *et al.*, 2003), sind bei der systemischen Depletion von PAD4 vorrangig Effekte auf diese Zellen zu erwarten. PAD4 bildet das einzige Mitglied der PAD-Enzym Familie, das im Zellkern gefunden wird (Nakashima *et al.*, 2002). Der Verlust dieses Enzyms kann also nicht durch andere PAD Enzyme kompensiert werden und die PAD4-vermittelte Citrullinierung der Histone im Prozess der NET-Bildung (Hemmers *et al.*, 2011) kann nicht ablaufen, weshalb PAD4-defiziente Mäuse als weit verbreitetes Modell verwendet werden, um die Rolle von NETs *in vivo* zu untersuchen (Li *et al.*, 2010; Hemmers *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2020). Allerdings konnten einzelne Studien bereits zeigen, dass PAD4 in verschiedensten humanen Tumoren überexprimiert wird (Chang *et al.*, 2009; Yuzhalin, 2019; Chen *et al.*, 2021) und dass die PAD4 Expression eine tumorfördernde Auswirkung haben kann (Yuzhalin,

4. Diskussion

2019). Auch in PDAC ist eine höhere Expression von PAD4 beschrieben worden (Chang und Han, 2006), wobei noch nicht ganz klar ist, auf welche Zellen im Tumor diese erhöhte Expression zurückzuführen ist. Obwohl in verschiedenen humanen PDAC Zelllinien keine PAD4 Expression gefunden werden konnte (Uysal-Onganer *et al.*, 2021), lassen sich direkte Effekte einer PAD4 Depletion auf Tumorzellen in KPC-PAD4 KO Mäusen nicht ausschließen. Um solche NET-unabhängigen Effekte einer PAD4 Depletion ausschließen zu können, müsste die PAD4 Depletion spezifisch in Neutrophilen durchgeführt werden, beispielsweise mit PAD4-flankierenden *FLP Recombinase Target* (FRT) Sequenzen und einer *Flippase* (FLP) Rekombinase unter Kontrolle eines neutrophilenspezifischen Promotors. Die Verwendung des weit verbreiteten *Cre-lox*-Systems zur Depletion von PAD4 bietet sich in KPC Mäusen nicht an, da es zu einer Interferenz mit dem *Cre-lox*-System des KPC Modells kommen würde.

Obwohl die Aussagekraft der globalen PAD4 Depletion begrenzt ist, passen die erhaltenen Daten zur Hypothese, dass TIMP-1 über die Bildung von NETs tumorfördernd wirkt. Dies ist im Einklang mit bereits publizierten Studien, die NETs eine tumorfördernde Eigenschaft im PDAC Kontext zuschreiben. So konnte gezeigt werden, dass NETs das Pankreastumorwachstum über die Aktivierung von pankreatischen Sternzellen verstärken (Miller-Ocuin *et al.*, 2019) und zur Immunosuppression beitragen (Zhang *et al.*, 2020). Interessant ist hierbei, dass Pankreastumorzellen selbst, über die Sekretion von bisher nicht definierten Proteinen, Neutrophile dazu veranlassen, NETs zu bilden (Abdol Razak *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2019). Obwohl IL-17 als Faktor identifiziert wurde, der die Sekretion von NET-induzierenden Proteinen durch PDAC Zellen bewirkt (Zhang *et al.*, 2020), konnte bisher kein Zytokin identifiziert werden, das direkt NETs im Kontext von PDAC auslöst (Schoeps *et al.*, 2021b). Die Entdeckung, dass TIMP-1 direkt die NET-Bildung induzieren konnte, ordnet damit zum ersten Mal einem PDAC-assoziierten Faktor eine NET-fördernde Eigenschaft zu (Schoeps *et al.*, 2021b). Da eine Depletion von TIMP-1 allerdings nicht zu einer kompletten Unterdrückung der NET-Bildung in Tumoren führte, ist es wahrscheinlich, dass weitere Faktoren existieren, die NETs in diesem Kontext auslösen (Schoeps *et al.*, 2021b).

Es ist bekannt, dass sowohl TIMP-1 (Seubert *et al.*, 2015; Grünwald *et al.*, 2016), als auch NETs (Cools-Lartigue *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2020; Langiu *et al.*, 2022) prometastatische Effekte besitzen. Daher ist es möglich, dass ein Zusammenhang zwischen der TIMP-1 Expression und der Metastasierung von Tumorzellen besteht (Schoeps *et al.*, 2021b). In der Tat sind viele der tumorfördernden Effekte von NETs auf eine verstärkte Bildung von Metastasen zurückzuführen (Yang *et al.*, 2020; Langiu *et al.*, 2022). So wurde bereits gezeigt, dass der DNA-Anteil in NETs an Tumorzellen bindet und intrazelluläre Signalwege aktiviert, die wiederum Zellmigration und die Metastasierung in die Leber und Lunge verstärken (Yang *et al.*, 2020). Diese Beobachtungen passen zu früheren Ergebnissen, die zeigten, dass extrazelluläre DNA, unabhängig von NETs, die Invasion und Metastasierung von PDAC Zellen erhöht (Wen *et al.*, 2013). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass NETs Tumorzellen in der Leber fangen und so die Metastasierung verstärken (Cools-Lartigue *et al.*, 2013). Da TIMP-1 eine prämetastatische Nische

4. Diskussion

in der Leber schafft (Seubert *et al.*, 2015; Grünwald *et al.*, 2016) und so zur verstärkten Metastasierung in die Leber beiträgt, ist es durchaus möglich, dass TIMP-1 durch die Bildung von NETs in der Leber prometastatisch wirkt. Die Fragestellung, inwieweit TIMP-1-induzierte NETs zur Metastasierung beitragen, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Weitere Studien sind daher notwendig, um festzustellen, inwieweit der Einfluss von TIMP-1 und PAD4 auf das Überleben der KPC Mäuse mit der Bildung von Metastasen zusammenhängt. Hier würden sich z.B. experimentelle Metastasierungsassays anbieten, bei denen PDAC Tumorzellen in TIMP-1- oder PAD4-defiziente Mäuse injiziert werden.

4.1.3. TIMP-1 / NETs als prognostischer Biomarker in PDAC Patienten

Die zentrale Rolle von TIMP-1 bei der Ausbildung von NETs in KPC Mäusen führte zur Frage nach einer klinischen Anwendbarkeit dieser Entdeckung. In der Tat stellte sich heraus, dass die TIMP-1-Spiegel auch in PDAC Patienten mit NETs assoziiert waren, was die Voraussetzung für eine Translation in den klinischen Kontext darstellte.

Zunächst zeigte sich, dass die lokale NET-Bildung im Tumor von PDAC Patienten mit der Präsenz von TIMP-1 assoziiert war, sowohl auf mikroskopischer, als auch auf Transkriptomebene. Die TIMP-1 Expression sowie die Expression von NET-assoziierten Faktoren war dabei hauptsächlich im aktivierten Tumorstroma von PDAC Patienten zu finden, was zu bereits publizierten Daten passt, die zeigen, dass NETs vor allem im intratumoralen Stroma zu finden sind (Jin *et al.*, 2019). Interessant ist, dass sowohl ein aktiviertes Tumorstroma (Moffitt *et al.*, 2015), als auch die lokale Bildung von NETs (Jin *et al.*, 2019) mit einer schlechten Prognose von PDAC Patienten assoziiert sind. NETs könnten also einen wichtigen Bestandteil des aktivierten Tumorstromas bilden. Da TIMP-1 bereits in prämaligen Läsionen erhöht ist (Grünwald *et al.*, 2016), ist es möglich, dass die hier identifizierten proinflammatorischen Eigenschaften von TIMP-1 zu einer Aktivierung des Stromas beitragen und so die Tumorprogression vorantreiben.

Der Zusammenhang zwischen TIMP-1, NETs und dem Überleben von KPC Mäusen führte zur Hypothese, dass TIMP-1 und NETs auch das Überleben von PDAC Patienten vorhersagen können. In der Tat korrelierten die NET-Spiegel mit den TIMP-1-Spiegeln im Plasma von PDAC Patienten und beide Faktoren waren mit einem kürzeren Überleben der Patienten assoziiert. Die Kombination beider prognostischer Indikatoren führte weiterhin zu einer verbesserten Einteilung der PDAC Patienten gemäß deren Prognose. Die Spezifität der TIMP-1/NET Kombination konnte durch Erweiterung um den bereits klinisch etablierten Biomarker CA19-9 zusätzlich erhöht werden. Der Vorteil dieser auf Blut von Patienten basierenden Biomarkerkombination liegt darin, dass zur Vorhersage der Prognose keine Tumorbiopsien entnommen werden müssen. Es genügt lediglich eine Blutprobe die mittels ELISA auf TIMP-1 und NETs untersucht wird und mit den häufig klinisch bestimmten CA19-9-Spiegeln (Ferrone *et al.*, 2006) kombiniert wird. Mit diesem einfachen Verfahren könnten Patienten über eine längere Zeit einfach beobachtet werden. Da die Einteilung von PDAC Patienten anhand des Risikos des

4. Diskussion

Fortschreitens der Erkrankung bisher eine der großen Herausforderungen darstellte (Neoptolemos *et al.*, 2018), könnte die Einteilung der Patienten anhand deren TIMP-1/NET/CA19-9-Spiegel eine neue Möglichkeit darstellen, Patienten mit einem hohen Risiko genauer zu beobachten und mit dieser enorm tödlichen Erkrankung (Quaresma *et al.*, 2015) so früh wie möglich zu intervenieren (Schoeps *et al.*, 2021b). Tatsächlich wird die Notwendigkeit eines neuen und potenten PDAC Biomarkers in Zukunft weiter zunehmen, da davon ausgegangen wird, dass PDAC zur zweitgrößten krebsbedingten Todesursache innerhalb der nächsten 10 Jahre voranschreiten wird (Rahib *et al.*, 2014).

Da sowohl NETs als auch TIMP-1-Spiegel in verschiedensten entzündlichen Erkrankungen erhöht vorliegen (Lorente *et al.*, 2014; Merza *et al.*, 2015; Nukarinen *et al.*, 2016; McDonald *et al.*, 2017), eignet sich diese Biomarkerkombination sehr wahrscheinlich nicht für eine diagnostische Identifikation von PDAC Patienten. Gerade diese Tatsache könnte die TIMP-1/NET Kombination jedoch zu einer breit einsetzbaren prognostischen Biomarkerkombination für entzündliche Erkrankungen machen (Schoeps *et al.*, 2021b). Dies sollte in anderen Erkrankungen getestet werden, beispielsweise Sepsis oder Pankreatitis, in denen bereits bekannt ist, dass TIMP-1 (Lorente *et al.*, 2014; Nukarinen *et al.*, 2016) mit einer schlechten Prognose von Patienten assoziiert ist und die Ausbildung von NETs als wichtiger Mechanismus identifiziert wurde, der den Krankheitsverlauf beeinflusst (Merza *et al.*, 2015; Leppkes *et al.*, 2016; McDonald *et al.*, 2017).

Die Identifikation des molekularen Mechanismus der TIMP-1-bedingten NET-Induktion, sowie der Zusammenhang beider Faktoren mit dem Überleben von Patienten, führt zur Frage der therapeutischen Nutzbarkeit dieser Entdeckung. In diesem Kontext ist es wichtig, sich die Multifunktionalität von TIMP-1 nochmals bewusst zu machen, und die damit einhergehenden möglichen Nebeneffekte einer unbedachten Hemmung dieses Proteins. Bei der Auswahl möglicher Therapieansätze sollte man sich auf die gezielte Interferenz mit einer der vielen TIMP-1 Funktionen konzentrieren. Die Interaktion mit CD63 bietet sich im Krebskontext als vielversprechendes Ziel an, da nicht nur die Auslösung von NETs, sondern auch andere Mechanismen bekannt sind, über die die TIMP-1/CD63 Bindung protumorigene Auswirkungen besitzt (Cui *et al.*, 2015; Grünwald *et al.*, 2016). Eine Blockade dieses Signalweges könnte damit nicht nur Einfluss auf die NET-Bildung haben, sondern auch weitere relevante Signalwege unterdrücken, die z.B. bei der Ausbildung der prämetastatischen Nische eine Rolle spielen (Grünwald *et al.*, 2016). Ein nächster Schritt für die Entwicklung einer zielgerichteten Interferenz mit TIMP-1/CD63 wäre die *in vivo* Analyse der Effekte des LEL-CD63 Peptids oder anti-TIMP-1 Antikörper gegen die letzten 9 Aminosäuren von TIMP-1, die für die Interaktion mit CD63 essentiell sind (Warner *et al.*, 2020). Da bereits gezeigt wurde, dass die Blockade von NETs zu einem verlängerten Überleben von Mäusen im Krebskontext führt (Albregues *et al.*, 2018), könnte die Inhibition der TIMP-1-bedingten NET-Bildung ebenfalls ein vielversprechendes therapeutisches Ziel darstellen (Schoeps *et al.*, 2021b).

