



Technische Universität München
Fakultät für Medizin

**Neue funktionelle Interaktionspartner vermitteln eine
zytokinische immunmodulatorische Signalfunktion von
*Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)***

Celina Eckfeld

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung einer
Doktorin der Naturwissenschaften (Dr. *rer. nat.*)
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Julia Jellusova

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Achim Krüger
2. Prof. Dr. Martin Klingenspor

Die Dissertation wurde am 01.03.2023 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 13.06.2023 angenommen.

Meinen Eltern Anja und Michael

INHALT

ZUSAMMENFASSUNG	V
ABSTRACT	VI
1. EINLEITUNG	1
1.1. TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASES-1 (TIMP-1).....	1
1.1.1. Klinische Bedeutung von TIMP-1	1
1.1.2. Struktur von TIMP-1	2
1.1.3. Anti-proteolytische Funktion von TIMP-1	3
1.1.4. Zytokinische Signalfunktion von TIMP-1	5
1.1.4.1. Die Signalfunktion von TIMP-1 vermittelt die Bildung einer prämetastatischen Nische in der Leber	5
1.1.4.2. Die Signalwirkung von TIMP-1 vermittelt ein Hypoxie-Mimikry in Tumorzellen	6
1.1.5. Die Signalwirkung von TIMP-1 wirkt immunmodulatorisch	7
1.2. MONOZYTEN - POTENTIELLE ZIELZELLEN DER IMMUNMODULATORISCHEN SIGNALWIRKUNG VON TIMP-1 .	8
1.2.1. Entwicklung und Funktionen von Monozyten	8
1.2.2. Die Rolle von Monozyten bei Entzündungs-assoziierten Erkrankungen	8
1.2.3. Aktivierung von Monozyten	10
1.2.4. Oberflächenrezeptoren vermitteln die Aktivierung von Monozyten	12
1.3. LRC-TRICEPS – EINE METHODE ZUR IDENTIFIKATION VON NEUEN TIMP-1 INTERAKTIONSPARTNERN AUF IMMUNZELLEN	13
ZIEL DIESER ARBEIT	15
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1. MATERIALIEN	16
2.1.1. Chemikalien	16
2.1.2. Verbrauchsmaterialien	18
2.1.3. Geräte.....	19
2.1.4. Puffer und Lösungen.....	21
2.1.5. Primer	22
2.1.6. Plasmide.....	22
2.1.7. Antikörper	23
2.1.8. Rekombinante Proteine	25
2.1.9. Kits.....	26
2.1.10. <i>Software</i>	27
2.2. PATIENTENPROBEN	28
2.2.1 Blutproben	28
2.2.2. Zulassung der durchgeführten Patientenstudien	28

2.3. TIEREXPERIMENTE	28
2.3.1. Verwendete Versuchstiere	28
2.3.2. Induktion von akuter Pankreatitis in Mäusen durch Injektion von Cerulein.....	28
2.3.3. Entnahme von Plasma aus Mausblut	29
2.4. METHODEN DER ZELLKULTUR	30
2.4.1. Isolation von primären humanen Monozyten aus Spenderblut	30
2.4.2. Kultivierung von Zelllinien.....	31
2.4.3. Bestimmung von Zellzahlen	32
2.4.4. Stimulation von Zellen.....	33
2.4.4.1. Stimulation von primären humanen Monozyten in der Hypoxiekammer	33
2.4.4.2. Stimulation von primären humanen Monozyten zur Analyse der Glukoseaufnahme	33
2.4.4.3. Stimulation von primären humanen Monozyten zur Analyse von intrazellulären Zytokinspiegeln.....	33
2.4.4.4. Stimulation von primären humanen Monozyten zur Analyse von intrazellulären Signalwegmolekülen	34
2.4.4.5. Stimulation von Zellen mit Alexa ⁵⁵⁵ -TIMP-1 für die konfokale Mikroskopie	34
2.4.4.5.1. Fluoreszenzmarkierung von TIMP-1 mit Alexa555	34
2.4.4.5.2. Färbung der Zellen mit Alexa555-TIMP-1	34
2.4.4.6. Stimulation von B-Lymphomzellen zur Durchführung des LRC-TriCEPS Ansatzes.....	34
2.4.4.7. Stimulation von SFCD74-LX2 Zellen für die Ko-Immunpräzipitation	35
2.4.5. Generierung von APP <i>knockdown</i> THP-1 Zellen	35
2.4.6. Generierung von CD74-Überexpressionszellen.....	36
2.5. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	37
2.5.1. Durchführung von Protein-Arrays	37
2.5.1.1. Humaner Zellstress-Array und humaner XL Zytokin-Array.....	37
2.5.1.2. Muriner LEGENDPlex-Maus Inflammations Array.....	38
2.5.2. Durchflusszytometrie.....	38
2.5.2.1. Färbung von Oberflächenproteinen	38
2.5.2.2. Färbung von intrazellulären Proteinen	38
2.5.2.3. Analyse der Glukoseaufnahme	38
2.5.3. LRC-TriCEPS Assay.....	39
2.5.3.1. Durchführung des Assays.....	39
2.5.3.2. Auswertung der Daten	39
2.5.4. <i>Dot Blot Assay</i>	40
2.5.5. <i>Pull Down Assay</i>	40
2.5.6. Ko-Immunpräzipitation	41
2.5.7. ELISA	42
2.5.7.1. TIMP-1 ELISA	42
2.5.7.2. sCD163 ELISA.....	42
2.5.7.3. IL-6 ELISA.....	42

INHALT

2.5.8. qRT-PCR Analysen	43
2.5.8.1. Isolierung von RNA aus Zellen	43
2.5.8.2. RNA-Konzentrationsbestimmung und Kontrolle der RNA-Integrität	43
2.5.8.3. Reverse Transkription.....	43
2.5.8.4. Genexpressionsanalyse durch qRT-PCR	45
2.5.9. Isolation und Konzentrationsbestimmung von Proteinen aus Zellen	45
2.5.9.1. Isolation von Proteinen aus Zellen.....	45
2.5.9.2. Bestimmungen von Proteinkonzentrationen mittels BCA	46
2.5.10. SDS Gelelektrophorese.....	46
2.5.11. Western Blot	47
2.5.12. Konfokale Mikroskopie	47
2.5.12.1. Färbung der TIMP-1 Rezeptoren	47
2.5.12.3. Konfokale Mikroskopie	48
2.5.12.4. Bearbeitung und Auswertung der konfokalen Aufnahmen	48
2.6. <i>IN SILICO</i> ANALYSE VON TRANSKRIPTOM DATEN.....	48
2.6.1. Analyse von publizierten immunspezifischen Transkriptionsdaten von Patienten	48
2.6.2. Analyse von <i>bulk</i> Tumor Transkriptomdaten aus Patienten	48
2.6.3. <i>Gene Set Enrichment Analyse</i> (GSEA) von <i>bulk</i> Tumor Transkriptomdaten	49
2.7. STATISTISCHE ANALYSEN	49
2.8. KRITERIEN UND VORGEHENSWEISEN BEI DER DARSTELLUNG VON INTERAKTOM-DIAGRAMMEN UND PROGNOSTISCHEN PARAMETERN DER TIMPS	50
2.8.1. Kriterien zur Identifikation von bekannten TIMP Interaktionspartnern anhand von Literaturdaten ...	50
2.8.2. Kriterien zur Zusammenfassung der basalen Expressionsspiegel, Expressionsveränderungen und prognostischen Werte der TIMPs	51
3. ERGEBNISSE.....	52
3.1. JEDES TIMP BESITZT EIN EINZIGARTIGES INTERAKTOM	52
3.2. TIMP-1 INTERAGIERT MIT DEM REZEPTOR CD74	54
3.2.1. TIMP-1 interagiert mit CD74 in artifiziell CD74-überexprimierenden HSCs.....	54
3.2.2. TIMP-1 interagiert mit CD74 in physiologisch CD74-exprimierenden B-Lymphomzellen.....	56
3.3. DIE SIGNALFUNKTION VON TIMP-1 VERMITTELT EINE PRO-INFLAMMATORISCHE STRESSANTWORT IN MONOZYTEN.....	58
3.3.1. TIMP-1 induziert einen Hypoxiestress-assoziierten Phänotyp in Monozyten	58
3.3.2. TIMP-1 erhöht die Spiegel von pro-inflammatorischen Zytokinen in Monozyten.....	60
3.3.3. Die pro-inflammatorische Wirkung von TIMP-1 auf Monozyten erfordert die Anwesenheit der C-terminalen Domäne des Proteins	62
3.3.4. Die Monozyten-aktivierende Signalfunktion von TIMP-1 wird durch das <i>Amyloid Precursor Protein</i> vermittelt.....	64

INHALT

3.3.4.1 APPs sind neue Interaktionspartner von TIMP-1	64
3.3.4.2. Der pro-inflammatorische Effekt von TIMP-1 auf Monozyten wird über APP vermittelt.....	67
3.4. <i>IN VIVO</i> RELEVANZ DER PRO-INFLAMMATORISCHEN WIRKUNG VON TIMP-1	72
3.4.1. Die Expression von TIMP-1 wird in nahezu allen Tumorentitäten hochreguliert und korreliert mit einer schlechten Prognose für die Patienten	72
3.4.2. TIMP-1 korreliert mit Monozyten-assoziierten Prozessen <i>in vivo</i>	74
3.4.3. TIMP-1 korreliert mit pro-inflammatorischen Zytokinen <i>in vivo</i>	75
3.4.4. TIMP-1 korreliert mit dem Monozyten-Aktivierungsmarker sCD163	76
4. DISKUSSION.....	77
4.1. NEUE INTERAKTIONSPARTNER ERWEITERN DAS INTERAKTOM VON TIMP-1	77
4.2. DIE NEU IDENTIFIZIERTEN INTERAKTIONSPARTNER VON TIMP-1 VERMITTELN NEUE IMMUNMODULATORISCHE SIGNALFUNKTIONEN	82
4.3. DIE PRO-INFLAMMATORISCHE WIRKUNG VON TIMP-1 AUF MONOZYTEN IST KLINISCH RELEVANT	86
4.4. AUSBLICK	87
5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	88
6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS	90
7. TABELLENVERZEICHNIS.....	91
8. LITERATURVERZEICHNIS.....	92
9. DANKSAGUNG	125
10. ANHANG	128

ZUSAMMENFASSUNG

Das Protein *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1* (TIMP-1) ist ein multifunktionales Molekül, dessen Expression in zahlreichen entzündungs-assoziierten Erkrankungen hochreguliert wird und meist mit einer schlechten Prognose für die Patienten korreliert. Die molekularen Ursachen für diese Assoziation sind allerdings bisher nicht vollständig verstanden. Die Multifunktionalität von TIMP-1 wird maßgeblich durch Interaktionen mit verschiedenen Molekülen bestimmt, die sowohl die anti-proteolytische, als auch die zytokinische Funktion von TIMP-1 ermöglichen. In dieser Arbeit konnten neue Interaktionspartner von TIMP-1 identifiziert werden, die neue zytokinische immunmodulatorische Signalfunktionen vermitteln können. Hierfür wurde zunächst eine graphische Darstellung aller bisher bekannten Interaktionspartner der TIMP Familie erstellt und hinsichtlich der Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den TIMPs analysiert. Weiterhin wurde die Interaktion von TIMP-1 mit dem Rezeptor CD74 mittels Ko-Immünpräzipitation und konfokaler Mikroskopie überprüft. Um neue Signalfunktionen von TIMP-1 in Immunzellen zu beschreiben, wurde der Einfluss von TIMP-1 auf die Aktivierung von Monozyten untersucht, indem humane Monozyten mit rekombinantem TIMP-1 stimuliert wurden und deren Fähigkeit zur Zytokinproduktion und zur Glukoseaufnahme getestet wurde. Die klinische Relevanz der neuen Signalfunktion von TIMP-1 wurde überprüft, indem publizierte Transkriptom-Datensätze verschiedener Tumorentitäten herangezogen wurden und die Gewebeexpression von TIMP-1 sowohl mit Monozyten-assoziierten biologischen Prozessen, als auch mit pro-inflammatorischen Zytokinen korreliert wurde. Im Plasma von an pankreatischem duktalem Adenokarzinom (PDAC) erkrankten Patienten wurde weiterhin überprüft, ob TIMP-1 mit dem Zytokin IL-6 und dem Monozyten-spezifischen Aktivierungsmarker sCD163 korreliert, und ob die kombinatorische Verwendung von TIMP-1 und sCD163 eine prognostische Aussage über das Überleben der Patienten erlaubt. Es konnte gezeigt werden, dass TIMP-1 sowohl mit CD74, als auch mit APP und APLP2, zwei Vertretern der *Amyloid Precursor Protein* (APP) Familie, interagiert. Weiterhin wurde herausgefunden, dass TIMP-1 eine pro-inflammatorische Monozyten Aktivierung auslöst, die abhängig von der Interaktion mit dem neu identifizierten Rezeptor APP ist und die C-terminale Domäne von TIMP-1 involviert. *In vivo* korrelierte die Gewebeexpression von TIMP-1 mit zahlreichen Monozyten-assoziierten Prozessen und pro-inflammatorischen Zytokinen. Weiterhin zeigten sich positive Korrelationen der TIMP-1 Plasmaspiegel mit dem Zytokin IL-6 und dem löslichen Monozyten-spezifischen Aktivierungsmarker sCD613. Die Kombination der Spiegel von TIMP-1 und sCD163 wurde dabei als wertvoller prognostischer Marker für die Einschätzung der Überlebenschancen von Pankreaskarzinom-Patienten identifiziert. Die hier gewonnenen Ergebnisse konnten die Kenntnis über das Interaktom und die Multifunktionalität von TIMP-1 erweitern und dadurch ein besseres molekulares Verständnis der krankheitsfördernden Eigenschaften von TIMP-1 schaffen.

ABSTRACT

TIMP-1 is a multifunctional protein, which is highly expressed in a variety of inflammation-associated diseases and correlates with a poor clinical outcome for patients. So far, the underlying molecular mechanisms explaining this association are not fully understood. The multifunctionality of TIMP-1 is considerably determined by interactions with different molecules facilitating anti-proteolytic as well as cytokinic signaling functions of TIMP-1. In this study, novel interaction partners of TIMP-1 mediating new cytokinic immunomodulatory signaling functions of TIMP-1 were identified. For this, a graphical depiction of all interaction partners of the TIMP family was created to evaluate similarities and differences between the TIMPs. In addition, the interaction of TIMP-1 with the receptor CD74 was analyzed by co-immunoprecipitation as well as confocal microscopy. To identify novel signaling functions of TIMP-1 in immune cells, the impact of TIMP-1 on monocyte activation was investigated by stimulation of human monocytes with recombinant TIMP-1 and the subsequent analysis of their ability to produce cytokines and to take up glucose. Clinical relevance of this novel signaling activity of TIMP-1 was investigated by analyzing published transcriptome data sets of different tumor entities and by correlating tissue expression levels of TIMP-1 with monocyte-associated biological processes as well as with pro-inflammatory cytokines. In plasma samples of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) patients, it was evaluated, whether TIMP-1 correlates with the cytokine IL-6 as well as with the monocyte-specific activation marker sCD163, and, whether combination of TIMP-1 and sCD163 allows a prognostic estimation of the overall survival of PDAC patients. This study shows, that TIMP-1 interacts with CD74, as well as with APP and APLP2, two members of the amyloid precursor protein (APP) family. In addition, it was shown that TIMP-1 induces pro-inflammatory activation of human monocytes, which is dependent on interaction with the newly identified receptor APP and involves the C-terminal domain of TIMP-1. *In vivo*, tissue expression of TIMP-1 correlated with a variety of monocyte-associated processes as well as with pro-inflammatory cytokines. Furthermore, a positive correlation between plasma levels of TIMP-1 and sCD163 was demonstrated. Combined use of TIMP-1 and sCD163 turned out as a promising biomarker predicting survival of PDAC patients. These data could expand the knowledge about the interactome and multifunctionality of TIMP-1 and improved the understanding of the molecular basis of disease-promoting features of TIMP-1.

1. EINLEITUNG

1.1. *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)*

Das Protein *Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1)* repräsentiert einen Vertreter der sogenannten TIMP Familie, die insgesamt aus den Molekülen TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, und TIMP-4 besteht (Brew und Nagase, 2010). TIMPs sind sezernierte Proteine, die ursprünglich als natürliche Inhibitoren von Metalloproteinasen (MPs) beschrieben wurden (Lambert et al., 2004). Der historisch am frühesten entdeckte Vertreter der Familie wurde zunächst als Kollagenase-Inhibitor sowohl aus Überständen humaner Hautfibroblasten (Welgus et al., 1979), als auch aus humanem Fruchtwasser (Murphy et al., 1981) isoliert später TIMP-1 benannt (Murphy et al., 1981). In den folgenden Jahren wurde aufgedeckt, dass TIMP-1 zahlreiche weitere MPs inhibieren und somit auf die Gewebemöostase einwirken kann (Arpino et al., 2015). Später stellte sich heraus, dass das im Jahre 1985 aus Zellkultur-Überständen isolierte Molekül *erythroid-potentiating activity (EPA)* identisch zum MP-Inhibitor TIMP-1 ist und eine MP-unabhängige, pro-proliferative Funktion besitzt (Docherty et al., 1985). Diese Erkenntnis deutete schon sehr früh darauf hin, dass TIMP-1 nicht nur die namensgebende Funktion als MP-Inhibitor, sondern auch MP-unabhängige zytokinische Funktionen ausübt. Zahlreiche folgende Studien zeigten dann immer deutlicher, dass TIMP-1 diverse Signalwirkungen in verschiedenen Zelltypen induzieren kann, weshalb TIMP-1 auch als multifunktionales Protein bezeichnet wird (Grünwald et al., 2019). Die detaillierte Beschreibung und Charakterisierung der Multifunktionalität von TIMP-1 stellt einen bedeutenden Aspekt aktueller Forschungen dar, die auf die Aufklärung der Rolle von TIMP-1 in der Entstehung und Progression verschiedener Erkrankungen, sowie auf die Etablierung von TIMP-1 als neuer prognostischer und prädiktiver Biomarker abzielen.

1.1.1. **Klinische Bedeutung von TIMP-1**

Das Streben nach einer detaillierten Aufklärung der molekularen Biologie von TIMP-1 ist vor allem durch zahlreiche klinische Beobachtungen bedingt, die TIMP-1 als einen Faktor identifizieren, der in diversen Erkrankungen sowohl durch eine stark erhöhte Expression hervorsteht (Lorente et al., 2009; Prokopchuk et al., 2018; Eckfeld et al., 2019), als auch meist mit einer schlechten Prognose für das Überleben von Patienten assoziiert ist (Hoffmann et al., 2006; Eckfeld et al., 2019; Hermann et al., 2021; Schoeps, et al., 2021a). Dieser Trend ist vor allem bei entzündungs-assoziierten Erkrankungen, wie unter anderem bei der Pankreatitis (Nukarinen et al., 2016; Prokopchuk et al., 2018), der Sepsis (Hoffmann et al., 2006), *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)* (Herr et al., 2021), chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (Kapsoritakis et al., 2008), und nahezu allen malignen Tumorerkrankungen (Eckfeld et al., 2019) zu beobachten. Besonders im Kontext des duktales Adenokarzinoms des Pankreas

(*pancreatic ductal adenocarcinoma*, PDAC), der häufigsten neoplastischen Erkrankung der Bauchspeicheldrüse (Kleeff et al., 2016), scheint TIMP-1 eine krankheitsfördernde Rolle zu spielen (Grünwald et al., 2016; Hermann et al., 2021; Schoeps et al., 2021a). PDAC gilt als eine überaus aggressive Tumorerkrankung (Ushio et al., 2021), die, im Vergleich zu anderen Krebsarten, nur eine sehr geringe 5-Jahre-Überlebensrate von ungefähr 11 % aufweist und meist innerhalb des ersten Jahres nach der Diagnose zum Tod führt (Siegel et al., 2022). Dies ist hauptsächlich auf eine sehr späte Diagnose der Erkrankung und einer frühen Bildung von Metastasen zurückzuführen (Ma und Jemal, 2013). Bei der PDAC Progression steigen typischerweise die systemischen Spiegel von TIMP-1 stark an (Mroczko et al., 2009; Grünwald et al., 2016; Prokopchuk et al., 2018) und korrelieren mit einer schlechten Prognose für die Patienten (Mroczko et al., 2009; Eckfeld et al., 2019; Schoeps et al., 2021a). In vergangenen Studien konnten potentielle zugrundeliegende molekulare Mechanismen, die diese Korrelation erklären könnten, bereits teilweise aufgedeckt werden. Zum Beispiel fördert TIMP-1 schon in frühen Stadien der PDAC-Progression die Metastasierung in die Leber (Grünwald et al., 2016). Weiterhin induziert TIMP-1 die Aktivierung von Neutrophilen Granulozyten zur Bildung von sogenannten *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs) (Schoeps et al., 2021a), die stark mit einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit von PDAC Patienten in der Klinik assoziiert sind (Schoeps et al., 2021a).

Aufgrund dieser klinischen Beobachtungen ist es von großer Bedeutung, die molekularen Wirkungsmechanismen des Proteins TIMP-1 auf zellulärer und molekularer Ebene, unter Berücksichtigung der Molekülstruktur, der Vielfalt an Interaktionspartnern und der Multifunktionalität von TIMP-1, aufzuklären.

1.1.2. Struktur von TIMP-1

TIMP-1 ist ein glykosyliertes, 28 kDa großes Protein (Willenbrock und Murphy, 1994). Durch zwölf im Molekül enthaltene Cystein-Residuen werden sechs Disulfidbrücken ausgebildet, die essentiell für die Ausbildung der Tertiärstruktur des Proteins sind (Williamson et al., 1990). Strukturell kann TIMP-1 in zwei distinkte Domänen unterteilt werden, wobei die N-terminale Domäne, meist unabhängig von der C-terminalen Domäne, durch das enthaltene CTC-Motiv die Inhibition von MPs vermitteln kann (**Abbildung 1**) (Murphy et al., 1991). Die isolierte rekombinante N-terminale Domäne von TIMP-1 (N-TIMP-1) faltet sich stabil, ohne die anti-proteolytische Funktion zu verlieren (Murphy et al., 1991).

1.1.3. Anti-proteolytische Funktion von TIMP-1

Als Breitspektrum-MP-Inhibitor ist TIMP-1 in der Lage, zahlreiche Matrix-MPs (MMPs), *A Disintegrin and Metalloproteinases* (ADAMs), sowie *A Disintegrin and Metalloproteinases* mit Thrombospondin-Motiv (ADAM-TS) zu inhibieren (Murphy, 2011). Diese Funktion wird durch die Bindung der inhibitorischen N-terminalen Domäne an das aktive Zentrum der MP ermöglicht (Murphy, 2011). Das N-terminal-ständige CTC Motiv stellt dabei ein wichtiges Strukturmotiv für die MP-Inhibition dar (Visse und Nagase, 2003; Nagase et al., 2006). MPs selbst sind sezernierte oder membranständige Proteine, die fast alle Moleküle der extrazellulären Matrix (EZM) spalten können und dadurch eine tragende Rolle beim Umbau der EZM, sowie zellulären Interaktionen mit der EZM spielen (Murphy und Nagase, 2008). Hierdurch können MPs sowohl auf diverse physiologische Prozesse (z.B. die Gewebeentstehung oder den Umbau eines Gewebes (Löffek et al., 2011)), als auch auf patho-physiologische Prozesse (z.B. die Tumorzell-Invasion (Stamenkovic, 2000) oder die Metastasierung (Liotta et al., 1980; Stamenkovic, 2000)) Einfluss nehmen (**Abbildung 1**). Da TIMP-1 auch membranständige ADAMs inhibieren kann, besteht für TIMP-1 zusätzlich die Möglichkeit, ADAM-vermittelte Prozesse, wie das sogenannte *Ectodomain Shedding*, zu beeinflussen (Miller et al., 2017). *Ectodomain Shedding* bezeichnet die Spaltung von Transmembranproteinen auf der Zelloberfläche (Weber und Saftig, 2012). Typischerweise können durch ADAMs Zytokine oder Wachstumsfaktoren prozessiert und dadurch verschiedene biologische Prozesse moduliert werden (Reiss und Saftig, 2009; Weber und Saftig, 2012). ADAM-10 kann zum Beispiel die Moleküle *T cell immunoglobulin and mucin domain 3* (Tim3) (Möller-Hackbarth et al., 2013), CXCL-16 (Abel et al., 2004), CX3C *chemokine fractalkine* (CX3CL1) (Hundhausen et al., 2003), sowie den IL-6 Rezeptor (IL-6R) (Matthews et al., 2003), das *low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) (Liu et al., 2009), und den Tyrosinkinase Rezeptor Met (Schelter et al., 2010) prozessieren. In Neuronen stellt ADAM-10 die konstitutive Sheddase des *Amyloid Precursor Proteins* (APP) dar (Kuhn et al., 2010).

APP repräsentiert einen der drei Mitglieder der sogenannten APP Familie, welche aus APP, *Amyloid Precursor-like Protein-1* (APLP-1), und -2 (APLP2) besteht (Zheng und Koo, 2011). Funktionell sind APPs gut hinsichtlich ihrer Rolle in neuronalen Prozessen untersucht (Laßek et al., 2013). Im Kontext der Alzheimer Erkrankung werden zum Beispiel durch das ADAM-10- und ADAM-17-vermittelte *Shedding* von APP amyloidogene A β -Peptide freigesetzt, die zu Amyloid-Plaques akkumulieren können (Zhang et al., 2012). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der ADAM-10 Inhibitor TIMP-1 die Prozessierung von APP herabsetzen kann (Pasciuto et al., 2015). APP wird aufgrund des strukturellen Aufbaus des Moleküls jedoch weiterhin als Oberflächenrezeptor diskutiert, der die Aktivierung intrazellulärer Signalwege vermitteln kann (Müller et al., 2017). Zytokinische Liganden für diesen Rezeptor waren bisher allerdings noch nicht bekannt.

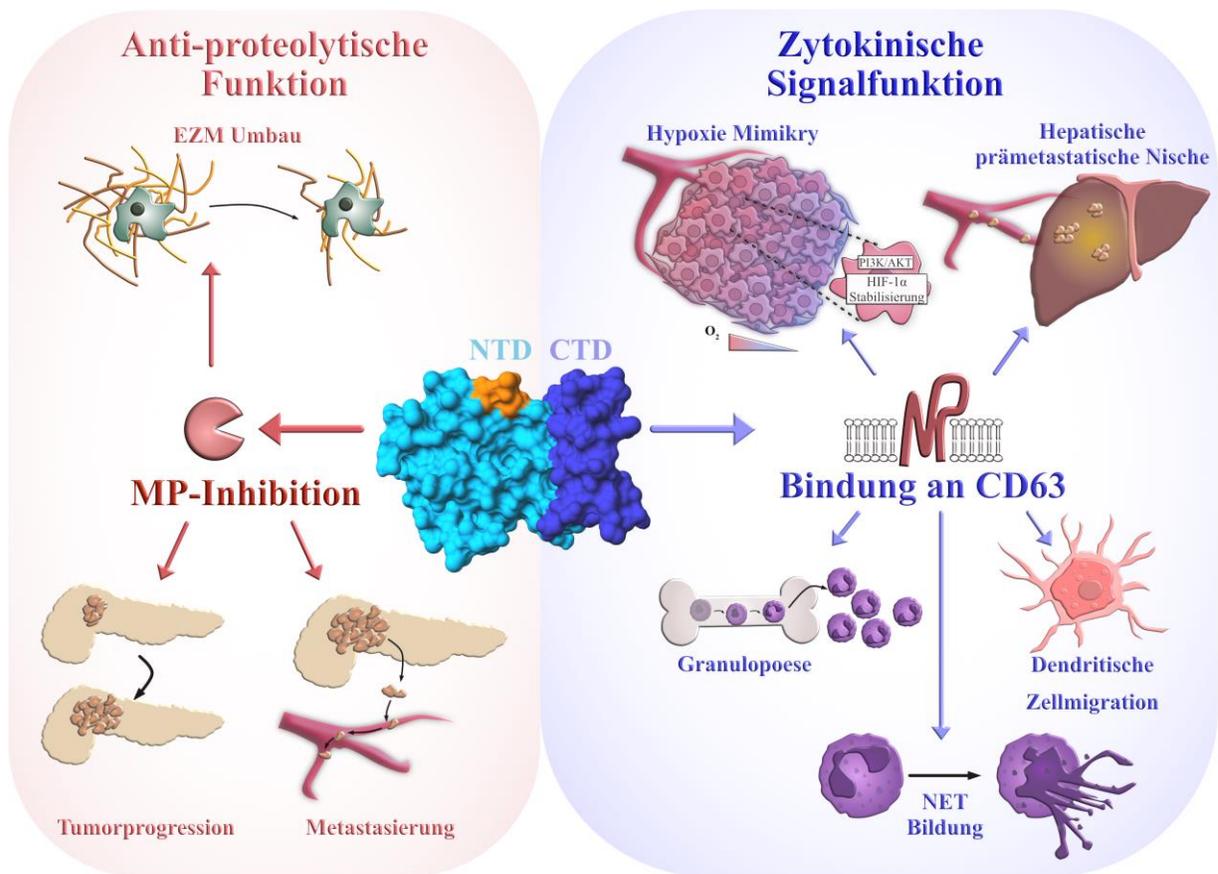


Abbildung 1 Die Multifunktionalität von TIMP-1. Die anti-proteolytische Funktion von TIMP-1 wird über das in der N-terminalen Domäne (hellblau) enthaltene CTC-Motiv (orange) vermittelt. Durch die Inhibition von MPs kann TIMP-1 zum Beispiel den Umbau der EZM, die Tumorprogression, sowie die Metastasierung beeinflussen. Über die C-terminale Domäne (dunkelblau) kann TIMP-1 an das Tetraspanin CD63 binden und damit unter anderem ein Hypoxie-Mimikry in Tumorzellen auslösen, die Bildung einer prämetastatischen Nische in der Leber fördern, die Bildung von NETs induzieren, die Granulopoese fördern, und die Migration von dendritischen Zellen induzieren. **Abkürzungen:** CTD C-terminale Domäne, EZM Extrazelluläre Matrix, NETs Neutrophil Extracellular Traps, NTD N-terminale Domäne

1.1.4. Zytokinische Signalfunktion von TIMP-1

Die bereits im Jahre 1985 entdeckte Funktion von TIMP-1, erythroide Vorläuferzellen stimulieren zu können (Docherty et al., 1985), deutete schon früh auf die Multifunktionalität von TIMP-1 hin. Weiterhin suggerierten viele Studien, dass TIMP-1, unabhängig von der anti-proteolytischen Funktion, zahlreiche biologische Prozesse wie zum Beispiel das Wachstum von Zellen (Hayakawa et al., 1992), oder den programmierten Zelltod (Liu et al., 2003) beeinflussen kann. Allerdings wurde einer möglichen zytokinischen Funktion von TIMP-1 lange Zeit wenig Aufmerksamkeit geschenkt, weshalb TIMP-1 meist fast ausschließlich als MP-Inhibitor bezeichnet wurde. Im Jahre 2006 konnte dann das Tetraspanin CD63 als Oberflächenrezeptor von TIMP-1 identifiziert werden, der die TIMP-1-induzierte Aktivierung einer Signalwegkaskade vermittelt, die das Integrin $\beta 1$ und die *Focal Adhesion Kinase* (FAK) involviert (Jung et al., 2006). Später wurde herausgefunden, dass TIMP-1 durch die Interaktion mit CD63 diverse weitere zytokinische Effekte induzieren kann (Egea et al., 2012; Jung, 2014; Kobuch et al., 2015; Takawale et al., 2017; Tang et al., 2020; Schoeps et al., 2021a) (**Abbildung 1**). Hierzu zählen unter anderem die TIMP-1/CD63-vermittelte Ausbildung einer prämetastatischen Nische in der Leber (Grünwald et al., 2016), die TIMP-1/CD63-vermittelte, Hypoxie-nachahmende Funktion von TIMP-1 in Tumorzellen (Schelter et al., 2011; Cui et al., 2015), und einige modulierende Effekte von TIMP-1 auf Zellen des Immunsystems (**Abbildung 1**) (Ólafsson et al., 2019; Schoeps et al., 2021a; Schoeps et al., 2021b).

1.1.4.1. Die Signalfunktion von TIMP-1 vermittelt die Bildung einer prämetastatischen Nische in der Leber

Eine gut beschriebene zytokinische Signalfunktion von TIMP-1 stellt die Bildung einer hepatischen prämetastatischen Nische schon in frühen Stadien der PDAC-Progression dar, die die Ansiedlung metastasierender Tumorzellen in der Leber begünstigt (Grünwald et al., 2016) (**Abbildung 1**). Auf molekularer Ebene bewirkt TIMP-1 diesen Effekt über eine CD63/PI3K-vermittelte Aktivierung von hepatischen Sternzellen (HSCs) (Grünwald et al., 2016). TIMP-1 induziert weiterhin über diese Signalfunktion die Sekretion des *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1), der die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten in die Leber fördert (Grünwald et al., 2016). Sowohl die TIMP-1-induzierte Aktivierung von HSCs, als auch die Rekrutierung von Neutrophilen bewirken eine Umstrukturierung der Leber als metastatisches Zielorgan und begünstigt die Ansiedlung von Tumorzellen in der Leber (Seubert et al., 2015; Grünwald et al., 2016). Kürzlich konnten wir zeigen, dass TIMP-1 die prämetastatische Nische in der Leber geschlechtsspezifisch induziert wird (Hermann et al., 2021). Neben TIMP-1 ist ebenfalls das Zytokin *macrophage migration inhibitory factor* (MIF) als ein weiterer Nischenfaktor identifiziert worden, der stark in von Pankreastumorzellen stammenden Exosomen angereichert ist und ebenfalls die Bildung einer prämetastatischen Nische in der Leber fördert (Costa-

Silva et al., 2015). MIF stellte den einzigen bisher bekannten Liganden des Rezeptors *invariant chain* (CD74) dar (Leng et al., 2003). CD74 ist ein glykosyliertes, multifunktionales Typ-II-Transmembranprotein, das in Homo-Trimere assemblieren kann (Roche et al., 1991; Schröder, 2016) und besonders von Immunzellen wie zum Beispiel dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen exprimiert wird (Beswick und Reyes, 2009; Schröder, 2016). Die Bindung von MIF an CD74 kann die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signalmoleküle, wie zum Beispiel die Kinasen *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-1/2 (Leng et al., 2003), *AMP-activated protein kinase* (AMPK) (Heinrichs et al., 2011), oder *zeta-chain associated kinase-70* (ZAP-70) (Klasen et al., 2014) induzieren. Ob TIMP-1 als weiterer bekannter Nischenfaktor ebenfalls an den Rezeptor CD74 binden kann, war bisher zwar in einem im Jahre 2015 publizierten *Abstract* postuliert, wurde jedoch bisher nicht experimentell bewiesen. Da CD74 vorwiegend von Immunzellen exprimiert wird (Beswick und Reyes, 2009; Schröder, 2016), könnte ein Nachweis der Interaktion von TIMP-1 mit CD74 einen neuen Ansatzpunkt für die mechanistische Aufklärung von immunmodulatorischen Signalwirkungen von TIMP-1 bieten.

1.1.4.2. Die Signalwirkung von TIMP-1 vermittelt ein Hypoxie-Mimikry in Tumorzellen

Im Kontext von Tumorerkrankungen wurde weiterhin eine Hypoxie-nachahmende Signalwirkung von TIMP-1 entdeckt und charakterisiert (Schelter et al., 2011; Cui et al., 2015). Hypoxie ist einer der häufigsten Stress-Faktoren während der Entstehung solider Tumore und bezeichnet den Zustand einer Sauerstoff-Unterversorgung des Gewebes unter ein Niveau, das für die Aufrechterhaltung einer normalen Zellfunktion nötig ist (Höckel und Vaupel, 2001; Chen et al., 2020). Sowohl Tumor- als auch Wirtszellen müssen sich an diese kritischen Bedingungen adaptieren, um überleben und proliferieren zu können (Harris, 2002). Einer der bekanntesten Vermittler der Adaption von Zellen an Hypoxie ist das Protein *hypoxia-inducible factor 1 α* (HIF-1 α) (Ziello et al., 2007). HIF-1 α wird unter normoxischen Bedingungen durch das Enzym Prolyl Hydroxylase (PHD) hydroxyliert, ubiquitinyliert und anschließend proteasomal abgebaut wird (Yee Koh et al., 2008). Unter hypoxischen Bedingungen dagegen ist die PHD inaktiv, HIF-1 α wird dadurch stabilisiert und kann als aktiver Transkriptionsfaktor in den Zellkern translozieren (Yee Koh et al., 2008). Dort aktiviert dieser die Expression einer Reihe von HIF-1-responsiven Genen, die die Adaption von Zellen an Hypoxie ermöglichen (Semenza, 2002). Ein Beispiel hierfür ist die Expression von Molekülen, die eine metabolische Reprogrammierung des Stoffwechsels einer Tumorzelle von einer aeroben oxidativen zu einer anaeroben glykolytischen Energiegewinnung vermitteln (Semenza, 2009). Es zeigte sich, dass TIMP-1 in der Lage ist, in Tumorzellen die zelluläre Antwort auf Hypoxie nachzuahmen, indem TIMP-1 HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen über die Aktivierung des PI3K/AKT-Signalwegs CD63-abhängig

induzieren kann (Schelter et al., 2011; Cui et al., 2015) (**Abbildung 1**). Ob TIMP-1 eine solche Stressantwort auch in Immunzellen induziert, war bisher nicht bekannt.