4.2. CD74: Ein neuer TIMP-1 Rezeptor auf Immunzellen

4.2.1. Identifikation einer *Moonlighting* Funktion von TIMP-1

TIMP-1 bindet über seine N-terminale Domäne an CD74 (Schoeps *et al.*, 2021a) und konnte so die Aktivierung von intrazellulären Signalwegen auslösen. Diese Beobachtung ordnet dem multifunktionalen Protein TIMP-1 eine völlig neue Dimension der Funktionalität zu, da diese Domäne bisher hauptsächlich mit der anti-proteolytischen Aktivität von TIMP-1 verbunden wurde (Murphy *et al.*, 1991). Die klassische Einteilung der molekularen Funktionen von TIMP-1 in N-terminale MP-inhibition und C-terminales *Signaling* (**Abb. 1.2**) kann damit nicht aufrechterhalten werden (Schoeps *et al.*, 2021a). Die Entdeckung, dass TIMP-1 über ein und dieselbe Domäne sowohl MPs inhibiert (Murphy *et al.*, 1991), als auch an CD74 bindet (Schoeps *et al.*, 2021a), wirft einige Fragen auf. Zunächst stellt sich die Frage, inwieweit die Bindung von MPs an TIMP-1 eine Interaktion zwischen TIMP-1 und CD74 beeinflusst. Falls ähnliche Bereiche von TIMP-1 an einer Bindung von CD74 beteiligt sind wie bei der Bindung an MPs, ist es wahrscheinlich, dass die Bindung des einen Interaktionspartners die Bindung des anderen blockiert. Damit würden die Effekte von TIMP-1 im Gewebe nicht nur durch die Konzentration von TIMP-1 bestimmt, sondern auch durch die Spiegel beider N-terminalen Interaktionspartner. Da sowohl MPs (Manicone und McGuire, 2008), als auch CD74 (Schröder, 2016) unter entzündlichen Bedingungen erhöht sind, könnte die Frage einer möglichen Interferenz beider Interaktionspartner von physiologischer Bedeutung sein. Die Tatsache, dass CD74 ein membrangebundenes Homotrimer ist, erschwerte bisherige Untersuchungen zu dessen Molekülstruktur, weshalb sich die bekannte CD74 Struktur auf einen 74 Aminosäuren langen extrazellulären Teil beschränkt (Jasanoff *et al.*, 1998; Meza-Romero *et al.*, 2016). Weitere Studien sind notwendig, um die molekularen Eigenschaften der TIMP-1/CD74 Interaktion aufzudecken, wie z.B. die Bindungskinetik zwischen TIMP-1 und CD74, sowie die jeweils involvierten Aminosäuren.

Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die N-terminale Domäne ausreichend war, um TIMP-1-vermittelte Signalwege zu aktivieren, lässt sich nicht ausschließen, dass auch die C-terminale Domäne Einfluss auf die TIMP-1/CD74 Interaktion besitzt. So könnte die C-terminale Domäne zur Feinregulation der aktivierten Signalwege beitragen (Schoeps *et al.*, 2021a). Ähnliche Effekte wurden bereits bei der MP-Inhibition durch die N-terminale Domäne von TIMP-1 beschrieben, die durch zusätzliche Aminosäuren der C-terminalen Domäne feinjustiert wird (Huang *et al.*, 1996; Raeeszadeh-Sarmazdeh *et al.*, 2019). Weitere detaillierte Signalwegsanalysen könnten Unterschiede zwischen TIMP-1- und N-TIMP-1-aktivierten CD74-abhängigen Signalwegen aufdecken und so den Einfluss C-terminaler Bereiche von TIMP-1 auf die TIMP-1/CD74 Interaktion offenlegen.

Die Entdeckung, dass die N-terminale Domäne von TIMP-1 sowohl zytokinische Eigenschaften besaß, als auch eine MP-inhibitorische Kapazität, ordnet TIMP-1 einer speziellen Klasse von multifunktionalen Proteinen zu (**Abb. 4.2**), den sogenannten *Moonlighting Proteins* (Huberts und van der Klei, 2010).

4. Diskussion

Diese Proteine können verschiedene Funktionen ausüben, ohne diese Funktionen auf unterschiedliche Domänen des Proteins zu verteilen (Huberts und van der Klei, 2010). Inwieweit weitere Mitglieder der TIMP Familie Proteine mit *Moonlighting* Funktion sind ist bisher nicht bekannt, allerdings gibt es erste Hinweise darauf, dass die anderen TIMPs ebenfalls MP-unabhängige Funktionen besitzen. So kann TIMP-4 auch an CD63 binden (Chirco *et al.*, 2006), TIMP-3 bindet an VEGFR2 (Qi *et al.*, 2003) und TIMP-2 interagiert mit $\alpha 3\beta 1$ Integrin (Seo *et al.*, 2003). Es ist also möglich, dass TIMP-1 als Prototyp für die Multifunktionalität der gesamten TIMP Familie angesehen werden kann.

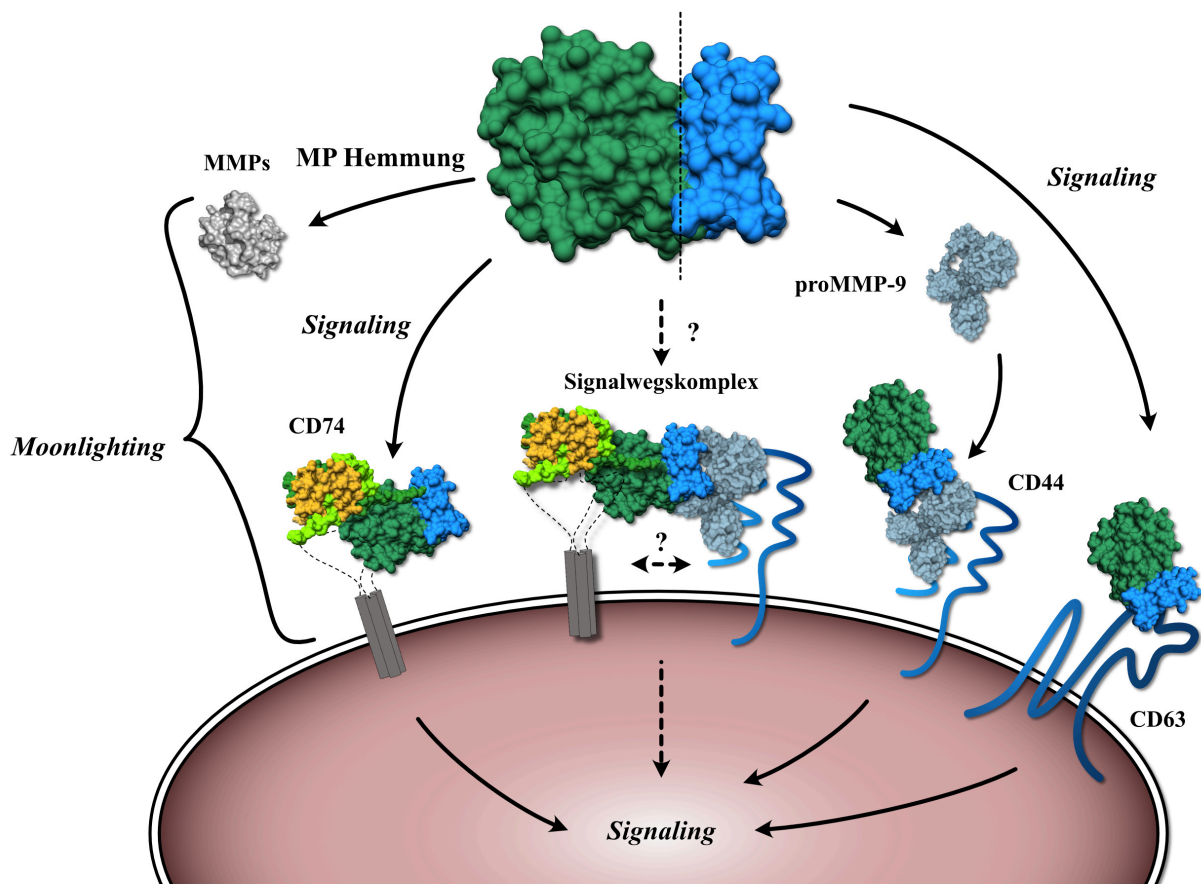


Abbildung 4.2: Identifikation einer *Moonlighting* Funktion von TIMP-1. TIMP-1 ist in der Lage über seine N-terminale Domäne sowohl Metalloproteinasen zu hemmen, als auch an CD74 zu binden und so intrazelluläre Signalwege zu aktivieren. TIMP-1 kann somit zu den *Moonlighting* Proteinen gezählt werden, die mehrere Funktionen über ein und dieselbe Domäne bewirken. Über Interaktionen seiner C-terminalen Domäne mit CD63 oder dem proMMP9-CD44 Komplex können zudem intrazelluläre Signalwege aktiviert werden. Unbekannt ist bisher, ob TIMP-1 durch N-terminale Bindung an CD74 und C-terminale Bindung an proMMP-9/CD44 einen Signalwegskomplex an der Zelloberfläche schafft, der effektives intrazelluläres *Signaling* ermöglicht. Die der Abbildung zugrunde liegenden Informationen wurden entnommen aus: (Murphy *et al.*, 1991; Bodden *et al.*, 1994; Jung *et al.*, 2006; Lambert *et al.*, 2009; Huberts und van der Klei, 2010).

4.2.2. TIMP-1 als neuer Ligand für CD74

Die Beobachtung, dass TIMP-1 über CD74 intrazelluläre Signalwege aktivierte, führt zur Frage nach der physiologischen Bedeutung einer solchen Interaktion. CD74 (Schröder, 2016) und TIMP-1 (Lorente *et al.*, 2014; Nukarinen *et al.*, 2016) sind beide unter entzündlichen Bedingungen in erhöhten Mengen vorhanden. Daher ist es wahrscheinlich, dass eine Interaktion beider Partner in inflammatorischen Umgebungen stattfindet. CD74 unterstützt einerseits die Antigenpräsentation (Stockinger *et al.*, 1989) und reguliert andererseits intrazelluläre Signalwege nach Bindung des bisher einzigen bekannten Liganden MIF (Leng *et al.*, 2003). Neben der namensgebenden Eigenschaft auf die Makrophagenmigration inhibierend zu wirken (Bloom und Bennett, 1966; David, 1966) besitzt MIF weitere Effekte auf verschiedenste Immunzellen. Dies beinhaltet unter anderem die Regulation der Aktivität von T-Zellen (Bacher *et al.*, 1996; Gaber *et al.*, 2011) und dendritischen Zellen (Figueiredo *et al.*, 2018), des Überlebens von Makrophagen (Mitchell *et al.*, 2002) und B-Zellen (Gore *et al.*, 2008), sowie der Monozytenrekutierung (Bernhagen *et al.*, 2007). Diese Vielzahl an immunregulatorischen Eigenschaften von MIF erklären dessen wichtige Rolle bei der Pathogenese von entzündlichen Erkrankungen, Autoimmunerkrankungen und Sepsis (Calandra *et al.*, 2000; Calandra und Roger, 2003), weshalb MIF als therapeutisches Ziel diskutiert wird (Calandra und Roger, 2003).

Die Entdeckung, dass TIMP-1, ähnlich wie MIF, ZAP-70 in B-Lymphomzellen aktivierte, lässt vermuten, dass beide Proteine, zumindest über CD74, ähnliche zelluläre Effekte bewirken (Schoeps *et al.*, 2021a). Daher ist es möglich, dass TIMP-1 bisher unbekannte Effekte auf verschiedenste Immunzellen vermittelt (**Abb. 4.3**) und weitere Studien, die den Einfluss von TIMP-1 auf die Aktivität von CD74-exprimierenden Immunzellen untersuchen, sind notwendig. Die Entdeckung, dass das C36L1-Peptid, das die Interaktionsstelle von MIF an CD74 blockiert (Figueiredo *et al.*, 2018), ebenfalls die TIMP-1-induzierte ZAP-70 Phosphorylierung verhinderte, legt nahe, dass beide Proteine einen ähnlichen Bereich an CD74 binden (Schoeps *et al.*, 2021a). Zukünftige Studien mit Deletionsmutanten von CD74 könnten dabei helfen, den genauen Interaktionsbereich mit TIMP-1 zu identifizieren. Stellt sich heraus, dass TIMP-1 und MIF tatsächlich einen ähnlichen Bereich an CD74 binden, dann hätte dies möglicherweise wichtige physiologische Konsequenzen. So könnte es zur Konkurrenz zwischen TIMP-1 und MIF um die Bindung an CD74 kommen (Schoeps *et al.*, 2021a) (**Abb. 4.3**). Da TIMP-1 unter inflammatorischen Bedingungen wie Sepsis in sehr hohen Konzentrationen vorkommt (TIMP-1: 1000 ng/ml \approx 36 nM (Sivula *et al.*, 2015); MIF: 17,8 ng/ml \approx 1,4 nM (Calandra *et al.*, 2000)), wäre eine solche Konkurrenz beider Liganden um die Bindung an CD74 nicht zu vernachlässigen.

4. Diskussion

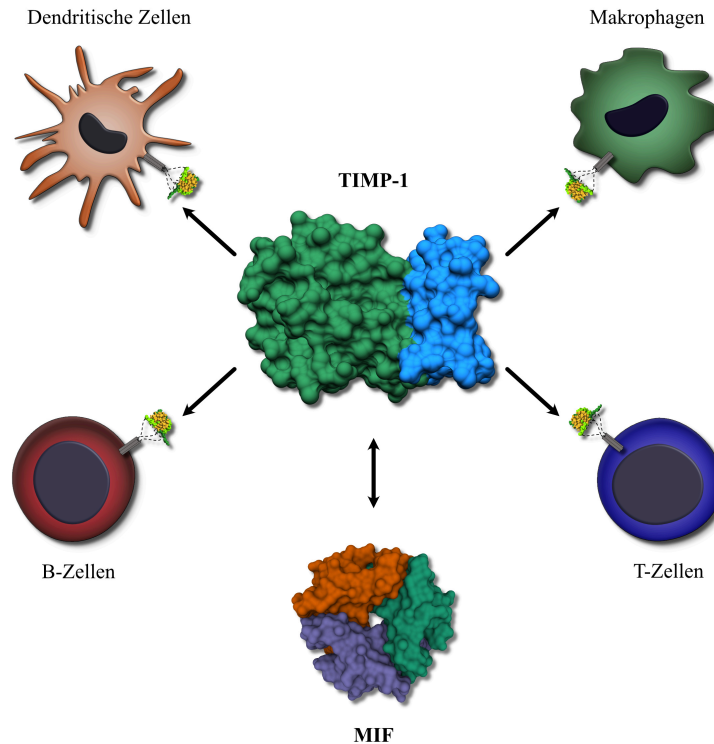


Abbildung 4.3: Potentielle Zielzellen für ein TIMP-1/CD74 Signaling. Als neuer Ligand von CD74 besitzt TIMP-1 viele potentielle Zielzellen. Hierzu zählen hauptsächlich Immunzellen, bei denen bereits bekannt ist, dass CD74-induzierte Signalwege funktionelle Konsequenzen besitzen. Da CD74-vermittelte Effekte auf B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen bisher MIF zugeordnet werden konnten, stellt sich nun die Frage, inwieweit TIMP-1 und MIF um die Bindung an CD74 konkurrieren und ob sich die bewirkten zellulären Effekte zwischen beiden Liganden unterscheiden. Die der Abbildung zugrunde liegenden Informationen wurden entnommen aus: (Bacher *et al.*, 1996; Mitchell *et al.*, 2002; Gore *et al.*, 2008; Gaber *et al.*, 2011; Figueiredo *et al.*, 2018).

Die Fokussierung auf ZAP-70 als bekannten Mediator einer CD74 Rezeptoraktivität in B-Lymphomzellen beschränkt die gewonnenen Erkenntnisse über TIMP-1/CD74 Signaling auf diesen spezifischen Signalweg. Daher ist es essentiell, dass in weiteren Studien die Vielzahl an möglichen TIMP-1/CD74-induzierten Signalwegen aufgedeckt wird. Diese können dann mit MIF/CD74-induzierten Signalwegen verglichen werden, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den beiden CD74-Liganden zu identifizieren. Fall sich herausstellen sollte, dass MIF und TIMP-1 redundante Signalwege aktivieren, dann hätte dies möglicherweise Auswirkungen auf therapeutische Ansätze, die es zum Ziel haben, MIF in inflammatorischen Erkrankungen zu blockieren (Wen *et al.*, 2021). Sollten Unterschiede zwischen TIMP-1/CD74 und MIF/CD74-induzierten Signalwegen aufgedeckt werden, dann könnte dies z.B. über eine unterschiedliche Rekrutierung von Co-Rezeptoren durch die beiden Liganden vermittelt werden. Da CD74 keine eigene Kinaseaktivität besitzt (Shi *et al.*, 2006), ist es bei der Aktivierung von Signalwegen auf Co-Rezeptoren angewiesen, die dann weitere Signalwegskomponenten rekrutieren (Schröder, 2016). So sind CD44 (Shi *et al.*, 2006) oder CXCR4

(Schwartz *et al.*, 2009) bekannte Co-Rezeptoren von CD74, die einen wichtigen Beitrag zu MIF/CD74-induzierten Signalwegen leisten. In dieser Hinsicht ist es interessant, dass CD44 proMMP-9 an die Zellmembran rekrutiert und so auch als TIMP-1 Rezeptor dient (Lambert *et al.*, 2009). Da TIMP-1 proMMP-9 über seine C-terminale Domäne bindet (Bodden *et al.*, 1994), wäre die N-terminale Domäne von TIMP-1 frei, um an CD74 zu binden und so einen Signalwegskomplex an der Zelloberfläche zu schaffen (**Abb. 4.2**).

4.2.3. Die TIMP-1/CD74 Interaktion aktiviert ZAP-70 in B-Lymphomzellen

TIMP-1 war in der Lage durch Bindung an CD74 auf B-Lymphomzellen die ZAP-70 Phosphorylierung zu erhöhen. Bringt man diese Entdeckung mit bereits bekannter Literatur in Verbindung, so fällt auf, dass ein Rezeptor, der eine zytokinische Aktivität von TIMP-1 auf B-Zellen vermittelt, einige bisher beobachtete Effekte erklären könnte. So wurde bereits 1998 herausgefunden, dass TIMP-1 den programmierten Zelltod von B-Lymphomzellen unterdrückt, wobei diese Funktion nicht über MP-Inhibition vermittelt wurde (Guedez *et al.*, 1998). Darauf folgende Studien zeigten, dass TIMP-1 die Interleukin-10 Expression von B-Zellen, sowie bestimmte Schritte bei der Differenzierung von B-Lymphomzellen, reguliert (Guedez *et al.*, 2001; Guedez *et al.*, 2005). Alle diese Daten legen nahe, dass TIMP-1 ein wichtiger Faktor bei der Pathogenese von B-Zell Lymphomen spielt, wobei die molekularen Mechanismen, wie TIMP-1 auf diese B-Zellen wirkt, bisher nicht identifiziert werden konnten. Die Entdeckung, dass CD74 ein Rezeptor für TIMP-1 auf B-Zellen ist, legt nahe, dass einige dieser Effekte über eine TIMP-1/CD74 Interaktion vermittelt werden. Diese Hypothese wird durch Studien unterstützt, die CD74 eine zentrale Rolle bei der Reifung und Funktion von B-Zellen zuordnen (Shachar und Flavell, 1996). Weiterhin wurde herausgefunden, dass CD74-vermittelte Signalwege zur Zellproliferation, der Reifung und dem Überleben von B-Zellen führen (Starlets *et al.*, 2006) und dass die Interaktion von MIF mit CD74 auf B-Zellen deren Überleben und Proliferation erhöht (Gore *et al.*, 2008). Damit hat TIMP-1 einen ähnlichen Effekt auf B-Zellen wie die Aktivierung von CD74 durch MIF. Dies passt zu dem Ergebnis, dass die ZAP-70 Phosphorylierung in B-Lymphomzellen sowohl durch TIMP-1 als auch durch MIF verstärkt wurde. ZAP-70 ist hauptsächlich dafür bekannt, dass es bei der Aktivierung von T-Zellen über den T-Zell Rezeptor involviert ist (Chen *et al.*, 2020). Allerdings konnte eine aberrante Expression von ZAP-70 in malignen Erkrankungen des B-Zell-Kompartments beobachtet werden, weshalb aktuell verschiedene protumorigene Funktionen von ZAP-70 in diesem Kontext diskutiert werden (Chen *et al.*, 2020). Diese beinhalten sowohl direkte Effekte auf Tumorzellen, als auch die Modulation der Tumormikroumgebung (Chen *et al.*, 2020). Auswirkungen der TIMP-1/CD74-bedingten Aktivierung von ZAP-70 auf die Progression von malignen B-Zell Erkrankungen stellen daher einen interessanten zukünftigen Forschungsbereich dar.

Betrachtet man einen potentiellen klinischen Zusammenhang zwischen TIMP-1, CD74 und B-Zell Lymphomen, so lassen sich Parallelen feststellen. CD74 wird von nahezu allen humanen B-Zell

Lymphomen exprimiert (Zhao *et al.*, 2019) und die TIMP-1 Expression ist mit einer negativen Prognose von B-Lymphompatienten assoziiert (Choi *et al.*, 2006). Da bereits klinische Studien mit anti-CD74 Antikörpern zur Therapie von B-Zell Lymphomen durchgeführt wurden (Stein *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2015), könnte die hier identifizierte Interaktion zwischen TIMP-1 und CD74 von klinischem Interesse sein.

4.3. Ausblick

In dieser Arbeit wurde TIMP-1 als ein Zytokin identifiziert, das an verschiedene Immunzellen bindet und deren Aktivität beeinflusst. Damit ist nicht nur der bereits durch frühere Studien (Jung *et al.*, 2006) eingeleitete Paradigmenwechsel, dass TIMP-1 als Zytokin fungiert und nicht nur als MP-Inhibitor, vollzogen, sondern es ergeben sich auch völlig neue Blickwinkel auf die vielfältigen Funktionen von TIMP-1. Bisher wurden die zytokinischen Eigenschaften von TIMP-1 vor allem im Kontext von Krebs betrachtet und die meisten Studien haben direkte Effekte der TIMP-1-induzierten Signalwege auf Tumorzellen untersucht. Die hier beschriebenen Daten zeigten nicht nur, dass TIMP-1 durch Bindung an CD63 auf Immunzellen deren Aktivität regulierte, sondern es wurde mit CD74 ein zusätzlicher neuer Rezeptor beschrieben, der hauptsächlich von Immunzellen exprimiert wird. Dies erweitert das Spektrum möglicher TIMP-1 Effekte und Funktionen enorm und erlaubt eine neue Sichtweise auf klinische Beobachtungen die zeigen, dass TIMP-1 in entzündlichen Erkrankungen in erhöhten Spiegeln vorhanden ist. Dies reicht von Krebs (Eckfeld *et al.*, 2019), über Sepsis (Lorente *et al.*, 2014) und entzündlichen Darmerkrankungen (Kapsoritakis *et al.*, 2008) bis hin zu Pankreatitis (Nukarinen *et al.*, 2016). Es ist also möglich, dass TIMP-1 unter verschiedensten inflammatorischen Bedingungen die Aktivität von Immunzellen moduliert und so Einfluss auf den Verlauf der Krankheiten nimmt. Weiterführende Studien sind daher notwendig, um die Rolle von TIMP-1 in diesen Erkrankungen zu untersuchen und daraus mögliche Therapieansätze abzuleiten.

Die Entdeckungen dieser Arbeit zeigten aber auch deutlich, dass das komplexe Interaktom von TIMP-1 eine Vielzahl an Effekten auslösen kann und die Tatsache, dass TIMP-1 über ein und dieselbe Domäne verschiedene Funktionen ausübte, zeigt, wie wichtig es ist, sowohl die Interaktionspartner von TIMP-1, als auch die genauen Interaktionsstellen zu identifizieren. Dieses Wissen stellt die Grundlage dar, um mit einer der vielen Funktionen zielgerichtet zu interferieren, ohne dabei unerwünschte Nebeneffekte zu bewirken. Es ist außerdem davon auszugehen, dass das TIMP-1 Interaktom noch weit komplexer ist als bisher beschrieben und zukünftige Studien werden sehr wahrscheinlich weitere Interaktionspartner und Funktionen von TIMP-1 aufdecken. Für eine erfolgreiche therapeutische Intervention mit TIMP-1-induzierten Effekten ist daher noch dringend weitere Forschung notwendig.

5. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
AKT	Proteinkinase B
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	<i>Circa</i>
CA19-9	<i>Carbohydrate Antigen 19-9</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
citH3	Citrulliniertes Histon H3
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ERK	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinase</i>
EtOH	Ethanol
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> , Fötales Kälberserum
g	Gramm
Gln	Glutamin
h	Stunde
H&E	Hematoxylin-Eosin
HSA	Humanes Serumalbumin
KPC	<i>Pdx-1^{+/-Cre}; Kras^{+/-LSL-G12D}; Trp53^{+/-LSL-R172H}</i>
KRAS	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
l	Liter
LEL	<i>Large Extracellular Loop</i>
M	Molar (mol/l)
MEM	<i>Modified Eagles Medium</i>
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
min	Minuten
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MMP	Matrix Metalloproteinase
MP	Metalloproteinase
MPO	Myeloperoxidase
NE	Neutrophile Elastase
NETs	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
PAD4	<i>Peptidyl Arginine Deiminase 4</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion

5. Abkürzungsverzeichnis

PDAC	<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i>
rpm	<i>Revolutions Per Minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>Quantitative Reverse Transcription PCR</i>
s	Sekunden
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
s.e.m.	<i>Standard Error of the Mean</i> , Standardfehler
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1</i>
U	<i>Enzyme unit</i> , Enzymeinheit
V	Volt
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung (relative Zentrifugalkraft)
ZAP-70	<i>Zeta-Chain-Associated Protein Kinase-70</i>
z.B.	Zum Beispiel

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der Molekülstruktur von TIMP-1.	2
Abbildung 1.2:	TIMP-1 ist ein multifunktionales Protein mit einem vielseitigen Interaktom	3
Abbildung 1.3:	Funktionen von CD74.	7
Abbildung 1.4:	Entwicklung des PDAC.	11
Abbildung 1.5:	Schematische Darstellung der Effekte von TIMP-1 und NETs auf PDAC Tumorzellen.	13
Abbildung 2.1:	Charakterisierung der Patientenkohorte.	28
Abbildung 2.2:	Repräsentative H&E Färbung von Pankreastumorgewebe aus KPC Mäusen mit fortgeschrittenem PDAC.	31
Abbildung 3.1:	Mikroskopische Untersuchung der TIMP-1-induzierten NET-Bildung.	45
Abbildung 3.2:	Charakterisierung der TIMP-1-induzierten NET-Bildung.	47
Abbildung 3.3:	Pathophysiologische TIMP-1-Spiegel induzieren NETs.	48
Abbildung 3.4:	TIMP-1 induziert NETs über die C-terminale Domäne.	49
Abbildung 3.5:	TIMP-1 bindet an CD63 von Neutrophilen.	50
Abbildung 3.6:	Die TIMP-1/CD63 Interaktion löst NETs aus.	51
Abbildung 3.7:	<i>Priming</i> von Neutrophilen erhöht die CD63 Expression und die TIMP-1-induzierte NET-Bildung.	52
Abbildung 3.8:	Die TIMP-1/CD63 Interaktion aktiviert den ERK Signalweg in Neutrophilen.	53
Abbildung 3.9:	TIMP-1 induziert NETs über ERK <i>Signaling</i>	54
Abbildung 3.10:	TIMP-1 induziert die NET-Bildung in KPC Mäusen.	55
Abbildung 3.11:	TIMP-1 und NETs beeinflussen das Überleben von Mäusen mit Pankreastumoren.	56
Abbildung 3.12:	TIMP-1 ist mit der NET-Bildung in PDAC Tumoren assoziiert.	57
Abbildung 3.13:	Assoziation von TIMP-1 mit NET Faktoren in PDAC Tumoren.	58
Abbildung 3.14:	TIMP-1 und NETs korrelieren im Plasma von PDAC Patienten.	59
Abbildung 3.15:	TIMP-1 und NETs sind prognostische Marker in PDAC Patienten.	60
Abbildung 3.16:	<i>ROC curve</i> Analyse von TIMP-1, NETs und CA19-9.	61
Abbildung 3.17:	Die Kombination von TIMP-1, NETs und CA19-9 erhöht den prognostischen Wert.	62
Abbildung 3.18:	CD74 Expression in verschiedenen Geweben und Zellen.	63
Abbildung 3.19:	TIMP-1 induziert die ZAP-70 Phosphorylierung in Namalwa Zellen.	64