1.1.5. Die Signalwirkung von TIMP-1 wirkt immunmodulatorisch

Da TIMP-1 vor allem in entzündungs-assoziierten Erkrankungen eine relevante Rolle zu spielen scheint (Lorente et al., 2009; Prokopchuk et al., 2018; Herr et al., 2021), gewann die Erforschung der zugrundeliegenden molekularen Grundlagen einer zytokinischen Signalwirkung von TIMP-1 auf Immunzellen zunehmend an Bedeutung. Einige immunmodulatorische Funktionen von TIMP-1 konnten bereits aufgedeckt werden. Im Zuge der Aufklärung der Metastasen-fördernden Wirkung von TIMP-1 im Kontext der PDAC Erkrankung konnte nicht nur gezeigt werden, dass TIMP-1 über eine CD63-abhängige Signalaktivität die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten in die Leber induzieren kann (**Abbildung 1**) (Seubert et al., 2015; Grünwald et al., 2016), sondern auch, dass TIMP-1 die Bildung myeloider Vorläuferzellen im Knochenmark (Granulopoese) CD63-abhängig fördern kann (**Abbildung 1**) (Kobuch et al., 2015). Eine weitere Signalwirkung von TIMP-1 auf Neutrophile Granulozyten konnten wir kürzlich aufdecken, indem wir zeigen konnten, dass TIMP-1 durch die CD63-abhängige Aktivierung des Signalmoleküls ERK die Bildung von NETs induziert (**Abbildung 1**) (Schoeps et al., 2021a). Die NET-induzierende Wirkung von TIMP-1 konnten wir dabei sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* in biologischem Material von PDAC-Tumorpatienten und genetisch manipulierten Mäusen nachweisen (Schoeps et al., 2021a). Neben den zahlreichen zytokinischen Effekten von TIMP-1 auf Neutrophile Granulozyten ist zudem bekannt, dass TIMP-1 primäre dendritische Zellen beeinflussen kann, indem TIMP-1 die Aktivierung des CD63/ β 1-Integrin CD29 (ITGB1)-FAK Signalwegs induziert und damit die Migration von dendritischen Zellen fördert (**Abbildung 1**) (Ólafsson et al., 2019). Ob TIMP-1 ebenfalls eine zytokinische Signalfunktion in Monozyten induziert, wurde bisher noch nicht untersucht. Da Monozyten, wie TIMP-1, eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression entzündungs-assoziiierter Erkrankungen spielen (Haveman, 1999; Jafarzadeh et al., 2020; Kiss et al., 2020), stellt die Untersuchung der Wirkung von TIMP-1 auf Monozyten einen wichtigen Aspekt aktueller Forschungen dar.

1.2. Monozyten - Potentielle Zielzellen der immunmodulatorischen Signalwirkung von TIMP-1

1.2.1. Entwicklung und Funktionen von Monozyten

Monozyten sind mononukleäre, myeloide Immunzellen des angeborenen (innaten) Immunsystems (Chiu und Bharat, 2016). Das innate Immunsystem umfasst als zelluläre Bestandteile Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Mastzellen, Neutrophile Granulozyten, Eosinophile, und NK-Zellen (Turvey und Broide, 2010; Chiu und Bharat, 2016) und ermöglicht den Schutz eines Organismus vor Bakterien, Viren, und Parasiten (Janeway und Medzhitov, 2002). Monozyten werden kontinuierlich im Knochenmark produziert und in das Blutsystem freigesetzt, um dort als Zellen des peripheren Blutes zu zirkulieren und durch chemotaktische Faktoren in verschiedene Gewebe rekrutiert zu werden (Jakubzick et al., 2017). Im Blut nehmen Monozyten einen Anteil von etwa 5-12 % der gesamten Leukozytenpopulation ein (Karlmark et al., 2012) und besitzen eine Größe von 7-8 μm (Jakubzick et al., 2017). Generell kann zwischen den an Blutgefäßen patrouillierenden Monozyten, die eine Endothelzellschützende Funktion besitzen, und Monozyten, welche durch das Endothel dringen und damit in das Gewebe eintreten können, unterschieden werden (Auffray et al., 2007; Jakubzick et al., 2013). Im Gewebe können Monozyten durch Faktoren wie den Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor (GM-CSF) oder den Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF) zu Makrophagen differenzieren (Hamilton, 2008), und dann sehr vielseitige Funktionen wie die Antigen-Präsentation, die Phagozytose oder die Produktion von Zytokinen, ausüben (Hamilton, 2008; Orekhov et al., 2019). Als antigenpräsentierende Zellen können auch Monozyten fremde Strukturen auf deren Oberfläche an Zellen des adaptiven Immunsystems präsentieren und damit das adaptive Immunsystem aktivieren (Jakubzick et al., 2017). Als professionelle phagozytisch aktive Zellen sind Monozyten und Makrophagen in der Lage, durch Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs) verschiedene Gefahrensignale zu erkennen und daraufhin ein Pathogen zu phagozytieren (Uribe-Querol und Rosales, 2020). Als Produzenten von Zytokinen und Chemokinen können Monozyten zudem Entzündungsreaktionen fördern oder eindämmen (Chiu und Bharat, 2016).

1.2.2. Die Rolle von Monozyten bei entzündungs-assoziierten Erkrankungen

Neben der Rolle von Monozyten bei zellulären Abwehrreaktionen, sind Monozyten auch substantiell an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt (Karlmark et al., 2012). Vor allem in entzündungs-assoziierten Krankheiten wie der Leber-Fibrose (Heymann et al., 2009), der Arteriosklerose (Woollard und Geissmann, 2010), der Multiplen Sklerose (Reder et al., 1998), der akuten Pankreatitis (Shrivastava und Bhatia, 2010) und vielen Tumorerkrankungen (Olingy et al., 2019) scheinen Monozyten eine tragende Rolle zu spielen. Dabei werden sowohl Krankheits-fördernde, als auch Krankheits-dämpfende

Funktionen diskutiert (Karlmark et al., 2012). Im Kontext von Tumorerkrankungen beeinflussen Monozyten nahezu alle Schritte von der Tumorentstehung bis hin zur Metastasierung (Olingy et al., 2019). Der prozentuale Anteil an Monozyten im peripheren Blut steigt typischerweise in Krebspatienten an und korreliert mit einer schlechteren Prognose für die Patienten (Hayashi et al., 2017; Feng et al., 2018). Dies kann entweder die Folge einer verstärkten Bildung von Monozyten im Knochenmark, oder der verstärkten Rekrutierung aus dem Knochenmark in die Peripherie sein (Kiss et al., 2020). Die Rekrutierung von Monozyten zum Tumorgewebe erfolgt schon in sehr frühen Phasen der Tumorentstehung (Franklin et al., 2014) und wird vor allem durch das chemoattraktive Molekül CC-Chemokin-Ligand 2 (CCL2), welches auch *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) genannt wird, reguliert (Jin et al., 2021). CCL2 selbst wird dabei vor allem von Tumorzellen überexprimiert (Chun et al., 2015; Eckstein et al., 2020), um Immunzellen zum Tumor zu locken. Monozyten können einerseits zum Beispiel durch die Sekretion des Proteins *Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand* (TRAIL) (Griffith et al., 1999), oder durch Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) (Yeap et al., 2016), zytotoxisch auf Tumorzellen wirken. Andererseits können Monozyten durch eine Veränderung der komplexen Tumor-Mikroumgebung (*tumor microenvironment*, TME) das Tumorwachstum fördern (Olingy et al., 2019). Zum Beispiel können sie die Bildung von neuen Blutgefäßen (Angiogenese) fördern (Rivera und Bergers, 2015), um eine bessere Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Tumors zu gewährleisten. Weiterhin kann durch Monozyten der Umbau des TME, im Speziellen der EZM, gefördert und damit die Migration und Invasion von Tumorzellen beeinflussen werden (Lu et al., 2012; Porrello et al., 2018). Ein wichtiger weiterer Prozess, durch den Monozyten auf die Tumorgenese wirken können, ist eine immun-supprimierende Aktivität zum Beispiel gegenüber antigenpräsentierenden Zellen (Mengos et al., 2019; Trovato et al., 2019; Kiss et al., 2020). Auch die für aktivierte Monozyten typische Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie unter anderem die Expression des Interleukins 6 (IL-6), welches eines der bedeutendsten Zytokine im TME darstellt, kann die Tumorentstehung maßgeblich beeinflussen (Kumari et al., 2016; Masjedi et al., 2018). Generell sind hohe Blutspiegel von Zytokinen wie IL-6, TNF- α , IL-10, *Transforming growth factor beta* (TGF- β) und MIF häufig in Krebspatienten zu finden, korrelieren mit einer schlechten Prognose für die Patienten (Kumari et al., 2016; Lippitz und Harris, 2016) und fördern ein typisches lokales inflammatorisches Milieu im TME (Mantovani et al., 2006; Mantovani et al., 2008).

1.2.3. Aktivierung von Monozyten

Eine pro-inflammatorische Aktivierung von Monozyten kann zum Beispiel durch die Stimulation mit pro-inflammatorischen Liganden (wie z.B. Lipopolysacchariden (LPS)) (Guha und Mackman, 2001), oder auch Hypoxie (Eltzschig und Carmeliet, 2011) induziert werden (**Abbildung 2**). Intrazellulär kann dann eine Aktivierung verschiedener Signalwege, wie unter anderem dem *nuclear factor κ B* (NF κ B) Signalweg (Sharif et al., 2007), den *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalwegen (Guha und Mackman, 2001), sowie dem ERK- (Guha et al., 2001), dem *C-Jun-N-terminale kinase* (JNK)-, oder dem p38-Signalweg (Plevin et al., 2016), stattfinden. Zudem finden sich in aktivierten Monozyten meist erhöhte Level von HIF-1 α (Frede et al., 2006). Eine typische Folge der Aktivierung von Monozyten ist die verstärkte Expression verschiedener inflammatorischer Mediatoren, wie Chemokinen und Zytokinen (Guha und Mackman, 2001; Rossol et al., 2011). Bei der Aktivierung von Monozyten kann zudem die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle wie zum Beispiel CD163, CD16, und CD11b verändert sein und als Marker der Aktivierung dienen (Ivanova und Orekhov, 2016; Kiefer et al., 2021). Teilweise werden Oberflächenmoleküle auch während der Aktivierung der Monozyten an der Zelloberfläche prozessiert und lassen sich dann als lösliche Proteine im Blut finden. Die bekanntesten Monozyten-Aktivierungs-spezifischen löslichen Proteine, welche von Oberflächenmolekülen stammen, sind die löslichen Formen von CD14 (sCD14) (Shive et al., 2015) und CD163 (sCD163) (Gómez-Rial et al., 2020) (**Abbildung 2**). Besonders sCD163 wird in der Klinik auch als Biomarker für eine Monozyten- und Makrophagen-Aktivierung bei verschiedenen Erkrankungen eingesetzt (Ryan, 2017; Silva et al., 2017). Auf molekularer Ebene erfolgt die Freisetzung von sCD163 als Folge einer proteolytischen Spaltung durch die Entzündungs-sensitive Protease ADAM-17 (Etzerodt et al., 2014).

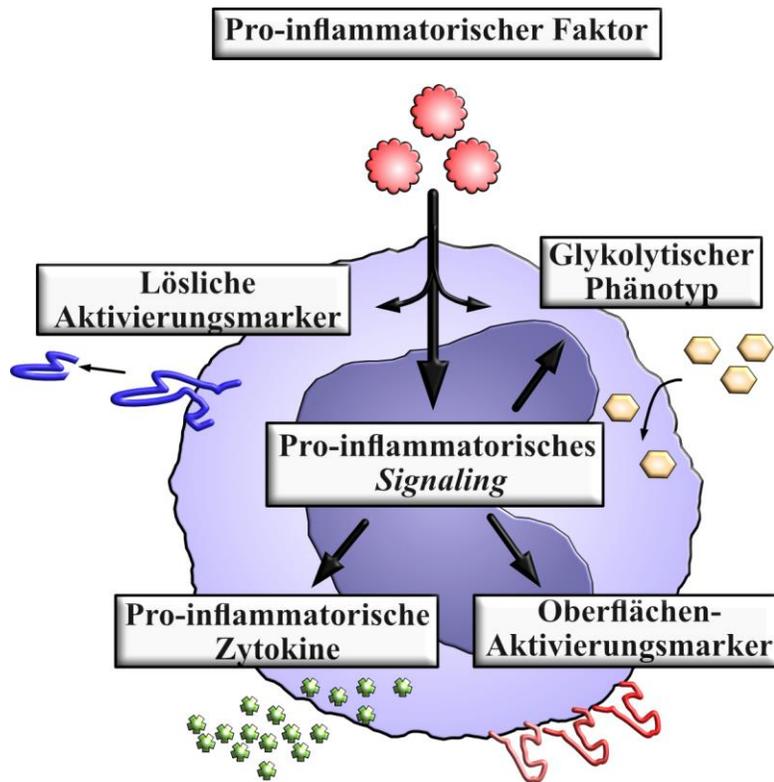


Abbildung 2 Die Aktivierung von Monozyten. Monozyten können durch pro-inflammatorische Faktoren aktiviert werden. Diese Aktivierung drückt sich zum Beispiel durch die Induktion intrazellulärer pro-inflammatorischer Signalwege, der gesteigerten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, der verstärkten Expression von Oberflächen-Aktivierungsmarkern, der Freisetzung löslicher Aktivierungsmarker, sowie einer Umstellung des Metabolismus in Richtung eines glykolytischen Phänotyps aus.

1.2.4. Oberflächenrezeptoren vermitteln die Aktivierung von Monozyten

Eine Aktivierung von Monozyten ist meist abhängig von der Bindung löslicher Faktoren an entsprechende Oberflächenrezeptoren. Hierzu zählen unter anderem TLRs, die pathogene Komponenten erkennen und die Aktivierung von Monozyten vermitteln können (Farina et al., 2004). Beispielsweise bindet das von Gram negativen Bakterien stammende LPS an einen Komplex aus CD14 und TLR4 und fördert dadurch die intrazelluläre Aktivierung von Signalwegen (Arroyo-Espliguero et al., 2004). Fc gamma Rezeptoren (FcγRs), welche die Fc-Regionen von Immunglobulin G (IgG) Antikörpern erkennen können (Hayes et al., 2016), werden ebenfalls stark von Monozyten exprimiert und vermitteln unter anderem die Produktion pro-inflammatorischer Mediatoren (Vogelpoel et al., 2015). Weiterhin exprimieren Monozyten Zytokinrezeptoren, die durch Bindung der entsprechenden Zytokine zur Aktivierung von Monozyten führen. Zu den bekanntesten Zytokinrezeptoren auf Monozyten zählen der Rezeptor für das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 (IL-6R) (Bauer et al., 1989), oder der TNF-α Rezeptor (TNFR) (Gane et al., 2016). Während zu den hier genannten Rezeptoren die entsprechenden löslichen Liganden bekannt sind, werden auch weitere Oberflächenmoleküle als pro-inflammatorische Rezeptoren auf Monozyten diskutiert, deren lösliche Liganden bisher noch nicht identifiziert wurden. Hierzu zählt zum Beispiel das durch ADAM-10-prozessierte Protein APP, das nicht nur von neuronalen Zellen, sondern auch von Zellen des Immunsystems, wie unter anderem Monozyten (Jung et al., 1999), exprimiert wird. Die Wissenschaftler Sondag und Combs konnten in drei Studien zeigen, dass die Adhäsion von Monozyten an Typ I Kollagen, sowie eine Stimulation mit anti-APP Antikörpern, eine pro-inflammatorische Aktivierung von Monozyten vermittelt (Sondag und Combs, 2004; Sondag und Combs, 2006; Sondag und Combs, 2010). Lösliche zytokinische Liganden, welche an APP binden und die Aktivierung von Monozyten vermitteln können, waren bisher noch nicht bekannt.

1.3. LRC-TriCEPS – Eine Methode zur Identifikation von neuen TIMP-1 Interaktionspartnern auf Immunzellen

Um neue Rezeptoren von TIMP-1 auf Immunzellen zu identifizieren, kann ein sogenannter *ligand-based receptor capture* (LRC)-TriCEPS Ansatz durchgeführt werden. Allgemein kann in einem LRC-TriCEPS Experiment ein bliebiger Ligand von Interesse auf Interaktionen mit glykosylierten Proteinen unter nahezu nativen Bedingungen untersucht werden werden (Frei et al., 2012). Hierzu wird ein spezielles Molekül (TriCEPs) verwendet, das insgesamt drei Arme besitzt. An den einen Arm, der eine N-Hydroxysuccinimid Gruppe enthält, wird der zu untersuchende Ligand gekoppelt (**Abbildung 3A**) (Frei et al., 2012). Das Ligand-gekoppelte Molekül wird dann mit lebenden Zellen inkubiert. Die Art der Zelle variiert je nach experimenteller Fragestellung. Der zweite Arm des TriCEPS Molekül kann sich durch ein geschütztes Hydrazin mit den Aldehyden in den Glykosylierungsstrukturen von oxidierten glykosylierten Proteinen vernetzen, die vom TriCEPs-gekoppelten Liganden gebunden wurden (**Abbildung 3A**) (Frei et al., 2012). Mit Hilfe des dritten Arms, der eine Biotingruppe enthält, kann anschließend eine Affinitätsreinigung und eine Visualisierung der gebundenen Glykopeptide mittels einer LC-MS/MS-Analyse erfolgen (**Abbildung 3A, B**) (Frei et al., 2012). Die Analyse erfolgt jeweils relativ zu Vergleichsliganden, deren Bindungsverhalten an humane Zellen bekannt ist. Zu beachten ist, dass in dieser Methode nicht nur direkte Interaktionspartner des Liganden identifiziert werden, sondern auch indirekt gebundene Proteine als Interaktionspartner erscheinen können, die Teil eines größeren Komplexes sind.

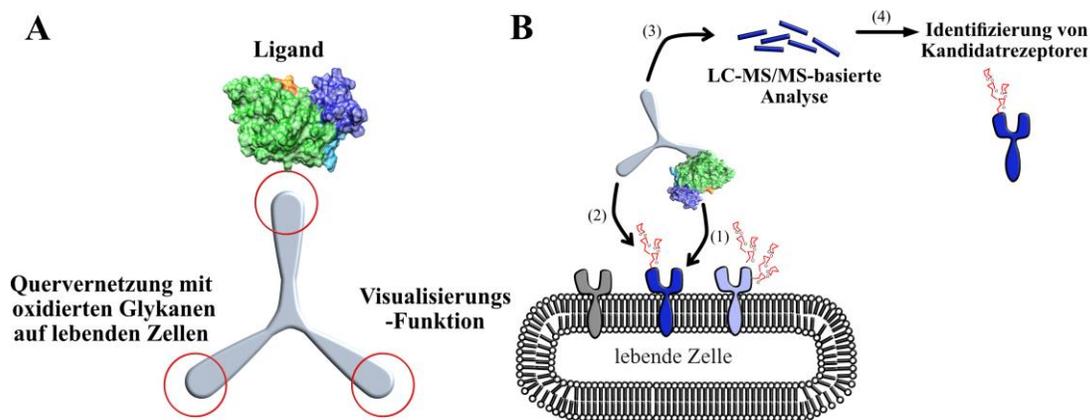


Abbildung 3 Das Prinzip eines LRC-TriCEPs Experiments. (A) Schematische Darstellung des TriCEPs-Moleküls. Ein Arm des TriCEPs Moleküls wird für die Kopplung des Liganden verwendet, der zweite Arm des Moleküls bindet an Ligand-gebundene Interaktionspartner. Der dritte Arm wird zur späteren Visualisierung mittels LC-MS/MS verwendet. (B) Schematische Darstellung des Ablaufs eines TriCEPs-Ansatzes. Der TriCEPs-Ligand-Komplex wird mit lebenden Zellen inkubiert, wobei der Ligand an seine Interaktionspartner binden kann (1). Der zweite Arm des TriCEPs-Moleküls kann an Ligand-gebundene Interaktionspartner koppeln (2), mit Hilfe des dritten Arms entfernt (3) und mittels LC-MS/MS analysiert werden (4).

EINLEITUNG

Die mittels LRC-TriCEPS identifizierten Kandidat-Interaktionspartner können dann weiterhin mittels biochemischer Verfahren, wie zum Beispiel einer Ko-Immunpräzipitation (Lin und Lai, 2017), einem *Pull Down Assay* (Louche et al., 2017), einem *Dot Blot Assay* (Heinicke et al., 1992), oder der konfokalen Mikroskopie (French et al., 2008) validiert werden.

ZIEL DIESER ARBEIT

Ziel dieser Arbeit war es, neue immunmodulatorische Signalfunktionen von TIMP-1 in Immunzellen zu beschreiben. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei auf der Identifikation neuer Interaktionspartner von TIMP-1 liegen, die als funktionelle Oberflächenrezeptoren fungieren und eine zytokinische Signalwirkung von TIMP-1 vermitteln können. Hierzu sollte zunächst mit Hilfe einer umfangreichen Literaturrecherche ein Überblick über die Gesamtheit aller bekannten Interaktionen aller Mitglieder der TIMP Familie gewonnen werden, um diese graphisch darzustellen. Weiterhin sollte die Interaktion von TIMP-1 mit dem Immunzell-assoziierten Rezeptor CD74 erstmals experimentell nachgewiesen werden, um einen Ansatzpunkt für weitere mechanistische Studien zur Untersuchung immunmodulatorischer Signalfunktionen von TIMP-1 zu schaffen. Zudem sollten neue Rezeptoren von TIMP-1 auf Immunzellen mittels einer unvoreingenommenen LRC-TriCEPS Analyse identifiziert und biochemisch validiert werden. Um neue Signalfunktionen von TIMP-1 aufzudecken, die über die neu identifizierten Rezeptoren vermittelt werden können, sollte zudem überprüft werden, ob TIMP-1 eine Hypoxie-ähnliche Stressantwort in Monozyten auslöst, da eine solche Signalfunktion von TIMP-1 bereits in Tumorzellen beschrieben wurde. Hierbei sollte unter anderem die Wirkung von TIMP-1 auf die Aktivierung von Monozyten durch die Messung intrazellulärer Zytokinpiegel, sowie durch die Messung der Glukoseaufnahme, getestet werden. Die Relevanz der identifizierten Rezeptoren für diese Signalfunktionen sollte dann durch Antikörper-basierte Interferenzversuche und durch die genetische Manipulation einer monozytären Zelllinie überprüft werden. Um zudem eine patho-physiologische Relevanz der TIMP-1-induzierten pro-inflammatorischen Monozyten-Aktivierung zu demonstrieren, sollten die *in vitro* entdeckten pro-inflammatorischen Funktionen von TIMP-1 *in vivo* überprüft werden, indem Evidenzen für eine Assoziation von TIMP-1 mit pro-inflammatorischen Faktoren in Patientengewebe gewonnen werden sollten. Hierbei sollte zunächst ebenfalls mit Hilfe einer Literaturrecherche der aktuelle Stand der Forschung bezüglich der bekannten klinischen Assoziationen jedes TIMPs im Kontext von Tumorerkrankungen ermittelt werden. Daraufhin sollte die Gewebeexpression von TIMP-1 mit Monozyten-Aktivierungs-assoziierten biologischen Prozessen und mit pro-inflammatorischen Zytokinen in zahlreichen Tumorentitäten korreliert werden, um eine pro-inflammatorische Wirkung von TIMP-1 *in vivo* zu demonstrieren. Fokussierend auf die Erkrankung des PDAC sollte weiterhin eine Korrelation der Plasmaspiegel von TIMP-1 mit den Plasmaspiegeln des löslichen Monozyten-Aktivierungsmarkers sCD163 und des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 getestet werden. Insgesamt sollten die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zu einem besseren Verständnis der Multifunktionalität von TIMP-1 beitragen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

In **Tabelle 1** sind die in dieser verwendeten Arbeit verwendeten Chemikalien aufgelistet.

Tabelle 1 Übersicht über die verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Firmensitz, Land
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Absolve	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland
Agarose	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Brefeldin A	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Chloroform	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
DMSO	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 % (EtOH 70 %)	Apotheke 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
Incidin perfekt	Ecolab, Wien, Österreich
Inhibitorcocktail Plus (Proteaseinhibitor, 100x)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Lipofectamine 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland
Nukleasefreies Wasser	Qiagen, Hilden, Deutschland
Page Ruler Proteinleiter	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PeqGreen DNA und RNA Farbstoff	Peqlab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Pferdeserum (Gibco Horse Serum)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphatase Inhibitor Cocktail Set V, 50x	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Pierce™ ECL Substrat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

MATERIAL UND METHODEN

Chemikalie	Hersteller, Firmensitz, Land
Polybren (Hexadimetribromid)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
PolymorphPrep	Progen, Heidelberg, Deutschland
Ponceau S-Lösung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Puromycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Roti®-Mount FluorCare (Eindeckmedium)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
RT Puffer (10x)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
RT Random Primers (10x)	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SYBR green	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
SYPRO Ruby Protein-Blot Färbemittel	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 Blue Solution (0,4 %)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Tween20	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

In **Tabelle 2** sind die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tabelle 2 Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien

Gegenstand	Hersteller, Firmensitz, Land
Aluminiumfolie	Fora, Radolfzell, Deutschland
Biosphere Filter Tips	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Deckgläser (24 x 50 mm)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Deckgläser rund (12 mm)	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, 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
Nitrozellulosemembran	Amersham Bioscience, Piscataway, USA
Objektträger (Superfrost Plus Adhesion Microscope Slides)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
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 v-bottom	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz
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
Sterican Kanülen (20 G, 27 G)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Ungestopfte Pipettenspitzen	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Verschlussfolie, 96-well Platte	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Zellschaber (Cell Scraper M)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz

2.1.3. Geräte

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

Tabelle 3 Übersicht über die verwendeten Geräte

Gerät	Firma, Stadt, Land	Exakte Bezeichnung
Blotting System	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	Trans-Blot® Turbo Transfer System
Dot Blot-Apparatur	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	BioDot® microfiltration apparatus
Durchflusszytometer	Sony Biotechnology Inc., Weybridge, Vereinigtes Königreich	SA3800 und SP6800 Spectral Analyzers
Elektrophorese Netzgerät	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	Power Pac 300
ELISA Waschgerät	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	MODEL 1575 ImmunoWash
Gel/Membran Dokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	ChemiDoc™ imaging system
Gelkammer mit Zubehör	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland	Mini Sub Cell GT
Hypoxiekammer	Baker, Sanford, USA	InvivoO ₂ Physiological Cell Culture Workstation
Inkubationshaube	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, Deutschland	Inkubationshaube TH15
Konfokalmikroskop	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland	TCS SP8 confocal microscope
Magnetständer	Invitrogen, Waltham, USA	DynaMag™-2 Magnetic Particle Concentrator
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 Cycler	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland	Mastercycler
pH-Meter	WTW GmbH, Weilheim, Deutschland	pH 3110
Real-Time PCR Gerät	Thermo Fisher Scientific Inc., Ulm, Deutschland	StepOnePlus Real-Time PCR System

MATERIAL UND METHODEN

Gerät	Firma, Stadt, Land	Exakte Bezeichnung
Rotationsrad	Labinco BV Laboratory Equipment, Breda, Niederlande	Rotationsschüttler
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	Thermo Electron Corporation, Karlsruhe, Deutschland	Haake DC10
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. Puffer und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen, sowie deren Zusammensetzung ist **Tabelle 4** zu entnehmen.

Tabelle 4 Verwendete Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blocklösung (<i>Western Blot</i>)	5% (w/v) BSA in TBST
Blocklösung A für <i>Pull Down</i> Experimente	500 mM Ethanolamin 500 nM NaCl
Blocklösung B für <i>Pull Down</i> Experimente	100 mM NaCH ₃ COO ⁻ 500 mM NaCl; pH 4,0
<i>Blotting</i> -Puffer	0,3 % (w/v) Tris 1,12 % (w/v) Glycin 10 % (v/v) Methanol
<i>Dot Blot Assay</i> Puffer	1x TBS
Elektrophoresepuffer	25 mM Tris 192 mM Glycine 1 % (w/v) SDS
FACS / MACS Puffer	PBS + 1 % fetal calf serum (FCS) + 2 mM EDTA
Ladepuffer für Proteinproben	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
Lysepuffer 17 für Protein <i>Arrays</i>	1 % Igepal CA-630 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 137 mM NaCl 2 mM EDTA, 200 mM Sodiunorthovanadat 5mM NaF
Nicht-denaturierender Zelllysepuffer	20 mM Tris HCl pH 8,0 137 mM NaCl 1 % Triton X-100 2 mM EDTA
PBS-T	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)
RNA-Auftragungspuffer	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

2.1.5. Primer

In **Tabelle 5** sind die verwendeten Primer und deren Sequenzen zu finden.

Tabelle 5 Übersicht über die verwendeten Primer

Zielgen	Primer-Name	Primer-Sequenz
18S rRNA	18S_Fwd	CCATCCAATCGGTAGTAGCG
18S rRNA	18S_Rev	GTAACCCGTTGAACCCATT
CD74	CD74_Fwd	GGTGTGACCAAGCAGGATC
CD74	CD74_Rev	TGGCAGGATGTTGAAGACC
APP	APP_Fwd	GCCCGAGATCCTGTAAACT
APP	APP_Rev	ACCTGCCTAAAGCCGACAG
TIMP-1	TIMP-1_Fwd	TGCGGATACTTCCACAGGTC
TIMP-1	TIMP-1_Rev	ATGGATAAACAGGGAAACTGTGC

2.1.6. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind **Tabelle 6** zu entnehmen.

Tabelle 6 Übersicht über die verwendeten Plasmide

Plasmid	Verwendung	Bezugsquelle
pLKO.1/shAPP #1 (TRCN0000011042)	Transferplasmid, APP <i>knockdown</i>	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pLKO.1/shAPP #2 (TRCN0000011043)	Transferplasmid, APP <i>knockdown</i>	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pLKO.1/shNT	Transferplasmid, <i>non- targeting</i> Kontrolle	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
pMD.G	Verpackungsplasmid, das für env aus VSVG kodiert	Klinikum rechts der Isar, München
pMD.GP	Verpackungsplasmid, das für gag und pol kodiert	Klinikum rechts der Isar, München
pRSV-rev	Verpackungsplasmid, das für rev kodiert	Klinikum rechts der Isar, München

2.1.7. Antikörper

In **Tabelle 7** sind die in verwendeten Primärantikörper, in **Tabelle 8** die verwendeten Sekundärantikörper aufgeführt.

Tabelle 7 Übersicht über die verwendeten Primärantikörper

Antigen	Anwendung	Verwendete Verdünnung	Bestellnummer	Bezugsquelle
APLP2	Konfokale Mikroskopie	1:100	NBP1-32814	Novus Biologicals, Littleton, USA
APLP2	<i>Western Blot</i>	1:1000	NBP1-32814	Novus Biologicals, Littleton, USA
APLP2	Interferenz-Experiment	5 µg/ml	NBP1-32814	Novus Biologicals, Littleton, USA
APP	Durchflusszytometrie (AlexaFluor488)	1:100	MAB348A4	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
APP	Konfokale Mikroskopie	1:50	NBP-76910	Novus Biologicals, Littleton, USA
APP	<i>Western Blot</i>	1:1000	29765S	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
APP	Interferenz-Experiment	5 µg/ml	2453S	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
CCL20	Durchflusszytometrie intrazellulär (FITC)	1:50	ABIN192397	Antikörper-online, Aachen, Deutschland
CD163	ELISA	2 µg/ml	Teilnummern 842908 und 842909 (enthalten im Human CD163 DuoSet ELISA kit)	R&D Systems, Minneapolis, USA
CD74	<i>Dot Blot</i>	1:1000	#sc-20082	Santa Cruz Biotechnology
CD74	Durchflusszytometrie (FITC)	1:50	11-0748-42	Thermo Fisher Scientific

MATERIAL UND METHODEN

Antigen	Anwendung	Verwendete Verdünnung	Bestellnummer	Bezugsquelle
CD74	<i>Western Blot</i>	1:1000	#sc-20082	Santa Cruz Biotechnology
CXCL1	Durchflusszytometrie intrazellulär (PE)	1:50	IC275P	R&D Systems, Minneapolis, USA
HIF-1 α	<i>Western Blot</i>	1:1000	14179	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
IL-1 α	Durchflusszytometrie intrazellulär (FITC)	1:50	508206	Biologend, San Diego, USA
IL-6	Durchflusszytometrie intrazellulär (BV-421)	1:50	563279	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
IL-6	ELISA	2 μ g/ml	Teilnummer 840113 und 840114 (Detection) (enthalten im Human IL-6 DuoSet ELISA Development System)	R&D Systems, Minneapolis, USA
P-p38	<i>Western Blot</i>	1:1000	4511	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
TIMP-1	ELISA	2 μ g/ml	Teilnummern 840294 (Capture) und 840295 (Detection) (enthalten im TIMP-1 DuoSet ELISA kit)	R&D Systems, Minneapolis, USA
TNF- α	Durchflusszytometrie intrazellulär (PE)	1:50	557068	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA

Tabelle 8 Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper

Anwendung	Antigen	Kopplung	Verwendete Verdünnung	Bestellnummer	Bezugsquelle
-----------	---------	----------	-----------------------	---------------	--------------

Konfokale Mikroskopie	Affen-IgG	DyLight650	1:500	#A4099	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
<i>Western Blot</i>	Kaninchen- IgG	HRP	1:5000	#31462	Thermo Fisher Scientific
<i>Western Blot</i>	Maus-IgG	HRP	1:5000	#31432	Thermo Fisher Scientific
<i>Western Blot</i>	Goat-IgG	HRP	1:5000	#SA5- 10089	Thermo Fisher Scientific

2.1.8. Rekombinante Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine sind in **Tabelle 9** aufgeführt. Die rekombinanten humanen Proteine TIMP-1 und N-TIMP-1 wurden von Herrn Daniel Häußler (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) in einem endotoxinfreien Zellkultursystem in HEK293F Zellen produziert und anschließend unter Verwendung eines Äktapure *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)-Systems gereinigt.

Tabelle 9 Übersicht über die verwendeten rekombinanten Proteine

Rekombinantes Protein	Bestellnummer	Bezugsquelle
<i>MultiScribe Reverse Transcriptase</i>	Enthalten im Kit #4368814	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
N-TIMP-1	-	Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
TIMP-1	-	Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland

2.1.9. Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in **Tabelle 10** dargestellt.