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.20:	TIMP-1 induziert die ZAP-70 Phosphorylierung über CD74.	65
Abbildung 3.21:	Das C36L1 Peptid blockiert die TIMP-1-induzierte ZAP-70 Phosphorylierung.	66
Abbildung 3.22:	TIMP-1 induziert die ZAP-70 Phosphorylierung über seine N-terminale Domäne.	67
Abbildung 4.1:	Hypothetisierter Ablauf des <i>Primings</i> und der Bildung von NETs in Entzündungen.	70
Abbildung 4.2:	Identifikation einer <i>Moonlighting</i> Funktion von TIMP-1.	76
Abbildung 4.3:	Potentielle Zielzellen für ein TIMP-1/CD74 Signaling.	78

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Chemikalien	16
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien	18
Tabelle 3: Übersicht über die verwendeten Geräte	19
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer	22
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Plasmide	23
Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Primärantikörper	24
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper	25
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten rekombinanten Proteine	25
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Kits	26
Tabelle 10: Übersicht über die verwendete Software	27
Tabelle 11: Informationen über die Patientenkohorte.	28
Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Zellkulturlösungen	34
Tabelle 13: Reaktionsansatz reverse Transkription	39
Tabelle 14: Gewähltes Programm für die reverse Transkription.	39
Tabelle 15: Reaktionsansatz für die Analyse der 18S rRNA	39
Tabelle 16: Reaktionsansatz für die Analyse der CD74 Expression	40
Tabelle 17: Programmierung des RT-qPCR Gerätes	40
Tabelle 18: Zusammensetzung von SDS Gelen	41

8. Literaturverzeichnis

- Abdol Razak, N., Elaskalani, O., und Metharom, P. (2017). Pancreatic Cancer-Induced Neutrophil Extracellular Traps: A Potential Contributor to Cancer-Associated Thrombosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(3), 487.
- Albregues, J., Shields, M.A., Ng, D., Park, C.G., Ambrico, A., Poindexter, M.E., Upadhyay, P., Uyeminami, D.L., Pommier, A., Küttner, V., Bružas, E., Maiorino, L., Bautista, C., Carmona, E.M., Gimotty, P.A., Fearon, D.T., Chang, K., Lyons, S.K., Pinkerton, K.E., Trotman, L.C., Goldberg, M.S., Yeh, J.T.-H., und Egeblad, M. (2018). Neutrophil Extracellular Traps Produced During Inflammation Awaken Dormant Cancer Cells in Mice. *Science*, 361(6409), eaao4227.
- Arpino, V., Brock, M., und Gill, S.E. (2015). The Role of TIMPs in Regulation of Extracellular Matrix Proteolysis. *Matrix Biol.*, 44-46, 247-254.
- Bacher, M., Metz, C.N., Calandra, T., Mayer, K., Chesney, J., Lohoff, M., Gemsa, D., Donnelly, T., und Bucala, R. (1996). An Essential Regulatory Role for Macrophage Migration Inhibitory Factor in T-Cell Activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93(15), 7849-7854.
- Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., Gregory, J.L., Zerneck, A., Koenen, R.R., Dewor, M., Georgiev, I., Schober, A., Leng, L., Kooistra, T., Fingerle-Rowson, G., Ghezzi, P., Kleemann, R., McColl, S.R., Bucala, R., Hickey, M.J., und Weber, C. (2007). MIF Is a Noncognate Ligand of CXC Chemokine Receptors in Inflammatory and Atherogenic Cell Recruitment. *Nat. Med.*, 13(5), 587-596.
- Bijlmakers, M.J., Benaroch, P., und Ploegh, H.L. (1994). Mapping Functional Regions in the Luminal Domain of the Class II-Associated Invariant Chain. *J. Exp. Med.*, 180(2), 623-629.
- Blanche, P., Dartigues, J.-F., und Jacqmin-Gadda, H. (2013). Estimating and Comparing Time-Dependent Areas Under Receiver Operating Characteristic Curves for Censored Event Times with Competing Risks. *Stat. Med.*, 32(30), 5381-5397.
- Bloom, B.R., und Bennett, B. (1966). Mechanism of a Reaction in Vitro Associated with Delayed-Type Hypersensitivity. *Science*, 153(3731), 80-82.
- Bodden, M.K., Windsor, L.J., Caterina, N.C., Harber, G.J., Birkedal-Hansen, B., und Birkedal-Hansen, H. (1994). Human TIMP-1 Binds to Pro-M R 92K GL (Gelatinase B, MMP-9) Through the "Second Disulfide Knot". *Ann. N Y Acad. Sci.*, 732(1), 403-407.
- Botta, G.P., Reichert, M., Reginato, M.J., Heeg, S., Rustgi, A.K., und Lelkes, P.I. (2013). ERK2-Regulated TIMP1 Induces Hyperproliferation of K-RasG12D-Transformed Pancreatic Ductal Cells. *Neoplasia*, 15(4), 359-372.

- Boujrad, N., Ogwuegbu, S.O., Garnier, M., Lee, C.H., Martin, B.M., und Papadopoulos, V. (1995). Identification of a Stimulator of Steroid Hormone Synthesis Isolated from Testis. *Science*, 268(5217), 1609-1612.
- Boulday, G., Fitau, J., Coupel, S., Soulillou, J.-P., und Charreau, B. (2004). Exogenous Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Promotes Endothelial Cell Survival Through Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Pathway. *Ann. N Y Acad. Sci.*, 1030(1), 28-36.
- Branzk, N., Lubojemska, A., Hardison, S.E., Wang, Q., Gutierrez, M.G., Brown, G.D., und Papayannopoulos, V. (2014). Neutrophils Sense Microbe Size and Selectively Release Neutrophil Extracellular Traps in Response to Large Pathogens. *Nat. Immunol.*, 15(11), 1017-1025.
- Brew, K., Dinakarandian, D., und Nagase, H. (2000). Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. Evolution, Structure and Function. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1477(1-2), 267-283.
- Brew, K., und Nagase, H. (2010). The Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs): An Ancient Family with Structural and Functional Diversity. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1803(1), 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(5663), 1532-1535.
- Calandra, T., Echtenacher, B., Roy, D.L., Pugin, J., Metz, C.N., Hültner, L., Heumann, D., Männel, D., Bucala, R., und Glauser, M.P. (2000). Protection from Septic Shock by Neutralization of Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Nat. Med.*, 6(2), 164-170.
- Calandra, T., und Roger, T. (2003). Macrophage Migration Inhibitory Factor: A Regulator of Innate Immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 3(10), 791-800.
- Carpenter, A.E., Jones, T.R., Lamprecht, M.R., Clarke, C., Kang, I.H., Friman, O., Guertin, D.A., Chang, J.H., Lindquist, R.A., Moffat, J., Golland, P., und Sabatini, D.M. (2006). CellProfiler: Image Analysis Software for Identifying and Quantifying Cell Phenotypes. *Genome Biol.*, 7(10), R100.
- Castanheira, F.V.S., und Kubes, P. (2019). Neutrophils and NETS in Modulating Acute and Chronic Inflammation. *Blood*, 133(20), 2178-2185.
- Caudrillier, A., Kessenbrock, K., Gilliss, B.M., Nguyen, J.X., Marques, M.B., Monestier, M., Toy, P., Werb, Z., und Looney, M.R. (2012). Platelets Induce Neutrophil Extracellular Traps in Transfusion-Related Acute Lung Injury. *J. Clin. Invest.*, 122(7), 2661-2671.
- Cawston, T.E., Galloway, W.A., Mercer, E., Murphy, G., und Reynolds, J.J. (1981). Purification of Rabbit Bone Inhibitor of Collagenase. *Biochem. J.*, 195(1), 159-165.
- Chang, X., und Han, J. (2006). Expression of Peptidylarginine Deiminase Type 4 (PAD4) in Various Tumors. *Mol. Carcinog.*, 45(3), 183-196.

8. Literaturverzeichnis

- Chang, X., Han, J., Pang, L., Zhao, Y., Yang, Y., und Shen, Z. (2009). Increased PADI4 Expression in Blood and Tissues of Patients with Malignant Tumors. *BMC Cancer*, 9, 40.
- Cheng, H., Long, F., Jaiswar, M., Yang, L., Wang, C., und Zhou, Z. (2015). Prognostic Role of the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Pancreatic Cancer: A Meta-Analysis. *Sci. Rep.*, 5, 11026.
- Chen, H., Luo, M., Wang, X., Liang, T., Huang, C., Huang, C., und Wei, L. (2021). Inhibition of PAD4 Enhances Radiosensitivity and Inhibits Aggressive Phenotypes of Nasopharyngeal Carcinoma Cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 26(1), 9.
- Chen, J., Moore, A., und Ringshausen, I. (2020). ZAP-70 Shapes the Immune Microenvironment in B Cell Malignancies. *Front. Oncol.*, 10, 595832.
- 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(1), 99-113.
- Choi, J.-W., An, J.-S., Lee, J.-H., Lee, E.-S., Kim, K.H., und Kim, Y.-S. (2006). Clinicopathologic Implications of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1-Positive Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Mod. Pathol.*, 19(7), 963-973.
- Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., und Pavletich, N.P. (1994). Crystal Structure of a P53 Tumor Suppressor-DNA Complex: Understanding Tumorigenic Mutations. *Science*, 265(5170), 346-355.
- Chromek, M., Tullus, K., Lundahl, J., und Brauner, A. (2004). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 Activates Normal Human Granulocytes, Protects Them from Apoptosis, and Blocks Their Transmigration During Inflammation. *Infect. Immun.*, 72(1), 82-88.
- Coffelt, S.B., Wellenstein, M.D., und Visser, K.E. de (2016). Neutrophils in Cancer: Neutral No More. *Nat. Rev. Cancer.*, 16(7), 431-446.
- Cohen, J. (2002). The Immunopathogenesis of Sepsis. *Nature*, 420(6917), 885-891.
- Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., Bourdeau, F., Kubes, P., und Ferri, L. (2013). Neutrophil Extracellular Traps Sequester Circulating Tumor Cells and Promote Metastasis. *J. Clin. Invest.*, 123(8), 3446-3458.
- Cui, H., Seubert, B., Stahl, E., Dietz, H., Reuning, U., Moreno-Leon, L., Ilie, M., Hofman, P., Nagase, H., Mari, B., und Krüger, A. (2015). Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Induces a Pro-Tumourigenic Increase of MiR-210 in Lung Adenocarcinoma Cells and Their Exosomes. *Oncogene*, 34(28), 3640-3650.
- David, J.R. (1966). Delayed Hypersensitivity in Vitro: Its Mediation by Cell-Free Substances Formed by Lymphoid Cell-Antigen Interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 56(1), 72-77.

8. Literaturverzeichnis

- D'Costa, Z., Jones, K., Azad, A., van Stiphout, R., Lim, S.Y., Gomes, A.L., Kinchesh, P., Smart, S.C., Gillies McKenna, W., Buffa, F.M., Sansom, O.J., Muschel, R.J., O'Neill, E., und Fokas, E. (2017). Gemcitabine-Induced TIMP1 Attenuates Therapy Response and Promotes Tumor Growth and Liver Metastasis in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.*, 77(21), 5952-5962.
- Docherty, A.J., Lyons, A., Smith, B.J., Wright, E.M., Stephens, P.E., Harris, T.J., Murphy, G., und Reynolds, J.J. (1985). Sequence of Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinases and its Identity to Erythroid-Potentiating Activity. *Nature*, 318(6041), 66-69.
- DuBridge, R.B., Tang, P., Hsia, H.C., Leong, P.M., Miller, J.H., und Calos, M.P. (1987). Analysis of Mutation in Human Cells by Using an Epstein-Barr Virus Shuttle System. *Mol. Cell. Biol.*, 7(1), 379-387.
- Eckfeld, C., Häußler, D., Schoeps, B., Hermann, C.D., und Krüger, A. (2019). Functional Disparities Within the TIMP Family in Cancer: Hints from Molecular Divergence. *Cancer Metastasis Rev.*, 38(3), 469-481.
- Eck, M.J., und Sprang, S.R. (1989). The Structure of Tumor Necrosis Factor-Alpha at 2.6 Å Resolution. *J. Biol. Chem.*, 264(29), 17595-17605.
- Egberts, J.-H., Cloosters, V., Noack, A., Schniewind, B., Thon, L., Klose, S., Kettler, B., Forstner, C. von, Kneitz, C., Tepel, J., Adam, D., Wajant, H., Kalthoff, H., und Trauzold, A. (2008). Anti-Tumor Necrosis Factor Therapy Inhibits Pancreatic Tumor Growth and Metastasis. *Cancer Res.*, 68(5), 1443-1450.
- 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/ -Catenin Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 109(6), E309-E316.
- Egeblad, M., und Werb, Z. (2002). New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Nat Rev Cancer*, 2(3), 161-174.
- Elkins, P.A., Ho, Y.S., Smith, W.W., Janson, C.A., D'Alessio, K.J., McQueney, M.S., Cummings, M.D., und Romanic, A.M. (2002). Structure of the C-Terminally Truncated Human ProMMP9, a Gelatin-Binding Matrix Metalloproteinase. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 58(Pt 7), 1182-1192.
- Eming, S.A., Wynn, T.A., und Martin, P. (2017). Inflammation and Metabolism in Tissue Repair and Regeneration. *Science*, 356(6342), 1026-1030.
- Ferrone, C.R., Finkelstein, D.M., Thayer, S.P., Muzikansky, A., Fernandez-delCastillo, C., und Warshaw, A.L. (2006). Perioperative CA19-9 Levels Can Predict Stage and Survival in Patients with Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.*, 24(18), 2897-2902.

- Figueiredo, C.R., Azevedo, R.A., Mousdell, S., Resende-Lara, P.T., Ireland, L., Santos, A., Girola, N., Cunha, R.L.O.R., Schmid, M.C., Polonelli, L., Travassos, L.R., und Mielgo, A. (2018). Blockade of MIF-CD74 Signalling on Macrophages and Dendritic Cells Restores the Antitumour Immune Response Against Metastatic Melanoma. *Front. Immunol.*, 9, 1132.
- Gaber, T., Schellmann, S., Erekul, K.B., Fangradt, M., Tykwinska, K., Hahne, M., Maschmeyer, P., Wagegg, M., Stahn, C., Kolar, P., Dziurla, R., Löhning, M., Burmester, G.-R., und Buttgereit, F. (2011). Macrophage Migration Inhibitory Factor Counterregulates Dexamethasone-Mediated Suppression of Hypoxia-Inducible Factor-1 Alpha Function and Differentially Influences Human CD4+ T Cell Proliferation Under Hypoxia. *J. Immunol.*, 186(2), 764-774.
- Gaida, M.M., Steffen, T.G., Günther, F., Tschaharganeh, D.F., Felix, K., Bergmann, F., Schirmacher, P., und Hänsch, G.M. (2012). Polymorphonuclear Neutrophils Promote Dyshesion of Tumor Cells and Elastase-Mediated Degradation of E-Cadherin in Pancreatic Tumors. *Eur. J. Immunol.*, 42(12), 3369-3380.
- Gasson, J.C., Golde, D.W., Kaufman, S.E., Westbrook, C.A., Hewick, R.M., Kaufman, R.J., Wong, G.G., Temple, P.A., Leary, A.C., und Brown, E.L. (1985). Molecular Characterization and Expression of the Gene Encoding Human Erythroid-Potentiating Activity. *Nature*, 315(6022), 768-771.
- Gomis-Rüth, F.X., Maskos, K., Betz, M., Bergner, A., Huber, R., Suzuki, K., Yoshida, N., Nagase, H., Brew, K., Bourenkov, G.P., Bartunik, H., und Bode, W. (1997). Mechanism of Inhibition of the Human Matrix Metalloproteinase Stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature*, 389(6646), 77-81.
- Gore, Y., Starlets, D., Maharshak, N., Becker-Herman, S., Kaneyuki, U., Leng, L., Bucala, R., und Shachar, I. (2008). Macrophage Migration Inhibitory Factor Induces B Cell Survival by Activation of a CD74-CD44 Receptor Complex. *J. Biol. Chem.*, 283(5), 2784-2792.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., und Nairn, R. (1977). Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J. Gen. Virol.*, 36(1), 59-74.
- Grivennikov, S.I., Greten, F.R., und Karin, M. (2010). Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell*, 140(6), 883-899.
- Grünwald, B., Harant, V., Schaten, S., Fruhschutz, M., Spallek, R., Hochst, B., Stutzer, K., Berchtold, S., Erkan, M., Prokopchuk, O., Martignoni, M., Esposito, I., Heikenwalder, M., Gupta, A., Siveke, J., Saftig, P., Knolle, P., Wohlleber, D., und Krüger, A. (2016). Pancreatic Pre-Malignant Lesions Secrete TIMP1, Which Activates Hepatic Stellate Cells via CD63 Signaling to Create a Pre-Metastatic Niche in the Liver. *Gastroenterology*, 151(5), 1011-1024.
- Grünwald, B., Schoeps, B., und Krüger, A. (2019). Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1. *Trends. Cell. Biol.*, 29(1), 6-19.

8. Literaturverzeichnis

- Guedez, L., Stetler-Stevenson, W.G., Wolff, L., Wang, J., Fukushima, P., Mansoor, A., und Stetler-Stevenson, M. (1998). In Vitro Suppression of Programmed Cell Death of B Cells by Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1. *J. Clin. Invest.*, 102(11), 2002-2010.
- Guedez, L., Mansoor, A., Birkedal-Hansen, B., Lim, M.S., Fukushima, P., Venzon, D., Stetler-Stevenson, W.G., und Stetler-Stevenson, M. (2001). Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 Regulation of Interleukin-10 in B-Cell Differentiation and Lymphomagenesis. *Blood*, 97(6), 1796-1802.
- Guedez, L., Martinez, A., Zhao, S., Vivero, A., Pittaluga, S., Stetler-Stevenson, M., Raffeld, M., und Stetler-Stevenson, W.G. (2005). Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 (TIMP-1) Promotes Plasmablastic Differentiation of a Burkitt Lymphoma Cell Line: Implications in the Pathogenesis of Plasmacytic/Plasmablastic Tumors. *Blood*, 105(4), 1660-1668.
- Hakim, A., Fuchs, T.A., Martinez, N.E., Hess, S., Prinz, H., Zychlinsky, A., und Waldmann, H. (2011). Activation of the Raf-MEK-ERK Pathway Is Required for Neutrophil Extracellular Trap Formation. *Nat. Chem. Biol.*, 7(2), 75-77.
- Hayakawa, T., Yamashita, K., Ohuchi, E., und Shinagawa, A. (1994). Cell Growth-Promoting Activity of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 (TIMP-2). *J. Cell Sci.*, 107 (Pt 9), 2373-2379.
- Hayakawa, T. (1994). Tissue Inhibitors of Metalloproteinases and Their Cell Growth-Promoting Activity. *Cell Struct. Funct.*, 19(3), 109-114.
- Hazeldine, J., Harris, P., Chapple, I.L., Grant, M., Greenwood, H., Livesey, A., Sapey, E., und Lord, J.M. (2014). Impaired Neutrophil Extracellular Trap Formation: A Novel Defect in the Innate Immune System of Aged Individuals. *Aging Cell*, 13(4), 690-698.
- Hemler, M.E. (2005). Tetraspanin Functions and Associated Microdomains. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 6(10), 801-811.
- Hemmers, S., Teijaro, J.R., Arandjelovic, S., und Mowen, K.A. (2011). PAD4-Mediated Neutrophil Extracellular Trap Formation Is Not Required for Immunity Against Influenza Infection. *PLoS One*, 6(7), e22043.
- Hermann, C.D., Schoeps, B., Eckfeld, C., Munkhbaatar, E., Kniep, L., Prokopchuk, O., Wirges, N., Steiger, K., Häußler, D., Knolle, P., Poulton, E., Khokha, R., Grünwald, B.T., Demir, I.E., und Krüger, A. (2021). TIMP1 Expression Underlies Sex Disparity in Liver Metastasis and Survival in Pancreatic Cancer. *J. Exp. Med.*, 218(11), e20210911.
- Hingorani, S.R., Petricoin, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., Kawaguchi, Y., Johann, D., Liotta, L.A., Crawford, H.C., Putt, M.E., Jacks, T., Wright, C.V.E., Hruban, R.H., Lowy, A.M., und Tuveson, D.A. (2003). Preinvasive and Invasive Ductal Pancreatic Cancer and its Early Detection in the Mouse. *Cancer Cell*, 4(6), 437-450.

8. Literaturverzeichnis

- Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramaudt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., und Tuveson, D.A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D Cooperate to Promote Chromosomal Instability and Widely Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. *Cancer Cell*, 7(5), 469-483.
- Hisada, Y., Grover, S.P., Maqsood, A., Houston, R., Ay, C., Noubouossie, D.F., Cooley, B.C., Wallén, H., Key, N.S., Thålin, C., Farkas, Á.Z., Farkas, V.J., Tenekedjiev, K., Kolev, K., und Mackman, N. (2020). Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Venous Thrombosis in Mice Bearing Human Pancreatic Tumors. *Haematologica*, 105(1), 218-225.
- Hothorn, T., und Zeileis, A. (2008). Generalized Maximally Selected Statistics. *Biometrics*, 64(4), 1263-1269.
- Hruban, R.H., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Anver, M.R., Biankin, A.V., Boivin, G.P., Furth, E.E., Furukawa, T., Klein, A., Klimstra, D.S., Kloppel, G., Lauwers, G.Y., Longnecker, D.S., Luttges, J., Maitra, A., Offerhaus, G.J.A., Pérez-Gallego, L., Redston, M., und Tuveson, D.A. (2006). Pathology of Genetically Engineered Mouse Models of Pancreatic Exocrine Cancer: Consensus Report and Recommendations. *Cancer Res.*, 66(1), 95-106.
- Huang, W., Suzuki, K., Nagase, H., Arumugan, S., van Doren, S.R., und Brew, K. (1996). Folding and Characterization of the Amino-Terminal Domain of Human Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) Expressed at High Yield in E. Coli. *FEBS Lett.*, 384(2), 155-161.
- Huberts, D.H.E.W., und van der Klei, I.J. (2010). Moonlighting Proteins: An Intriguing Mode of Multitasking. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1803(4), 520-525.
- Iacobuzio-Donahue, C.A., und Herman, J.M. (2014). Autophagy, P53, and Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.*, 370(14), 1352-1353.
- Ino, Y., Yamazaki-Itoh, R., Shimada, K., Iwasaki, M., Kosuge, T., Kanai, Y., und Hiraoka, N. (2013). Immune Cell Infiltration as an Indicator of the Immune Microenvironment of Pancreatic Cancer. *Br. J. Cancer*, 108(4), 914-923.
- Itoh, Y., und Nagase, H. (1995). Preferential Inactivation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 That Is Bound to the Precursor of Matrix Metalloproteinase 9 (Progelatinase B) By Human Neutrophil Elastase. *J. Biol. Chem.*, 270(28), 16518-16521.
- Jasanoff, A., Wagner, G., und Wiley, D.C. (1998). Structure of a Trimeric Domain of the MHC Class II-Associated Chaperonin and Targeting Protein Ii. *EMBO J.*, 17(23), 6812-6818.
- Jin, W., Xu, H.-X., Zhang, S.-R., Li, H., Wang, W.-Q., Gao, H.-L., Wu, C.-T., Xu, J.-Z., Qi, Z.-H., Li, S., Ni, Q.-X., Liu, L., und Yu, X.-J. (2019). Tumor-Infiltrating NETs Predict Postsurgical Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*, 26(2), 635-643.

8. Literaturverzeichnis

- Joergensen, M.T., Brünner, N., und Muckadell, O.B.S. de (2010). Comparison of Circulating MMP-9, TIMP-1 and CA19-9 in the Detection of Pancreatic Cancer. *Anticancer Res.*, 30(2), 587-592.
- Jung, H.S., Gu, J., Kim, J.-E., Nam, Y., Song, J.W., und Kim, H.K. (2019). Cancer Cell-Induced Neutrophil Extracellular Traps Promote Both Hypercoagulability and Cancer Progression. *PLoS One*, 14(4), e0216055.
- 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(17), 3934-3942.
- 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 Gastroenterol*, 8, 55.
- Kenny, E.F., Herzig, A., Krüger, R., Muth, A., Mondal, S., Thompson, P.R., Brinkmann, V., Bernuth, H.v., und Zychlinsky, A. (2017). Diverse Stimuli Engage Different Neutrophil Extracellular Trap Pathways. *Elife*, 6, e24437.
- Keshari, R.S., Jyoti, A., Dubey, M., Kothari, N., Kohli, M., Bogra, J., Barthwal, M.K., und Dikshit, M. (2012). Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation. Implication for the Inflammatory Disease Condition. *PLoS One*, 7(10), e48111.
- Klasen, C., Ohl, K., Sternkopf, M., Shachar, I., Schmitz, C., Heussen, N., Hobeika, E., Levit-Zerdoun, E., Tenbrock, K., Reth, M., Bernhagen, J., und El Bounkari, O. (2014). MIF Promotes B Cell Chemotaxis Through the Receptors CXCR4 and CD74 and ZAP-70 Signaling. *J. Immunol.*, 192(11), 5273-5284.
- Kleeff, J., Korc, M., Apte, M., La Vecchia, C., Johnson, C.D., Biankin, A.V., Neale, R.E., Tempero, M., Tuveson, D.A., Hruban, R.H., und Neoptolemos, J.P. (2016). Pancreatic Cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers*, 2, 16022.
- Klein, G., Dombos, L., und Gothoskar, B. (1972). Sensitivity of Epstein-Barr Virus (EBV) Producer and Non-Producer Human Lymphoblastoid Cell Lines to Superinfection with EB-Virus. *Int. J. Cancer*, 10(1), 44-57.
- Knight, B.E., Kozlowski, N., Havelin, J., King, T., Crocker, S.J., Young, E.E., und Baumbauer, K.M. (2019). TIMP-1 Attenuates the Development of Inflammatory Pain Through MMP-Dependent and Receptor-Mediated Cell Signaling Mechanisms. *Front. Mol. Neurosci.*, 12, 220.
- Kobuch, J., Cui, H., Grünwald, B., Saftig, P., Knolle, P.A., und Krüger, A. (2015). TIMP-1 Signaling via CD63 Triggers Granulopoiesis and Neutrophilia in Mice. *Haematologica*, 100(8), 1005-1013.
- Koch, N., Koch, S., und Hämmerling, G.J. (1982). Ia Invariant Chain Detected on Lymphocyte Surfaces by Monoclonal Antibody. *Nature*, 299(5884), 644-645.