Tabelle 10 Übersicht über die verwendeten Kits

Bezeichnung	Anwendung	Bestellnummer	Bezugsquelle
Alexa Fluor® 555 <i>Microscale Protein Labeling Kit</i>	Fluoreszenzmarkierung von TIMP-1	#A30007	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
CD14 <i>MicroBeads</i> , human	CD14 Positivselektion	#130-050-201	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
DuoSet ELISA <i>Ancillary Reagent Kit 2</i>	ELISA	#DY008	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>High-Capacity Reverse Transcription Kit</i>	Reverse Transkription	#4368814	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Human CD163 DuoSet ELISA kit	CD163 ELISA	#DY1607-05	R&D Systems, Minneapolis, USA
Human IL-6 DuoSet ELISA Development System	IL-6 ELISA	#DY206	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set</i>	Intrazelluläre Färbung von Proteinen für die Durchflusszytometrie	#88-8824-00	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>LEGENDPlex Mouse Inflammation Panel</i>	Messung von IL-6 in murinem Plasma	#740446	Biolegend, San Diego, USA
LRC-TriCEPS Kit	TriCEPS	-	Dualsystems Biotech AG, Schlieren, Schweiz
<i>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</i>	Bestimmung der Proteinkonzentration	#23225	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
<i>Proteome Profiler Human Cell Stress Array Kit</i>	Humaner Zellstress Array	#ARY018	R&D Systems, Minneapolis, USA
<i>Proteome Profiler Human XL Cytokine Array Kit</i>	Humaner Zytokin Array	#ARY022B	R&D Systems, Minneapolis, USA
TIMP-1 DuoSet ELISA Kit	TIMP-1 ELISA	#DY970-05	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.10. Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software ist in **Tabelle 11** aufgeführt. Für die Darstellung der Molekülstruktur von TIMP-1 (PDB ID: 1UEA, (Gomis-Rüth et al., 1997) wurde das Programm UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004) (entwickelt durch die *Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California*, San Francisco, mit der Unterstützung durch NIH P41-GM103311), Mol* Viewer (Sehnal et al., 2021) und die RCSB *Protein Data Bank* (PDB) verwendet. Für die Darstellung der Molekülstruktur von APP wurde der Algorithmus Robetta (Song et al., 2013; Baek et al., 2021), welcher eine *ab initio* Vorhersage von Molekülstrukturen erlaubt, verwendet. Die Darstellung der Proteinstrukturen erfolgte durch Herrn Daniel Häußler (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM).

Tabelle 11 Übersicht über die verwendete Software

Software, Version	Hersteller, Land
Affinity Designer 1.10.3	Serif, Großbritannien
Citavi 6	Swiss Academic Software, Schweiz
FlowJo Software (10.8.0.)	Tree Star Inc., USA
GraphPad Prism 9	Graphpad Software Inc, USA
ImageLab Software 6.0	BioRad Laboratories Inc., USA
Imaris 9.3.1	Oxford Instruments, Vereinigtes Königreich
Microsoft Office 2016	Microsoft, USA
Mol* Viewer	RCSB PDB, USA
UCSF Chimera	UCSF, USA

2.2. Patientenproben

2.2.1 Blutproben

Die in dieser Arbeit verwendeten Blutproben wurden in einem EDTA-Röhrchen abgenommen und umgehend vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 2.000 xg für 15 min bei 15°C. Das Plasma wurde abgenommen, im flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2. Zulassung der durchgeführten Patientenstudien

Die in dieser Arbeit durchgeführten Studien, bei welchen Patientenmaterialien verwendet wurden, wurden vom Ethikkommittee der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität München zugelassen (#183/18S, #409/16S, #395/17S). Die Patienten zeigten zum Zeitpunkt der Blutentnahme keine Anzeichen einer akuten Entzündung.

2.3. Tierexperimente

Zur Untersuchung der kausalen Abhängigkeit zwischen den Plasmaspiegeln von TIMP-1 und den Plasmaspiegeln von IL-6 im Kontext pankreatischer Erkrankungen wurden genetisch manipulierte Mäuse verwendet.

2.3.1. Verwendete Versuchstiere

Es wurden ausschließlich männliche, unter spezifisch pathogen-freien (SPF) Standardbedingungen im Zentrum für Präklinische Forschung (ZPF) des Klinikums rechts der Isar gezüchtete Mäuse verwendet, die regelmäßig durch geschultes Personal gepflegt wurden. Die verwendeten C57BL/6 und C57BL/6.129S4-Timp-1^{tm1Pds/J} (Soloway et al., 1996) Mauslinien wurden von *The Jackson Laboratory*, Maine, USA bezogen.

2.3.2. Induktion von akuter Pankreatitis in Mäusen durch Injektion von Cerulein

Zur Untersuchung einer kausalen Assoziation von TIMP-1 und IL-6 wurde durch repetitive Injektion von Cerulein das Krankheitsbild der akuten Pankreatitis induziert. Hierbei wurden 50 µg Cerulein (C9026, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) pro Kilogramm Körpergewicht jeder Maus intraperitoneal (i.p.) injiziert. Dies wurde insgesamt 8-mal in einem Abstand von je einer Stunde wiederholt. Die Injektion erfolgte in männliche Mäuse, die ein Alter zwischen 6-9 Wochen aufwiesen. Als Kontrolle wurde die gleiche Injektion mit PBS vorgenommen. 24 h nach der ersten Injektion wurden das Experiment beendet und die Versuchstiere durch eine Überdosis Isofluran getötet. Die Durchführung

der Tierexperimente wurde durch Herrn Dr. Benjamin Schoeps (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) und Herrn Dr. Chris Hermann (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) durchgeführt.

2.3.3. Entnahme von Plasma aus Mausblut

Am Ende des Experiments erfolgte die Tötung der Versuchstiere. Das Blut der Mäuse wurde aus der Bauchvene mit einer zuvor mit EDTA gespülten Spritze entnommen. Das Blut wurde anschließend zentrifugiert (500xg, 5 min, 4°C), das Plasma abgenommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.4. Methoden der Zellkultur

2.4.1. Isolation von primären humanen Monozyten aus Spenderblut

Zur Isolation von primären Monozyten wurde menschliches Blut mit Hilfe von EDTA-Röhrchen abgenommen, vorsichtig invertiert und direkt in 15 ml Zentrifugenröhrchen über 5 ml einer Polymorphprep-Lösung (Progen) im Verhältnis 1:1 geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 450 xg für 30 min bei Raumtemperatur (RT), wobei die Bremse der Zentrifuge dabei ausgestellt war, um eine Vermischung der entstehenden Gradientenschichten zu vermeiden. Anschließend wurde die obere, *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PMBC)-enthaltende Leukozytenschicht abgenommen und in PBS verdünnt. Die Zellen wurden dann bei 450 xg für 10 min bei RT zentrifugiert, mit 30 ml PBS gewaschen, und bei 250 xg für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 40 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer gezählt (**Kapitel 2.3.4.**). Die Isolation der Monozyten erfolgte dann mittels positiver Selektion auf CD14-positive Zellen mit Hilfe von anti-CD14 *Beads* und magnetischer Zellsortierung (MACS) gemäß den Angaben des Herstellers. Dabei wurden je 100 µl magnetischer anti-CD14 *Beads* pro $1 \cdot 10^8$ Zellen mit je 400 µl pro $1 \cdot 10^8$ Zellen gemischt und für 15 min aus Eis inkubiert. Währenddessen wurden magnetische Säulen mit 5 ml FACS-Puffer äquilibriert. Die *Bead*-Zell-Suspension wurde auf 6 ml Gesamtvolumen aufgefüllt und auf die äquilibrierte, in einen Magnetständer eingespannte Säule gegeben. Nachdem die gesamte Flüssigkeit die Säule durchlaufen hat, wurde diese zweimal mit je 3 ml MACS-Puffer nachgespült. Zur Freisetzung der CD14-positiven Monozyten wurde die Säule aus dem Magnetständer entnommen und mit Hilfe einer Spritze mit insgesamt 5 ml MACS Puffer aus der Säule in ein Zentrifugenröhrchen gespritzt. Danach erfolgte eine erneute Zählung der Zellen.

2.4.2. Kultivierung von Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurde routinemäßig dreimal pro Woche entweder durch Frau Katja Honert (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) oder die Autorin selbst passagiert und in Brutschränken unter Standardbedingungen unter Verwendung entsprechender Zellkulturlösungen (**Tabelle 12**) kultiviert.

Folgende Zelllinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

HEK293T

HEK293T Zellen stellen ein Derivat der *Human embryonic kidney* 293 (HEK293) Zelllinie dar, welche aus embryonalen Nierengewebe im Jahre 1973 isoliert und durch Fragmente der Adenovirus 5 DNA immortalisiert wurden (Graham et al., 1977). HEK293T Zellen wurden im Jahre 1987 durch die Einbringung des *Simian Virus 40* (SV49) *large T antigen* hergestellt, was die Replikation von Plasmiden, welche einen SV40 Replikationsursprung enthalten, erlaubt (Graham et al., 1977; DuBridgde et al., 1987). HEK293T Zellen wurden in dieser Arbeit zur Herstellung von lentiviralen Vektoren verwendet. Die Zellen wurden in DMEM Medium, supplementiert mit 10 % FCS, 20 mM L-Glutamin, 100 mM HEPES, 0,55 mM Asparagin und 0,27 mM Arginin, kultiviert.

LX2

LX2 Zellen repräsentieren eine hepatische Sternzelle (HSC)-Zelllinie, welche unter reduzierten Serumkonzentrationen aus primären humanen Zellen spontan immortalisiert wurden (Xu et al., 2005). Die Zellen wurden in DMEM Medium, supplementiert mit 2 % FCS, 1 % Glutamin und 2 % Penicillin/Streptomycin, kultiviert.

Namalwa

Namalwa Zellen stellen eine B-Lymphozyten-Zelllinie dar, welche aus einem dreijährigen an Burkitt-Lymphom erkrankten Patienten isoliert wurden (Klein et al., 1972). Die Zellen wurden in RPMI-1640 Medium, supplementiert mit 7,5 % FCS, kultiviert.

SH-SY5Y

SH-SY5Y Zellen stellen eine neuronale Zelllinie dar, welche ursprünglich aus den metastatischen Neuroblastom-Zelllinien SK-N-SH und SK-N-MC subkloniert wurde (Biedler et al., 1973; Biedler et al., 1978). SH-SY5Y Zellen werden in 50 % *Eagle Minimum Essential Medium* (EMEM), 50 % Ham's F-12 Nährstoffmischung, supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1% Natriumpyruvat und 1 % nicht-essentiellen Aminosäuren, kultiviert.

THP-1

THP-1 Zellen stellen eine humane leukämische Zelllinie dar, welche ursprünglich aus einem einjährigen Patienten mit monozytärer Leukämie isoliert (Tsuchiya et al., 1980) und repräsentieren ein etabliertes Zellsystem für humane Monozyten und Makrophagen (Bosshart und Heinzelmann, 2016). Die Zellen wurden in RPMI-1640 Medium, supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Glutamin, kultiviert.

Tabelle 12 Übersicht über die verwendeten Zellkulturlösungen

Lösung	Bezugsquelle
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Eagle´s Minimum Essential Medium (EMEM)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Fetal calf serum (FCS)	CellSystems, St. Katharinen, Deutschland
Gibco Opti-Mem	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ham´s F-12 Nährstoffmischung	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MEM 10x	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS-Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin/EDTA-Lösung (0,02% (w/v) EDTA, 0,05% (w/v) Trypsin, pH 7,4)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.4.3. Bestimmung von Zellzahlen

Die Bestimmung von Zellzahlen wurde mittels Neubauer Zählkammer durchgeführt. Dazu wurde eine Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit einer Trypanblaulösung gemischt und 10 µl dieser Suspension in die Neubauer Zählkammer gegeben. Insgesamt wurden die in zwei der vier großen Quadrate enthaltenen Zellen ausgezählt und die Gesamtzellzahl gemäß folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtzellzahl} = \frac{\text{Summe der gezählten Zellen}}{2} * 2 * \frac{10^4}{\text{ml}} * \text{Volumen der Zellsuspension}$$

Formel 1 Bestimmung der Gesamtzellzahl in einer Zellsuspension

2.4.4. Stimulation von Zellen

2.4.4.1. Stimulation von primären humanen Monozyten in der Hypoxiekammer

Für die Kultivierung von primären humanen Monozyten unter hypoxischen Bedingungen wurden die frisch isolierten Zellen gezählt, in entsprechender Zellzahl ($2 \cdot 10^6$ Zellen pro 6 cm Zellkulturschale für *Western Blot* Analysen, oder je $2 \cdot 10^5$ Zellen pro 96-well v-Bottom Platte für FACS-basierte Analysen) in RPMI Medium, supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, ausgesät und in der sterilen Hypoxiekammer (Sauerstoffgehalt 1 %) inkubiert (24 h für *Western Blot* Analysen, 3 h für die FACS-basierte Messung der Glukoseaufnahme).

2.4.4.2. Stimulation von primären humanen Monozyten zur Analyse der Glukoseaufnahme

Für die Untersuchung der Glukoseaufnahme wurden insgesamt $2 \cdot 10^5$ Zellen pro 96-well v-bottom Platte in einem Gesamtvolumen von 200 μ l RPMI-1640 Medium, supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, ausgesät und mit rhTIMP-1 (500 ng/ml, falls nicht anders angegeben) oder rhN-TIMP-1 (äquimolar konzentriert zu 500 ng/ml TIMP-1) für 3 h bei 37°C, 5% CO₂ (Standardbedingungen) stimuliert. Danach erfolgte direkt die Zugabe von 2-NBDG in einer Konzentration von 50 μ M, welche für 30 min unter Standardbedingungen inkubiert wurde. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, wobei die Zellen nach jedem Waschschrift bei 450 xg für 3 min bei 4°C zentrifugiert wurden. Die Glukoseaufnahme wurde dann gemäß dem Protokoll zur Analyse der Glukoseaufnahme in Zellen (**Kapitel 2.5.2.3**) durchgeführt.

2.4.4.3. Stimulation von primären humanen Monozyten zur Analyse von intrazellulären Zytokinspiegeln

Für die Analyse intrazellulärer Zytokinspiegel wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen pro 96-well v-Bottom Platte in 200 μ l RPMI-1640 Medium, supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin, ausgesät. Um eine Sekretion der Zytokine zu vermeiden, wurde die Stimulation der Zellen (500 ng/ml rhTIMP-1, falls nicht anders angegeben, oder äquimolare Mengen an rhN-TIMP-1 für 5 h unter Standardbedingungen) in Anwesenheit des Proteintransport-Inhibitors Brefeldin A durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Falls zusätzlich zur Färbung intrazellulärer Zytokine auch Oberflächen-Moleküle analysiert wurden, erfolgte zuerst die Färbung der entsprechenden Oberflächenrezeptoren gemäß dem Protokoll für Oberflächenfärbungen (**Kapitel 2.5.2.1**). Danach, oder falls keine Oberflächenfärbung vorgenommen wurde, wurden die Zellen gemäß dem Protokoll für intrazelluläre Färbungen (**Kapitel 2.5.2.2**) gefärbt.

2.4.4.4. Stimulation von primären humanen Monozyten zur Analyse von intrazellulären Signalwegmolekülen

Zur Analyse intrazellulärer Signalwegmoleküle wurden $2 \cdot 10^6$ frisch isolierte primäre humane Monozyten in eine 6 cm Zellkulturschale in RPMI Medium ohne FCS, supplementiert mit 1 % Penicillin/Streptomycin, ausgesät und für 1 h unter Standardbedingungen inkubiert, um eine Adhäsion der Zellen an die Zellkulturschale zu erreichen. Danach wurde das Medium auf in RPMI-1640 Medium, supplementiert mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin umgestellt und die Zellen mit rhTIMP-1 (500 ng/ml) für 24 h unter Standardbedingungen stimuliert. Danach erfolgte eine Zelllyse mittels RIPA-Lysepuffer (**Kapitel 2.5.9.1**).

2.4.4.5. Stimulation von Zellen mit Alexa⁵⁵⁵-TIMP-1 für die konfokale Mikroskopie

Die Visualisierung von TIMP-1/Rezeptor-Interaktionen wurde mittels konfokaler Mikroskopie durchgeführt. Hierzu wurden sowohl primäre humane Monozyten als auch LX2 und Namalwa Zellen verwendet.

2.4.4.5.1. Fluoreszenzmarkierung von TIMP-1 mit Alexa555

Die Markierung von rhTIMP-1 erfolgte mittels des AlexaFluor⁵⁵⁵ *Microscale Labeling* Kits gemäß den Herstellerangaben. Die Markierung von TIMP-1 wurde durch Herrn Daniel Häußler (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) durchgeführt.

2.4.4.5.2. Färbung der Zellen mit Alexa555-TIMP-1

Für die Stimulation von Zellen mit Alexa⁵⁵⁵-TIMP-1 wurden jeweils $2 \cdot 10^5$ Zellen pro Well einer 96-well v-bottom Platte im entsprechenden Kulturmedium ausgesät und für 30 min auf Eis gekühlt. Die Kühlung der Zellen wurde vorgenommen, um eine mögliche Internalisierung des Liganden zu reduzieren. Anschließend wurden die Zellen mit 20.000 ng/ml fluoreszenzmarkiertem TIMP-1 für 10 min auf Eis stimuliert und danach dreimal mit PBS gewaschen, um Reste des ungebundenen Liganden zu entfernen. Dann folgte die weitere Prozessierung der Zellen und die Färbung entsprechender Oberflächenrezeptoren (**Kapitel 2.5.12.1**).

2.4.4.6. Stimulation von B-Lymphomzellen zur Durchführung des LRC-TriCEPS Ansatzes

Für die Identifikation neuer Interaktionspartner von TIMP-1 mittels des LRC-TriCEPS Ansatzes (**Kapitel 2.5.3**) wurden Namalwa Zellen im Verhältnis 1:6 auf insgesamt zehn T-150 Zellkulturschalen passagiert und für 3 Tage unter Standardbedingungen kultiviert. Die Zellen wurden dann vereint, gezählt, und auf neun 50 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Zellen wurden pelletiert (300 xg, 5 min, 4°C), in 49 ml eiskaltem PBS (pH 6.5) resuspendiert und mit 1 ml Oxidationsreagenz (NaIO₄, finale Konzentration: 1,5 mM) versetzt. Die Zellsuspension wurde für 15 min bei 4°C auf dem Rollrad

inkubiert, die Zellen anschließend pelletiert (300 xg, 5 min, 4°C), und in 27 ml eiskaltem PBS (pH 7.4) inkubiert. Die Zellen wurden dann gleichmäßig in insgesamt drei 15 ml Reaktionsgefäße verteilt und, wie in **Kapitel 2.5.3.** beschrieben, weiterverarbeitet.

2.4.4.7. Stimulation von SFCD74-LX2 Zellen für die Ko-Immünpräzipitation

Zur Analyse der Interaktion von TIMP-1 mit CD74 mittels Ko-Immünpräzipitation wurden CD74-überexprimierende LX2 Zellen in zwei 10 cm Zellkulturschalen ausgesät, mit rhTIMP-1 (500 ng/ml) für 10 min stimuliert und durch einen nicht-denaturierenden Zelllysepuffer lysiert. Die Konzentration des Lysates wurde dann mittels BCA-Assay (**Kapitel 2.5.9.2**) bestimmt und für Ko-Immünpräzipitations Experimente (**Kapitel 2.5.6.**) verwendet.

2.4.5. Generierung von APP *knockdown* THP-1 Zellen

Sowohl der *knockdown* von APP in THP-1 Zellen, als auch die Produktion lentiviraler Partikel, wurden mit der Hilfe von Frau Katja Honert (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforchung, TUM) durchgeführt. Hierzu wurden $5 \cdot 10^6$ HEK293T-Zellen in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und über Nacht unter Standardbedingungen kultiviert. Am nächsten Tag wurde ein Medienwechsel vorgenommen, und die Zellen mit lentiviralen Transferplasmiden und lentiviralen Verpackungsplasmiden (**Tabelle 7**) kotransfiziert. Als Kontrolle diente ein Plasmid, welches shRNA enthält, die kein bekanntes humanes oder murines Zielgen hat (shNT). Die Kotransfektion wurde durchgeführt, indem 36 µl Lipofectamin 2000 mit 1,5 ml OptiMEM Medium gemischt und für 5 min bei RT inkubiert wurden. Zudem wurde das Transferplasmid mit den Verpackungsplasmiden in 1,5 ml OptiMEM gemischt, und zum Lipofectamin-OptiMEM-Gemisch gegeben. Diese Mixtur wurde dann für 20 min bei RT inkubiert. Das Medium der HEK293T-Zellen wurde durch 5 ml OptiMEM, supplementiert mit 10% FCS, ersetzt und das Plasmid/Lipofectamin/OptiMEM-Gemisch tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 6 h unter Standardbedingungen wurde das Medium abgesaugt und durch HEK293T-Kulturmedium ersetzt. Nach zwei Tagen Inkubation unter Standardbedingungen wurde der Virusüberstand abgenommen, durch einen 0,45 µm Filter gefiltert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung des *knockdowns* wurden THP-1^{TKO} Zellen mit den lentiviralen Partikeln, unter Zugabe von 8 µg/ml Polybren, infiziert und nach 3 Tagen durch 10 µg/ml Puromycin selektioniert. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Selektion dienten nicht infizierte THP-1^{TKO} Kontrollzellen, welche durch Puromycin-Zugabe absterben.

2.4.6. Generierung von CD74-Überexpressionszellen

Die in dieser Arbeit verwendeten CD74-überexprimierenden LX2 Zellen (SFCD74) wurden bereits zuvor durch Frau Katja Honert (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM), mit Hilfe von Herrn Christoph Stange (Masterand am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) hergestellt. Hierzu wurden die drei Vektoren pLP1, pLP2 und pLPVSVG (ViraPower-Kit, Thermo Fisher) mit einem Transferplasmid in HEK293T-Zellen transfiziert. Die HEK293T-Zellen wurden dabei am Vortag in 10 cm Zellkulturschalen ($5 \cdot 10^5$ Zellen) ausgesät. Jeweils 1 ml Opti-MEM wurden mit 36 μ l Lipofektamin versetzt und für 5 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 10 μ l Transferplasmid, 6,6 μ g pLP1, 5 μ g pLP2 und 3 μ g pLPVSVG in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml Opti-MEM, und eine Inkubation für 20 min bei RT. Das Medium der HEK293T-Zellen wurde abgenommen und durch 5 ml Opti-MEM, supplementiert mit 10 % FCS, ersetzt. Das DNA-Lipofektamin-Gemisch wurden dann tropfenweise auf die Zellen gegeben und für 6 h unter Standardbedingungen inkubiert. Der Virusüberstand wurde abgenommen, durch einen 0,45 μ m Filter filtriert, und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Zur Überexpression von CD74 in LX2 Zellen wurden diese in 6 cm Zellkulturschalen ausgesät und 1 ml Virusüberstand, sowie 10 μ g/ml Polybren, auf die Zellen gegeben und für 2 h unter Standardbedingungen inkubiert, wobei die Schalen im Abstand von 20 min geschwenkt wurden, um eine gleichmäßige Verteilung des Virusüberstandes auf der Zellschicht zu gewährleisten. Danach wurden 4 ml des Kulturmediums hinzugefügt und je nach Zelldichte passagiert.

2.5. Molekularbiologische Methoden

2.5.1. Durchführung von Protein-Arrays

2.5.1.1. Humaner Zellstress-Array und humaner XL Zytokin-Array

Der humane Zellstress-Array und der humane XL Zytokin-Array (**Tabelle 10**) wurden gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Sowohl für den Zellstress-Array, als auch für den Zytokin-Array wurden primäre humane Monozyten isoliert und $2 \cdot 10^6$ Zellen direkt auf sechs Wells einer 6-well Zellkulturschale zunächst in FCS-freiem RPMI-1640 Medium, supplementiert mit 1% Penicillin/Streptomycin, ausgesät, und das Medium nach einer Stunde auf FCS-haltiges Kulturmedium umgestellt. Die Zellen wurden dann für 24 h (Zellstress-Array) oder 5 h (Zytokin-Array) mit 500 ng/ml rhTIMP-1 stimuliert. Die Stimulation für die spätere Durchführung des Zytokin Arrays erfolgte unter Anwesenheit des Proteintransportinhibitors Brefeldin A. Nach der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und durch den entsprechenden Lysepuffer (Zellstress-Array: *Lysis Buffer 6*, Zytokin-Array: *Lysis Buffer 17* (**Tabelle 4**); jeweils supplementiert mit 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, und 10 µg/ml Pepstatin) lysiert. Hierbei wurden je drei unbehandelte, und drei TIMP-1-behandelte Wells vereint, um eine ausreichende Lysatkonzentration zu erhalten. Die Lysate wurden dann für 30 min bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert und bei 14.000 xg für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde nun bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Bei der Durchführung der Arrays wurden je 2 ml des Array-Buffers 6 in eine Schale vorgelegt, in welche die entsprechenden Antikörpergekoppelten Membranen gelegt und für eine Stunde unter leichtem Schwanken inkubiert wurden. Währenddessen wurden die Proteinlysate auf die gleiche Konzentration in einem Gesamtvolumen von 1,5 ml Array Buffer 6 vorbereitet und die Membranen nach der einstündigen Inkubationszeit in dieser Lysat-Lösung über Nacht bei 4°C unter ständigem Schwanken inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen insgesamt dreimal für 10 min mit 20 ml 1x Waschpuffer gewaschen. Die verwendeten Schalen wurden gründlich mit ddH₂O gereinigt. Anschließend wurde die Detektionslösung hergestellt, indem 1,5 ml 1x Array Buffer 4/6 mit 30 µl Detektionsantikörper versetzt wurden. Die Membranen wurden dann in der gereinigten Schale für 1 h mit der Detektionslösung inkubiert. Danach wurden die Membranen erneut dreimal für 10 min gewaschen und anschließend für 30 min mit einer 1x Streptavidin-HRP-Lösung bei RT unter Schwanken inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der Membranen wurden diese mit je 1 ml *Chemi Reagent Mix* versetzt und mit Hilfe des ChemiDoc-Detektionsgerätes entwickelt. Die Auswertung der Arrays erfolgte durch die densitometrische Quantifizierung der *Dot*-Intensitäten. Je Protein befanden sich zwei *Dots* auf der Membran, aus welchen der Mittelwert der *Dot*-Intensitäten gebildet wurde. Um eine potentielle ungleiche Proteinbeladung der beiden Membranen zu berücksichtigen, wurden die erhaltene Werte auf den Mittelwert der Intensitäten der auf beiden Membranen enthaltenen Referenz-*Dots* normalisiert.

2.5.1.2. Muriner LEGENDPlex-Maus Inflammations Array

Zur Messung der Plasmaspiegel von IL-6 in C57BL/6 und C57BL/6.129S4-Timp-1^{tm1Pds/J} Mäusen wurde murines Plasma aus Cerulein- und PBS-behandelten Mäusen aufgetaut, im Verhältnis 1:2 in Assay Puffer verdünnt und gemäß den Herstellerangaben des LEGENDPlex *Mouse Inflammation Panel* (740446, Biolegend, San Diego, USA) durchgeführt. Die Messung erfolgte am Sony SP6800 Spectral Analyzer (Sony Biotechnology). Bei der Auswertung wurden die MFI-Werte des Zytokins IL-6 von Cerulein-behandelten C57BL/6 und C57BL/6.129S4-Timp-1^{tm1Pds/J} miteinander verglichen.

2.5.2. Durchflusszytometrie

Die in dieser Arbeit durchgeführten durchflusszytometrischen Messungen wurden grundsätzlich am SA3800 oder SP6800 Spectral Analyzer (Sony Biotechnology) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe von FlowJo (Version 10.8.0).

2.5.2.1. Färbung von Oberflächenproteinen

Bei der Färbung von Oberflächenproteinen wurden die Zellen nach der jeweiligen Stimulation in einer v-bottom Platte zweimal mit FACS Puffer gewaschen und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern (**Tabelle 7**) für 30 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt und nochmals zweimal gewaschen. Danach erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer und die anschließende Auswertung mit FlowJo.

2.5.2.2. Färbung von intrazellulären Proteinen

Bei der Färbung von intrazellulären Proteinen wurden die Zellen nach der jeweiligen Stimulation zweimal mit FACS Puffer gewaschen und für 30 min bei 4°C mit Fixierungs-Puffer fixiert, danach in FACS Puffer aufgenommen und über Nacht bei 4°C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen und mit den im Permeabilisierungspuffer verdünnten Antikörpern gegen intrazelluläre Zytokine für 2 h bei 4°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS Puffer gewaschen und mittels Durchflusszytometrie und FlowJo analysiert. Bei der Auswertung wurde jeweils auf die entsprechende FMO-Kontrolle durch Subtraktion des GeoMean-Wertes des entsprechenden Zytokines normalisiert.

2.5.2.3. Analyse der Glukoseaufnahme

Zur Analyse der Glukoseaufnahme wurden die Zellen nach der entsprechenden Stimulation zweimal mit FACS Puffer gewaschen und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Bei der Auswertung wurde jeweils das geometrische Mittel (GeoMean) der 2-NBDG Fluoreszenzintensität berechnet und auf eine *Fluorescence-Minus-One* (FMO)-Kontrolle durch Subtraktion des FMO-GeoMean-Wertes, normalisiert.

2.5.3. LRC-TriCEPS Assay

Zur Identifikation von neuen Oberflächen-Interaktionspartnern von TIMP-1 wurde ein sogenannter LRC-TriCEPS Assay, vertrieben von der Firma Dualsystems Biotech AG (Schlieren, Schweiz), gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Im LRC-TriCEPS Experiment können direkte Ligand-Rezeptor-Interaktionen unter nahezu nativen Bedingungen ermittelt werden (Frei et al., 2012).

2.5.3.1. Durchführung des Assays

Nach der Stimulation der B-Lymphomzellen (**Kapitel 2.4.2.6.**), wurde TIMP-1 (zu analysierender Ligand), BSA (Negativkontrolle), und Transferrin (Positivkontrolle) an das TriCEPS-Molekül gekoppelt. Hierbei wurden jeweils 300 µg Protein (gelöst in 150 µl 25 mM HEPES pH 7.4) mit 1,5 µl TriCEPS™ v.3.0. Reagenz versetzt, gemischt und bei 22°C auf dem Thermoschüttler (350 rpm) für 90 min inkubiert. Die TriCEPS-Ligand-Gemische wurden dann in die entsprechend vorbereiteten, mit der Zellsuspension versetzten Reaktionsgefäße gegeben und bei 4°C im Dunkeln, für 90 min, auf einem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Zellen pelletiert (300 xg, 5 min, 4°C) und in 3 ml eiskaltem LRC-Puffer (PBS, pH 7.4, supplementiert mit dem Katalysator 2-amino-5-methoxybenzoesäure) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann in jeweils drei 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt (um eine Messung in Triplikaten durchzuführen), pelletiert (3000 xg, 5 min, 4 °C) und bei -80°C gelagert. Die Zellpellets wurden dann an Dualsystems Biotech AG versandt. Alle Prozessierungsschritte nach der Sendung der Zellpellets wurden durch Duaylsystems Biotech AG (Schlieren, Schweiz) durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen lysiert, die mit dem TriCEPs-Molekül quervernetzten Oberflächenmoleküle mittels Affinitätschromatographie aufgereinigt, durch Trypsin verdaut, und mittels LC-MS/MS-Analyse analysiert.

2.5.3.2. Auswertung der Daten

Die (statistische) Auswertung und Interpretation der Daten erfolgte durch Dualsystems Biotech AG. Hierbei wurden die TriCEPs-TIMP-1-behandelten Zellen mit den TriCEPS-BSA- und TriCEPS-Transferrin-behandelten Zellen verglichen und untersucht, welche Proteine, relativ zu diesen Vergleichsliganden, signifikant in den TriCEPS-TIMP-1-behandelten Proben angereichert waren. BSA diente hierbei als Negativkontrolle, da BSA an keinen humanen Rezeptor binden sollte, und nur BSA selbst in der Analyse als angereichert detektiert werden sollte. Da Transferrin an den Transferrinrezeptor bindet, diente Transferrin als positive Kontrolle, da lediglich der Transferrinrezeptor in diesen Proben angereichert werden sollte. BSA und Transferrin dienten also sowohl als Kontrolle für den technischen Erfolg des Experiments, als auch als Vergleichsliganden zu TIMP-1. Ob ein angereicherter Rezeptor als Kandidatrezeptor für TIMP-1 definiert werden kann, wurde mittels folgender Kriterien festgelegt:

- 1) Es wurden mindestens zwei Peptide des entsprechenden Rezeptors in der LC-MS/MS-Analyse identifiziert.
- 2) Der Log₂-Wert der relativen Veränderung der Anreicherung des entsprechenden Rezeptors muss einen größeren Wert als 3 aufweisen.
- 3) Der Log₁₀-Wert des angepassten p-Wertes muss größer als 2 sein, was einem p-Wert von <0,01 entspricht.

Falls diese drei Kriterien für einen angereicherten Rezeptor erfüllt waren, wurde dieser als Kandidatrezeptor für TIMP-1 bezeichnet. Die Daten wurden zum einen in einem Volcano-Plot, zum anderen in einem Peptid-Anreicherungs-Plot dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte durch Dualsystems Biotech AG mittels ANOVA.

2.5.4. Dot Blot Assay

Dot Blot Assays wurden zur Überprüfung einer Interaktion von TIMP-1 mit potentiellen Interaktionspartnern, wie z.B. CD74, durchgeführt. Hierzu wurde auf eine Nitrozellulosemembran 6,7 µg rhTIMP-1, sowie äquimolare Mengen an MIF (Positivkontrolle), welche jeweils in Assay Puffer gelöst waren, immobilisiert. Dies geschah gemäß den Herstellerangaben des BioDot® *microfiltration apparatus* (Biorad). Als Negativkontrolle wurde ein *Dot* nicht mit einem rekombinanten Protein gekoppelt, sondern lediglich mit Assay Puffer inkubiert. Über Nacht wurden die entsprechenden *Dot* mit einem nicht-denaturierten Zellysat von Namalwa Zellen (20 µg/ml) bei 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal mit TBS-T gewaschen und mit Antikörpern gegen CD74 inkubiert, solange, bis die Antikörperlösung allein durch die Schwerkraft durch die Membran diffundiert ist. Danach erfolgten zwei weitere Waschschrirte mit TBS-T. Danach wurde die Membran mit HRP-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörpern inkubiert und zuletzt nochmals zweimal mit TBS-T gewaschen. Darauf folgte die Detektion des *Dot* Blots mit Hilfe des ChemiDoc™ imaging systems. Die *Dot*-Intensitäten wurden mittels ImageLab Software bestimmt und auf die Negativkontrolle normalisiert.

2.5.5. Pull Down Assay

Die in dieser Arbeit durchgeführten *Pull Down Assays* wurden mit Hilfe von Frau Daniela Abele (Praktikantin am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforshung, TUM) gemäß den Herstellerangaben der magnetischen NHS-*Beads* (Cytiva) durchgeführt. Sowohl der *Pull Down Assay*, als auch die Ko-Immünpräzipitation (**Kapitel 2.5.6.**) stellen die bekanntesten und am häufigsten verwendeten Techniken zur gezielten Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen darstellen (Jain et al., 2012).

Bei der Durchführung eines *Pull Down Assays* wurden zunächst nicht-denaturierte Zelllysate von SH-SY5Y Zellen hergestellt. Die magnetischen NHS-*Beads* wurden mit einer eiskalten HCl-Lösung (1 mM) äquilibriert und 2000 nM rhTIMP-1 (gelöst in *Coupling Puffer*) für 2 h bei RT mit den *Beads* inkubiert, während diese in einen Rotations-Schüttler eingespannt wurden. Die Kontroll-*Beads* wurden nur mit *Coupling Puffer* inkubiert. Danach wurden die *Beads* abwechselnd zweimal mit *Blocking Puffer A* und *Blocking Puffer B* gewaschen und zuletzt erst für 15 min mit *Blocking Puffer A* inkubiert und anschließend mit TBS äquilibriert. Nach jedem Schritt wurden die Reaktionsgefäße in einen magnetischen Ständer eingespannt, der das Abnehmen der Übersände ermöglicht. Danach erfolgte die Zugabe des nicht-denaturierten SH-SY5Y Zelllysats (100 µl, 2 mg/ml) und eine Inkubation für 4 °C über Nacht. Ein Teil des Lysats wurde aufbewahrt und diente als „*Input*“ für die spätere Analyse mittels *Western Blot*. Nach der Inkubation über Nacht wurde der Überstand der *Beads* abgenommen und als „*Output*“ aufbewahrt. Die *Beads* wurden dreimal mit TBS-T gewaschen und die an die *Beads* gekoppelten Proteine durch Zugabe von Ladepuffer bei 95°C für 5 min eluiert („*Elution*“). Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert und anschließend mittels *Western Blot* analysiert.

2.5.6. Ko-Immunpräzipitation

Die in dieser Arbeit durchgeführte Ko-Immunpräzipitation wurden mit Hilfe von Frau Laura Flüter (Masterandin am Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) durchgeführt. Das Prinzip der Ko-Immunpräzipitation basiert auf der Verwendung Zielprotein-spezifischer Antikörper („*Immun*“), die an Trägermaterialien, wie zum Beispiel magnetische *Beads*, gekoppelt werden, um das Zielprotein zusammen („*Ko*“) mit dessen Interaktionspartnern aus einem Zelllysate zu präzipitieren („*Präzipitation*“) (Lin und Lai, 2017).

Bei der Durchführung einer Ko-Immunpräzipitation wurden je 10 µg anti-CD74-gekoppelte Agarose-*Beads* (sc-6262-AC, Santa Cruz Biotechnology), sowie IgG-gekoppelte Kontroll-*Beads* mit je 1 ml PBS, supplementiert mit 5 % BSA, für 1 h bei RT, unter ständigem Rotieren der Reaktionsgefäße, inkubiert um unspezifische Bindestellen auf den *Beads* zu blockieren. Danach wurden die *Beads* dreimal mit PBS gewaschen und in nicht-denaturierenden Zelllysaten von TIMP-1-stimulierten LX2-Zellen über Nacht bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Am folgenden Tag wurden die *Beads* bei 1.000 rpm und 4°C für 30 Sekunden zentrifugiert und dreimal mit PBS gewaschen. Das verbleibende Pellet wurde dann in Ladepuffer resuspendiert, für 5 min bei 95°C denaturiert und bis zur Analyse mittels *Western Blot* bei -80°C gelagert.

2.5.7. ELISA

ELISA Messungen wurden mit Hilfe des DuoSet ELISA *Ancillary Reagent Kit 2* (R&D Systems) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt.

2.5.7.1. TIMP-1 ELISA

Die Messung von humanem TIMP-1 in Plasmaproben von PDAC Patienten wurde durch Herrn Dr. Chris Hermann (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) durchgeführt. Die Messung von TIMP-1 in Zellkulturüberständen von primären Monozyten oder THP-1 Zellen wurde durch Herrn Daniel Häußler (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) durchgeführt. Bei den Messungen wurden je 100 µl anti-TIMP-1 Antikörper (2 µg/ml, gelöst in PBST) in die Wells einer 96-Well Flachbodenplatte gegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellkulturüberstände (1:10 verdünnt in *Reagent Diluent*) und die Plasma-Proben (1:500 verdünnt in *Reagent Diluent*) in Duplikaten auf die anti-TIMP-1-Antikörper-gekoppelten Wells gegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Wells dreimal mit PBS gewaschen und 100 µl anti-TIMP-1 Antikörpern (50 ng/ml, verdünnt in *Reagent Diluent*) für 2 h im Dunkeln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden je 100 µl HRP-gekoppelte anti-Maus Antikörper in die Wells pipettiert und bei RT für 20 min inkubiert. Danach wurden je 100 µl *Stop Solution* hinzugegeben und die Absorption bei 450 nm im TECAN *Microplate Reader* gemessen. Bei der Auswertung der Daten wurde jeweils die Hintergrundabsorption (stammend aus einem Well, in dem kein Plasma oder Zellkulturüberstand, sondern nur *Reagent Diluent* hinzugegeben wurde), abgezogen, und mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.5.7.2. sCD163 ELISA

Die Messung von sCD163 im Plasma von PDAC Patienten wurde durch Herrn Dr. Chris Hermann (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) durchgeführt. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben des CD163 DuoSet ELISA Kits (R&D Systems) und wie in **Kapitel 2.7.7.1.** beschrieben.

2.5.7.3. IL-6 ELISA

Die Messung von IL-6 im Plasma von PDAC Patienten wurde durch Frau Simone Heisz (Institut für Ernährungsmedizin, TUM) gemäß den Herstellerangaben des human IL-6 DuoSet ELISA *development systems* (R&D Systems) und wie in **Kapitel 2.7.7.1.** beschrieben, durchgeführt.

2.5.8. qRT-PCR Analysen

2.5.8.1. Isolierung von RNA aus Zellen

Für die Isolation von RNA aus Zellen wurden diese zweimal mit PBS gewaschen, in 1 ml Trizol-Lösung aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert. Die Zell-Trizol-Mischung wurde auf Eis aufgetaut und anschließend bei RT für 5 min inkubiert. Danach wurden 200 µl Chloroform zugegeben, die Suspension für 15 Sekunden durch Vortexen gemischt und anschließend 3 min bei RT inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation bei 13.000 rpm bei 4°C für 10 min. Währenddessen wurden 250 µl Isopropanol in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt, in welches dann die obere, farblose Phase des Trizol/Chloroform-Gradienten gegeben und wieder durch Vortexen gemischt wurde. Danach folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm bei 4°C für 10 min. Der entstandene Überstand wurde abgenommen und verworfen, das Pellet wurde mit 1 ml 80% Ethanol gewaschen und bei 7.600 rpm bei 4°C für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Pellets bei RT getrocknet. Das Pellet wurde dann in nukleasefreiem Wasser gelöst und über Nacht bei 4°C inkubiert. Ab diesem Schritt wurde die RNA stets auf Eis gelagert.

2.5.8.2. RNA-Konzentrationsbestimmung und Kontrolle der RNA-Integrität

Die Konzentration der gelösten RNA wurde mittels *Nanodrop* (Thermo Fisher) bestimmt, nachdem diese für 10 min bei 65°C denaturiert wurde. Die RNA-Proben wurden dann jeweils mit nukleasefreiem Wasser auf 100 ng/µl eingestellt. 5 µl dieser Verdünnung wurden für Untersuchung der Integrität 1:1 mit 2x RNA-Ladepuffer verdünnt und mittels 1% Agarosegel bei 100 V für 30 min aufgetrennt. Das 1% Agarosegel wurde dabei in ein zuvor mit 2% Absolute gereinigtem Schlitten, unter Zugabe von 2,5 µl/50 ml SYBR *green* Lösung, gegossen. Die Detektion der Banden erfolgte mit Hilfe des ChemiDoc™ *imaging systems*.

2.5.8.3. Reverse Transkription

Wurde die Integrität der RNA bestätigt, konnte die RNA in cDNA mittels reverser Transkription umgeschrieben werden. Hierzu wurden jeweils 10 µl der RNA mit 10 µl eines zuvor vorbereiteten Master Mixes (**Tabelle 13**) in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäßen gemischt und mit Hilfe einer PCR Maschine gemäß dem in **Tabelle 14** beschriebenen Programm in cDNA umgeschrieben.

Tabelle 4 Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

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

Tabelle 5 Gewähltes Programm für die Reverse Transkription

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [$^{\circ}$ C]	25	37	85	4
Zeit	10 min	120 min	5 s	∞

2.5.8.4. Genexpressionsanalyse durch qRT-PCR

Die Analyse der Genexpression erfolgte mittels qRT-PCR, wobei die Messung der 18S rRNA jeweils als endogene Kontrolle diente. Die cDNA wurde jeweils 1:100 oder 1:1000 (für die Analyse der Zielgene), bzw. 1:100.000 (für die Analyse der 18S rRNA) in nukleasefreiem Wasser verdünnt und je 3 µl der Verdünnungen, bzw. 3 µl nukleasefreies Wasser (Negativkontrolle) in Triplikaten auf eine 384-Well Platte pipettiert. Hierzu wurden je 7 µl des entsprechenden Master Mixes (**Tabelle 15**) pipettiert, die Platte mit einer Abdeckfolie versiegelt und im *LightCycler* 480 (Roche) gemessen (**Tabelle 16**). Für die Auswertung wurden die aus den C_T -Werten berechnete relative Veränderung der Genexpressionen, herangezogen.

Tabelle 15 Reaktionsansatz Reverse Transkription

Reagens	Volumen [µl] pro Reaktion
Forward Primer (100 µM)	0,015
Nukleasefreies H ₂ O	0,97
Reverse Primer (100 µM)	0,015
Takyon™ No ROX SYBR 2x Master Mix blue dTTP	6,0
Gesamtvolumen pro Reaktion	7

Tabelle 16 Gewähltes Programm für die Reverse Transkription

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur [°C]	50	95	95	60
Zeit	2 min	3 min	10 s	60
Wiederholung	-		40x	

2.5.9. Isolation und Konzentrationsbestimmung von Proteinen aus Zellen

2.5.9.1. Isolation von Proteinen aus Zellen

Proteine wurden aus Zellen isoliert, indem diese nach der entsprechenden Stimulation zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 40 µ RIPA-Lysepuffer pro 6 cm Zellkulturschale, oder in 40 µl nicht-denaturierendem Lysepuffer, unter Zugabe von Protease- und Phosphatase-Inhibitoren, lysiert und für 5 min auf Eis inkubiert wurden. Danach erfolgte eine Behandlung im Ultraschallbad (3x 10 Sekunden) und die Schock-Gefrierung im flüssigen Stickstoff. Die Lysate wurden dann auf Eis aufgetaut und bei 13.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand (Lysat) wurde dann in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für die Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

2.5.9.2. Bestimmungen von Proteinkonzentrationen mittels BCA

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das Zelllysat im Verhältnis 1:25 mit ddH₂O gemischt und jeweils 10 µl davon in eine 96-Well Flachboden-Platte in Duplikaten pipettiert. Zusätzlich wurde ein BSA-Standard, bestehend aus 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 BSA in Doppelbestimmungen vorgelegt, um aus diesem später eine Standardkurve zu erstellen. Zu allen Proben und zum Standard wurden dann jeweils 200 µl einer zuvor vorbereiteten BCA-Lösung (BCA-Reagenz 1 und BCA-Reagenz 2, im Verhältnis 50:1) gegeben und die Platte bei 37°C für 30 min inkubiert. Danach erfolgte die Messung der Absorption bei 562 nm im TECAN-Reader und eine Einstellung der Proteinlysate auf gleiche Proteinkonzentrationen mittels Verdünnung in 5x Laemmli Puffer und ddH₂O und anschließender Denaturierung bei 95°C.

2.5.10. SDS Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinlysaten erfolgte jeweils mittels SDS-Gelelektrophorese. Hierzu wurden zunächst 10 % oder 12,5 % SDS-Gele gemäß der in **Tabelle 17** angegebenen Volumina, unter Verwendung eines 15-Taschen-Kamms, gegossen. Nach erfolgter Polymerisierung des Gels wurden die Geltaschen jeweils mit den auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellten Proteinlysaten beladen. Davor wurden diese bei 13.000 xg für 2 min zentrifugiert und jede Geltasche mit Hilfe einer 200 µl Pipette gespült. Die Proteine wurden dann zunächst bei 80 V für 20 min, dann bei 130 V aufgetrennt, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat. Zur Einschätzung der Molekulargewichte der detektierten Proteine wurden 4 µl eines vorgefärbten Molekulargewichtsmarkers (*PageRuler*, Thermo Fisher) auf das Gel aufgetragen.

Tabelle 17 Zusammensetzungen von SDS Gelen

Bestandteile	<u>Trenngel</u> Mengenangaben für 2 Gele			<u>Sammelgel</u> Mengenangaben für 2 Gele
	10 %	12,5 %	20 %	
H ₂ O	10 ml	8,75 ml	5 ml	6,1 ml
Polyacrylamid (40%, 29:1)	5 ml	6,25 ml	10 ml	1,25 ml
1,5 M Tris, pH 8,6, 0,4 % SDS	5 ml	5 ml	5 ml	2,5 ml
10 % (w/v) APS	115 µl	115 µl	115 µl	100 µl
TEMED	30 µl	30 µl	30 µl	10 µl

2.5.11. Western Blot

Der Transfer aufgetrennter Zell-Lysate auf eine Nitrozellulose Membran erfolgte mit Hilfe eines *semi-dry* Transfergerätes (BioRad, Trans-Blot Turbo). Hierzu wurde zunächst ein dickes, zuvor kurz mit Transferpuffer angefeuchtetes Filterpapier auf den Boden des *Blotting*-Gerätes gelegt und Luftblasen entfernt. Auf dieses Filterpapier wurde dann die kurz mit Wasser und Transfer-Puffer befeuchtete Nitrozellulose Membran gelegt, auf welche dann das Gel gegeben wurde. Der Transfer erfolgte dann bei 20 V für 30 min. Um eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Geltaschen zu überprüfen, wurde eine Färbung des Gesamtproteins mittels SYPRO Ruby Färbung gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde die Membran zunächst für 10 min in einer Lösung aus 7% Methanol und 20 % Essigsäure inkubiert, viermal für 5 min mit ddH₂O gewaschen, und anschließend im Dunkeln für 10 min mit der SYPRO-Lösung inkubiert. Nach viermaligem Waschen der Membran (jeweils 1 min), konnte diese mit Hilfe des ChemiDoc™ *Imaging Systems* belichtet werden. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen und für 1 h mit einer Lösung aus 5 % BSA in TBS-T geblockt, um eine unspezifische Bindung von Antikörpern auf der Membran zu unterbinden. Anschließend erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers (**Tabelle 7**) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst gewaschen (3 x 10 min mit TBS-T) und anschließend für 1 h mit den entsprechenden HRP-gekoppelten sekundären (**Tabelle 8**) bei Raumtemperatur inkubiert. Daran folgten weitere Waschschrte (3 x 10 min mit TBS-T), die Detektion der Banden mit Hilfe des ChemiDoc™ *imaging systems* und die densitometrische Auswertung mittels ImageLab. Für die Detektion wurde das Pierce™ ECL Substrat verwendet.

2.5.12. Konfokale Mikroskopie

2.5.12.1. Färbung der TIMP-1 Rezeptoren

Zellen, welche für die konfokale Mikroskopie verwendet wurden, wurden wie in **Kapitel 2.4.4.5** beschrieben, mit Alexa⁵⁵⁵-TIMP-1 stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit 4% PFA Lösung für 10 min bei RT fixiert und durch Zugabe von 5 % Pferdeserum, gelöst in PBS, für eine Stunde bei RT blockiert. Bei der Färbung von CD74 wurden die Zellen vor der Blockierung zusätzlich für 10 min bei RT mit 0,5 % Triton X-100, gelöst in PBS, permeabilisiert. Nach der Inkubationszeit des *Blocking* Puffers wurden die Zellen mit dem entsprechenden Primärantikörpern (anti-CD74, anti-APP oder anti-APLP2, jeweils gelöst in *Blocking* Puffer) über Nacht bei 4 °C unter ständigem Schwanken der Platte inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Fluorophor-gekoppelten Sekundärantikörpern für 1 h bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach erfolgten erneut zwei Waschschrte mit PBS und die Resuspension der Zellpellets in 10 µl

Eindeckmedium. Die in Eindeckmedium resuspendierten Zellen wurden dann auf einen Objektträger übertragen und mit einem Glasplättchen abgedeckt.

2.5.12.3. Konfokale Mikroskopie

Die mikroskopischen Aufnahmen der gefärbten Zellen wurden mit Hilfe von Herrn Felix Bayerl (Institut für Molekulare Immunologie, TUM) mit Hilfe des TCS SP8 konfokalen Mikroskops, unter Verwendung des HC PL APO CORR CS2 63x/1.30NA Objektivs, aufgenommen.

2.5.12.4. Bearbeitung und Auswertung der konfokalen Aufnahmen

Die aufgenommenen konfokalen 3D-Bilder wurden durch adaptive Bild-Dekonvolution mit Hilfe des *Lightning* Tools prozessiert. Die Analyse und Bearbeitung der Bilder erfolgte dann mit Hilfe der Imaris 9.7. software (Bitplane), wobei hier die Intensitäten der einzelnen Marker an eine FMO-Kontrolle angepasst wurden. Das Imaris *Surface Generation Tool* wurde verwendet, um eine Rekonstruktion der 3D-Oberflächen der Zellen zu generieren.

2.6. *In silico* Analyse von Transkriptom Daten

Die *in silico* Analyse von Transkriptom-Daten wurden entweder durch Herrn Dr. Chris Hermann (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) oder Herrn Julian Frädlich (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) durchgeführt.

2.6.1. Analyse von publizierten immunzellspezifischen Transkriptionsdaten von Patienten

Zur Identifikation der TICS-Zytokine wurden schon publizierte RNA-Sequenzierungs-Datensätze von insgesamt 29 Immunzelltypen in der PBMC-Fraktion von gesunden Donoren verwendet (Monaco et al., 2019). Hierzu wurden die Daten von der *Gene Expression Omnibus* (GEO) Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>; accession no. GSE107011) heruntergeladen und die mittlere Expression jedes Zielgens für jeden einzelnen Immunzelltyp berechnet. Die Analysen wurden von Herrn Dr. Chris Hermann (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) durchgeführt.

2.6.2. Analyse von *bulk* Tumor Transkriptomdaten aus Patienten

Um TIMP-1 mit der mRNA Expression der TICS-Zytokine zu korrelieren, wurden publizierte *bulk*-Tumor Transkriptomdaten von Patienten mit invasivem Brustkrebs (BRCA), kolorektalem Adenokarzinom (COADREAD), Gliom (GBMLGG), Nierenkrebs (KIPAN), hepatozellulärem Leberkrebs (LIHC), Lungenadenokarzinom (LUAD), pankreatischem Adenokarzinom (PAAD), oder Hautkrebs (SKCM) von der *FireBrowse* Datenbank (<http://firebrowse.org>, accession no. BRCA,

COADREAD, GBMLGG, KIPAN, LIHC, LUAD, PAAD, oder SKCM) heruntergeladen. Hierbei wurden in jeder einzelnen Patienten-Kohorte nur die Daten aus Primärtumoren (*sample type code* '01, 'primary solid tumor') verwendet. Nur bei der SKCM Kohorte wurden zudem auch regionale subkutane Tumor in die Analyse miteinbezogen. Die Analysen wurden von Herrn Dr. Chris Hermann (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) durchgeführt.

2.6.3. Gene Set Enrichment Analyse (GSEA) von *bulk* Tumor Transkriptomdaten

Um eine Assoziation von TIMP-1 mit biologischen Prozessen in verschiedenen Tumorarten herzustellen, wurden publizierte *bulk*-Tumor Transkriptomdaten von Patienten mit invasivem Brustkrebs (BRCA), kolorekalem Adenokarzinom (COADREAD), Gliom (GBMLGG), Nierenkrebs (KIPAN), hepatozellulärem Leberkrebs (LIHC), Lungenadenokarzinom (LUAD), pankreatischem Adenokarzinom (PAAD), oder Hautkrebs (SKCM) von der *FireBrowse* Datenbank (<http://firebrowse.org>, accession no. BRCA, COADREAD, GBMLGG, KIPAN, LIHC, LUAD, PAAD, oder SKCM) heruntergeladen. Die Daten wurden in anhand der TIMP-1 mRNA Werte (mediane normalisierte TIMP-1 mRNA Expression) in die Gruppen mit einer hohen TIMP-1 Expression (TIMP-1^{HI}), bzw. einer niedrigen TIMP-1 Expression (TIMP-1^{LO}) eingeteilt und die relativen Veränderungen der Genexpressionen in diesen Gruppen berechnet und mittels Mann-Whitney U Test auf statistische Signifikanz überprüft. Signifikant veränderte Gene (p-Wert < 0,05) wurden dann (GSEA; version 4.2.3) über die log₂-Werte der relativen Veränderungen geordnet und unter Verwendung des Referenzdatensatzes *Gene Ontology Matrix* „*Biological Processes*“ (c5.go.bp.v2022.1.Hs.symbols.gmt) mittels GSEA (Permutationen: 1000; Ausschluss von Gensets <15 oder >500) ausgewertet. Die Analysen wurden von Herrn Julian Frädrieh (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) durchgeführt.

2.7. Statistische Analysen

Die statistische Analyse der Daten wurde stets mittels GraphPad (Version 9) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Vorliegen einer Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft. Falls eine Normalverteilung vorlag, wurden die Daten mittels t-test auf Signifikanz überprüft. Sollten mehrere Gruppen miteinander verglichen werden, wurde die Signifikanz mittels ANOVA-Test überprüft. Falls die Daten nicht normalverteilt waren, wurde ein Mann-Whitney-U Test für unabhängige Variablen verwendet. Die Bestimmung des *cut off*-Wertes für die Einteilung von PDAC Patienten in die Gruppen TIMP-1^{HI} und TIMP-1^{LO} wurde der Median der TIMP-1 Plasmaspiegel aller Patienten berechnet. Korrelationen zwischen nicht normalverteilten Gruppen wurden mittels Spearman-Korrelation bestimmt.

2.8. Kriterien und Vorgehensweisen bei der Darstellung von Interaktom-Diagrammen und prognostischen Parametern der TIMPs

Um einen Überblick über die Vielfalt an Interaktionspartnern, die Expressionsmuster und Expressionsmusteränderungen, sowie klinischen Assoziationen der vier TIMP Familienmitglieder zu erlangen, erfolgte eine umfangreiche Literaturrecherche und eine graphische Zusammenfassung der erlangten Erkenntnisse.

2.8.1. Kriterien zur Identifikation von bekannten TIMP Interaktionspartnern anhand von Literaturdaten

Um alle bekannten Interaktionspartner der TIMPs zu identifizieren, wurde nach experimentell beschriebenen Interaktionen der Moleküle in begutachteten Publikationen recherchiert. Hierbei wurde lediglich auf die Interaktionen fokussiert, die mittels Experimenten belegt und veröffentlicht wurden. Jedes Interaktom eines TIMPs wurde dabei mit den Interaktomen der anderen TIMP Moleküle verglichen (Eckfeld et al., 2019) (**Abbildung 4**). Hierbei konnten Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den TIMPs festgestellt und in einem 4-Mengen Venn-Diagramm wie folgt dargestellt werden:

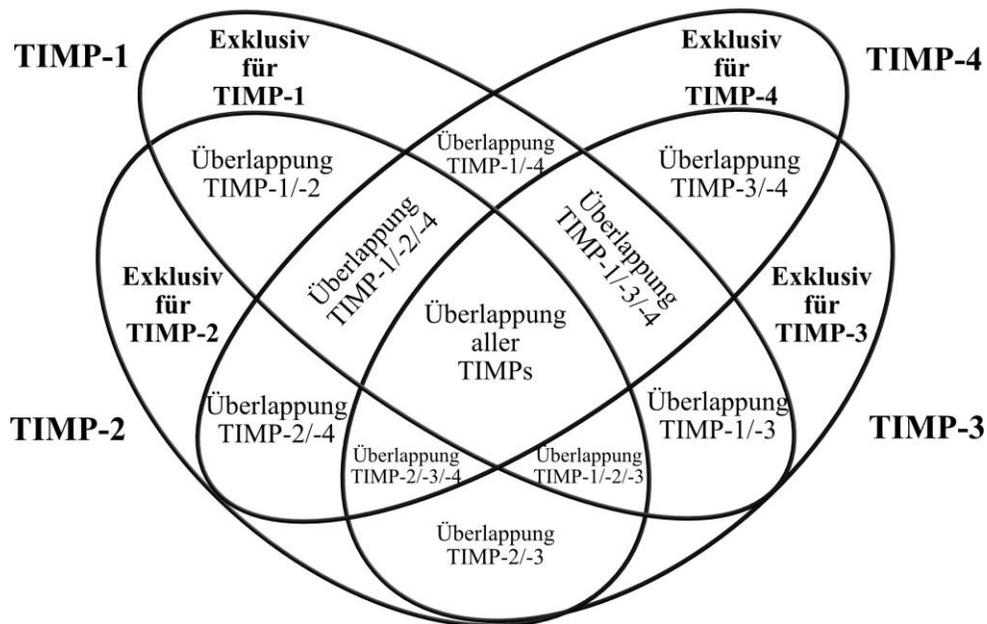


Abbildung 4 Zusammenfassung der TIMP Interaktome in einem Venn-Diagramm. Aus der Darstellung aller experimentell validierten Interaktionen der vier TIMP Moleküle können Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den Interaktionspartnern der TIMPs abgelesen werden.

2.8.2. Kriterien zur Zusammenfassung der basalen Expressionsspiegel, Expressionsveränderungen und prognostischen Werte der TIMPs

Um einzuschätzen, wie sich die Expression der vier Mitglieder der TIMP Familie hinsichtlich ihrer Expression und ihres prognostischen Wertes in verschiedenen Krebserkrankungen verhalten, wurde zunächst die basale Expression jedes TIMPs anhand publizierter Gewebe RNA-Expressionsdaten ermittelt, indem diese aus der Human Protein Atlas (HPA) Datenbank entnommen wurden (<https://www.proteinatlas.org>; (Uhlén et al., 2015)). Hierbei wurde die relative basale Expression des entsprechenden TIMPs in *Transcripts per million* (TPM) verwendet und, wie in der Legende angedeutet, in einen *Code* (z.B. ** entspricht 50 – 100 TPM) umgewandelt und in einer Tabelle für jede Tumorentität festgehalten (Eckfeld et al., 2019). Um zu bestimmen, wie sich die TIMPs hinsichtlich der Expressionsveränderungen bei Tumorpatienten verhalten, wurde in der Literatur nach beschriebenen Expressionsveränderungen recherchiert. Hierbei wurden sowohl Veränderungen auf Protein-Ebene (z.B. Immunhistochemie (IHC)-Färbungen, ELISA- oder *Western Blot*-Analysen) als auch RNA-Ebene (qRT-PCR-, oder RNA-Seq-Analysen) berücksichtigt. Weiterhin erfolgte hier eine Unterscheidung zwischen im Tumorgewebe gemessenen Expressionsveränderungen und im Blutplasma gemessenen Expressionsveränderungen. Ebenfalls wurde in der Literatur recherchiert, ob und inwiefern sich eine Expressionsveränderung des entsprechenden TIMPs auf die Prognose der Patienten auswirkt. Hierbei wurde ebenfalls zwischen im Gewebe oder im Plasma gemessenen Expressionen unterschieden (Eckfeld et al., 2019). Hinsichtlich der Einschätzung des prognostischen Wertes der TIMPs wurden sowohl Überlebensdaten, als auch beschriebene Aussagen über die Aggressivität, oder Rezidivraten der entsprechenden Tumorentität miteinbezogen. Alle erlangten Erkenntnisse wurden in Tabellen zusammengefasst, in denen die vier TIMPs einander gegenübergestellt wurden (Eckfeld et al., 2019).

3. ERGEBNISSE

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden bereits in einem *Review* (Eckfeld et al., 2019), in einem im Jahre 2021 veröffentlichten Artikel (Schoeps et al., 2021b), und in einem im Jahre 2023 veröffentlichten Artikel (Eckfeld et al., 2023) publiziert. Entsprechende Verweise sind jeweils in der Figur Legende gekennzeichnet.

3.1. Jedes TIMP besitzt ein einzigartiges Interaktom

Das Interktom eines Proteins beschreibt generell die Gesamtheit aller bekannten Wechselwirkungen mit anderen Molekülen und kann als Grundgerüst für ein besseres Verständnis der biologischen Funktionen eines multifunktionalen Moleküls dienen (Cusick et al., 2005; Vidal et al., 2011). Um einen Überblick über die Gesamtheit und Vielfalt aller bekannten Interaktionen des multifunktionalen Proteins TIMP-1 zu erlangen, wurde, basierend auf einer umfangreichen Literaturrecherche, eine graphische Darstellung des Interaktoms von TIMP-1 erstellt (**Abbildung 9**). Hierbei wurden nicht nur alle bekannten Interaktionspartner von TIMP-1 ermittelt, sondern diese weiterhin mit den Interaktomen der anderen TIMPs (TIMP-2, -3, und -4) verglichen.

Beim direkten Vergleich der Interaktome aller TIMPs zeigte sich, dass sowohl Gemeinsamkeiten (Überlappungen), als auch Unterschiede (partielle Überlappungen oder exklusive Interaktionspartner) zwischen den TIMPs festzustellen sind. Gemeinsamkeiten bezüglich der Interaktionspartner beziehen sich dabei vorwiegend auf MPs, die oft von allen oder mehreren TIMPs gebunden werden können (**Abbildung 5**) (Eckfeld et al., 2019). Beispielsweise überlappt TIMP-1 bezüglich aller bekannten MP-Interaktionen mit mindestens einem anderen TIMP Familienmitglied (**Abbildung 5**). Eine Ausnahme gilt für TIMP-3, den einzigen Vertreter der Familie, der mit den membranständigen Proteinasen ADAM-TS2 (Wang et al., 2006) und ADAM-TS5 (Kashiwagi et al., 2001) interagiert und TIMP-2, den einzigen Vertreter, der mit der Protease MT5-MMP interagieren kann (Paumier et al., 2019). Die größten Unterschiede zwischen den vier TIMP Interaktomen ließen sich bei Molekülen feststellen, die nicht zur Proteinase-Familie zählen, wie zum Beispiel Oberflächenmoleküle oder Bestandteile der EZM (**Abbildung 5**) (Eckfeld et al., 2019). Betrachtet man speziell das exklusive Interaktom von TIMP-1, fällt auf, dass zu den TIMP-1-spezifischen Interaktionen zahlreiche Rezeptoren oder Ko-Rezeptoren, wie zum Beispiel CD82 (Zhang et al., 2017), CD44 (Lambert et al., 2009), Integrin $\beta 1$ (Toricelli et al., 2013), Integrin $\alpha V\beta 3$ (Tsagaraki et al., 2010), und LRP1 (Thevenard et al., 2014) zählen, welche als mögliche Vermittler der zytokinischen Funktionen von TIMP-1 diskutiert werden (Grünwald et al., 2019). CD63, der bekannteste funktionelle Rezeptor für die zytokinische Funktion von TIMP-1 (Jung et al., 2006; Ries, 2014; Grünwald et al., 2019), wird zusätzlich von TIMP-4 gebunden (Rorive et al., 2010), wobei für diese Interaktion bisher keine Funktionalität gezeigt wurde.

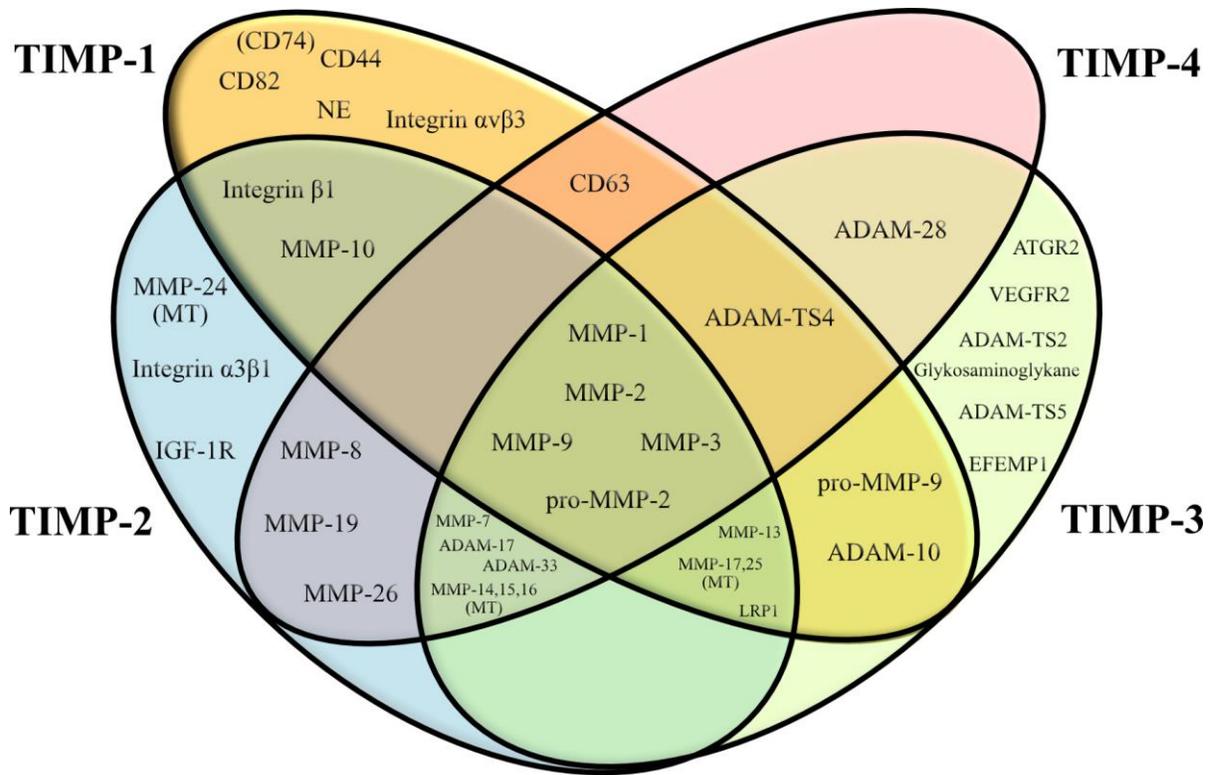


Abbildung 5 Das Interaktom der TIMPs. Darstellung aller experimentell validierten Interaktionspartner der TIMP Familie. TIMP-1, -2, -3 und -4 weisen teilweise gleiche Interaktionspartner, jedoch auch TIMP-spezifische, exklusive Interaktionspartner auf. Die Referenzen der dargestellten Interaktionen sind im Anhang aufgelistet. **Abkürzungen:** ADAM a disintegrin and metalloproteinase, ADAM-TS ADAM with thrombospondin motif, AGTR2 angiotensin II receptor type 2, EFEMP1 EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1, IGF-1R insulin-like growth factor 1 receptor, LRP1 low-density lipoprotein receptor-related protein 1, MMP Matrix Metalloproteinase, MT Membran-Typ, NE Neutrophile Elastase, VEGFR2 vascular endothelial growth factor receptor 2. Die Abbildung wurde dem veröffentlichten Review (Eckfeld et al., 2019) entnommen und adaptiert.

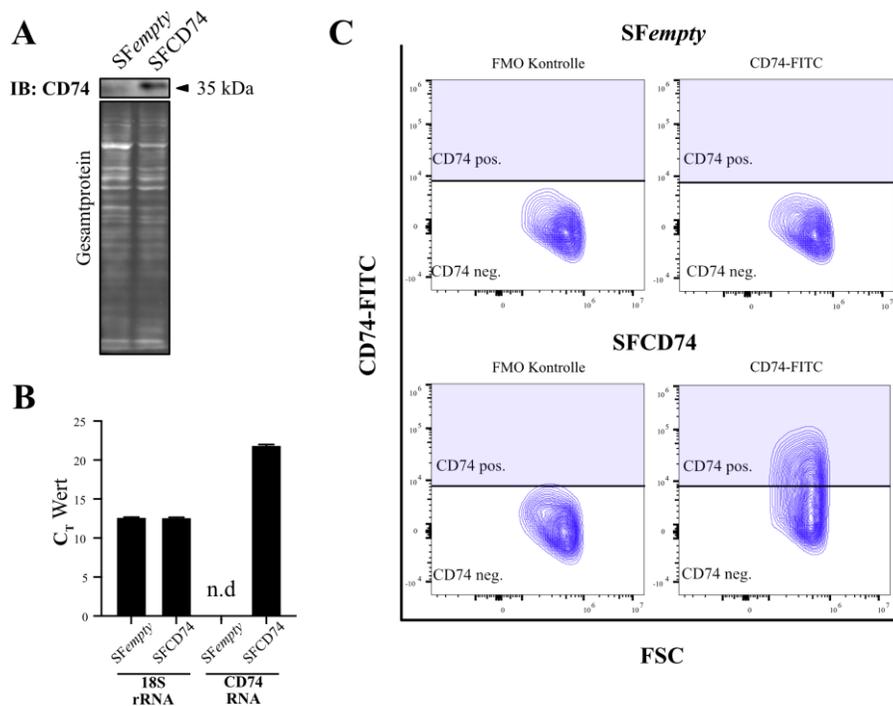
Da die zytokinische Signalwirkung von TIMP-1 im Vergleich zur anti-proteolytischen Funktion noch wenig erforscht ist, zielen aktuelle Untersuchungen zunehmend auf die Identifikation neuer Zytokinfunktion-vermittelnder Rezeptoren ab. Erste Hinweise auf eine potentielle Interaktion von TIMP-1 mit dem Rezeptor CD74 deuteten sich bereits sowohl aus der funktionellen Überlappung der Zytokine MIF und TIMP-1 an, die beide in der Lage sind, eine prämetastatische Nische in der Leber zu induzieren (Costa-Silva et al., 2015; Grünwald et al., 2016), als auch aus den ersten Andeutungen einer Interaktion von TIMP-1 mit CD74 in einem im Jahre 2015 publizierten *Abstract* (Moreira et al., 2015).

3.2. TIMP-1 interagiert mit dem Rezeptor CD74

Die Interaktion von TIMP-1 mit dem Rezeptor CD74 wurde nun experimentell überprüft, um eine mechanistische Grundlage für die Erforschung der Signalwirkung von TIMP-1 in Immunzellen zu schaffen. Hierzu wurden zum einen genetisch manipulierte hepatische Sternzellen (HSCs), als auch nicht genetisch manipulierte Immunzellen verwendet und die Interaktion von TIMP-1 mit CD74 mittels verschiedener biochemischer Methoden wie der Ko-Immünpräzipitation, der *Dot Blot* Analyse, sowie mittels konfokaler Mikroskopie überprüft (Schoeps et al., 2021b).