8. Literaturverzeichnis

- Kolaczowska, E., und Kubes, P. (2013). Neutrophil Recruitment and Function in Health and Inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 13(3), 159-175.
- Kuijpers, T.W., Tool, A.T., van der Schoot, C.E., Ginsel, L.A., Onderwater, J.J., Roos, D., und Verhoeven, A.J. (1991). Membrane Surface Antigen Expression on Neutrophils: A Reappraisal of the Use of Surface Markers for Neutrophil Activation. *Blood*, 78(4), 1105-1111.
- Lambert, E., Bridoux, L., Devy, J., Dasse, E., Sowa, M.-L., Duca, L., Hornebeck, W., Martiny, L., und Petitfrere-Charpentier, E. (2009). TIMP-1 Binding to ProMMP-9/CD44 Complex Localized at the Cell Surface Promotes Erythroid Cell Survival. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 41(5), 1102-1115.
- Langiu, M., Palacios-Acedo, A.-L., Crescence, L., Mege, D., Dubois, C., und Panicot-Dubois, L. (2022). Neutrophils, Cancer and Thrombosis: The New Bermuda Triangle in Cancer Research. *Int. J. Mol. Sci.*, 23(3), 1257.
- Lee, J.W., Stone, M.L., Porrett, P.M., Thomas, S.K., Komar, C.A., Li, J.H., Delman, D., Graham, K., Gladney, W.L., Hua, X., Black, T.A., Chien, A.L., Majmundar, K.S., Thompson, J.C., Yee, S.S., O'Hara, M.H., Aggarwal, C., Xin, D., Shaked, A., Gao, M., Liu, D., Borad, M.J., Ramanathan, R.K., Carpenter, E.L., Ji, A., Beer, M.C. de, Beer, F.C. de, Webb, N.R., und Beatty, G.L. (2019). Hepatocytes Direct the Formation of a Pro-Metastatic Niche in the Liver. *Nature*, 567(7747), 249-252.
- Leng, L., Metz, C.N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A., und Bucala, R. (2003). MIF Signal Transduction Initiated by Binding to CD74. *J. Exp. Med.*, 197(11), 1467-1476.
- Leppkes, M., Maueroeder, C., Hirth, S., Nowecki, S., Gunther, C., Billmeier, U., Paulus, S., Biermann, M., Munoz, L.E., Hoffmann, M., Wildner, D., Croxford, A.L., Waisman, A., Mowen, K., Jenne, D.E., Krenn, V., Mayerle, J., Lerch, M.M., Schett, G., Wirtz, S., Neurath, M.F., Herrmann, M., und Becker, C. (2016). Externalized Decondensed Neutrophil Chromatin Occludes Pancreatic Ducts and Drives Pancreatitis. *Nat. Commun.*, 7, 10973.
- Levy, S., und Shoham, T. (2005). The Tetraspanin Web Modulates Immune-Signalling Complexes. *Nat. Rev. Immunol.*, 5(2), 136-148.
- Li, P., Li, M., Lindberg, M.R., Kennett, M.J., Xiong, N., und Wang, Y. (2010). PAD4 Is Essential for Antibacterial Innate Immunity Mediated by Neutrophil Extracellular Traps. *J. Exp. Med.*, 207(9), 1853-1862.
- Lorente, L., Martín, M.M., Solé-Violán, J., Blanquer, J., Labarta, L., Díaz, C., Borreguero-León, J.M., Orbe, J., Rodríguez, J.A., Jiménez, A., und Páramo, J.A. (2014). Association of Sepsis-Related Mortality with Early Increase of TIMP-1/MMP-9 Ratio. *PLoS One*, 9(4), e94318.
- Lüllmann-Rauch, R. (2009). Taschenlehrbuch Histologie. *Thieme*, Stuttgart, Deutschland.
- Maitra, A., und Hruban, R.H. (2008). Pancreatic Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 3, 157-188.

8. Literaturverzeichnis

- Manicone, A.M., und McGuire, J.K. (2008). Matrix Metalloproteinases as Modulators of Inflammation. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 19(1), 34-41.
- Mao, J.-Y., Zhang, J.-H., Cheng, W., Chen, J.-W., und Cui, N. (2021). Effects of Neutrophil Extracellular Traps in Patients with Septic Coagulopathy and Their Interaction with Autophagy. *Front. Immunol.*, 12, 757041.
- Martinelli, S., Urosevic, M., Daryadel, A., Oberholzer, P.A., Baumann, C., Fey, M.F., Dummer, R., Simon, H.-U., und Yousefi, S. (2004). Induction of Genes Mediating Interferon-Dependent Extracellular Trap Formation During Neutrophil Differentiation. *J. Biol. Chem.*, 279(42), 44123-44132.
- Martin, P., Furman, R.R., Rutherford, S., Ruan, J., Ely, S., Greenberg, J., Coleman, M., Goldsmith, S.J., und Leonard, J.P. (2015). Phase I Study of the Anti-CD74 Monoclonal Antibody Milatuzumab (HLL1) in Patients with Previously Treated B-Cell Lymphomas. *Leuk. Lymphoma.*, 56(11), 3065-3070.
- Matza, D., Kerem, A., und Shachar, I. (2003). Invariant Chain, a Chain of Command. *Trends Immunol.*, 24(5), 264-268.
- McDonald, B., Davis, R.P., Kim, S.-J., Tse, M., Esmon, C.T., Kolaczowska, E., und Jenne, C.N. (2017). Platelets and Neutrophil Extracellular Traps Collaborate to Promote Intravascular Coagulation During Sepsis in Mice. *Blood*, 129(10), 1357-1367.
- McKaig, B.C., McWilliams, D., Watson, S.A., und Mahida, Y.R. (2003). Expression and Regulation of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 and Matrix Metalloproteinases by Intestinal Myofibroblasts in Inflammatory Bowel Disease. *Am. J. Pathol.*, 162(4), 1355-1360.
- Merza, M., Hartman, H., Rahman, M., Hwaiz, R., Zhang, E., Renström, E., Luo, L., Mörgelin, M., Regner, S., und Thorlacius, H. (2015). Neutrophil Extracellular Traps Induce Trypsin Activation, Inflammation, and Tissue Damage in Mice with Severe Acute Pancreatitis. *Gastroenterology*, 149(7), 1920-1931.e8.
- Metzler, K.D., Goosmann, C., Lubojemska, A., Zychlinsky, A., und Papayannopoulos, V. (2014). A Myeloperoxidase-Containing Complex Regulates Neutrophil Elastase Release and Actin Dynamics During NETosis. *Cell Rep.*, 8(3), 883-896.
- Meza-Romero, R., Benedek, G., Leng, L., Bucala, R., und Vandenbark, A.A. (2016). Predicted Structure of MIF/CD74 and RTL1000/CD74 Complexes. *Metab. Brain. Dis.*, 31(2), 249-255.
- Miller-Ocuin, J.L., Liang, X., Boone, B.A., Doerfler, W.R., Singhi, A.D., Tang, D., Kang, R., Lotze, M.T., und Zeh, H.J. (2019). DNA Released from Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Activates Pancreatic Stellate Cells and Enhances Pancreatic Tumor Growth. *Oncoimmunology*, 8(9), e1605822.

- Mitchell, R.A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J., und Bucala, R. (2002). Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Sustains Macrophage Proinflammatory Function by Inhibiting P53: Regulatory Role in the Innate Immune Response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 99(1), 345-350.
- Moffitt, R.A., Marayati, R., Flate, E.L., Volmar, K.E., Loeza, S.G.H., Hoadley, K.A., Rashid, N.U., Williams, L.A., Eaton, S.C., Chung, A.H., Smyla, J.K., Anderson, J.M., Kim, H.J., Bentrem, D.J., Talamonti, M.S., Iacobuzio-Donahue, C.A., Hollingsworth, M.A., und Yeh, J.J. (2015). Virtual Microdissection Identifies Distinct Tumor- and Stroma-Specific Subtypes of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Nat. Genet.*, 47(10), 1168-1178.
- Moreira, J.M., Høeberg, M., Ulrik Lademann, U., Viuff, B., Jensen, L.V., Stenvang, J., Nygård, S.B., Ørum-Madsen, M.S., Vistesén, M.V., Fuglsang, A.T., Liu, S., und Brünner, N. (2015). Identification and Characterization of a New TIMP-1 Binding Protein [Abstract]. *Cancer Res.*, 75(9 Supplement), Abstract nr P5-07-08.
- Mroczo, B., Lukaszewicz-Zajac, M., Wereszczynska-Siemiatkowska, U., Groblewska, M., Gryko, M., Kedra, B., Jurkowska, G., und Szmitkowski, M. (2009). Clinical Significance of the Measurements of Serum Matrix Metalloproteinase-9 and its Inhibitor (Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1) in Patients with Pancreatic Cancer: Metalloproteinase-9 as an Independent Prognostic Factor. *Pancreas*, 38(6), 613-618.
- 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(33), 8097-8102.
- Nakashima, K., Hagiwara, T., und Yamada, M. (2002). Nuclear Localization of Peptidylarginine Deiminase V and Histone Deimination in Granulocytes. *J. Biol. Chem.*, 277(51), 49562-49568.
- Neefjes, J., Jongasma, M.L.M., Paul, P., und Bakke, O. (2011). Towards a Systems Understanding of MHC Class I and MHC Class II Antigen Presentation. *Nat. Rev. Immunol.*, 11(12), 823-836.
- Neoptolemos, J.P., Kleeff, J., Michl, P., Costello, E., Greenhalf, W., und Palmer, D.H. (2018). Therapeutic Developments in Pancreatic Cancer: Current and Future Perspectives. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 15(6), 333-348.
- Nukarinen, E., Lindström, O., Kuuliala, K., Kylänpää, L., Pettilä, V., Puolakkainen, P., Kuuliala, A., Hämäläinen, M., Moilanen, E., Repo, H., und Hästbacka, J. (2016). Association of Matrix Metalloproteinases -7, -8 and -9 and TIMP -1 with Disease Severity in Acute Pancreatitis. A Cohort Study. *PLoS One*, 11(8), e0161480.

8. Literaturverzeichnis

- Olive, K.P., Tuveson, D.A., Ruhe, Z.C., Yin, B., Willis, N.A., Bronson, R.T., Crowley, D., und Jacks, T. (2004). Mutant P53 Gain of Function in Two Mouse Models of Li-Fraumeni Syndrome. *Cell*, 119(6), 847-860.
- Olive, K.P., und Tuveson, D.A. (2006). The Use of Targeted Mouse Models for Preclinical Testing of Novel Cancer Therapeutics. *Clin. Cancer Res.*, 12(18), 5277-5287.
- Padmanabhan, K., Eddy, W.F., und Crowley, J.C. (2010). A Novel Algorithm for Optimal Image Thresholding of Biological Data. *J. Neurosci. Methods*, 193(2), 380-384.
- Pan, S., Chen, R., Crispin, D.A., May, D., Stevens, T., McIntosh, M.W., Bronner, M.P., Ziogas, A., Anton-Culver, H., und Brentnall, T.A. (2011). Protein Alterations Associated with Pancreatic Cancer and Chronic Pancreatitis Found in Human Plasma Using Global Quantitative Proteomics Profiling. *J. Proteome Res.*, 10(5), 2359-2376.
- Papayannopoulos, V., Metzler, K.D., Hakkim, A., und Zychlinsky, A. (2010). Neutrophil Elastase and Myeloperoxidase Regulate the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. *J. Cell. Biol.*, 191(3), 677-691.
- Papayannopoulos, V. (2018). Neutrophil Extracellular Traps in Immunity and Disease. *Nat. Rev. Immunol.*, 18(2), 134.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., und Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera - A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.*, 25(13), 1605-1612.
- Piciocchi, M., Stigliano, S., Archibugi, L., Zerboni, G., Signoretti, M., Barucca, V., Valente, R., Fave, G.D., und Capurso, G. (2017). The Neutrophil/Lymphocyte Ratio at Diagnosis Is Significantly Associated with Survival in Metastatic Pancreatic Cancer Patients. *Int. J. Mol. Sci.*, 18(4), 730.
- Poruk, K.E., Firpo, M.A., Scaife, C.L., Adler, D.G., Emerson, L.L., Boucher, K.M., und Mulvihill, S.J. (2013). Serum Osteopontin and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas*, 42(2), 193-197.
- Qi, J.H., Ebrahim, Q., Moore, N., Murphy, G., Claesson-Welsh, L., Bond, M., Baker, A., und Anand-Apte, B. (2003). A Novel Function for Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-3 (TIMP3): Inhibition of Angiogenesis by Blockage of VEGF Binding to VEGF Receptor-2. *Nat. Med.*, 9(4), 407-415.
- Quaresma, M., Coleman, M.P., und Rachet, B. (2015). 40-Year Trends in an Index of Survival for All Cancers Combined and Survival Adjusted for Age and Sex for Each Cancer in England and Wales, 1971–2011. A population-based study. *Lancet*, 385(9974), 1206-1218.