3.2.1. TIMP-1 interagiert mit CD74 in artifiziell CD74-überexprimierenden HSCs

In der hepatische Sternzelllinie LX2, welche selbst keine endogene CD74 Expression aufweist (*SFempty*, **Abbildung 6A, B**), wurde zunächst die Expression von CD74 durch eine Überexpression artifiziell erzeugt (*SFCD74*, **Abbildung 6A-C**), um diese Zelllinie für biochemische Interaktionsstudien zu nutzen. Die Überexpression von CD74 wurde mittels *Western Blot* (**Abbildung 6A**), quantitativer RT-PCR (**Abbildung 6B**), sowie Durchflusszytometrie überprüft und bestätigt (**Abbildung 6C**) (Schoeps et al., 2021b).



Figur 6 Nachweis der Überexpression von CD74 in LX2 Zellen. (A) Repräsentativer Western Blot der CD74 Spiegel in LX2 Kontrollzellen (*SFempty*) und CD74-überexprimierenden LX2 Zellen (*SFCD74*). (B) C_t -Werte der qRT-PCR Analyse von LX2 Kontrollzellen (*SFempty*) und CD74-über-exprimierenden LX2 Zellen (*SFCD74*). (C) Repräsentative Kontur-Diagramme der Oberflächenfärbung von CD74 in LX2 Kontrollzellen (*SFempty*, oben) und CD74-überexprimierenden LX2 Zellen (*SFCD74*, unten). Die Einteilung in CD74-negative und CD74-positive Zellen wurden anhand der FMO Kontrolle (links) vorgenommen. Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Schoeps et al., 2021b) entnommen.

ERGEBNISSE

Im Zuge einer Ko-Immunpräzipitation konnte dann mit Hilfe anti-TIMP-1 Antikörper-gekoppelter magnetischer *Beads* eine Ko-Präzipitation von TIMP-1 und CD74 nachgewiesen werden (**Abbildung 7A**). Weiterhin zeigten konfokale Aufnahmen von HSCs, die mit fluoreszenzmarkiertem TIMP-1 stimuliert wurden, dass TIMP-1 und CD74 in intakten Zellen ko-lokalisieren (**Abbildung 7B**).

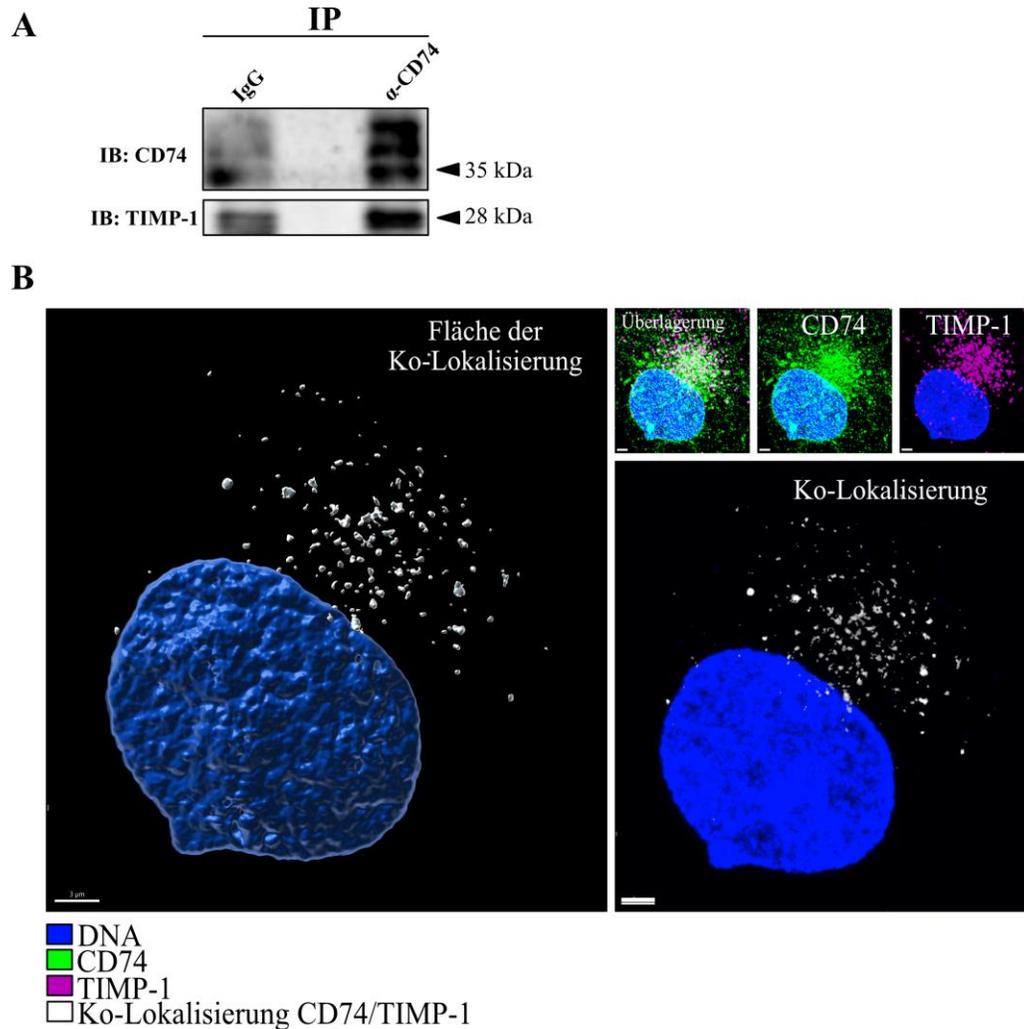
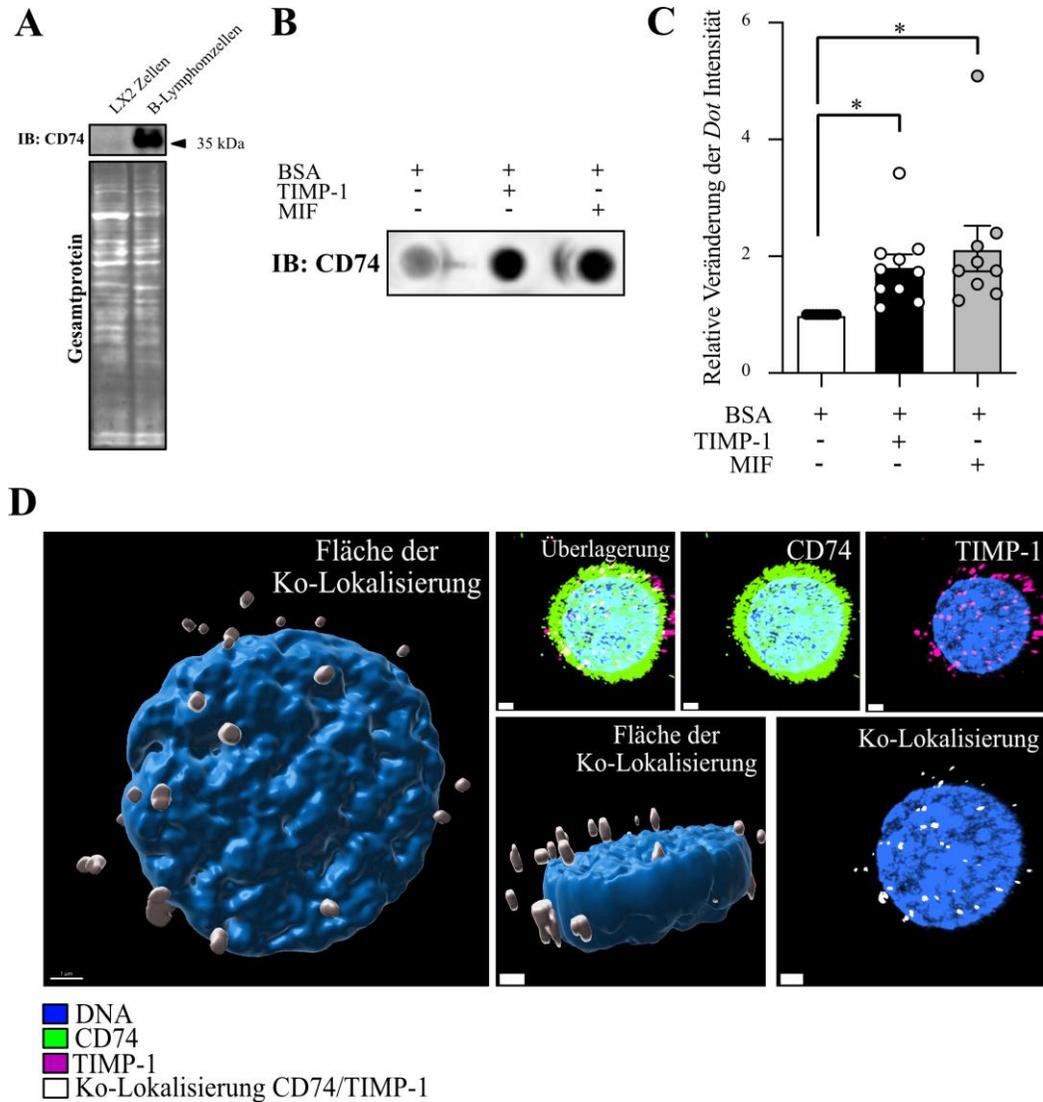


Abbildung 7 *TIMP-1 interagiert mit CD74 in CD74-überexprimierenden LX2 Zellen.* (A) Western Blot der Ko-Immunpräzipitation von TIMP-1 und CD74. (B) Repräsentative konfokale Aufnahmen von TIMP-1 Alexa555-stimulierten LX2 SFCD74 Zellen. Dargestellt sind jeweils die Einzelfärbungen und Überlagerungen von CD74 (grün) mit TIMP-1 (magenta). Die ermittelte ko-lokalisierende Fläche ist jeweils in weiß dargestellt. Das linke Panel zeigt eine Oberflächen-Visualisierung der rechts dargestellten Färbungen. Die Maßstabsbalken entsprechen 3 μm . Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Schoeps et al., 2021b) entnommen.

3.2.2. TIMP-1 interagiert mit CD74 in physiologisch CD74-exprimierenden B-Lymphomzellen

Neben des Interaktionsnachweises von TIMP-1 und CD74 in artifiziell CD74-überexprimierenden Zellen wurden weitere Interaktionsstudien mit physiologisch CD74-exprimierenden B-Lymphomzellen vorgenommen, die, im Vergleich zu LX2 Zellen, eine starke natürliche Expression von CD74 aufweisen (**Abbildung 8A**). Mit nicht-denaturierten Zelllysaten dieser Zellen wurden *Dot Blot* Analysen durchgeführt, die zeigen, dass CD74 aus dem Zelllysate signifikant mehr an TIMP-1-immobilisierte *Dots* bindet als an ungekoppelte Kontroll-*Dots* (**Abbildung 8B, C**). MIF, der bekannte physiologische Interaktionspartner von CD74 (Leng et al., 2003), wurde in diesem Experiment als positive Kontrolle verwendet und bewirkte ebenfalls eine Anreicherung des Rezeptors auf dem entsprechenden *Dot* (**Abbildung 8B, C**). Auch in B-Lymphomzellen konnte eine Ko-Lokalisierung von TIMP-1 mit CD74 mittels konfokaler Mikroskopie visualisiert werden (Schoeps et al., 2021b) (**Abbildung 8D**).

Insgesamt stellen die hier durchgeführten Experimente eine erste experimentelle Validierung der Interaktion von TIMP-1 mit CD74 dar. Die physiologische funktionelle Konsequenz dieser Interaktion in Form einer Aktivierung des Signalproteins ZAP-70 konnten wir in dem entsprechenden veröffentlichten Artikel (Schoeps et al., 2021b) zeigen.



Figur 8 *TIMP-1* bindet an *CD74* in physiologisch *CD74*-exprimierenden *B*-Lymphomzellen. (A) Repräsentativer Western Blot der *CD74* Spiegel in LX2 und *B*-Lymphomzellen. (B) Repräsentativer Dot Blot zur Überprüfung der Interaktion von *TIMP-1* mit *CD74*. (C) Quantifizierung der relativen Intensitäten des gebundenen *CD74* Proteins an ungekoppelte, *TIMP-1*- und *MIF*-gekoppelte Dots. Die Normierung erfolgte jeweils auf die ungekoppelte Kontrolle (*BSA*). (D) Repräsentative konfokale Aufnahmen von *TIMP-1*-Alexa555-stimulierten *B* Lymphomzellen Zellen. Dargestellt sind jeweils die Einzelfärbungen und Überlagerungen von *CD74* (grün) mit *TIMP-1* (magenta). Die ermittelte ko-lokalisierende Fläche ist jeweils in weiß dargestellt. Das linke und untere Panel zeigen eine Oberflächen-Visualisierung der rechts dargestellten Färbungen. Die Maßstabsbalken entsprechen 2 μ m. Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Schoeps et al., 2021b) entnommen. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$; ****, $P \leq 0,0001$, n.s., nicht signifikant.

3.3. Die Signalfunktion von TIMP-1 vermittelt eine pro-inflammatorische Stressantwort in Monozyten

Zusätzlich zur Verifizierung der Interaktion von TIMP-1 mit dem Rezeptor CD74 war ein weiterer wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit, eine neue Signalfunktion von TIMP-1 in Immunzellen zu identifizieren und diese mechanistisch durch die Identifikation des involvierten Oberflächenrezeptors zu charakterisieren. Basierend auf den bereits publizierten Erkenntnissen, dass TIMP-1 eine Hypoxie-ähnliche Stressantwort in Tumorzellen ausüben kann (Schelter et al., 2011; Cui et al., 2012), wurde nun untersucht, ob TIMP-1 eine solche Signalfunktion auch in Immunzellen ausübt. Als Modellsystem zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden Monozyten gewählt, da Monozyten ähnliche Adaptionsmechanismen an Hypoxie besitzen wie Tumorzellen und zudem eine tragende Rolle bei entzündungs-assoziierten Prozessen spielen (Ziegler-Heitbrock, 2007; Perides et al., 2011; Komura et al., 2015; Jafarzadeh et al., 2020), in denen auch TIMP-1 eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Prokopchuk et al., 2018; Hermann et al., 2021; Herr et al., 2021; Schoeps et al., 2021a).

3.3.1. TIMP-1 induziert einen Hypoxiestress-assoziierten Phänotyp in Monozyten

Um erste Hinweise für eine potentielle TIMP-1-induzierte Stressantwort in Monozyten zu erhalten, wurde ein Zellstress-Array durchgeführt, der die Analyse einer Veränderung von Zellstress-assoziierten Proteinen in TIMP-1-stimulierten Zellen erlaubt. Hierbei wurden einige Stress-assoziierte Proteine identifiziert, die durch die Stimulation von primären humanen Monozyten mit rekombinantem humanen TIMP-1 induziert wurden (**Abbildung 9A**). Die Proteine NF κ B (D'Ignazio und Rocha, 2016), HIF-1 α (Wang et al., 1995), p21/CIP (Kaija et al., 2012), Carboanhydrase IX (Potter und Harris, 2004), Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Schmedtje et al., 1997), und das Hitzeschockprotein 70 (HSP70) (Benjamin et al., 1990) stellen dabei Proteine dar, deren intrazelluläre Spiegel typischerweise auch durch hypoxischen Stress hochreguliert werden (**Abbildung 9A**, graue und schwarze Balken). Die Anreicherungen der Proteine HIF-1 α und die Phosphorylierung der MAP Kinase p38 (**Abbildung 9A**, schwarze Balken) wurden mittels *Western Blot* Analyse weiterhin in Zelllysaten TIMP-1-stimulierter primärer Monozyten verifiziert und quantifiziert (**Abbildung 9B, C**). Dass der TIMP-1-vermittelte Effekt auf Monozyten den Effekt von Hypoxie nachahmt, zeigte sich deutlich durch den direkten Vergleich TIMP-1-stimulierter Proteinlysate mit Proteinlysaten aus Monozyten, die einer hypoxischen Umgebung mit einer Sauerstoffverfügbarkeit von 1% ausgesetzt wurden und dadurch ebenfalls eine starke Induktion der betreffenden Proteine zeigten (**Abbildung 9B, C**). Da eine Umstellung der metabolischen Eigenschaften in Richtung eines glykolytischen Phänotyps ein typisches Merkmal der hypoxischen Stress-Antwort von Monozyten darstellt (Mantovani et al., 2004), und sowohl durch P-p38 (Sozen et al., 2015), als auch HIF-1 α (Nagao et al., 2019) gefördert wird, wurde zudem die Fähigkeit der TIMP-1-stimulierten Zellen zur Aufnahme extrazellulär zugegebener Glukose untersucht. Hierbei zeigte

sich, dass sowohl TIMP-1, als auch die positive Kontrolle Hypoxie, die Aufnahme von Glukose in Monozyten steigert (Abbildung 9D).

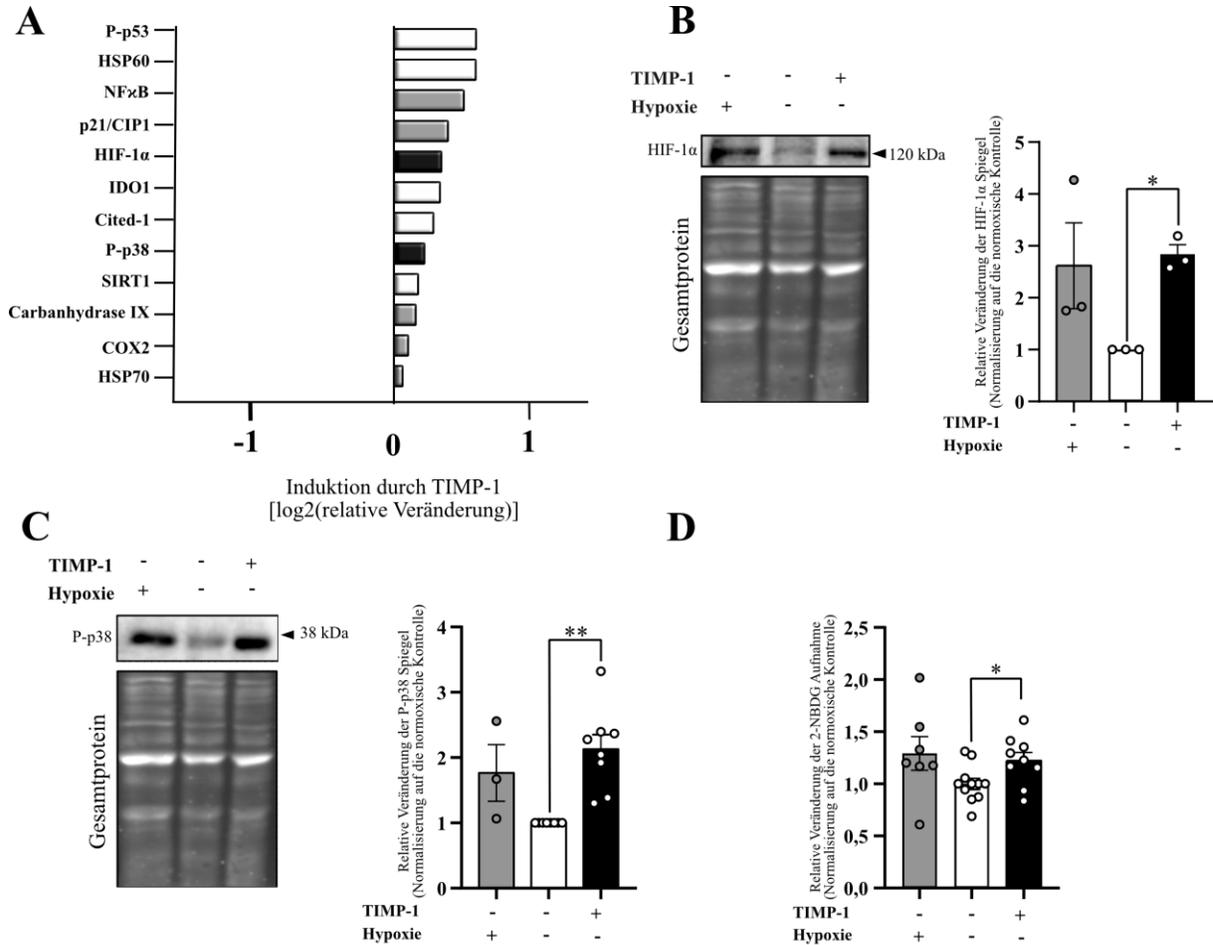
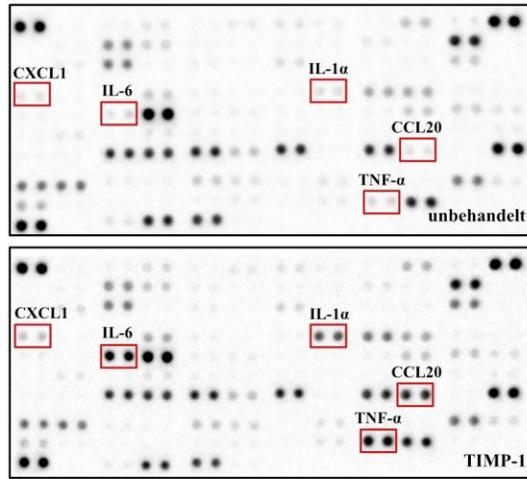


Abbildung 9 TIMP-1 induziert einen Hypoxiestress-assoziierten Phänotyp in Monozyten. (A) Ergebnisse des Zellstress-Arrays. Durch Hypoxie induzierbare Proteine sind in grau, die in weiteren Experimenten untersuchten Proteine in schwarz eingefärbt. (B, C) Repräsentative Western Blots der Spiegel von HIF-1α (A) und P-p38 (B) in primären Monozyten, die entweder unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, oder mit TIMP-1 stimuliert wurden. Die relativen Veränderungen wurden quantitativ durch die densitometrische Auswertung der Bandenintensität aus mehreren biologischen Replikaten berechnet (rechts). (D) Quantifizierung der Glukoseaufnahme nach Kultivierung von primären humanen Monozyten in Hypoxie oder nach der Stimulation mit TIMP-1. Dargestellt ist jeweils die relative Veränderung des geometrischen Mittels des 2-NBDG Signals, die Normalisierung erfolgte auf die entsprechende unbehandelte Kontrolle. Zur statistischen Auswertung wurde ein one-sample t-test zum Referenzwert 1 durchgeführt. Das verwendete biologische Material aus (B) und (C) stammt jeweils aus mindestens zwei gesunden Spendern, die Anzahl der biologischen Replikate betrug jeweils mindestens 3. Die Daten wurden teilweise der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen und sind hier in einer modifizierten Form dargestellt. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$; ****, $P \leq 0,0001$, n.s., nicht signifikant.

3.3.2. TIMP-1 erhöht die Spiegel von pro-inflammatorischen Zytokinen in Monozyten

Da mit einer hypoxischen Stress-Antwort typischerweise eine Aktivierung von Monozyten einhergeht (Bosco et al., 2008), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die Stimulation primärer humaner Monozyten mit TIMP-1 zur einer Veränderung der intrazellulären Spiegel von Zytokinen bewirkt. In einem Zytokin-*Array* konnten zahlreiche pro-inflammatorische Zytokine identifiziert werden, die durch TIMP-1 induziert wurden (**Abbildung 10A, B**). Um die Wirkung von TIMP-1 auf die Veränderung dieser pro-inflammatorischen Faktoren durch weitere Methoden zu validieren, wurden zunächst die Zytokine ausgewählt, die sowohl durch TIMP-1 induziert wurden, als auch *in vivo* vorwiegend von Monozyten (und nicht von anderen Immunzellen) exprimiert werden. Um diese Zytokine auszuwählen, wurde ein publizierter Datensatz (Monaco et al., 2019) herangezogen, welchem die Expressionsspiegel der zehn am stärksten durch TIMP-1 induzierten Zytokine in verschiedenen Immunzelltypen entnommen wurden (**Abbildung 10C**). Hierbei wurden die Zytokine IL-6, TNF- α , IL-1 α , CXCL1 und CCL20 als TIMP-1-induzierte und vorwiegend von Monozyten exprimierte Zytokine ausgewählt und nachfolgend als TIMP-1-induzierte Zytokin-Signatur (*TIMP-1-induced cytokine signature*, abgekürzt „TICS“) bezeichnet. Der Effekt verschiedener TIMP-1 Konzentrationen auf die intrazellulären Spiegel der TICS Zytokine wurde mittels intrazellulärer Zytokin-Färbung und anschließender Durchflusszytometrie quantifiziert (**Abbildung 10D-H**). Hierbei stellte sich die Konzentration von 500 ng/ml TIMP-1, welche patho-physiologischen Plasmaspiegeln von TIMP-1 entspricht (Grünwald et al., 2016), als die Dosis an TIMP-1 heraus, die die robustesten und signifikantesten Effekte erzielte. Zusätzlich zur Durchflusszytometrie-basierten Validierung der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine durch TIMP-1 konnte eine Erhöhung der Protein-Spiegel dieser Zytokine mittels *Western Blot* gezeigt werden (**Abbildung 10I-M**).

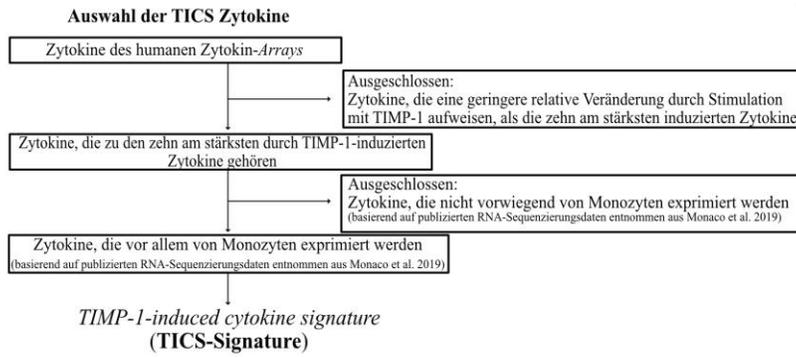
A



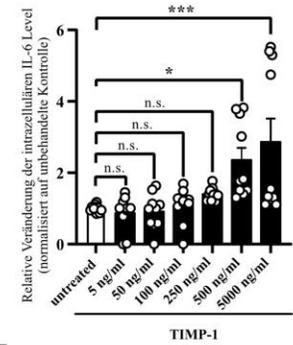
B

Gene	log2(relative Veränderung)	Kategorie
IL-6	3.48	hochreguliert
TNF- α	3.20	
CCL20	2.84	
IL-1 α	2.36	
IL-3	2.18	
GM-CSF	1.42	
Adiponectin	1.32	
CXCL1	1.07	
EGF	1.06	
IGFBP-2	0.80	
ENA-78	0.60	
IL-1 β	0.60	
IL-5	-0.51	herunterreguliert
IL-23	-0.52	
ST2	-0.56	
TFF3	-0.65	
Vitamin D BP	-0.69	
Serpin E1	-0.77	
CD30	-0.86	
MIG	-1.16	
TARC	-1.17	

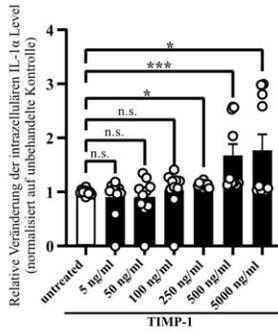
C



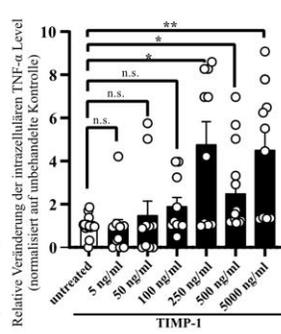
D



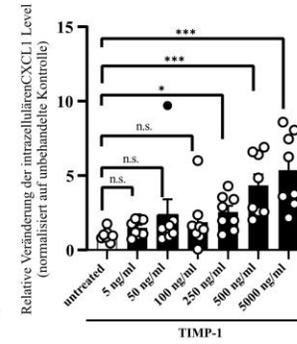
E



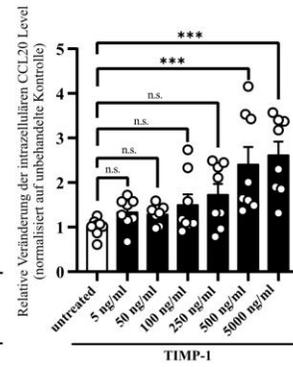
F



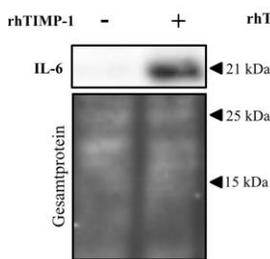
G



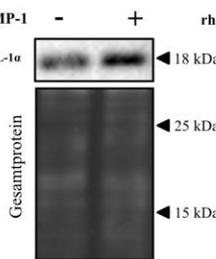
H



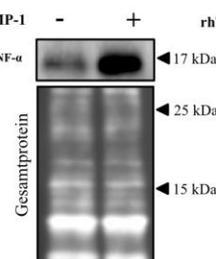
I



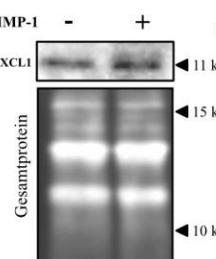
J



K



L



M

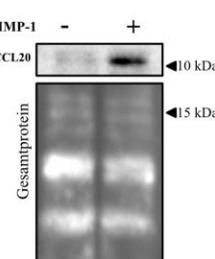


Abbildung 10 TIMP-1 induziert pro-inflammatorische Zytokine in primären humanen Monozyten. (A) Membranen des Zellstress-Arrays aus unbehandelten (oben) und TIMP-1-behandelten (unten) primären humanen Monozyten. (B) Quantifizierung der relativen Veränderungen der Dot-Intensitäten der Zytokine des Arrays. Dargestellt ist jeweils der \log_2 -Wert der relativen Veränderung der Intensitäten bedingt durch die TIMP-1-Behandlung. Hochregulierte Zytokine sind in rot, herunterregulierte Zytokine sind in blau eingefärbt. (C) Beschreibung des Vorgehens bei der Auswahl der TICS-Zytokine. (D - H) Quantifizierungen des geometrischen Mittels der Zytokine IL-6 (D), TNF- α (E), IL-1 α (F), CXCL-1 (G), und CCL-20 (H). Das verwendete biologische Material aus (D-H) stammt jeweils aus mindestens zwei gesunden Spendern, die Anzahl der biologischen Replikate betrug $n=10$. Dargestellt ist jeweils die relative Veränderung des geometrischen Mittels der Zytokine normalisiert auf die entsprechende unbehandelte Kontrolle. (I-M) Western Blots der Zytokine IL-6 (I), TNF- α (J), IL-1 α (K), CXCL-1 (L), und CCL-20 (M). Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-test im Fall einer Normalverteilung der Daten oder durch einen Mann-Whitney-U Test, falls keine Normalverteilung vorlag. Statistische Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen (D-H) wurden mittels One-Way ANOVA Dunnet Test für multiple Vergleiche zwischen jeder Gruppe und einer Kontrolle durchgeführt. Die Daten wurden der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen und sind hier in modifizierter Form dargestellt. Die Daten sind jeweils als Mittelwert \pm SEM dargestellt. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$; ****, $P \leq 0,0001$, n.s., nicht signifikant.

3.3.3. Die pro-inflammatorische Wirkung von TIMP-1 auf Monozyten erfordert die Anwesenheit der C-terminalen Domäne des Proteins

TIMP-1 kann in eine N-terminale, sowie eine C-terminale Domäne unterteilt werden, wobei die N-terminale Domäne fast ausschließlich für die Inhibition von MPs verantwortlich ist, und die C-terminale Domäne vorwiegend die zytokinische Funktion von TIMP-1 vermittelt (Grünwald et al., 2019). Um herauszufinden, welche dieser beiden Domänen an der TIMP-1-vermittelten pro-inflammatorischen Wirkung beteiligt ist, wurde die isolierte rekombinante N-terminale Domäne von TIMP-1 (N-TIMP-1), die sich zu einer stabilen Proteinstruktur mit erhaltener anti-proteolytischer Aktivität faltet (Murphy et al., 1991), verwendet. Primäre humane Monozyten wurden hierzu mit N-TIMP-1 stimuliert und sowohl deren Fähigkeit zur Aufnahme von Glukose, als auch zur Produktion von Zytokinen getestet. Es zeigte sich hierbei, dass durch N-TIMP-1 weder eine verstärkte Glukoseaufnahme induziert werden konnte (**Abbildung 11**), welche bei der Verwendung des Vollängen-Proteins zu beobachten war (**Abbildung 9**), noch ein Einfluss dieser Variante auf die intrazellulären Spiegel von IL-6 zu detektieren war (**Abbildung 11**). Dies impliziert, dass die Anwesenheit der C-terminalen Domäne erforderlich für die Vermittlung der pro-inflammatorischen Wirkung von TIMP-1 ist und diese Effekte eine neue Signalfunktion von TIMP-1 darstellen.

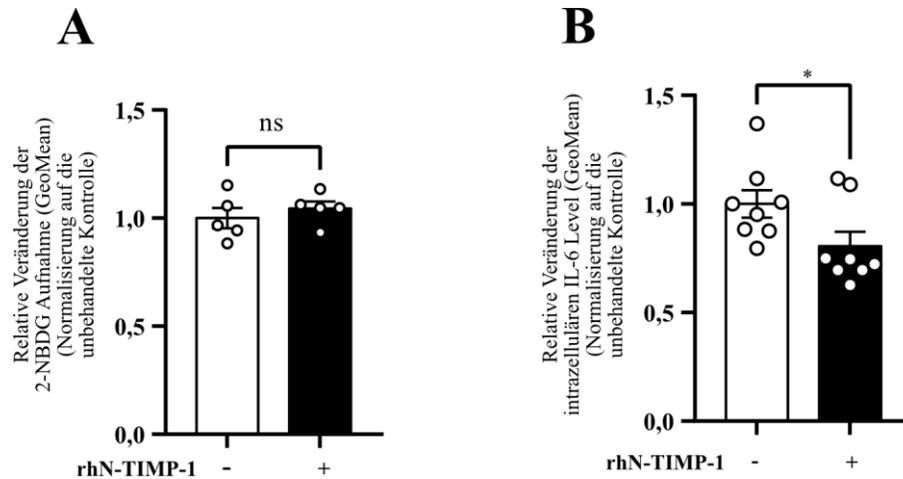


Abbildung 11 Die C-terminale Domäne von TIMP-1 ist nötig für die pro-inflammatorische Wirkung von TIMP-1. (A) Quantifizierung der Glukoseaufnahme in primären Monozyten nach Stimulation mit N-TIMP-1. Dargestellt ist jeweils die relative Veränderung des geometrischen Mittels des 2-NBDG Signals, normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. (B) Quantifizierung der intrazellulären Zytokinspiegel von IL-6 in primären Monozyten, die mit N-TIMP-1 stimuliert wurden. Dargestellt ist jeweils die relative Veränderung des geometrischen Mittels von IL-6 normalisiert auf die unbehandelte Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-test, falls Normalverteilung der Daten vorlag oder durch einen Mann-Whitney-U Test, falls keine Normalverteilung vorlag. Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; *, $P \leq 0,001$; ****, $P \leq 0,0001$, n.s., nicht signifikant.**

3.3.4. Die Monozyten-aktivierende Signalfunktion von TIMP-1 wird durch das *Amyloid Precursor Protein* vermittelt

Da eine neue Signalfunktion von TIMP-1 in Form einer pro-inflammatorischen Aktivierung von Monozyten entdeckt wurde, wurde im folgenden Schritt der in diesem Prozess involvierte Rezeptor identifiziert und charakterisiert. Hierzu wurde sowohl eine unvoreingenommene Analyse durchgeführt, die die Entdeckung neuer Oberflächenrezeptoren definierter Liganden erlaubt, als auch eine biochemische Validierung der identifizierten Interaktionen mittels *Pull Down Assay* und konfokaler Mikroskopie vorgenommen.

3.3.4.1 APPs sind neue Interaktionspartner von TIMP-1

Zur Identifikation neuer Oberflächenrezeptoren von TIMP-1 wurde zunächst ein unvoreingenommenes LRC-TriCEPS Experiment (Dualsystems Biotech, Schlieren, Schweiz) in B-Lymphomzellen durchgeführt, das die Analyse von neuen Oberflächenrezeptoren in lebenden Zellen ermöglicht. Da diese Methode einen direkten Vergleich des Liganden von Interesse (TIMP-1) mit zwei Vergleichsliganden erfordert, wurde die Analyse zusätzlich mit der Positivkontrolle Transferrin, sowie der Negativkontrolle BSA durchgeführt. Es zeigte sich hierbei, dass im Vergleich zu beiden Kontroll-Liganden (BSA und Transferrin, **Abbildung 12B**), eine signifikante Anreicherung der Proteine APP und APLP2 in TIMP-1-TriCEPS-behandelten Zelllysaten zu detektieren war (**Abbildung 12B – E**). Dies offenbart APP und APLP2 als neue Kandidat-Rezeptoren für TIMP-1.

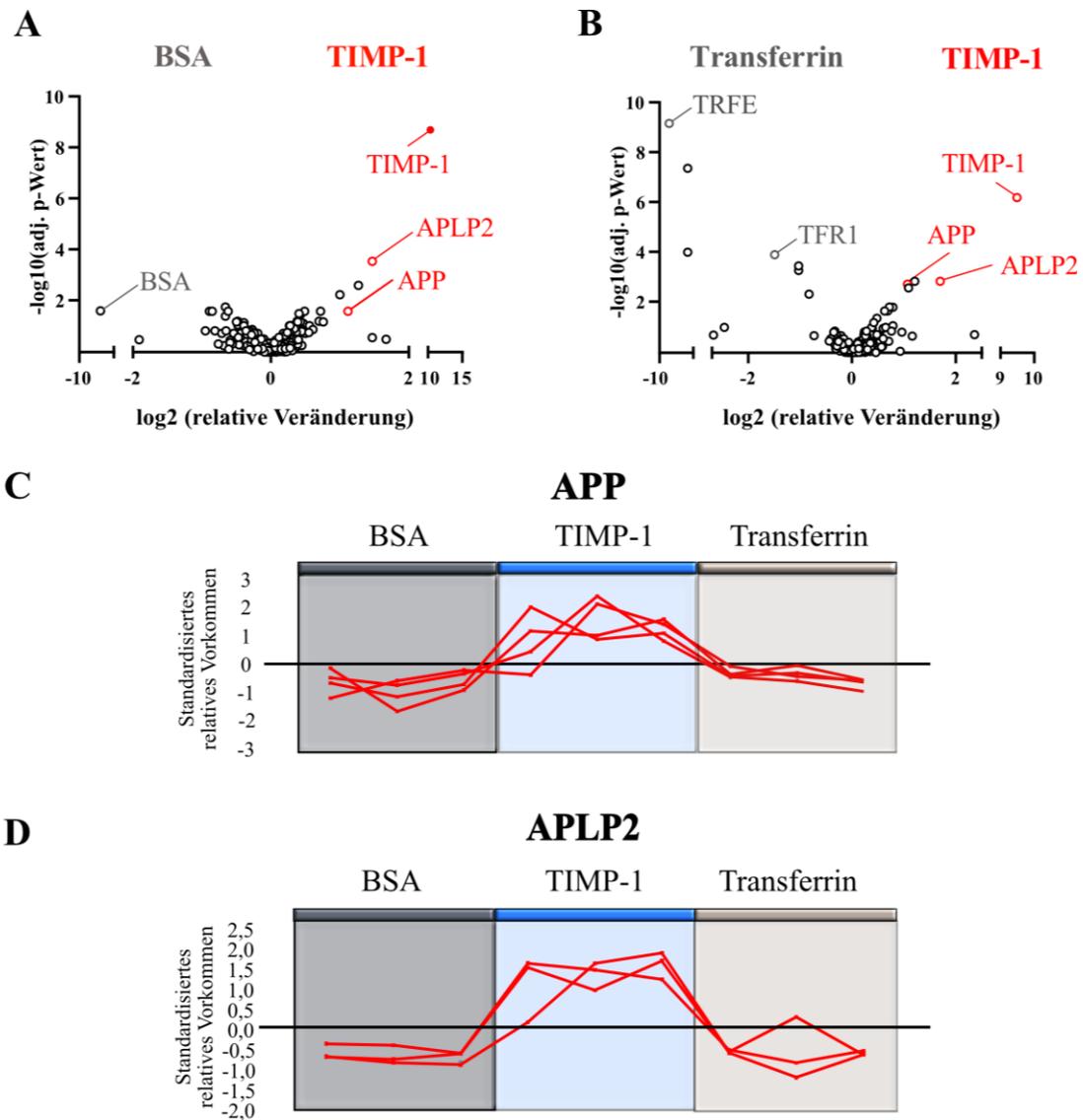
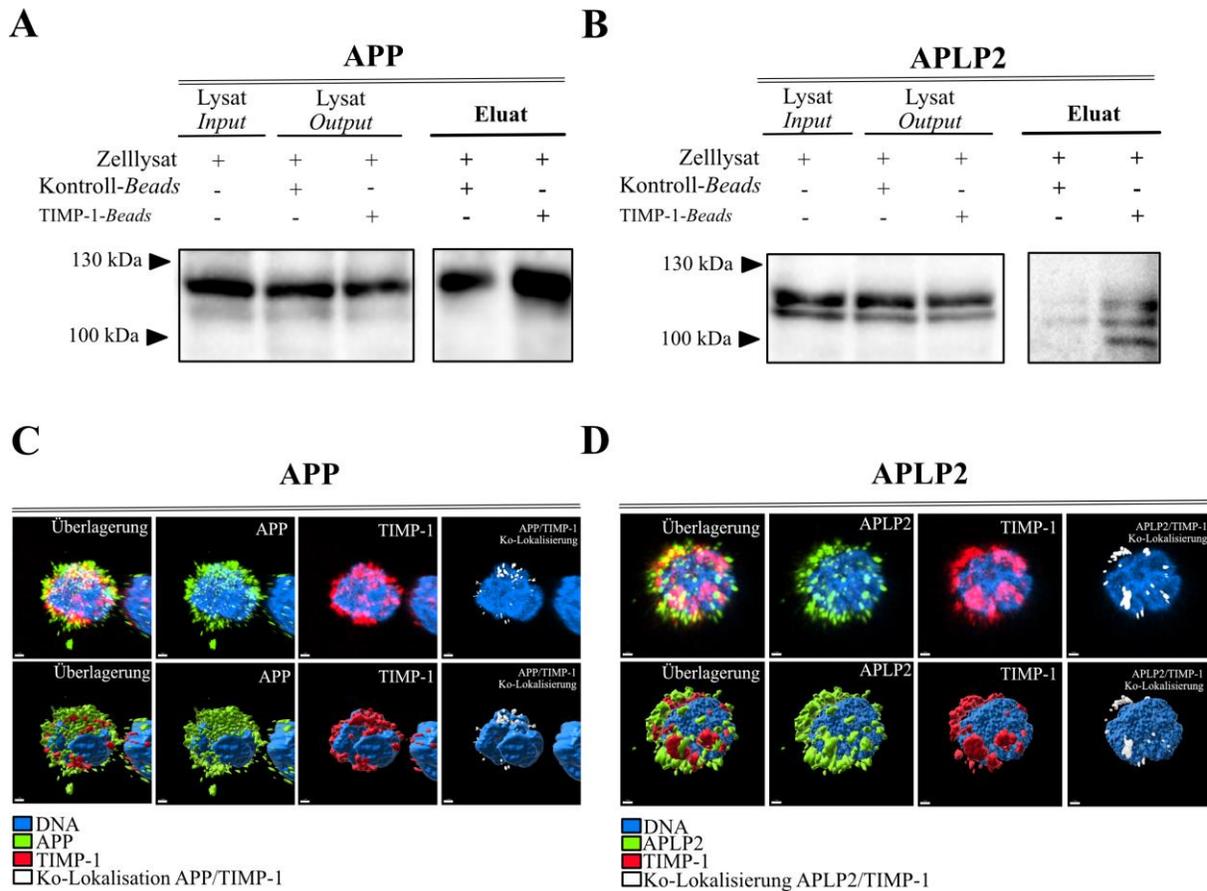


Abbildung 12 TIMP-1 bindet an Amyloid Precursor Proteine. (A, B) Volcano Plots der angereicherten, mittels LC-MS/MS identifizierten Moleküle in Zelllysaten aus TIMP-1-TriCEPs-behandelten B-Lymphomzellen relativ zu den Vergleichsliganden BSA (A) und Transferrin (B). Dargestellt ist jeweils der $-\log_{10}$ -Wert des p -wertes (Y-Achse), sowie der \log_2 -Wert der relativen Veränderung der Proteine in den entsprechenden Zelllysaten (X-Achse). (C, D) Peptid-Anreicherungs-Diagramme der Kandidat-Rezeptoren APP und APLP2. Dargestellt ist jeweils das standardisierte Vorkommen der identifizierten Peptide von APP (C) und APLP2 (D) in BSA-, TIMP-1- und Transferrin-TriCEPS-behandelten Zellen. Die TriCEPS-Analyse wurde mit insgesamt drei biologischen Stimulationen durchgeführt. Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen.

ERGEBNISSE

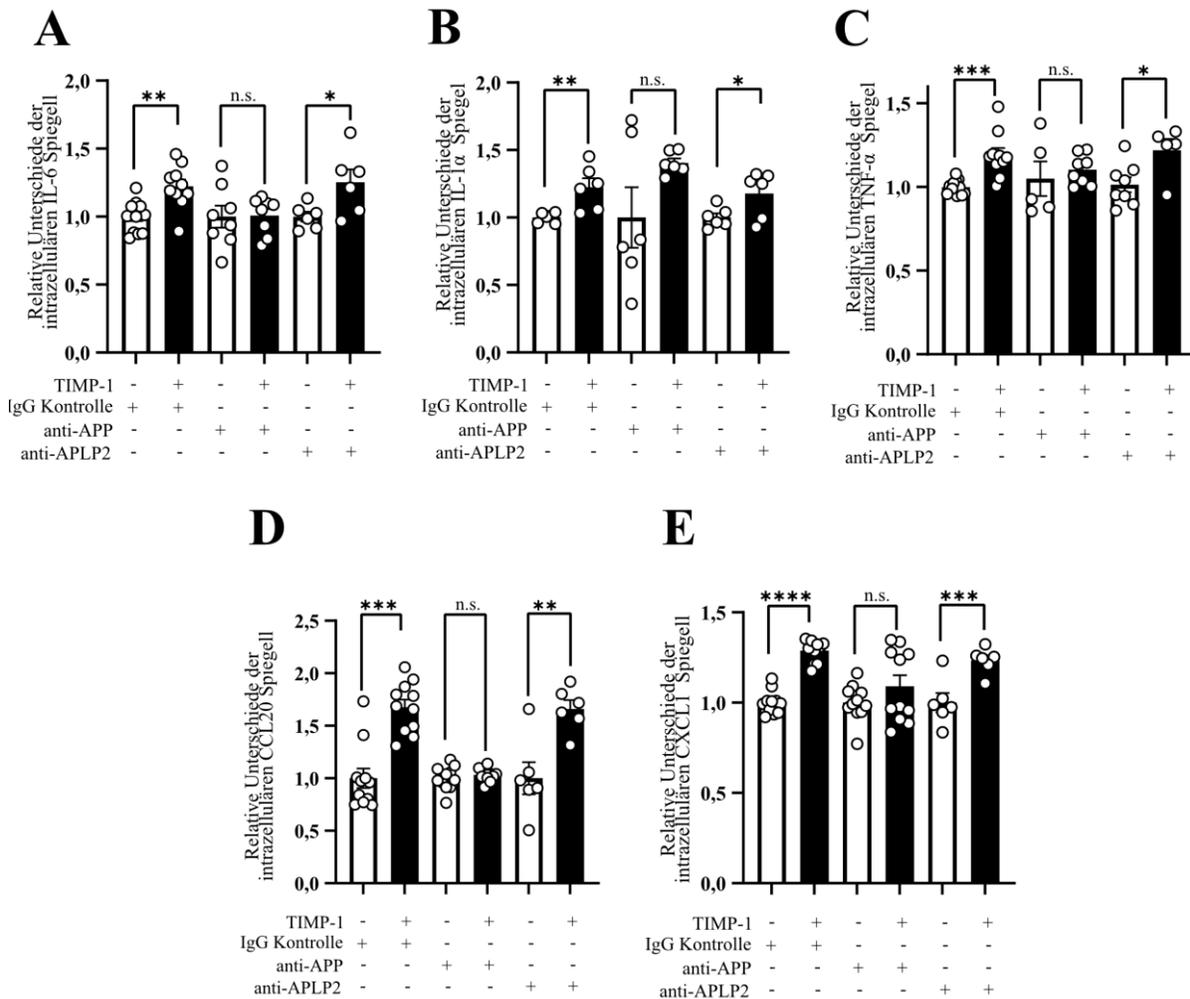
Die im TriCEPs-Experiment identifizierten Kandidat-Rezeptoren von TIMP-1 wurden nun durch weitere Methoden in verschiedenen Zelltypen als Interaktionspartner von TIMP-1 validiert. Hierzu wurde einerseits ein *Pull Down Assay* mit Zelllysaten aus APP- und APLP2-exprimierenden neuronalen Zellen (SH-SY5Y) durchgeführt, die eine hohe Expression der Rezeptoren aufweisen. Mittels magnetischer TIMP-1-konjugierter *Beads* konnte im Vergleich zu ungekoppelten Kontroll-*Beads* eine deutliche Anreicherung von APP (**Abbildung 13A**) und APLP2 (**Abbildung 13B**) in den Eluat-Fractionen detektiert werden. Zudem zeigte sich in konfokalen Aufnahmen, dass APP (**Abbildung 13C**) und APLP2 (**Abbildung 13D**) mit fluoreszenzmarkiertem TIMP-1 in primären Monozyten ko-lokalisieren.



Figur 13 Validierung der Interaktion von TIMP-1 mit APP und APLP2. (A, B) Western Blots der Pull-Down Assays von APP (A) und APLP2 (B). (C, D) Repräsentative konfokale Aufnahmen von TIMP-1 Alexa555-stimulierten primären humanen Monozyten. Dargestellt sind jeweils die Einzelfärbungen und Überlagerungen von APP (C, grün, oben) mit TIMP-1 (rot, oben), bzw. APLP2 (D, grün, oben) und TIMP-1 (rot, oben). Die ermittelte ko-lokalisierende Fläche ist jeweils in weiß dargestellt. Das untere Panel zeigt eine Oberflächen-Visualisierung der im oberen Panel dargestellten Färbungen. Die Maßstabsbalken entsprechen jeweils 1 μ m. Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen.

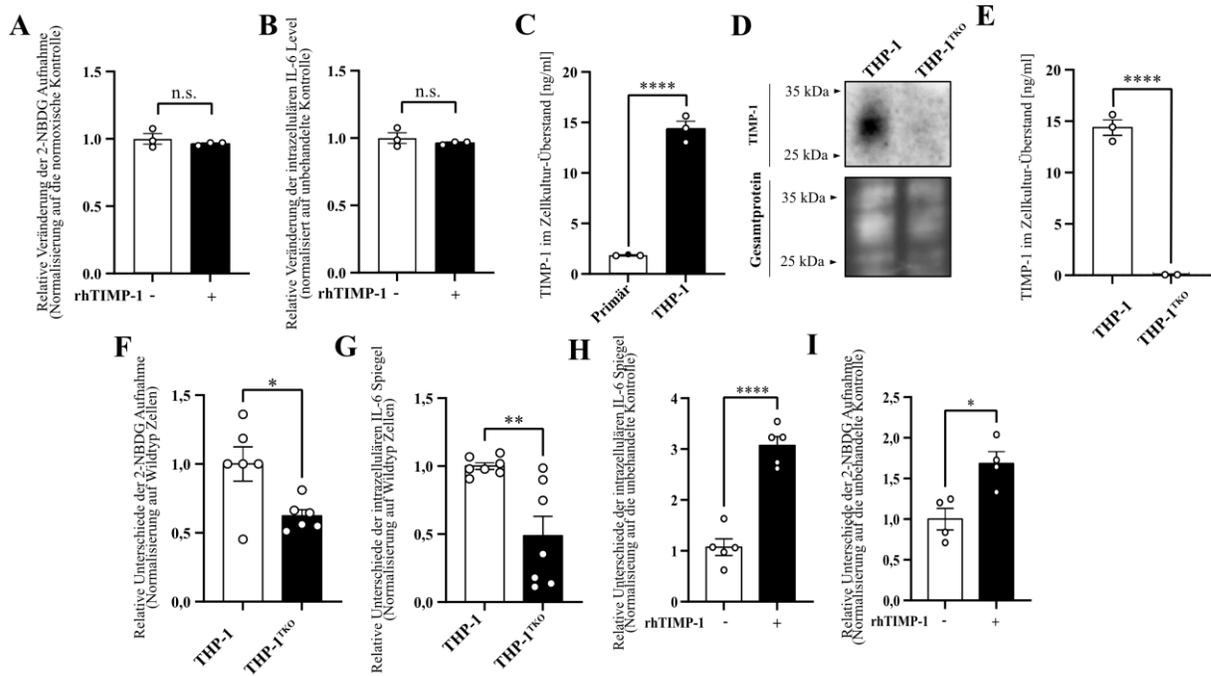
3.3.4.2. Der pro-inflammatorische Effekt von TIMP-1 auf Monozyten wird über APP vermittelt

Da APPs, insbesondere APP, als pro-inflammatorische Rezeptoren auf Monozyten diskutiert werden (Sondag und Combs, 2004; Sondag und Combs, 2006), und TIMP-1 sowohl eine pro-inflammatorische Aktivierung von Monozyten induziert (**Abbildung 10**), als auch als neuer Ligand von APP und APLP2 identifiziert wurde (**Abbildungen 12, 13**), wurde nun untersucht, ob die Interaktion von TIMP-1 mit APP und/oder APLP2 die Aktivierung von Monozyten vermittelt. Hierzu wurden primäre humane Monozyten mit anti-APP, bzw. anti-APLP2 Antikörpern behandelt, bevor diese mit TIMP-1 stimuliert wurden, um die Interaktion von TIMP-1 mit dem entsprechenden Rezeptor zu blockieren. Eine Messung der Spiegel der TICS-Zytokine zeigte, dass die Interferenz mit APP, aber nicht mit APLP2, die TIMP-1-vermittelte Induktion dieser Zytokine abschwächte (**Abbildung 14**). Diese Daten weisen darauf hin, dass APP, jedoch nicht APLP2, der funktionelle Rezeptor für die neue Monozyten-aktivierende Signalfunktion von TIMP-1 ist.



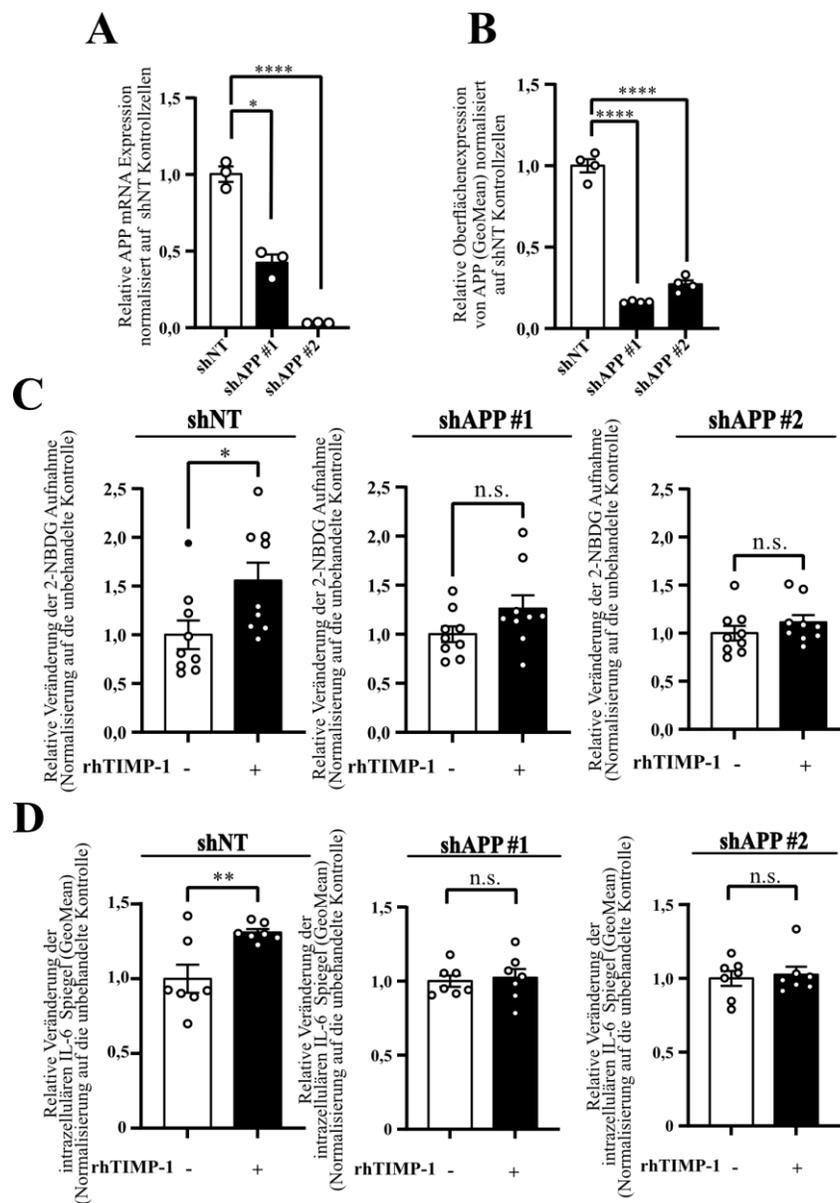
Figur 14 Analyse der APP- und APLP2-Abhängigkeit der pro-inflammatorischen Wirkung von TIMP-1 auf Monozyten. (A-E) Quantifizierungen der geometrischen Mittel der Zytokine IL-6 (A), TNF- α (B), IL-1 α (C), CCL-20 (D), und CXCL-1 (E) in primären humanen Monozyten nach Vor-inkubation mit IgG-Kontrollantikörpern oder anti-APP, bzw. anti-APLP2 Antikörpern. Das verwendete biologische Material stammt jeweils aus mindestens zwei gesunden Spendern, die Anzahl der biologischen Replikate betrug jeweils mindestens $n=6$. Dargestellt ist die relative Veränderung (Mittelwert \pm SEM) des geometrischen Mittels der entsprechenden Zytokine normalisiert auf die entsprechende unbehandelte Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t -test im Falle einer Normalverteilung der Daten oder durch einen Mann-Whitney-U Test, falls keine Normalverteilung vorlag. Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$; ****, $P \leq 0,0001$, n.s., nicht signifikant.

Die durch Antikörper-Interferenz-Versuche demonstrierte Abhängigkeit der TIMP-1-vermittelten Monozyten-Aktivierung von dem neu identifizierten Rezeptor APP wurde nun weiterhin in der genetisch manipulierbaren monozytären Zelllinie THP-1 validiert. Zunächst wurde hierbei die Eignung von THP-1 Zellen als Modellsystem für die Untersuchung TIMP-1-vermittelter Effekte auf Monozyten überprüft, indem die in primären Monozyten induzierbaren Effekte auf die Zytokinproduktion, sowie auf die Glukoseaufnahme reproduziert werden sollten. Die Stimulation von THP-1 Zellen mit TIMP-1 konnte weder eine verstärkte Aufnahme von Glukose (**Abbildung 15A**), noch eine gesteigerte Produktion von IL-6 (**Abbildung 15B**) induzieren. THP-1 Zellen weisen im direkten Vergleich mit primären Monozyten eine signifikant höhere endogene Expression von TIMP-1 auf (**Abbildung 15C**), was die Ansprechbarkeit dieser Zellen durch konstitutive hohe TIMP-1 Spiegel im Überstand überschatten könnte. Um eine potentielle konstitutive Aktivierung der THP-1 Zellen durch endogenes TIMP-1 ausschließen zu können, wurden THP-1 Zellen verwendet, die einen *knockout* von TIMP-1 aufweisen (THP-1^{TKO}) (**Abbildung 15D, E**) und dadurch eine geringere basale Aufnahme von Glukose (**Abbildung 15F**), sowie geringere basale Spiegel an IL-6 (**Abbildung 15G**) zeigen. Da THP-1^{TKO} Zellen sowohl mit einer gesteigerten Produktion von IL-6 (**Abbildung 15H**), als auch mit einer erhöhten Aufnahme von Glukose (**Abbildung 15I**) auf die Stimulation mit TIMP-1 reagieren, repräsentieren diese Zellen eine TIMP-1-responsive, geeignete Zelllinie zur mechanistischen Untersuchung von TIMP-1-vermittelten Effekten auf Monozyten.



Figur 15 THP-1^{TKO} Zellen eignen sich als Modellsystem für die mechanistische Untersuchung TIMP-1-vermittelter Effekte auf Monozyten. (A) Quantifizierung der Glukoseaufnahme nach der Stimulation von THP-1^{WT} Zellen mit TIMP-1. (B) Quantifizierung der intrazellulären IL-6 Spiegel in THP-1^{WT} Zellen nach Stimulation mit TIMP-1. (C) Konzentrationen von TIMP-1 im Überstand primärer und THP-1 Monozyten, die für 24 h unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. (D) Repräsentativer Western Blot von TIMP-1 in Zelllysaten aus THP-1^{WT} und THP-1^{TKO} Zellen. (E) Konzentrationen von TIMP-1 in Überständen von THP-1 und THP-1^{TKO} Zellen, welche für 24 h unter identischen Bedingungen kultiviert wurden. Die Konzentrationen wurden mittels ELISA bestimmt. (F) Quantifizierung der basalen Glukoseaufnahme in THP-1^{WT} und THP-1^{TKO} Zellen. (G) Quantifizierung der basalen IL-6 Spiegel in THP-1^{WT} und THP-1^{TKO} Zellen. Dargestellt ist jeweils die relative Veränderung des geometrischen Mittels des 2-NBDG oder IL-6 Signals, normalisiert auf die entsprechende unbehandelte Kontrolle. (H) Quantifizierung der Glukoseaufnahme in THP-1^{TKO} Zellen nach Stimulation mit rhTIMP-1. (I) Quantifizierung der intrazellulären IL-6 Spiegel in THP-1^{TKO} nach Stimulation mit rhTIMP-1. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-test im Falle einer Normalverteilung der Daten oder durch einen Mann-Whitney-U Test, falls keine Normalverteilung vorlag. Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$; ****, $P \leq 0,0001$, n.s., nicht signifikant.

Um in THP-1^{TKO} Zellen nun die APP-abhängige pro-inflammatorische Wirkung von TIMP-1 zu validieren, wurde die Expression von APP in THP-1^{TKO} Zellen mittels shRNAi reduziert. Dies konnte sowohl auf RNA-Ebene (**Abbildung 16A**), als auch auf der Zelloberfläche (**Abbildung 16B**) nachgewiesen werden. Im Vergleich zur Kontrollzelllinie (shNT), konnte in den *knockdown* Zelllinien (shAPP #1 und shAPP #2) weder die Glukoseaufnahme (**Abbildung 16C**), noch die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 (**Abbildung 16D**) durch TIMP-1 induziert werden. Dies bestätigt die Hypothese, dass diese Effekte von der Interaktion von TIMP-1 mit APP abhängig sind.



Figur 16 Der knockdown von APP verhindert die pro-inflammatorischen Effekte von TIMP-1 auf THP-1^{TKO} Monozyten. (A) Relative mRNA Expression von APP in Kontrollzellen (THP-1^{TKO} shNT) und zwei APP-knockdown Zelllinien (THP-1^{TKO} shAPP #1 und #2). Die Messung erfolgte mittels qRT-PCR. (B) Relative Oberflächenexpression von APP in THP-1^{TKO} shNT und THP-1^{TKO} shAPP Zelllinien. Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist jeweils die relative Veränderung des gemessenen geometrischen Mittels von APP normalisiert auf die shNT Kontrolle. (C) Quantifizierung der Glukoseaufnahme in THP-1^{TKO} shNT und THP-1^{TKO} shAPP Zelllinien. (D) Quantifizierung der intrazellulären Zytokinspiegel von IL-6 in THP-1^{TKO} shNT und THP-1^{TKO} shAPP Zelllinien. Dargestellt ist jeweils die relative Veränderung des geometrischen Mittels der 2-NBDG oder IL-6 Färbung normalisiert auf die entsprechende unbehandelte Kontrolle. Die statistische Auswertung erfolgte durch einen t-test im Falle einer Normalverteilung der Daten oder durch einen Mann-Whitney-U Test, falls keine Normalverteilung vorlag. Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$; ****, $P \leq 0,0001$, n.s., nicht signifikant.

3.4. *In vivo* Relevanz der pro-inflammatorischen Wirkung von TIMP-1

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen zeigten, dass TIMP-1 *in vitro* eine pro-inflammatorische Monozyten-Aktivierung induziert. Nun wurde analysiert, ob diese Funktion auch *in vivo* relevant ist. Dies wurde im Kontext von Tumorerkrankungen untersucht, da sowohl TIMP-1 (Eckfeld et al., 2019), als auch Monozyten (Kiss et al., 2020) in diesen meist mit einer schlechten Prognose für die Patienten korrelieren. Um zunächst die in der Klinik beobachteten Eigenschaften von TIMP-1 übersichtlich darzustellen, wurden die Tumor-bedingten Expressionsveränderungen von TIMP-1 und die damit assoziierten prognostischen Konsequenzen mit Hilfe einer Literaturrecherche ermittelt und den anderen TIMPs gegenübergestellt, um nicht nur deren Interaktome (**Kapitel 3.1**), sondern auch deren Eigenschaften in der Klinik miteinander zu vergleichen.

3.4.1. Die Expression von TIMP-1 wird in nahezu allen Tumorentitäten hochreguliert und korreliert mit einer schlechten Prognose für die Patienten

Um die Expressionsmusteränderungen der vier TIMPs in verschiedenen Tumorentitäten darzustellen, wurde zunächst die basale physiologische Expression jedes TIMPs im gesunden Ursprungsgewebe einer Tumorentität mit Hilfe von RNA-Seq Datensätzen der Datenbank des *Human Protein Atlas* (HPA) (<https://www.proteinatlas.org>; (Uhlén et al., 2015)) ermittelt. Hierbei zeigte sich, dass TIMP-1, -2 und -3 relativ ähnliche basale Expressionsspiegel aufzeigen (< 50 bis zu > 1000 TPM) (**Abbildung 17A**). Lediglich TIMP-4 wird gewebespezifisch (im Gehirn, GIT, in der Niere, in weiblich- und männlich-assoziierten Geweben, und im Brustgewebe) exprimiert und weist insgesamt eine schwache Expression auf (TPM < 50) (Eckfeld et al., 2019) (**Abbildung 17A**). Ob die Expression eines TIMPs im Tumorgewebe sowie im Blutplasma während einer Tumorerkrankung typischerweise hoch- oder herunterreguliert wird, wurde mit Hilfe einer Literaturrecherche ermittelt. Weiterhin wurden Informationen über die prognostischen Konsequenzen der Expressionsmusteränderungen der TIMPs gesammelt und jeweils angegeben, ob hohe (HI) oder niedrige (LO) Spiegel des Moleküls mit einer schlechten Prognose für die Patienten einhergehen. Hierbei zeigten sich Unterschiede zwischen den vier TIMPs. TIMP-1 wird in nahezu allen Tumorentitäten sowohl im Tumorgewebe (**Abbildung 17A**), als auch im Blutplasma (**Abbildung 17B**) hochreguliert. Die entsprechende Expressionsveränderung von TIMP-1 korreliert dabei durchweg mit einer schlechten Prognose (Eckfeld et al., 2019) (**Abbildung 17**). Im Gegensatz dazu zeigte sich für die anderen TIMPs sowohl bezüglich der Expressionsveränderungen, als auch hinsichtlich des prognostischen Wertes entweder ein ambivalentes (TIMP-2) oder sogar gegenteiliges Bild (TIMP-3) (**Abbildung 17A, B**). Lediglich TIMP-4 ähnelt hinsichtlich der Expressionsmusteränderung und des prognostischen Wertes TIMP-1 (Eckfeld et al., 2019).

A

Ursprungsgewebe	TIMP-1			TIMP-2			TIMP-3			TIMP-4		
	Relative basale Expression	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose	Relative basale Expression	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose	Relative basale Expression	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose	Relative basale Expression	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose
Gehirn 	***	↑	HI	***	↓	LO	***	↓	LO	*	↑	HI
Lunge 	***	↑	HI	***	↓	LO	***	↑↓	LO	n.e.	/	/
Immunsystem 	***	↑		**/**	/	/	**/**	/	/	n.e.	↑	/
GIT 	***	↑	HI	***	↑	HI	**	↑↓	LO	*	/	LO
Pankreas 	*	↑	/	*	↓	LO	*	↓	LO	n.e.	↑	/
Leber 	***	↑	HI	*	↑	HI	*	↓	LO	n.e.	/	/
Niere 	**	↑	HI	**	↑↓	HI	***	↓	keine Korrelation	*	↑	/
Haut 	**	↑	/	***	/	/	**	↓	keine Korrelation	n.e.	/	/
Weibliche Organe 	*****	↑	HI	*****	↑	LO	***	↓	/	*	/	HI
Brust 	***	↑	HI	***	↑	HI	***	↓	LO	*	/	HI
Männliche Organe 	***	↓	LO	***	↓	HI	***	↓	/	*	/	/

B

Ursprungsgewebe	TIMP-1		TIMP-2		TIMP-3		TIMP-4	
	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose
Gehirn 	↑	HI	/	/	↓	/	/	/
Lunge 	↑	HI	↑↓	HI	/	/	/	/
Immunsystem 	↑	HI		/	/	/	/	/
GIT 	↑	HI	↓	keine Korrelation	/	/	/	/
Pankreas 	↑	HI	↓	keine Korrelation	/	/	/	/
Leber 	↑	HI	↑	HI oder LO	/	/	/	/
Niere 	↑	HI	↓	/	/	/	/	/
Haut 	↑	HI	↑↓	/	↓	/	/	/
Weibliche Organe 	↑	HI	↑↓	keine Korrelation	↓	LO	/	/
Brust 	↑	HI	↑	/	/	/	/	/
Männliche Organe 	↑	HI	↑↓	keine Korrelation	/	/	/	/

Expressionsveränderung

↑ Hochregulation
↓ Herunterregulation
/ unbekannt

Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose

HI Hohe Spiegel
LO Niedrige Spiegel
/ unbekannt

Relative basale RNA Expression

TPM < 50 *

50 - 100 TPM **

100 - 300 TPM ***

300 - 600 TPM ****

600 - 1000 TPM *****

TPM > 1000 *****

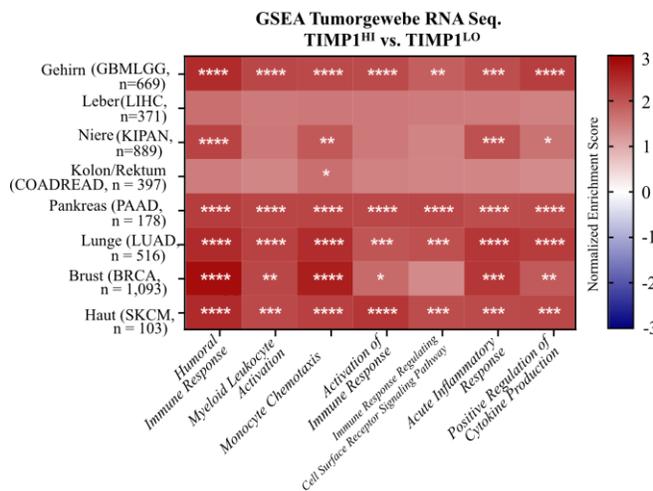
nicht exprimiert n.e.

Abbildung 17 TIMPs in der Klinik. Dargestellt sind jeweils die Expressionsmuster, Expressionsmusteränderungen und prognostischen Eigenschaften der vier TIMPs in verschiedenen Tumorentitäten. Die basale mRNA Expression des entsprechenden TIMPs (in TPM) wurde entsprechend der Größe der TPM-Werte in einen Symbol-Code (* - *****) umgewandelt (A, erste Spalte). Die ermittelten Expressionsmusteränderungen eines TIMPs im Gewebe- (A) oder Plasma (B) wurden mit ↑ (Hochregulation), mit ↓ (Herunterregulation) oder ↑↓ (ambivalente Daten) gekennzeichnet und angedeutet, ob hohe (HI) oder niedrige (LO) Spiegel des TIMPs mit einer schlechten Prognose für die Patienten der entsprechenden Tumorentität assoziiert sind. Die Abbildung wurde in modifizierter Form der Publikation (Eckfeld et al., 2019) entnommen. Die Quellen aller hier zusammengefasster Originalpublikationen sind dem Anhang zu entnehmen. **Abkürzungen:** GIT Gastrointestinal Trakt, TPM Transcripts per million.