8. Literaturverzeichnis

- Raeeszadeh-Sarmazdeh, M., Greene, K.A., Sankaran, B., Downey, G.P., Radisky, D.C., und Radisky, E.S. (2019). Directed Evolution of the Metalloproteinase Inhibitor TIMP-1 Reveals That its N- and C-Terminal Domains Cooperate in Matrix Metalloproteinase Recognition. *J. Biol. Chem.*, 294(24), 9476-9488.
- Rahib, L., Smith, B.D., Aizenberg, R., Rosenzweig, A.B., Fleshman, J.M., und Matrisian, L.M. (2014). Projecting Cancer Incidence and Deaths to 2030: The Unexpected Burden of Thyroid, Liver, and Pancreas Cancers in the United States. *Cancer Res.*, 74(11), 2913-2921.
- 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(2), 433-439.
- Ries, C. (2014). Cytokine Functions of TIMP-1. *Cell. Mol. Life Sci.*, 71(4), 659-672.
- Robbins, S.L. (2013). Robbins Basic Pathology. Elsevier Saunders, Philadelphia, PA, USA.
- Roche, P.A., Marks, M.S., und Cresswell, P. (1991). Formation of a Nine-Subunit Complex by HLA Class II Glycoproteins and the Invariant Chain. *Nature*, 354(6352), 392-394.
- Rosazza, T., Warner, J., und Sollberger, G. (2021). NET Formation - Mechanisms and How They Relate to Other Cell Death Pathways. *FEBS J.*, 288(11), 3334-3350.
- Roswit, W.T., McCourt, D.W., Partridge, N.C., und Jeffrey, J.J. (1992). Purification and Sequence Analysis of Two Rat Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Arch. Biochem. Biophys.*, 292(2), 402-410.
- Schoeps, B., Eckfeld, C., Flüter, L., Keppler, S., Mishra, R., Knolle, P., Bayerl, F., Böttcher, J., Hermann, C.D., Häußler, D., und Krüger, A. (2021a). Identification of Invariant Chain CD74 as a Functional Receptor of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1). *J. Biol. Chem.*, 297(3), 101072.
- Schoeps, B., Eckfeld, C., Prokopchuk, O., Böttcher, J., Häußler, D., Steiger, K., Demir, I.E., Knolle, P., Soehnlein, O., Jenne, D.E., Hermann, C.D., und Krüger, A. (2021b). TIMP1 Triggers Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.*, 81(13), 3568-3579.
- Schröder, B. (2016). The Multifaceted Roles of the Invariant Chain CD74 - More Than Just a Chaperone. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1863(6 Pt A), 1269-1281.
- Schröder, J., Lullmann-Rauch, R., Himmerkus, N., Pleines, I., Nieswandt, B., Orinska, Z., Koch-Nolte, F., Schroder, B., Bleich, M., und Saftig, P. (2009). Deficiency of the Tetraspanin CD63 Associated with Kidney Pathology but Normal Lysosomal Function. *Mol. Cell. Biol.*, 29(4), 1083-1094.

8. Literaturverzeichnis

- Schwartz, V., Lue, H., Kraemer, S., Korbiel, J., Krohn, R., Ohl, K., Bucala, R., Weber, C., und Bernhagen, J. (2009). A Functional Heteromeric MIF Receptor Formed by CD74 and CXCR4. *FEBS Lett.*, 583(17), 2749-2757.
- Sehnal, D., Bittrich, S., Deshpande, M., Svobodová, R., Berka, K., Bazgier, V., Velankar, S., Burley, S.K., Koča, J., und Rose, A.S. (2021). Mol* Viewer: Modern Web App for 3D Visualization and Analysis of Large Biomolecular Structures. *Nucleic Acids Res.*, 49(W1), W431-W437.
- Seo, D.-W., Li, H., Guedez, L., Wingfield, P.T., Diaz, T., Salloum, R., Wei, B., und Stetler-Stevenson, W.G. (2003). TIMP-2 Mediated Inhibition of Angiogenesis. *Cell*, 114(2), 171-180.
- 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., und Krüger, A. (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(1), 238-248.
- Shachar, I., und Flavell, R.A. (1996). Requirement for Invariant Chain in B Cell Maturation and Function. *Science*, 274(5284), 106-108.
- Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., McDonald, C., Chen, Z., Murphy, J.W., Lolis, E., Noble, P., Knudson, W., und Bucala, R. (2006). CD44 Is the Signaling Component of the Macrophage Migration Inhibitory Factor-CD74 Receptor Complex. *Immunity*, 25(4), 595-606.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., und Jemal, A. (2015). Cancer Statistics, 2015. *CA Cancer J. Clin.*, 65(1), 5-29.
- Sincock, P.M., Mayrhofer, G., und Ashman, L.K. (1997). Localization of the Transmembrane 4 Superfamily (TM4SF) Member PETA-3 (CD151) in Normal Human Tissues: Comparison with CD9, CD63, and Alpha5beta1 Integrin. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(4), 515-525.
- Sivula, M., Hastbacka, J., Kuitunen, A., Lassila, R., Tervahartiala, T., Sorsa, T., und Pettila, V. (2015). Systemic Matrix Metalloproteinase-8 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Levels in Severe Sepsis-Associated Coagulopathy. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 59(2), 176-184.
- 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(8), 3617-3626.
- Soloway, P.D., Alexander, C.M., Werb, Z., und Jaenisch, R. (1996). Targeted Mutagenesis of Timp-1 Reveals That Lung Tumor Invasion Is Influenced by Timp-1 Genotype of the Tumor but Not by That of the Host. *Oncogene*, 13(11), 2307-2314.

8. Literaturverzeichnis

- Starlets, D., Gore, Y., Binsky, I., Haran, M., Harpaz, N., Shvidel, L., Becker-Herman, S., Berrebi, A., und Shachar, I. (2006). Cell-Surface CD74 Initiates a Signaling Cascade Leading to Cell Proliferation and Survival. *Blood*, 107(12), 4807-4816.
- Stein, R., Mattes, M.J., Cardillo, T.M., Hansen, H.J., Chang, C.-H., Burton, J., Govindan, S., und Goldenberg, D.M. (2007). CD74: A New Candidate Target for the Immunotherapy of B-Cell Neoplasms. *Clin. Cancer Res.*, 13(18 Pt 2), 5556s-5563s.
- Stenken, J.A., und Poschenrieder, A.J. (2015). Bioanalytical Chemistry of Cytokines - A Review. *Anal. Chim. Acta*, 853, 95-115.
- Stockinger, B., Pessara, U., Lin, R.H., Habicht, J., Grez, M., und Koch, N. (1989). A Role of La-Associated Invariant Chains in Antigen Processing and Presentation. *Cell*, 56(4), 683-689.
- Sun, H.W., Bernhagen, J., Bucala, R., und Lolis, E. (1996). Crystal Structure at 2.6-Å Resolution of Human Macrophage Migration Inhibitory Factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 93(11), 5191-5196.
- Suzuki, R., Takagi, T., Hikichi, T., Konno, N., Sugimoto, M., Watanabe, K.O., Nakamura, J., Waragai, Y., Kikuchi, H., Takasumi, M., Watanabe, H., und Ohira, H. (2016). Derived Neutrophil/lymphocyte Ratio Predicts Gemcitabine Therapy Outcome in Unresectable Pancreatic Cancer. *Oncol. Lett.*, 11(5), 3441-3445.
- Takei, H., Araki, A., Watanabe, H., Ichinose, A., und Sendo, F. (1996). Rapid Killing of Human Neutrophils by the Potent Activator Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) Accompanied by Changes Different from Typical Apoptosis or Necrosis. *J. Leukoc. Biol.*, 59(2), 229-240.
- Tu, M., Klein, L., Espinet, E., Georgomanolis, T., Wegwitz, F., Li, X., Urbach, L., Danieli-Mackay, A., Küffer, S., Bojarczuk, K., Mizi, A., Günesdogan, U., Chapuy, B., Gu, Z., Neesse, A., Kishore, U., Ströbel, P., Hessmann, E., Hahn, S.A., Trumpp, A., Papantonis, A., Ellenrieder, V., und Singh, S.K. (2021). TNF-A-Producing Macrophages Determine Subtype Identity and Prognosis via AP1 Enhancer Reprogramming in Pancreatic Cancer. *Nat Cancer*, 2(11), 1185-1203.
- Uhlén, M., Fagerberg, L., Hallström, B.M., Lindskog, C., Oksvold, P., Mardinoglu, A., Sivertsson, Å., Kampf, C., Sjöstedt, E., Asplund, A., Olsson, I., Edlund, K., Lundberg, E., Navani, S., Szigartyo, C.A.-K., Odeberg, J., Djureinovic, D., Takanen, J.O., Hober, S., Alm, T., Edqvist, P.-H., Berling, H., Tegel, H., Mulder, J., Rockberg, J., Nilsson, P., Schwenk, J.M., Hamsten, M., Feilitzén, K. von, Forsberg, M., Persson, L., Johansson, F., Zwahlen, M., Heijne, G. von, Nielsen, J., und Pontén, F. (2015). Proteomics. Tissue-Based Map of the Human Proteome. *Science*, 347(6220), 1260419.
- Urban, C.F., Ermert, D., Schmid, M., Abu-Abed, U., Goosmann, C., Nacken, W., Brinkmann, V., Jungblut, P.R., und Zychlinsky, A. (2009). Neutrophil Extracellular Traps Contain Calprotectin, a Cytosolic Protein Complex Involved in Host Defense Against *Candida Albicans*. *PLoS Pathog.*, 5(10), e1000639.

8. Literaturverzeichnis

- Uysal-Onganer, P., D'Alessio, S., Mortoglou, M., Kraev, I., und Lange, S. (2021). Peptidylarginine Deiminase Inhibitor Application, Using Cl-Amidine, PAD2, PAD3 and PAD4 Isozyme-Specific Inhibitors in Pancreatic Cancer Cells, Reveals Roles for PAD2 and PAD3 in Cancer Invasion and Modulation of Extracellular Vesicle Signatures. *Int. J. Mol. Sci.*, 22(3), 1396.
- Vatansever, S., Erman, B., und Gümüş, Z.H. (2019). Oncogenic G12D Mutation Alters Local Conformations and Dynamics of K-Ras. *Sci. Rep.*, 9(1), 11730.
- Ventriglia, J., Petrillo, A., Huerta Alváro, M., Laterza, M.M., Savastano, B., Gambardella, V., Tirino, G., Pompella, L., Diana, A., Iovino, F., Troiani, T., Martinelli, E., Morgillo, F., Orditura, M., Cervantes, A., Ciardiello, F., und Vita, F. de (2018). Neutrophil to Lymphocyte Ratio as a Predictor of Poor Prognosis in Metastatic Pancreatic Cancer Patients Treated with Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine. A Propensity Score Analysis. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2018, 2373868.
- Verzeaux, L., Belloy, N., Thevenard-Devy, J., Devy, J., Ferracci, G., Martiny, L., Dedieu, S., Dauchez, M., Emonard, H., Etique, N., und Devarenne-Charpentier, E. (2017). Intrinsic Dynamics Study Identifies Two Amino Acids of TIMP-1 Critical for its LRP-1-Mediated Endocytosis in Neurons. *Sci. Rep.*, 7(1), 5375.
- Vossenaar, E.R., Zendman, A.J.W., van Venrooij, W.J., und Pruijn, G.J.M. (2003). PAD, a Growing Family of Citrullinating Enzymes: Genes, Features and Involvement in Disease. *Bioessays.*, 25(11), 1106-1118.
- Wang, T., Yamashita, K., Iwata, K., und Hayakawa, T. (2002). Both Tissue Inhibitors of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) And TIMP-2 Activate Ras but Through Different Pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 296(1), 201-205.
- Wang, Y., Wysocka, J., Sayegh, J., Lee, Y.H., Perlin, JR, Leonelli, L., Sonbuchner, L.S., McDonald, C.H., Cook, R.G., Dou, Y., Roeder, R.G., Clarke, S., Stallcup, Allis, C.D., und Coonrod, S.A. (2004). Human PAD4 Regulates Histone Arginine Methylation Levels via Demethylination. *Science*, 306(5694), 279-283.
- Wang, Y., Fang, T., Huang, L., Wang, H., Zhang, L., Wang, Z., und Cui, Y. (2018). Neutrophils Infiltrating Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Indicate Higher Malignancy and Worse Prognosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 501(1), 313-319.
- Warner, R.B., Najy, A.J., Jung, Y.S., Fridman, R., Kim, S., und Kim, H.-R.C. (2020). Establishment of Structure-Function Relationship of Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 for its Interaction with CD63. Implication for Cancer Therapy. *Sci. Rep.*, 10(1), 2099.

8. Literaturverzeichnis

- Weckbach, L.T., Grabmaier, U., Uhl, A., Gess, S., Boehm, F., Zehrer, A., Pick, R., Salvermoser, M., Czermak, T., Pircher, J., Sorrelle, N., Migliorini, M., Strickland, D.K., Klingel, K., Brinkmann, V., Abu Abed, U., Eriksson, U., Massberg, S., Brunner, S., und Walzog, B. (2019). Midkine Drives Cardiac Inflammation by Promoting Neutrophil Trafficking and NETosis in Myocarditis. *J. Exp. Med.*, 216(2), 350-368.
- Welgus, H.G., Stricklin, G.P., Eisen, A.Z., Bauer, E.A., Cooney, R.V., und Jeffrey, J.J. (1979). A Specific Inhibitor of Vertebrate Collagenase Produced by Human Skin Fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 254(6), 1938-1943.
- Wen, F., Shen, A., Choi, A., Gerner, E.W., und Shi, J. (2013). Extracellular DNA in Pancreatic Cancer Promotes Cell Invasion and Metastasis. *Cancer Res.*, 73(14), 4256-4266.
- Wen, Y., Cai, W., Yang, J., Fu, X., Putha, L., Xia, Q., Windsor, J.A., Phillips, A.R., Tyndall, J.D.A., Du, D., Liu, T., und Huang, W. (2021). Targeting Macrophage Migration Inhibitory Factor in Acute Pancreatitis and Pancreatic Cancer. *Front. Pharmacol.*, 12, 638950.
- Wilhelmsen, K., Farrar, K., und Hellman, J. (2013). Quantitative in Vitro Assay to Measure Neutrophil Adhesion to Activated Primary Human Microvascular Endothelial Cells Under Static Conditions. *J. Vis. Exp.*, (78), e50677.
- Wilk, C.M., Schildberg, F.A., Lauterbach, M.A., Cadeddu, R.P., Frobel, J., Westphal, V., Tolba, R.H., Hell, S.W., Czibere, A., Bruns, I., und Haas, R. (2013). The Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 Improves Migration and Adhesion of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Exp. Hematol.*, 41(9), 823-831.e2.
- Xia, Y., Yeddula, N., Leblanc, M., Ke, E., Zhang, Y., Oldfield, E., Shaw, R.J., und Verma, I.M. (2012). Reduced Cell Proliferation by IKK2 Depletion in a Mouse Lung-Cancer Model. *Nat. Cell. Biol.*, 14(3), 257-265.
- Xu, L., Hui, A.Y., Albanis, E., Arthur, M.J., O'Byrne, S.M., Blaner, W.S., Mukherjee, P., Friedman, S.L., und Eng, F.J. (2005). Human Hepatic Stellate Cell Lines, LX-1 and LX-2. New Tools for Analysis of Hepatic Fibrosis. *Gut*, 54(1), 142-151.
- Yamashita, K., Suzuki, M., Iwata, H., Koike, T., Hamaguchi, M., Shinagawa, A., Noguchi, T., und Hayakawa, T. (1996). Tyrosine Phosphorylation Is Crucial for Growth Signaling by Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2). *FEBS Lett.*, 396(1), 103-107.
- Yang, L., Liu, Q., Zhang, X., Liu, X., Zhou, B., Chen, J., Di Huang, Li, J., Li, H., Chen, F., Liu, J., Xing, Y., Chen, X., Su, S., und Song, E. (2020). DNA of Neutrophil Extracellular Traps Promotes Cancer Metastasis via CCDC25. *Nature*, 583(7814), 133-138.
- Yipp, B.G., und Kubes, P. (2013). NETosis: How Vital Is It? *Blood*, 122(16), 2784-2794.

8. Literaturverzeichnis

- Yousefi, S., Mihalache, C., Kozlowski, E., Schmid, I., und Simon, H.U. (2009). Viable Neutrophils Release Mitochondrial DNA to Form Neutrophil Extracellular Traps. *Cell Death Differ.*, 16(11), 1438-1444.
- Yuzhalin, A.E. (2019). Citrullination in Cancer. *Cancer Res.*, 79(7), 1274-1284.
- Zhang, J., Wu, T., Zhan, S., Qiao, N., Zhang, X., Zhu, Y., Yang, N., Sun, Y., Zhang, X.A., Bleich, D., und Han, X. (2017). TIMP-1 and CD82, a Promising Combined Evaluation Marker for PDAC. *Oncotarget*, 8(4), 6496-6512.
- Zhang, Y., Chandra, V., Riquelme Sanchez, E., Dutta, P., Quesada, P.R., Rakoski, A., Zoltan, M., Arora, N., Baydogan, S., Horne, W., Burks, J., Xu, H., Hussain, P., Wang, H., Gupta, S., Maitra, A., Bailey, J.M., Moghaddam, S.J., Banerjee, S., Sahin, I., Bhattacharya, P., und McAllister, F. (2020). Interleukin-17-Induced Neutrophil Extracellular Traps Mediate Resistance to Checkpoint Blockade in Pancreatic Cancer. *J. Exp. Med.*, 217(12), e20190354.
- Zhao, S., Molina, A., Yu, A., Hanson, J., Cheung, H., Li, X., und Natkunam, Y. (2019). High Frequency of CD74 Expression in Lymphomas: Implications for Targeted Therapy Using a Novel Anti-CD74-Drug Conjugate. *J. Pathol. Clin. Res.*, 5(1), 12-24.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *Prof. Dr. Achim Krüger* für die kritischen Ratschläge und produktiven Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vor allem die herausragende Unterstützung bei der Anfertigung von wissenschaftlichen Texten, sowie bei der Vorbereitung von Präsentationen, wird mir in Erinnerung bleiben. Ich bedanke mich außerdem für die Möglichkeit, interessante Fragestellungen frei und eigenverantwortlich bearbeiten zu dürfen sowie die wertvollen Erfahrungen, an internationalen Konferenzen teilnehmen zu können. Die umfassenden Einblicke in die Betreuung von Studenten waren außerdem sehr lehrreich. Für die Einarbeitung in tierexperimentelle Methoden und die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Tierversuche danke ich ihm ebenfalls.

Bei den weiteren Mitgliedern meines Promotionsmentorats, *Prof. Dr. Dietmar Zehn* und *Prof. Dr. Klaus-Peter Janssen* bedanke ich mich für die hilfreichen Ratschläge und die Unterstützung während meiner Promotion.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Kollegen *Celina Eckfeld*, *Chris Hermann*, *Daniel Häußler*, *Katja Honert* und *Dr. Susanne Schaten*, die einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben. Die enge Zusammenarbeit, ständige Hilfsbereitschaft und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre bildeten eine optimale Grundlage für eine effektive Versuchsdurchführung und die Diskussion wissenschaftlicher Fragestellungen.

Celina Eckfeld danke ich für die umfassende Unterstützung bei der Durchführung vieler *in vitro* Experimente zur NET-Bildung und für die enge Zusammenarbeit am CD74-Projekt. Außerdem danke ich ihr für die zur Verfügung gestellten Daten zur *Dot Blot* Analyse (Abb. 3.5, D), die Unterstützung bei Signalwegsanalysen, sowie das hilfreiche Korrekturlesen dieser Arbeit. *Chris Hermann* danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der Tierexperimente, die Unterstützung bei Kaplan-Meier Analysen sowie die zur Verfügung gestellten Daten zur Transkriptomanalyse in PDAC Patienten (Abb. 3.13), ROC *curve*- (Abb. 3.16, Abb. 3.17, A) und AUC-Analysen (Abb. 3.17, B). Ich danke ihm außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Bei *Daniel Häußler* bedanke ich mich für die Herstellung und Charakterisierung der rekombinanten TIMP-1 Varianten, für die zur Verfügung gestellten Daten zum MMP Aktivitätsassay (Abb. 3.4, D) und die Unterstützung bei der digitalen Visualisierung verschiedener Molekülstrukturen. *Katja Honert* danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und Zuverlässigkeit. Die umfangreiche Unterstützung in der Zellkultur und die Durchführung der Genotypisierung der Versuchstiere war eine große Hilfe. Bei *Dr. Susanne Schaten* bedanke ich mich für die Organisation der Zucht der Versuchstiere und für die Unterstützung bei der Anfertigung von Tierversuchsanträgen. *Julian Frädrich* danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Bei *Felix Kühner* bedanke ich mich für die

Danksagung

Unterstützung bei den Genexpressionsanalysen, bei den anderen Praktikanten und Masterstudenten bedanke ich mich für den engagierten Einsatz.

Allen Kooperationspartnern danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit. *Dr. Olga Prokopchuk* danke ich für die Bereitstellung von klinischen Daten und Patientenmaterial. Bei der Gewebebank des Klinikums rechts der Isar und der TU München bedanke ich mich ebenfalls für die Bereitstellung von Patientenmaterial. *Dr. Jan Böttcher* danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung konfokaler Mikroskopieaufnahmen. Mein Dank gilt auch *PD Dr. Katja Steiger* für das *Grading* der KPC Mäuse sowie die zur Verfügung gestellten Bilder von Pankreastumorgewebe aus KPC Mäusen (Abb. 2.2). Der gesamten *Comparative experimental Pathology (CeP)*-Gruppe danke ich für die Unterstützung bei der Aufarbeitung der Proben der Versuchstiere. *PD Dr. Dieter Jenne* und *Prof. Dr. Oliver Söhnlein* danke ich für die hilfreichen Diskussionen und wissenschaftlichen Ratschläge.

Den Mitgliedern der Institute für Molekulare Immunologie und Experimentelle Onkologie danke ich für die gute Arbeitsatmosphäre und die tolle Zusammenarbeit. Bei *Prof. Dr. Percy Knolle* bedanke ich mich für die hilfreichen Anregungen während der Forschungsseminare und die fachliche Unterstützung. *PD Dr. Martina Anton* danke ich für die Unterstützung bei jeglichen Fragen rund um Gentechnik, Klonierung und Virusherstellung. Für die technische oder administrative Unterstützung bedanke ich mich außerdem bei *Josef Straßmair, Michaela Müller, Sandra Kimmerle, Savvoula Michailidou* und *Dr. Tobias Baumann*.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung bedanken. Ein besonderer Dank gilt hierbei meinen Eltern, die mich umfassend auf meinem bisherigen Weg gefördert haben, sowie meinem Großvater, der mir immer mit Ratschlägen zur Seite stand. Meiner Partnerin *Lisa* danke ich von ganzem Herzen für die bedingungslose Rücksichtnahme und für die Kraft, die sie mir jeden Tag schenkt.

Publikationsverzeichnis

Promotionsbezogene Publikationen

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden bereits erfolgreich veröffentlicht:

Schoeps, B.*, Eckfeld, C.*, Flüter, L., Keppler, S., Mishra, R., Knolle, P., Bayerl, F., Böttcher, J., Hermann, C.D., Häußler, D., und Krüger, A. (2021a). Identification of Invariant Chain CD74 as a Functional Receptor of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1). *J. Biol. Chem.*, 297(3), 101072.

Schoeps, B., Eckfeld, C., Prokopchuk, O., Böttcher, J., Häußler, D., Steiger, K., Demir, I.E., Knolle, P., Soehnlein, O., Jenne, D.E., Hermann, C.D., und Krüger, A. (2021b). TIMP1 Triggers Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.*, 81(13), 3568-3579.

Weitere Publikationen

Dyer, A., **Schoeps, B.**, Frost, S., Jakeman, P., Scott, E.M., Freedman, J., Jacobus, E.J., und Seymour, L.W. (2019). Antagonism of Glycolysis and Reductive Carboxylation of Glutamine Potentiates Activity of Oncolytic Adenoviruses in Cancer Cells. *Cancer Res.*, 79(2), 331-345.

Eckfeld, C., Häußler, D., **Schoeps, B.**, Hermann, C.D., und Krüger, A. (2019). Functional Disparities Within the TIMP Family in Cancer: Hints from Molecular Divergence. *Cancer Metastasis Rev.*, 38(3), 469-481.

Görgülü, K., Diakopoulos, K.N., Ai, J., **Schoeps, B.**, Kabacaoglu, D., Karpathaki, A.-F., Ciecieski, K.J., Kaya-Aksoy, E., Ruess, D.A., Berninger, A., Kowalska, M., Stevanovic, M., Wörmann, S.M., Wartmann, T., Zhao, Y., Halangk, W., Voronina, S., Tepikin, A., Schlitter, A.M., Steiger, K., Artati, A., Adamski, J., Aichler, M., Walch, A., Jastroch, M., Hartleben, G., Mantzoros, C.S., Weichert, W., Schmid, R.M., Herzig, S., Krüger, A., Sainz, B., Lesina, M., und Algül, H. (2019). Levels of the Autophagy-Related 5 Protein Affect Progression and Metastasis of Pancreatic Tumors in Mice. *Gastroenterology*, 156(1), 203-217.e20.

Grünwald, B., **Schoeps, B.**, und Krüger, A. (2019). Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1. *Trends. Cell. Biol.*, 29(1), 6-19.

Hermann, C.D., **Schoeps, B.**, Eckfeld, C., Munkhbaatar, E., Kniep, L., Prokopchuk, O., Wirges, N., Steiger, K., Häußler, D., Knolle, P., Poulton, E., Khokha, R., Grünwald, B.T., Demir, I.E., und Krüger, A. (2021). TIMP1 Expression Underlies Sex Disparity in Liver Metastasis and Survival in Pancreatic Cancer. *J. Exp. Med.*, 218(11), e20210911.

Prokopchuk, O.* , Hermann, C.D.* , **Schoeps, B.***, Nitsche, U., Prokopchuk, O.L., Knolle, P., Friess, H., Martignoni, M.E., und Krüger, A. (2021). A Novel Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1/liver/cachexia Score Predicts Prognosis of Gastrointestinal Cancer Patients. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*, 12(2), 378-392.

Zhao, Y., **Schoeps, B.**, Yao, D., Zhang, Z., Schuck, K., Tissen, V., Jäger, C., Schlitter, A.M., van der Kammen, R., Ludwig, C., D'Haese, J.G., Raulefs, S., Maeritz, N., Shen, S., Zou, X., Krüger, A., Kleeff, J., Michalski, C.W., Friess, H., Innocenti, M., und Kong, B. (2021). MTORC1 and MTORC2 Converge on the Arp2/3 Complex to Promote KrasG12D-Induced Acinar-to-Ductal Metaplasia and Early Pancreatic Carcinogenesis. *Gastroenterology*, 160(5), 1755-1770.e17.

* Gleichberechtigte Koautoren