3.4.2. TIMP-1 korreliert mit Monozyten-assoziierten Prozessen *in vivo*

Um nun im Kontext von Tumorerkrankungen einen ersten Eindruck darüber zu gewinnen, ob TIMP-1 *in vivo* mit einer pro-inflammatorischen Monozyten-Aktivierung assoziiert ist, wurde mit Hilfe einer *Gene Set Enrichment Analyse* (GSEA) untersucht, mit welchen biologischen Prozessen die Expression von TIMP-1 im Tumorgewebe assoziiert ist. In zahlreichen Tumorentitäten (**Abbildung 18A**) korrelierten einige Monozyten-assoziierte Prozesse (z.B. „*Humoral Immune Response*“, „*Monocyte Leukocyte Activation*“, „*Monocyte Chemotaxis*“, „*Activation of Immune Response*“, „*Immune Response Regulating Cell Surface Receptor Signaling Pathway*“, „*Acute Inflammatory Response*“, und „*Positive Regulation of Cytokine Production*“) signifikant mit der TIMP-1 Expression. Da für TIMP-1 besonders im Pankreaskarzinom eine pro-tumorigene Funktion beschrieben ist (Grünwald et al., 2016; Hermann et al., 2021; Schoeps et al., 2021a), wurde in diesen (**Abbildung 18B**), und weiteren Analysen (**Abbildungen 19, 20**) auf die pro-inflammatorischen Eigenschaften von TIMP-1 in Pankreaskarzinom-Patienten fokussiert. Auch hier zeigte sich eine klare positive Korrelation von TIMP-1 mit den oben beschriebenen, Monozyten-assoziierten biologischen Prozessen (Eckfeld et al., 2023) (**Abbildung 18B**). Diese Daten weisen darauf hin, dass TIMP-1 auch *in vivo* mit einer Aktivierung von Monozyten assoziiert ist.

A



B

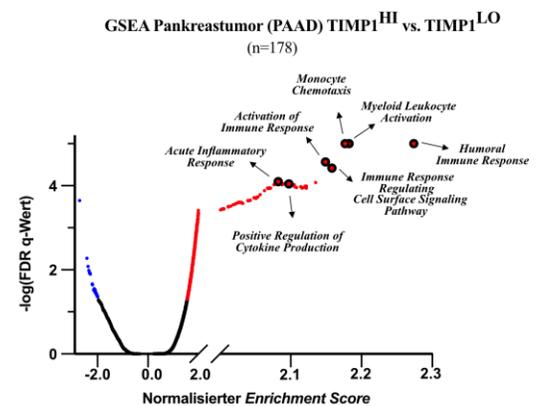


Abbildung 18 TIMP-1 korreliert mit Monozyten-assoziierten Prozessen *in vivo*. (A) GSEA von verschiedenen Tumorentitäten. (B) GSEA eines Pankreas Adenokarzinom RNA-Seq Datensatzes. TIMP-1 korreliert mit zahlreichen Monozyten Aktivierungs-assoziierten Prozessen im Pankreaskarzinom. Für die statistische Auswertung der GSEA Analysen wurde eine Spearman rank Korrelation aufgrund einer nicht vorhandenen Normalverteilung angewandt. Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$; ****, $P \leq 0,0001$, n.s., nicht signifikant.

3.4.3. TIMP-1 korreliert mit pro-inflammatorischen Zytokinen *in vivo*

Ein weiterer Hinweis für eine TIMP-1-vermittelte Monozyten-Aktivierung *in vivo* lieferte eine positive Korrelation der TIMP-1 Expression in verschiedenen Tumorentitäten mit den zuvor definierten Monozyten-spezifischen TICS-Zytokinen. Hierbei korrelierte vor allem das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 in allen betrachteten Tumorerkrankungen signifikant mit der TIMP-1 Expression (Eckfeld et al., 2023) (**Abbildung 19A**). Die Assoziation zwischen TIMP-1 und IL-6 konnte weiterhin im Plasma von PDAC Patienten nachgewiesen werden, nachdem diese in Patientengruppen mit hohen (TIMP-1^{HI}) und niedrigen TIMP-1-Spiegeln (TIMP-1^{LO}) eingeteilt wurden (**Abbildung 19B**). Ein kausaler Zusammenhang zwischen TIMP-1 und IL-6 wurde schließlich in einem Mausmodell hergestellt (**Abbildung 19C**), in welchem im Kontext der akuten Pankreatitis, einem gut etablierten Inflammations-assoziierten pankreatischen Krankheitsmodell, TIMP-1-kompetente Mäuse signifikant höhere IL-6 Spiegel aufwiesen als TIMP-1-defizienten Mäuse (Eckfeld et al., 2023).

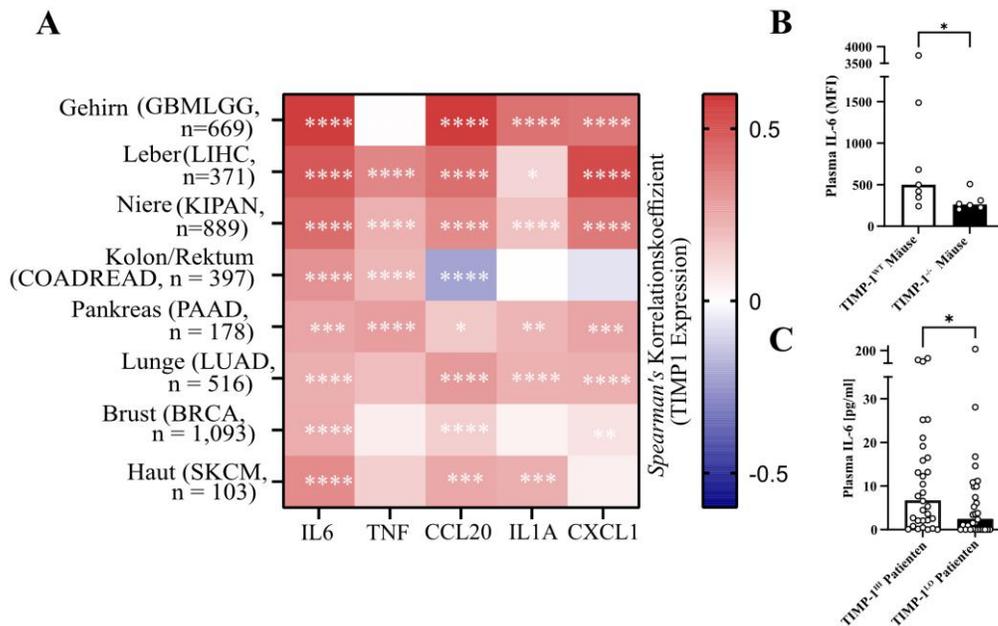


Abbildung 19 TIMP-1 korreliert mit pro-inflammatorischen Zytokinen *in vivo*. (A) Korrelation der TIMP-1 Expression mit den Expressionen der TICS-Zytokine in verschiedenen Tumorentitäten. (B) Plasmaspiegel von IL-6 (Median) in Patienten mit hohen (TIMP-1^{HI}, Plasmaspiegel > 240,67 ng/ml) und niedrigen TIMP-1 Spiegeln (TIMP-1^{LO}, Plasmaspiegel < 240,67 ng/ml). Die Einteilung der Patienten in die jeweiligen Gruppen erfolgte basierend auf den medianen Plasmaspiegeln von TIMP-1. (C) Plasma IL-6 Spiegel in TIMP-1^{WT} und TIMP-1^{KO} Mäusen, in welchen akute Pankreatitis durch die Cerulein-Injektion induziert wurde. Für die statistische Auswertung der GSEA Analysen wurde eine Spearman rank Korrelation aufgrund einer nicht vorhandenen Normalverteilung angewandt. Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen. *, P ≤ 0,05; **, P ≤ 0,01; ***, P ≤ 0,001; ****, P ≤ 0,0001, n.s., nicht signifikant.

3.4.4. TIMP-1 korreliert mit dem Monozyten-Aktivierungsmarker sCD163

Um einen direkten Zusammenhang zwischen TIMP-1 und der Monozyten Aktivierung *in vivo* herzustellen, wurden die TIMP-1 Plasmaspiegel aus PDAC Patienten mit dem Monozyten-spezifischen Aktivierungsmarker sCD163 korreliert. Hierbei zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen TIMP-1 und sCD163 (**Abbildung 20A**). Weiterhin wurde die Patientenkohorte hinsichtlich des Gesamtüberlebens jedes Patienten analysiert. Bei der Einteilung der Patienten in Gruppen mit hohen oder niedrigen Konzentrationen von sCD163 (**Abbildung 20B**) oder hohen oder niedrigen Konzentrationen von TIMP-1 (**Abbildung 20C**) zeigte sich, dass in dieser Kohorte kein signifikanter Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben der Patienten festzustellen war. Erst nach der Kombination beider Entzündungsmarker zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben der beiden Gruppen (**Abbildung 20D**). Die Gruppe, die sich durch sowohl hohe Spiegel an sCD163, als auch hohe Spiegel an TIMP-1 auszeichnete, (sCD163^{HI}TIMP-1^{HI}), wies hierbei ein signifikant geringeres Überleben im Vergleich zu allen anderen Gruppen auf (Eckfeld et al., 2023) (**Abbildung 20D**).

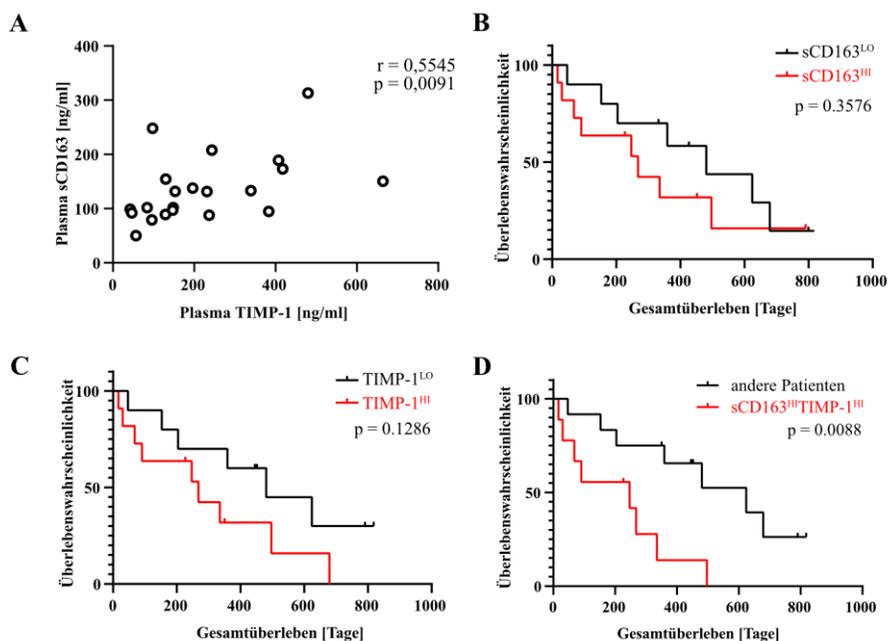


Abbildung 20 Die Kombination von TIMP-1 und sCD163 stellt einen prognostischen Parameter zur Einschätzung des Gesamtüberlebens von PDAC Patienten dar. (A) Korrelation der Plasmaspiegel von TIMP-1 mit sCD163. Für die statistische Auswertung wurde eine Spearman rank Korrelation aufgrund einer nicht vorhandenen Normalverteilung angewandt. (B-D) Kaplan-Meier Kurven von Pankreaskrebs Patienten. Dargestellt ist das Gesamtüberleben von Patienten mit hohen sCD163 oder niedrigen sCD163 Plasmaspiegeln (B), hohen oder niedrigen TIMP-1 Plasmaspiegeln (C) oder der Kombination aus hohen sCD163 und hohen TIMP-1 Spiegeln im Vergleich zu allen anderen Patienten (D). Die Daten wurden in modifizierter Form der Veröffentlichung (Eckfeld et al., 2023) entnommen. *, $P \leq 0,05$; **, $P \leq 0,01$; ***, $P \leq 0,001$; ****, $P \leq 0,0001$, n.s., nicht signifikant.

4. DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden erstmals neue Signalfunktionen von TIMP-1 in Immunzellen beschrieben und molekular durch die Identifikation neuer Oberflächenrezeptoren charakterisiert. Sowohl die Kenntnisse über das Interaktom, als auch über die Multifunktionalität von TIMP-1 konnten damit erweitert werden. Die erlangten Ergebnisse konnten einen neuen molekularen Mechanismus beschreiben, der die klinischen Beobachtungen über TIMP-1 im Kontext von Tumorerkrankungen, sowie in zahlreichen nicht malignen entzündungs-assoziierten Erkrankungen erklären könnte.

4.1. Neue Interaktionspartner erweitern das Interaktom von TIMP-1

Die Analyse der klinischen Eigenschaften der TIMP Familie zeigte deutlich, dass sich TIMP-1 sowohl hinsichtlich der Tumor-bedingten Expressionsveränderungen, als auch hinsichtlich des prognostischen Wertes für Tumorpatienten stark von den anderen Mitgliedern der TIMP Familie abhebt (**Abbildung 17**). Die beobachteten Unterschiede zwischen den TIMPs implizieren unterschiedliche molekulare Funktionen der einzelnen Proteine, die maßgeblich durch Differenzen in den Interaktionspartnern bedingt sein können (Eckfeld et al., 2019). Tatsächlich fällt bei der genauen Betrachtung des Interaktom-Diagramms (**Abbildung 5**) auf, dass jedes TIMP ein einzigartiges Interaktom besitzt, welches sich zwar hinsichtlich der MP-Interaktionen mit den anderen Mitgliedern der Familie vorwiegend überschneidet, aber gerade durch exklusive Interaktionen mit nicht proteolytisch aktiven Molekülen, wie Oberflächenrezeptoren, von den anderen TIMPs unterscheidet. Gerade diese exklusiven Interaktionen könnten die Ursache für funktionelle und klinische Unterschiede zwischen den TIMPs abbilden (Eckfeld et al., 2019). Evidenzen, die diese Hypothese untermauern können, lassen sich bereits in der Literatur finden. Beispielsweise wurde die Interaktion von TIMP-1 mit dem Tetraspanin CD63 bereits für einige pro-tumorigene Eigenschaften von TIMP-1 verantwortlich gemacht (Toricelli et al., 2013; Grünwald et al., 2016; Schoeps et al., 2021a; Duch et al., 2022). CD63 wird zwar ebenfalls von TIMP-4 gebunden (Rorive et al., 2010), und TIMP-4 verhält sich hinsichtlich des prognostischen Trends sehr ähnlich zu TIMP-1 (**Abbildung 17**), jedoch ist für die Interaktion von TIMP-4 mit CD63 bisher keine Funktionalität beschrieben. Auch die neu entdeckte Interaktion von TIMP-1 mit APP und die damit assoziierte pro-inflammatorische Signalwirkung von TIMP-1 auf Monozyten (Eckfeld et al., 2023) könnten die pro-tumorigene Wirkung von TIMP-1 auf molekularer Ebene erklären, da aktivierte Monozyten maßgeblich zur Tumorprogression beitragen (Olingy et al., 2019).

Dass die exklusiven Interaktionen eines TIMPs und die dadurch vermittelten molekularen Mechanismen eine mögliche Erklärung für die beobachteten klinischen Trends bieten könnten, wird ebenfalls bei der Betrachtung von TIMP-3 deutlich. TIMP-3 stellt den Vertreter der TIMP Familie dar, dessen Hochregulation im Gewebe oder im Plasma meist mit einer guten Prognose für die Patienten einhergeht (Eckfeld et al., 2019) (**Abbildung 17**). Im starken Gegensatz zu TIMP-1 gilt TIMP-3 daher auch als protektiver Faktor im Kontext von Tumorerkrankungen (Bachman et al., 1999), und unterscheidet sich auch hinsichtlich des exklusiven Interaktoms vom pro-tumorigenen Molekül TIMP-1. TIMP-3 bindet zum Beispiel den Rezeptor *angiotensin II type 2 receptor* (AGTR2) und reduziert dadurch den Tumor-assoziierten Prozess der Angiogenese (Kang et al., 2008). Diese anti-angiogene Eigenschaft von TIMP-3 wird zudem auch durch die Interaktion mit VEGFR2 vermittelt, die die pro-tumorigene, pro-proliferative und pro-migratorische Funktion von VEGF verhindert (Qi et al., 2003). Diese Beispiele zeigen, dass die Kenntnis über funktionelle Interaktionspartner der TIMPs, insbesondere Oberflächenrezeptoren, einen vielversprechenden Ansatzpunkt für die molekulare Aufklärung von klinischen und funktionellen Unterschieden zwischen Molekülen darstellt.

In dieser Arbeit konnte der Rezeptor CD74 als neuer Interaktionspartner von TIMP-1 sowohl in B-Lymphomzellen (**Abbildung 7**), als auch in hepatischen Sternzellen (**Abbildung 6**) identifiziert werden (Schoeps et al., 2021b). CD74 deutete sich bereits als potentieller Rezeptor für TIMP-1 an, da CD74 ebenfalls als Rezeptor für das Zytokin MIF fungiert (Leng et al., 2003), das, wie auch TIMP-1 (Grünwald et al., 2016), eine prämetastatische Nische in der Leber ausbilden kann (Costa-Silva et al., 2015). Durch diese Arbeit gelang nun der erste publizierte experimentelle Nachweis dieser Interaktion. Die Entdeckung der Interaktion von TIMP-1 mit CD74 könnte von großem klinischen Interesse sein, da CD74 als Zielstruktur gerichteter Therapien zur Behandlung von malignen B-Lymphomarten (Martin et al., 2015), akuten Leukämien (Le et al., 2021), sowie anderen Tumorerkrankungen (Borghese und Clanchy, 2011) diskutiert wird. Die Rolle von TIMP-1 bei der Pathogenese dieser Erkrankungen könnte demnach durch die Untersuchung eines möglichen zugrundeliegenden Mechanismus, der eine TIMP-1/CD74-vermittelte Signalwirkung involviert, besser verstanden werden.

DISKUSSION

Neben der Identifikation der TIMP-1/CD74 Interaktion wurden weiterhin in der unvoreingenommenen LRC-TriCEPS Analyse die Proteine APP und APLP2 als neue Interaktionspartner von TIMP-1 identifiziert (**Abbildung 12**) und mittels *Pull Down Assay* und konfokaler Mikroskopie (**Abbildung 13**) in verschiedenen Zelltypen validiert (Eckfeld et al., 2023). Diese Ergebnisse offenbarten erstmals einen zytokinischen Liganden für den Rezeptor APP, der eine immunmodulatorische Signalwirkung in Monozyten vermitteln kann. Bisher war APP vorwiegend im Forschungsfeld der Neurobiologie als zentrales in neuronale Prozesse involviertes Molekül bekannt, dem vor allem durch die stattfindenden Prozessierungen des Proteins eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Erkrankung zugeschrieben wird (Breen et al., 1991; Hoe et al., 2009; Coronel et al., 2019). Allerdings wurde, aufgrund der charakteristischen Molekülstruktur von APP, zunehmend diskutiert, dass APP ebenso eine Funktion als Oberflächenrezeptor für extrazelluläre Liganden ausüben kann (Müller et al., 2017). Schon früh zeigte sich, dass APP nicht nur von neuronalen Zellen, sondern auch von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert und nach der Aktivierung dieser Zellen hochreguliert wird (Bullido et al., 1996). Weiterhin wurde herausgefunden, dass APP eine pro-inflammatorische Aktivierung von Monozyten vermittelt, wenn Monozyten entweder mit anti-APP Antikörpern stimuliert werden (Sondag und Combs, 2004; Sondag und Combs, 2006) oder an Typ 1 Kollagen adhären (Sondag und Combs, 2010). Zytokinische Liganden, die diesen Prozess unter physiologischen Bedingungen auslösen können, waren bisher allerdings noch nicht bekannt.

Mit Hilfe der durchgeführten Interaktionsstudien konnte das exklusive Interaktom von TIMP-1 insgesamt um drei neue Proteine als Interaktionspartner (APP, APLP2, und CD74) erweitert werden (**Abbildung 21**). Anzumerken ist hierbei, dass bisher nicht untersucht wurde, ob die genannten Rezeptoren auch von anderen Mitgliedern der TIMP Familie gebunden werden und möglicherweise im Interaktom-Diagramm mit diesen überlappen.

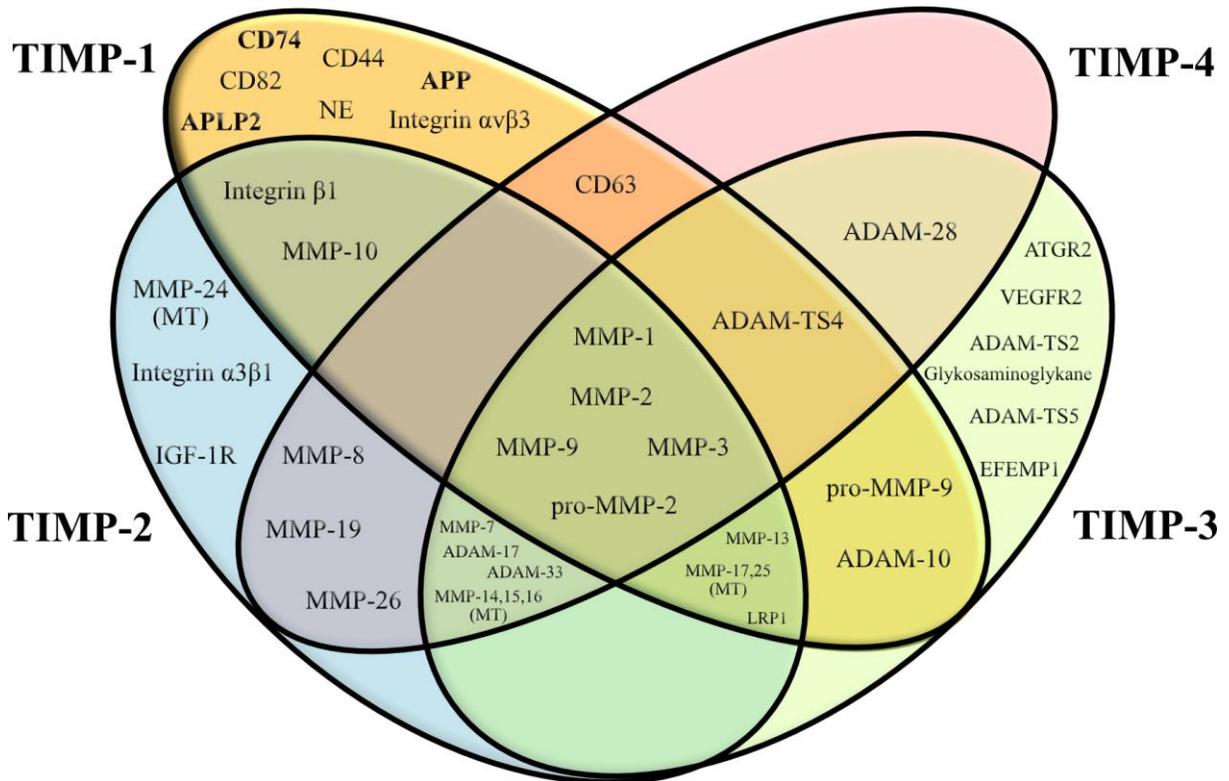


Abbildung 21 Das erweiterte Interaktom von TIMP-1. Das Interaktom von TIMP-1 konnte um die Interaktionspartner APP, APLP2, und CD74 erweitert werden. **Abkürzungen:** ADAM a disintegrin and metalloproteinase, ADAM-TS ADAM with thrombospondin motif, AGTR2 angiotensin II receptor type 2, APP Amyloid Precursor Protein, APLP2 Amyloid Precursor-like Protein 2, EFEMP1 EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1, IGF-1R insulin-like growth factor 1 receptor, LRP1 low-density lipoprotein receptor-related protein 1, MMP Matrix Metalloproteinase, MT Membran-Typ, NE Neutrophile Elastase, VEGFR2 vascular endothelial growth factor receptor 2. Die Abbildung von in adaptierter und erweiterter Form dem veröffentlichten Review (Eckfeld et al., 2019) entnommen.

Einschränkend ist sowohl bei der Analyse der TIMP-1/CD74, als auch bei der Analyse der TIMP-1/APP, bzw. TIMP-1/APLP2 Interaktionen darauf hinzuweisen, dass sowohl die LRC-TriCEPS Analyse, als auch die gezielten biochemischen Methoden nicht in der Lage sind zu beurteilen, ob die Interaktion von TIMP-1 mit den entsprechenden Rezeptoren durch eine direkte Bindung der beiden Proteine entsteht, oder über weitere Moleküle (wie z.B. Ko-Rezeptoren) vermittelt wird. Interessanterweise interagieren die beiden neu ermittelten Interaktionspartner CD74 und APP selbst miteinander (Matsuda et al., 2009) und könnten somit auch Teil eines gemeinsamen Komplexes sein. Der Nachweis einer direkten Interaktion zweier Proteine könnte zum Beispiel über ein *Yeast-Two-Hybrid* (YTH) Experiment erfolgen, welches jedoch erfordert, dass die zu untersuchenden Proteine in Hefezellen korrekt falten können, was vor allem durch posttranslationale Modifikationen von Proteinen limitiert sein kann (Rao et al., 2014). Da TIMP-1 ein glykosyliertes Protein ist (Kim et al., 2012), könnte dies die Durchführung eines YTH Experimentes beeinträchtigen. Weitere Methoden, die einen Aufschluss darüber geben können, ob eine Interaktion direkt oder indirekt stattfindet, stellen die beiden Techniken der sogenannten *Microscale Thermophoresis* (MST) (Jerabek-Willemsen et al., 2014) oder der *Surface Plasmon Resonance* (SPR) dar (Douzi, 2017), die zudem Informationen über Bindungsaffinitäten, Assoziations- und Dissoziationskonstanten liefern. Weiterhin könnten die in dieser Arbeit angewandten Methoden des *Pull Down Assays*, der Ko-Immunpräzipitation und der *Dot Blot* Analyse anstelle von Zelllysaten mit reinen rekombinanten Proteinen durchgeführt werden, um zu analysieren, ob die Interaktion der Proteine von einem weiteren Faktor abhängt. Allerdings ist diese Methode meist dadurch limitiert, dass sich Membranrezeptoren nur schwer als Vollängenprotein rekombinant produzieren und isolieren lassen (Puthenveetil et al., 2020). Obwohl in dieser Arbeit nicht die Frage geklärt werden konnte, ob die TIMP-1/CD74, sowie die TIMP-1/APP und TIMP-1/APLP2 Interaktionen von direkter oder indirekter Natur sind, demonstrieren alle angewandten Methoden, in Kombination mit Interferenzversuchen und genetischen Manipulationen eindeutig eine stattfindende Interaktion zwischen TIMP-1 und CD74 (Schoeps et al., 2021b), APP (Eckfeld et al., 2023), und APLP2 (Eckfeld et al., 2023).

Das Transmembranmolekül APP kann durch ADAM-10 und ADAM-17-vermitteltes *Shedding* proteolytisch geschnitten werden, was eine Freisetzung biologisch aktiver Moleküle zur Folge hat (Zhang et al., 2012). ADAM-10 stellt dabei die konstitutiv aktive α -Sekretase von APP dar, die die Entstehung des amyloidogenen A β Peptids reduziert (Kuhn et al., 2010). Das A β Peptid selbst entsteht nach einer Prozessierung von APP durch eine β -Sekretase (Citron, 2002) und kann neben neurotoxischen Effekten ebenfalls mit einer erhöhten Expression pro-inflammatorischer Zytokine assoziiert sein (Sondag und Combs, 2006). Da TIMP-1 in der Lage ist, ADAM-10 zu inhibieren (Amour et al., 2000), könnte die beobachtete pro-inflammatorische Wirkung von TIMP-1 auch indirekt durch die anti-proteolytische Aktivität von TIMP-1 bedingt sein, da es als Folge der ADAM-10 Inhibition zu einer

verstärkten Generierung des A β Peptids kommen könnte. Um zu zeigen, dass die pro-inflammatorische Wirkung von TIMP-1 über eine zytokinische Signalfunktion von TIMP-1, und nicht durch die Proteinase-Inhibition vermittelt wird, wurde die rekombinante N-terminale, anti-proteolytisch aktive (Murphy et al., 1991) N-TIMP-1 Variante eingesetzt (**Abbildung 11**). Diese war jedoch nicht in der Lage, die neue immunmodulatorische Funktion von TIMP-1 auf Monozyten zu vermitteln (Eckfeld et al., 2023). Diese Ergebnisse zeigen, dass die beobachteten pro-inflammatorischen Effekte von TIMP-1 tatsächlich eine neue zytokinische Signalwirkung von TIMP-1 darstellen und nicht von der anti-proteolytischen Aktivität von TIMP-1 abhängen (**Abbildung 22**).

4.2. Die neu identifizierten Interaktionspartner von TIMP-1 vermitteln neue immunmodulatorische Signalfunktionen

Zusätzlich zur Identifikation neuer Interaktionspartner von TIMP-1 konnten weiterhin neue zytokinische Signalfunktionen von TIMP-1 beschrieben werden. Da die Signalfunktion von TIMP-1 lange Zeit wenig intensiv erforscht wurde, und meist vorwiegend die Rolle von TIMP-1 als Proteinase-Inhibitor fokussiert betrachtet wurde, tragen die hier gewonnen Erkenntnisse zu einer besseren Etablierung von TIMP-1 als zytokinisches aktives Molekül mit diversen Signalwirkungen bei.

Das bereits in Tumorzellen beschriebene TIMP-1-induzierte Hypoxie-Mimikry (Schelter et al., 2011; Cui et al., 2015) konnte nun auch in Monozyten nachgewiesen werden (**Abbildung 9**). In Tumorzellen kann TIMP-1 unter normoxischen Bedingungen die mikroRNA miR-210, welche auch als *Hypoxamir* bezeichnet wird (Chan et al., 2011), und HIF-1 α , den Masterregulator einer zellulären Adaption an Hypoxie (Ziello et al., 2007), induzieren und somit die zelluläre Antwort auf Hypoxie auf molekularer Ebene nachahmen (Cui et al., 2015). Es wird diskutiert, dass dieser Mechanismus begünstigend für das Tumorwachstum ist, da dieser die Tumorzellen schon unter normoxischen Bedingungen auf den auftretenden Stress während der Tumorprogression vorbereiten kann (Cui et al., 2015). In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass TIMP-1 nicht nur in Tumorzellen eine Hypoxie-ähnliche Stressantwort auslösen kann, sondern diese Funktion auch in Monozyten als zentrale Zellen der Immunantwort ausübt (**Abbildung 9**). Ähnlich wie in Tumorzellen, könnte TIMP-1 in Monozyten dadurch eine Vorbereitung der Zellen auf spätere Phasen der Hypoxie ermöglichen, wie sie zum Beispiel in soliden Tumoren oder in entzündetem Gewebe auftreten (Eltzschig und Carmeliet, 2011). Im Gegensatz zum Gewebe stehen Monozyten im Blut typischerweise ausreichende Mengen an Sauerstoff zur Verfügung (Fangradt et al., 2012). Da während entzündungs-assoziierten Erkrankungen sowohl hohe Spiegel an TIMP-1 (Lorente et al., 2009; Prokopchuk et al., 2018; Herr et al., 2021), als auch erhöhte Mengen an Monozyten (Shi und Pamer, 2011) zu finden sind, könnten Monozyten also schon im Blut unter normoxischen

Bedingungen darauf vorbereitet werden, im hypoxischen Gewebe einen Überlebensvorteil zu haben, um ihre Funktionalität aufrechtzuerhalten.

Da eine Antwort von Monozyten auf Hypoxie meist mit einer Aktivierung der Zellen einhergeht (Bosco et al., 2008) und die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1, TNF und IL-6 durch Hypoxie angeregt wird (Lewis und Murdoch, 2005; Murdoch et al., 2005), wurde die Aktivierung von Monozyten als eine neue potentielle Signalfunktion von TIMP-1 untersucht und deren Abhängigkeit von den neu identifizierten Oberflächenrezeptoren APP und APLP2 überprüft. Es zeigte sich, dass TIMP-1 in der Lage ist, über die Interaktion mit APP, aber nicht APLP2, die eine Aktivierung von Monozyten herbeizuführen (Eckfeld et al., 2023) (**Abbildung 14**). Die durch TIMP-1 induzierte pro-inflammatorische Wirkung auf Monozyten von war im Wesentlichen durch eine verstärkte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen ausgedrückt (**Abbildung 10**), die sowohl durch Interferenz mit anti-APP Antikörpern (**Abbildung 14**), als auch durch einen *knockdown* von APP (**Abbildung 15, 16**), verhindert werden konnte (Eckfeld et al., 2023). Im Gegensatz zu APP konnte bezüglich der Interaktion von TIMP-1 mit APLP2 keine Evidenz für eine Relevanz in der TIMP-1-induzierten Monozyten Aktivierung gefunden werden (**Abbildung 14**). Ob TIMP-1 andere Signalaktivitäten über die Interaktion mit APLP2 induzieren kann, könnte Gegenstand zukünftiger Forschungen sein.

Bisher war bereits in der Literatur beschrieben, dass TIMP-1 die Expression des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 in Lungenzellen induzieren kann (Xiao et al., 2019), und kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der TIMP-1 Expression in Makrophagen zu einer verringerten LPS-induzierten Expression von IL-6 führt (Chernikov et al., 2023). Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über eine TIMP-1-induzierte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 (**Abbildung 10**) liefern nun eine weitere Evidenz für die Funktion von TIMP-1 als pro-inflammatorisches Zytokin und identifizieren zusätzlich APP als den involvierten Rezeptor bei der Monozyten Aktivierung (Eckfeld et al., 2023). Diese neue zytokinische Signalfunktion von TIMP-1 (**Abbildung 22**) stellt weiterhin einen neuen immunmodulatorischen Mechanismus dar, der die Assoziation von TIMP-1 mit der Pathogenese zahlreicher entzündungs-assoziiierter Erkrankungen erklären könnte (Eckfeld et al., 2023). Neben den schon beschriebenen immunmodulatorischen Funktionen von TIMP-1 zum Beispiel auf Neutrophile Granulozyten (Schoeps et al., 2021a), konnten nun Monozyten als ein neuer Immunzelltyp für die pro-inflammatorische Wirkung von TIMP-1 beschrieben werden.

Nicht nur die dargelegte TIMP-1/APP-vermittelte immunmodulatorische Wirkung auf Monozyten stellt eine neue Signalfunktion von TIMP-1 dar. Der in dieser Arbeit identifizierten Interaktion von TIMP-1 mit CD74 (**Abbildungen 5, 6**) konnte, in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Benjamin Schoeps (Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung, TUM) im Zuge der Rezeptor-Identifikation ebenfalls

DISKUSSION

eine zytokinische Signalwirkung zugeschrieben werden (Schoeps et al., 2021b). Die Bindung von TIMP-1 an CD74 vermittelt in B-Lymphomzellen eine Aktivierung der Kinase ZAP-70 (**Abbildung 22**) (Schoeps et al., 2021b). Die funktionellen Konsequenzen dieser Rezeptor-vermittelten Signalwirkung von TIMP-1 könnten in zukünftigen Studien weiter analysiert werden. Das Zytokin MIF, das ebenfalls an CD74 bindet (Leng et al., 2003) und auch die Aktivierung von ZAP-70 vermittelt (Klasen et al., 2014), induziert beispielsweise die CD74/CXCR4-abhängige Migration von B-Zellen, was als möglicher Mechanismus für die Rekrutierung von B-Zellen während B-Zell-assoziierten Erkrankungen diskutiert wird (Klasen et al., 2014). Beim direkten Vergleich der Zytokine TIMP-1 und MIF fällt auf, dass diese sich einen gemeinsamen Rezeptor teilen, eine ihnen gemeinsame Signalaktivität über ZAP-70 vermitteln (Klasen et al., 2014; Schoeps et al., 2021b), und, dass beide Zytokine an der hepatischen prämetastatischen Nischenbildung im Kontext des PDAC beteiligt sind (Costa-Silva et al., 2015; Grünwald et al., 2016). Möglicherweise könnten die beiden Zytokine also im physiologischen Kontext um die Bindung an CD74 konkurrieren (Schoeps et al., 2021b). Diese potentielle Konkurrenz und die Aufklärung funktioneller Unterschiede zwischen der TIMP-1/CD74, bzw. der MIF/CD74 Interaktion stellen einen wichtigen Bestandteil zukünftiger Forschungen dar.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit das Wissen über die zytokinischen Signalfunktionen von TIMP-1 und die Relevanz der neu identifizierten Rezeptoren von TIMP-1 für diese Signalwirkungen erweitert werden (**Abbildung 22**).

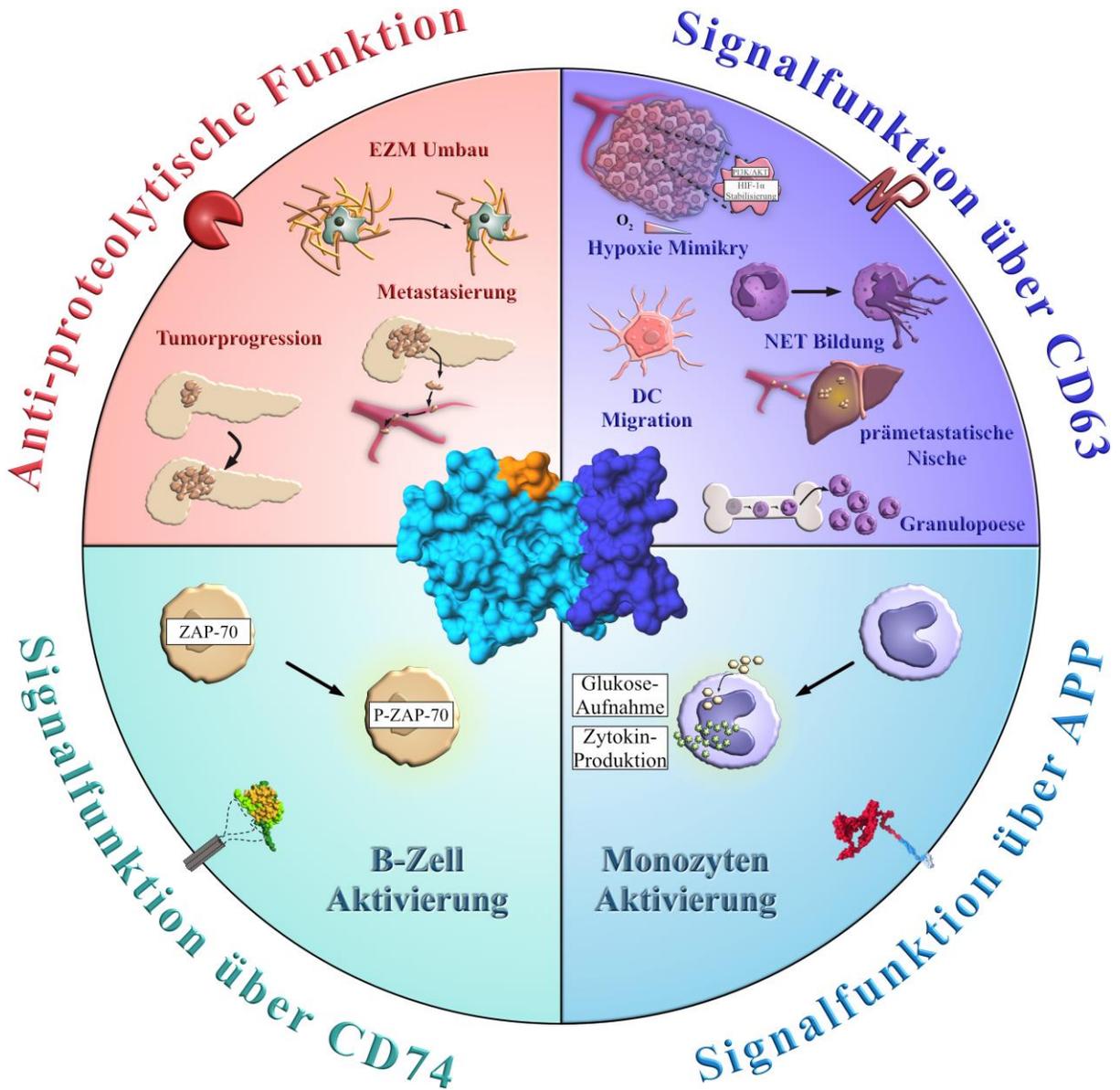


Abbildung 22 Die erweiterte Multifunktionalität von **TIMP-1**. **TIMP-1** vermittelt über die N-terminale Domäne (hellblau) die Inhibition von MPs und kann über Interaktion mit dem Tetraspanin **CD63** zahlreiche zytokinische Signalfunktionen vermitteln. Die Multifunktionalität von **TIMP-1** konnte nun durch die Identifikation der neuen Oberflächenrezeptoren **CD74** und **APP** und die dadurch vermittelten Signalfunktionen erweitert werden. **Abkürzungen:** **APP** Amyloid Precursor Protein, **EZM** Extrazelluläre Matrix, **DC** Dendritische Zelle (dendritic cell), **ZAP-70** zeta-chain associated kinase-70.

4.3. Die pro-inflammatorische Wirkung von TIMP-1 auf Monozyten ist klinisch relevant

Die klinische Relevanz der *in vitro* demonstrierten neuen pro-inflammatorischen Signalaktivität von TIMP-1 wurde untermauert, indem *in vivo* Evidenzen für eine pro-inflammatorische Funktion von TIMP-1 im Kontext von Tumorerkrankungen gesammelt wurden. Bei der Analyse von Transkriptom-Datensätzen diverser Tumorentitäten konnten zahlreiche signifikante positive Korrelationen zwischen TIMP-1 sowohl mit Monozyten-assoziierten Prozessen (**Abbildung 18**), als auch mit der Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen (**Abbildung 19A**) gefunden werden (Eckfeld et al., 2023). Zudem wurde sowohl assoziativ (**Abbildung 19B**), als auch kausal (**Abbildung 19C**) ein Zusammenhang von TIMP-1 mit dem Zytokin IL-6 im Kontext pankreatischer Erkrankungen hergestellt (Eckfeld et al., 2023). Diese Beobachtungen zeigen, dass TIMP-1 nicht nur *in vitro*, sondern auch in einem krankheitsrelevanten Kontext *in vivo* mit pro-inflammatorischen Prozessen im Zusammenhang steht. Dies ist von besonderer Bedeutung in der Klinik, da hohe Spiegel an pro-inflammatorischen Zytokinen im Blut unter anderem Aussagen über die Prognosen von Patienten erlauben, die zum Beispiel an Tumorerkrankungen (Karimi et al., 2021), Infektionskrankheiten (Betakova et al., 2017; Liu et al., 2020), oder Sepsis (Chaudhry et al., 2013) leiden. Bei der malignen PDAC Erkrankung zum Beispiel ist die Expression des Zytokins IL-6 typischerweise stark hochreguliert und korreliert mit einer schlechten Prognose (Ebrahimi et al., 2004; Miron et al., 2010; Mroczko et al., 2010). Im Kontext der Sepsis, einer oft tödlichen systemischen immunologischen Antwort des Körpers auf Infektionen (Gyawali et al., 2019), ist zudem bekannt, dass ein hohes Verhältnis von pro- zu anti-inflammatorischen Zytokinen im Blut vor allem von Monozyten vermittelt wird (Frimpong et al., 2022). Auch bei der COVID-19 Erkrankung stellen pro-inflammatorische Zytokine, insbesondere als Teil eines Zytokin-Sturms, einen bedeutenden Auslöser für das meist tödliche akute Lungen- und Multiorganversagen dar (Montazersaheb et al., 2022). Monozyten repräsentieren dabei Hauptproduzenten von pro-inflammatorischen Zytokinen und scheinen dadurch mit dem Schweregrad der Erkrankung und der Intensivpflichtigkeit der Patienten assoziiert zu sein (Zhou et al., 2020). Da auch die Spiegel von TIMP-1 in PDAC Patienten (Prokopchuk et al., 2018), in COVID-19 Patienten (Herr et al., 2021), sowie in septischen Patienten (Hoffmann et al., 2006) hochreguliert werden und mit einer geringeren Überlebenschance korrelieren, könnte der hier aufgedeckte neue Mechanismus einer TIMP-1-vermittelten Monozyten-Aktivierung eine kausale molekulare Erklärung für die Pathogenese dieser Erkrankungen bieten.

Schlussfolgernd lässt sich zusammenfassen, dass die in dieser Arbeit erlangten Erkenntnisse über neue Interaktionspartner von TIMP-1, über die Beschreibung neuer Rezeptor-vermittelter Signalfunktionen (**Abbildung 22**), und über die klinische Relevanz dieser neuen Funktionen, zu einem verbesserten Verständnis der Multifunktionalität von TIMP-1 beitragen.

4.4. Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse bieten nun eine Grundlage für weitere mechanistische und funktionelle Untersuchungen. TIMP-1 wurde als ein pro-inflammatorischer Stressfaktor identifiziert, der eine APP-abhängige Aktivierung von Monozyten vermittelt. Weiterhin wurden die Rezeptoren CD74 und APLP2 als neue Interaktionspartner von TIMP-1 identifiziert. Ausgehend davon könnten nun weitere Analysen angestrebt werden, die sowohl auf die Beschreibung weiterer APP-vermittelter Prozesse in anderen Zelltypen abzielen, als auch die Aufdeckung bisher unbekannter TIMP-1/APLP2-vermittelter Effekte adressieren. Sowohl APP (Hansel et al., 2003), als auch APLP2 (Poelaert et al., 2021) scheinen zum Beispiel eine funktionell relevante Rolle bei der Pankreaskarzinom-Progression zu spielen. Da auch TIMP-1 in die Pankreaskarzinomprogression involviert ist (Grünwald et al., 2016; Hermann et al., 2021; Schoeps et al., 2021a), könnte die Erforschung der Relevanz dieser Interaktionen zu einer detaillierteren Aufklärung der molekularen Grundlagen der Pankreaskarzinom Pathogenese beitragen. Auch die funktionellen Konsequenzen der Signalwirkung von TIMP-1 über den Rezeptor CD74 stellen ein vielversprechendes Forschungsfeld dar, das darauf abzielt, die pro-inflammatorische Funktion von TIMP-1 näher zu charakterisieren.

5. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinases</i>
ADAM-TS	<i>A Disintegrin and Metalloproteinases</i> mit Thrombospondin-Motiv
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> (Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität)
AGTR2	<i>Angiotensin II Receptor Type 2</i>
AKT	Protein Kinase B
AML	Akut Myeloische Leukämie
AMPK	<i>AMP-activated protein kinase</i>
APLP	<i>Amyloid Precursor-like Protein</i>
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
CCL	CC-Chemokin-Ligand
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
CX3CL1	<i>CX3C chemokine fractalkine</i>
CXCR4	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4
DC	<i>Dendritic Cells</i> (Dendritische Zellen)
DMEM	<i>Dulbeccos Modified Eagle Medium</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
EFEMP1	<i>EGF-containing Fibulin-like Extracellular Matrix Protein 1</i>
EMEM	<i>Eagle's Minimum Essential Medium</i>
EPA	<i>Erythroid-Potentiating Activity</i>
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FcγR	Fc gamma Rezeptor
FMO	<i>Fluorescence-Minus-One</i>
g	Gramm
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GSEA	<i>Gene Set Enrichment Analyse</i>
h	Stunde
HIF-1	Hypoxie-induzierter Faktor 1
HPA	<i>Human Protein Atlas</i>
HSC	Hepatischen Sternzellen
IHC	Immunhistochemie
IGF-R1	<i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IL-6R	IL-6 Rezeptor
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LPS	Lipopolysaccharid

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

LRC	<i>Ligand-based Receptor Capture</i>
LRP1	<i>Low-density Lipoprotein Receptor-related Protein 1</i>
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
M-CSF	Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIF	<i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i>
min	Minute
MP	Metalloproteinase
MST	<i>Microscale Thermophoresis</i>
MT	Membrantyp
NE	Neutrophile Elastase
NET	<i>Neutrophil extracellular Trap</i>
NF κ B	Nuclear Factor κ B
NK	Natürlichen Killerzellen
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PDAC	<i>Pancreatic Ductal Adenocarcinoma</i>
PHD	Prolyl Hydroxylase
PI3K	Phosphoinositide-3-kinase
PRR	<i>Pattern Recognition Receptor</i> (Mustererkennungszepetor)
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	<i>Revolutions Per Minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SPF	Spezifisch Pathogen-frei
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAM	Tumor-assoziierten Makrophagen
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TICS	<i>TIMP-1-Induced Cytokine Signature</i>
Tim3	<i>T cell Immunoglobulin and Mucin Domain 3</i>
TIMP-1	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1</i>
TLR	Toll-Like Rezeptoren
TME	Tumor Microenvironment (Tumormikroumgebung)
TNFR	<i>Transforming Growth Factor-α Receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TPM	<i>Transcripts Per Million</i>
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
V	Volt
VEGFR2	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2</i>
z.B.	Zum Beispiel
ZAP-70	<i>Zeta-chain Associated Kinase-70</i>
ZPF	Zentrum für Präklinische Forschung

6. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1** Die Multifunktionalität von TIMP-1
- Abbildung 2** Die Aktivierung von Monozyten
- Abbildung 3** Das Prinzip eines LRC-TriCEPs Experiments
- Abbildung 4** Zusammenfassung der TIMP Interaktome in einem Venn-Diagramm
- Abbildung 5** Das Interaktom der TIMPs
- Abbildung 6** Nachweis der Überexpression von CD74 in LX2 Zellen.
- Abbildung 7** TIMP-1 interagiert mit CD74 in CD74-überexprimierenden LX2 Zellen
- Abbildung 8** TIMP-1 bindet an CD74 in physiologisch CD74-exprimierenden B-Lymphomzellen
- Abbildung 9** TIMP-1 induziert einen Hypoxiestress-assoziierten Phänotyp in Monozyten
- Abbildung 10** TIMP-1 induziert pro-inflammatorische Zytokine in primären humanen Monozyten
- Abbildung 11** Die C-terminale Domäne von TIMP-1 ist nötig für die pro-inflammatorische Wirkung von TIMP-1
- Abbildung 12** TIMP-1 bindet an Amyloid Precursor Proteine
- Abbildung 13** Validierung der Interaktion von TIMP-1 mit APP und APLP2
- Abbildung 14** Analyse der APP- und APLP2-Abhängigkeit der pro-inflammatorischen Wirkung von TIMP-1 auf Monozyten
- Abbildung 15** THP-1^{TKO} Zellen eignen sich als Modellsystem für die mechanistische Untersuchung TIMP-1-vermittelter Effekte auf Monozyten
- Abbildung 16** Der *Knockdown* von APP verhindert die pro-inflammatorischen Effekte von rhTIMP-1 auf THP-1^{TKO} Monozyten
- Abbildung 17** TIMPs in der Klinik
- Abbildung 18** TIMP-1 korreliert mit Monozyten-assoziierten Prozessen *in vivo*
- Abbildung 19** TIMP-1 korreliert mit pro-inflammatorischen Zytokinen *in vivo*
- Abbildung 20** Die Kombination von TIMP-1 und sCD163 stellt einen prognostischen Parameter zur Einschätzung des Gesamtüberlebens von PDAC Patienten dar
- Abbildung 21** Das erweiterte Interaktom von TIMP-1
- Abbildung 22** Die erweiterte Multifunktionalität von TIMP-1

7. TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Übersicht über die verwendeten Chemikalien
Tabelle 2	Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien
Tabelle 3	Übersicht über die verwendeten Geräte
Tabelle 4	Verwendete Puffer und Lösungen und deren Zusammensetzungen
Tabelle 5	Übersicht über die verwendeten Primer
Tabelle 6	Übersicht über die verwendeten Plasmide
Tabelle 7	Übersicht über die verwendeten Primärantikörper
Tabelle 8	Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörper
Tabelle 9	Übersicht über alle verwendeten rekombinanten Proteine
Tabelle 10	Übersicht über die verwendeten Kits
Tabelle 11	Übersicht über die verwendete Software
Tabelle 12	Übersicht über die verwendeten Zellkulturlösungen
Tabelle 13	Reaktionsansatz für die Reverse Transkription
Tabelle 14	Gewähltes Programm für die Reverse Transkription
Tabelle 15	Reaktionsansatz für die Reverse Transkription
Tabelle 16	Gewähltes Programm für die Reverse Transkription
Tabelle 17	Zusammensetzungen von SDS Gelen
Tabelle A1	Referenzen der TIMP-1 Interaktionspartner (Abbildung 5, 21)
Tabelle A2	Referenzen der TIMP-2 Interaktionspartner (Abbildung 5, 21)
Tabelle A3	Referenzen der TIMP-3 Interaktionspartner (Abbildung 5, 21)
Tabelle A4	Referenzen der TIMP-4 Interaktionspartner (Abbildung 5, 21)
Tabelle A5	Referenzen der klinischen Beobachtungen zu TIMP-1 (Abbildung 17)
Tabelle A6	Referenzen der klinischen Beobachtungen zu TIMP-2 (Abbildung 17)
Tabelle A7	Referenzen der klinischen Beobachtungen zu TIMP-3 (Abbildung 17)
Tabelle A8	Referenzen der klinischen Beobachtungen zu TIMP-4 (Abbildung 17)

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Aaberg-Jessen, C., K. Christensen, H. Offenberg, A. Bartels, T. Dreehsen, S. Hansen, H.D. Schrøder, N. Brüner, und B.W. Kristensen. 2009. Low expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in glioblastoma predicts longer patient survival. *J. Neurooncol* 95:117–128.
- Abel, S., C. Hundhausen, R. Mentlein, A. Schulte, T.A. Berkhout, N. Broadway, D. Hartmann, R. Sedlacek, S. Dietrich, B. Muetze, B. Schuster, K.-J. Kallen, P. Saftig, S. Rose-John, und A. Ludwig. 2004. The transmembrane CXC-chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J. Immun.* 172:6362–6372.
- Airola, K., T. Karonen, M. Vaalamo, K. Lehti, J. Lohi, A.-L. Kariniemi, J. Keski-Oja, und U.K. Saarialho-Kere. 1999. Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. *Br. J. Cancer* 80:733–743.
- Amour, A., C.G. Knight, A. Webster, P.M. Slocombe, P.E. Stephens, V. Knäuper, A.J. Docherty, und G. Murphy. 2000. The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3. *FEBS Letters* 473:275–279.
- Anderson, N.G. 1998. Co-immunoprecipitation. Identification of interacting proteins. *Methods Mol. Biol.* 88:35–45.
- Angulo, J.C., A. Ferruelo, J.M. Rodríguez-Barbero, C. Núñez, F.R. de Fata, und J. González. 2011. Detection and molecular staging of bladder cancer using real-time RT-PCR for gelatinases (MMP-2, MMP-9) and TIMP-2 in peripheral blood. *Actas Urol. Esp.* 35:127–136.
- Anne, T.-M., und T.-H. Taina. 2010. Levels of circulating TIMP-2 and MMP2-TIMP2 complex are decreased in squamous cervical carcinoma. *Obstet. Gynecol. Int.* 2010.
- Ara, T., M. Fukuzawa, T. Kusafuka, Y. Komoto, T. Oue, M. Inoue, und A. Okada. 1998. Immunohistochemical expression of MMP-2, MMP-9, and TIMP-2 in neuroblastoma: Association with tumor progression and clinical outcome. *J. Pediatr. Surg.* 33:1272–1278.
- Arpino, V., M. Brock, und S.E. Gill. 2015. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 44-46:247–254.
- Arroyo-Espliguero, R., P. Avanzas, S. Jeffery, und J.C. Kaski. 2004. CD14 and toll-like receptor 4: a link between infection and acute coronary events? *Heart* 90:983–988.

- Hamze, A.B., Wei, S., Bahudhanapati, H. Kota, S., Acharya, K.R. und Brew.,K 2007. Constraining specificity in the N-domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1; gelatinase-selective inhibitors. *Protein Science* 16:1905–1913.
- Auffray, C., D. Fogg, M. Garfa, G. Elain, O. Join-Lambert, S. Kayal, S. Sarnacki, A. Cumano, G. Lauvau, und F. Geissmann. 2007. Monitoring of blood vessels and tissues by a population of monocytes with patrolling behavior. *Science* 317:666–670.
- Bachman, K.E., J.G. Herman, P.G. Corn, A. Merlo, J.F. Costello, W.K. Cavenee, S.B. Baylin, und J.R. Graff. 1999. Methylation-associated Silencing of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Gene Suggests a Suppressor Role in Kidney, Brain, and Other Human Cancers. *Cancer Res.* 59:798–802.
- Baek, M., F. DiMaio, I. Anishchenko, J. Dauparas, S. Ovchinnikov, G.R. Lee, J. Wang, Q. Cong, L.N. Kinch, R.D. Schaeffer, C. Millán, H. Park, C. Adams, C.R. Glassman, A. DeGiovanni, J.H. Pereira, A.V. Rodrigues, A.A. van Dijk, A.C. Ebrecht, D.J. Opperman, T. Sagmeister, C. Buhlheller, T. Pavkov-Keller, M.K. Rathinaswamy, U. Dalwadi, C.K. Yip, J.E. Burke, K.C. Garcia, N.V. Grishin, P.D. Adams, R.J. Read, und D. Baker. 2021. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science* 373:871–876.
- Baker, T., S. Tickle, H. Wasan, A. Docherty, D. Isenberg, und J. Waxman. 1994. Serum metalloproteinases and their inhibitors: markers for malignant potential. *Br. J. Cancer* 70:506–512.
- Baranger, K., M. Khrestchatisky, und S. Rivera. 2016. MT5-MMP, just a new APP processing proteinase in Alzheimer’s disease? *J. Neuroinflammation* 13:167.
- Batra, J., J. Robinson, A.S. Soares, A.P. Fields, D.C. Radisky, und E.S. Radisky. 2012. Matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) interaction with tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2: binding studies and crystal structure. *J. Biol. Chem.* 287:15935–15946.
- Bauer, J., T.M. Bauer, T. Kalb, T. Taga, G. Lengyel, T. Hirano, T. Kishimoto, G. Acs, L. Mayer, und W. Gerok. 1989. Regulation of interleukin 6 receptor expression in human monocytes and monocyte-derived macrophages. Comparison with the expression in human hepatocytes. *J. Exp. Med.* 170:1537–1549.
- Benjamin, I.J., B. Kröger, und R.S. Williams. 1990. Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in mammalian cells. *PNAS.* 87:6263–6267.
- Betakova, T., A. Kostrabova, V. Lachova, und L. Turianova. 2017. Cytokines Induced During Influenza Virus Infection. *Curr. Pharm. Des.* 23:2616–2622.

- Beswick, E.J., und V.E. Reyes. 2009. CD74 in antigen presentation, inflammation, and cancers of the gastrointestinal tract. *World J. Gastroenterol.* 15:2855–2861.
- Biedler, J.L., L. Helson, und B.A. Spengler. 1973. Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Res.* 33:2643–2652.
- Biedler, J.L., S. Roffler-Tarlov, M. Schachner, und L.S. Freedman. 1978. Multiple Neurotransmitter Synthesis by Human Neuroblastoma Cell Lines and Clones. *Cancer Res.* 38:3751–3757.
- Bister, V., T. Skoog, S. Virolainen, T. Kiviluoto, P. Puolakkainen, und U. Saarialho-Kere. 2007. Increased expression of matrix metalloproteinases-21 and -26 and TIMP-4 in pancreatic adenocarcinoma. *Mod, Pathol.* 20:1128–1140.
- Borghese, F., und F.I.L. Clanchy. 2011. CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease. *Expert Opin. Ther. Pat.* 5:237–251.
- Bosco, M.C., M. Puppo, F. Blengio, T. Fraone, P. Cappello, M. Giovarelli, und L. Varesio. 2008. Monocytes and dendritic cells in a hypoxic environment: Spotlights on chemotaxis and migration. *Immunobiology* 213:733–749.
- Bosshart, H., und M. Heinzemann. 2016. THP-1 cells as a model for human monocytes. *Ann. Transl. Med.* 4:438.
- Breen, K.C., M. Bruce, und B.H. Anderton. 1991. Beta amyloid precursor protein mediates neuronal cell-cell and cell-surface adhesion. *J. Neurosci. Res.* 28:90–100.
- Brew, K. 2019. Reflections on the evolution of the vertebrate tissue inhibitors of metalloproteinases. *FASEB J.* 33:71–87.
- Brew, K., und H. Nagase. 2010. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim. Biophys. Acta* 1803:55–71.
- Bullido, M.J., M.A. Muñoz-Fernandez, M. Recuero, M. Fresno, und F. Valdivieso. 1996. Alzheimer's amyloid precursor protein is expressed on the surface of hematopoietic cells upon activation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1313:54–62.
- Butler, G.S. Will, H. Atkinson, S.J. und Murphy, S., 1997. Membrane-Type-2 Matrix Metalloproteinase Can Initiate the Processing of Progelatinase A and is Regulated by the Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Eur. J. Biochem.* 244:653–657.

- Catasus, L., C. Pons, J. Muñoz, I. Espinosa, and J. Prat. 2013. Promoter hypermethylation contributes to TIMP3 down-regulation in high stage endometrioid endometrial carcinomas. *Histopathology* 62:632–641.
- Chan Y.C., Banerjee J, Choi S.Y., and Sen C.K. miR-210: The master hypoxamir. *Microcirculation* 19: 215–223, 2012.
- Chaudhry, H., Zhou, J., Zhong, M., Ali, M., McGuire, F., Nagarkatti, P.P., Nagarkatti, M., 2013, Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis. *In vivo*. 27:669–684.
- Chen, P.S., W.-T. Chiu, P.-L. Hsu, S.-C. Lin, I.-C. Peng, C.-Y. Wang, und S.-J. Tsai. 2020. Pathophysiological implications of hypoxia in human diseases. *J. Biomed. Sci.* 27:63.
- Chernikov, I.V., Y.Y. Staroseletz, I.S. Tatarnikova, A.V. Sen'kova, I.A. Savin, A.V. Markov, E.B. Logashenko, E.L. Chernolovskaya, M.A. Zenkova, und V.V. Vlassov. 2023. siRNA-Mediated Timp1 Silencing Inhibited the Inflammatory Phenotype during Acute Lung Injury. *Int. J. Mol. Sci.* 24:1641.
- Chiu, S., und A. Bharat. 2016. Role of monocytes and macrophages in regulating immune response following lung transplantation. *Curr. Opin. Organ Transplant.* 21:239–245.
- Chun, E., S. Lavoie, M. Michaud, C.A. Gallini, J. Kim, G. Soucy, R. Odze, J.N. Glickman, und W.S. Garrett. 2015. CCL2 Promotes Colorectal Carcinogenesis by Enhancing Polymorphonuclear Myeloid-Derived Suppressor Cell Population and Function. *Cell Reports.* 12:244–257.
- Citron, M. 2002. Beta-secretase as a target for the treatment of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 70:373–379.
- Coronel, R., C. Palmer, A. Bernabeu-Zornoza, M. Monteagudo, A. Rosca, A. Zambrano, und I. Liste. 2019. Physiological effects of amyloid precursor protein and its derivatives on neural stem cell biology and signaling pathways involved. *Neural. Regen. Res.* 14:1661–1671.
- Costa-Silva, B., N.M. Aiello, A.J. Ocean, S. Singh, H. Zhang, B.K. Thakur, A. Becker, A. Hoshino, M.T. Mark, H. Molina, J. Xiang, T. Zhang, T.-M. Theilen, G. García-Santos, C. Williams, Y. Ararso, Y. Huang, G. Rodrigues, T.-L. Shen, K.J. Labori, I.M.B. Lothe, E.H. Kure, J. Hernandez, A. Doussot, S.H. Ebbesen, P.M. Grandgenett, M.A. Hollingsworth, M. Jain, K. Mallya, S.K. Batra, W.R. Jarnagin, R.E. Schwartz, I. Matei, H. Peinado, B.Z. Stanger, J. Bromberg, und D. Lyden. 2015. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* 17:816–826.
- Crocker, M., S. Ashley, I. Giddings, V. Petrik, A. Hardcastle, W. Aherne, A. Pearson, B. Anthony Bell, S. Zacharoulis, und M.C. Papadopoulos. 2011. Serum angiogenic profile of patients with glioblastoma

identifies distinct tumor subtypes and shows that TIMP-1 is a prognostic factor. *Neuro. Oncol.* 13:99–108.

Cui, H., S. Grosso, F. Schelter, B. Mari, and A. Krüger. 2012. On the Pro-Metastatic Stress Response to Cancer Therapies: Evidence for a Positive Co-Operation between TIMP-1, HIF-1 α , and miR-210. *Front. Pharmacol.* 3:134.

Cui, H., B. Seubert, E. Stahl, H. Dietz, U. Reuning, L. Moreno-Leon, M. Ilie, P. Hofman, H. Nagase, B. Mari, and A. Krüger. 2015. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induces a pro-tumourigenic increase of miR-210 in lung adenocarcinoma cells and their exosomes. *Oncogene* 34:3640–3650.

Cusick, M.E., N. Klitgord, M. Vidal, and D.E. Hill. 2005. Interactome: gateway into systems biology. *Human molecular genetics* 14 Spec No. 2:R171-81.

Cymbaluk-Płoska, A., A. Chudecka-Głaz, E. Pius-Sadowska, B. Machaliński, J. Menkiszak, and A. Sompolska-Rzechuła. 2018. Suitability assessment of baseline concentration of MMP3, TIMP3, HE4 and CA125 in the serum of patients with ovarian cancer. *J. Ovarian. Res.* 11.

Das, A.M., M. Bolkestein, T. van der Kloek, C.M.C. Oude Ophuis, C.E. Vermeulen, J.A.P. Rens, W.N.M. Dinjens, P.N. Atmodimedjo, C. Verhoef, S. Koljenović, R. Smits, T.L.M. ten Hagen, and A.M.M. Eggermont. 2016. Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) expression decreases during melanoma progression and inhibits melanoma cell migration. *Eur. J. Cancer.* 66:34–46.

Dias, F., A.L. Teixeira, I. Nogueira, M. Morais, J. Maia, C. Bodo, M. Ferreira, I. Vieira, J. Silva, J. Lobo, J.P. Sequeira, J. Maurício, J. Oliveira, C. Palmeira, G. Martins, K. Kok, B. Costa-Silva, and R. Medeiros. 2020. Plasma extracellular vesicle-derived TIMP-1 mRNA as a prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma: A pilot study. *Int. J. Mol. Sci.* 21:4624.

D'Ignazio, L., and S. Rocha. 2016. Hypoxia Induced NF- κ B. *Cells* 5.

Docherty, A.J., A. Lyons, B.J. Smith, E.M. Wright, P.E. Stephens, T.J. Harris, G. Murphy, and J.J. Reynolds. 1985. Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity. *Nature* 318:66–69.

Douzi, B. 2017. Protein-Protein Interactions: Surface Plasmon Resonance. *Methods Mol. Biol.* 1615:257–275.

Drzewiecka-Jędrzejczyk, M., R. Wlazeł, M. Terlecka, and S. Jabłoński. 2017. Serum metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in lung carcinoma patients. *J. Thorac. Dis.* 9:5306–5313.

- DuBridge, R.B., P. Tang, H.C. Hsia, P.M. Leong, J.H. Miller, und M.P. Calos. 1987. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol. Cell. Biol.* 7:379–387.
- Duch, P., N. Díaz-Valdivia, R. Ikemori, M. Gabasa, E.S. Radisky, M. Arshakyan, S. Gea-Sorlí, A. Mateu-Bosch, P. Bragado, J.L. Carrasco, H. Mori, J. Ramírez, C. Teixidó, N. Reguart, C. Fillat, D.C. Radisky, und J. Alcaraz. 2022. Aberrant TIMP-1 overexpression in tumor-associated fibroblasts drives tumor progression through CD63 in lung adenocarcinoma. *Matrix biology* 111:207–225.
- Ebrahimi, B., S.L. Tucker, D. Li, J.L. Abbruzzese, und R. Kurzrock. 2004. Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis. *Cancer* 101:2727–2736.
- 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.* 38:469–481.
- Eckfeld, C., Schoeps, B., Häußler, D., Frädlich, J., Bayerl, F., Böttcher, J.P., Knolle, P., Heisz, S., Prokopchuk, O., Hauner, H., Munkhbaatar, E., Demir, I.E., Hermann, C.D., und Krüger, A.. 2023. TIMP-1 is a novel ligand of Amyloid Precursor Protein and triggers a proinflammatory phenotype in human monocytes. *J. Cell Biol.* 222.
- Eckstein, M., E. Epple, R. Jung, K. Weigelt, V. Lieb, D. Sikic, R. Stöhr, C. Geppert, V. Weyerer, S. Bertz, A. Kehlen, A. Hartmann, B. Wullich, H. Taubert, und S. Wach. 2020. CCL2 Expression in Tumor Cells and Tumor-Infiltrating Immune Cells Shows Divergent Prognostic Potential for Bladder Cancer Patients Depending on Lymph Node Stage. *Cancers* 12.
- Egea, V., S. Zahler, N. Rieth, P. Neth, T. Popp, K. Kehe, M. Jochum, und C. Ries. 2012. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) regulates mesenchymal stem cells through let-7f microRNA and Wnt/ β -catenin signaling. *PNAS*. 109: E309-16.
- Eltzschig, H.K., und P. Carmeliet. 2011. Hypoxia and inflammation. *N. Engl. J. Med.* 364:656–665.
- Emmert-Buck, M.R., H.P. Emonard, M.L. Corcoran, H.C. Krutzsch, J.M. Foidart, und W.G. Stetler-Stevenson. 1995. Cell surface binding of TIMP-2 and pro-MMP-2/TIMP-2 complex. *FEBS Letters* 364(1), 28–32
- English, J.L., Z. Kassiri, I. Koskivirta, S.J. Atkinson, M. Di Grappa, P.D. Soloway, H. Nagase, E. Vuorio, G. Murphy, und R. Khokha. 2006. Individual Timp deficiencies differentially impact pro-MMP-2 activation. *J. Biol. Chem.* 281:10337–10346.
- Etzerodt, A., M.R. Rasmussen, P. Svendsen, A. Chalaris, J. Schwarz, I. Galea, H.J. Møller, und S.K. Moestrup. 2014. Structural basis for inflammation-driven shedding of CD163 ectodomain and tumor necrosis factor- α in macrophages. *J. Biol. Chem.* 289:778–788.

- Fangradt, M., M. Hahne, T. Gaber, C. Strehl, R. Rauch, P. Hoff, M. Löhning, G.-R. Burmester, und F. Buttgereit. 2012. Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of adaptation to hypoxia. *Arthritis Res. Ther.* 14: R181.
- Farina, C., D. Theil, B. Semlinger, R. Hohlfeld, und E. Meinel. 2004. Distinct responses of monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *Int. Immunol.* 16:799–809.
- Farr, L., S. Ghosh, und S. Moonah. 2020. Role of MIF Cytokine/CD74 Receptor Pathway in Protecting Against Injury and Promoting Repair. *Front. Immunol* 11:1273.
- Farr, M., M. Pieper, J. Calvete, und H. Tschesche. 1999. The N-terminus of collagenase MMP-8 determines superactivity and inhibition: a relation of structure and function analyzed by biomolecular interaction analysis. *Biochemistry* 38:7332–7338.
- Fendrich, V., E.P. Slater, E. Heinmöller, A. Ramaswamy, I. Celik, O. Nowak, B. Chaloupka, B. Gerdes, und D.K. Bartsch. 2005. Alterations of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 (TIMP3) Gene in Pancreatic Adenocarcinomas. *Pancreas* 30: e40.
- Feng, F., G. Zheng, Q. Wang, S. Liu, Z. Liu, G. Xu, F. Wang, M. Guo, X. Lian, und H. Zhang. 2018. Low lymphocyte count and high monocyte count predicts poor prognosis of gastric cancer. *BMC Gastroenterol.* 18:148.
- Feng, Y.-H., L.-S. Wu, J. Su, Z.-F. Feng, und Q. Chen. 2013. Expression and significance of MMP-26, TIMP-4 and MMP-9 in diffuse large B-cell lymphoma cells. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi* 21:1167–1172.
- Fernandez-Catalan, C., Bode, W., Huber, R., Turk, D., Calvete, J.J., Lichte, U. Tschesche, H., und Maskos, K. 1998. Crystal structure of the complex formed by the membrane type 1-matrix metalloproteinase with the tissue inhibitor of metalloproteinases-2, the soluble progelatinase A receptor. *EMBO J.* 17:5238–5248.
- Fernandez, C.A., R. Roy, S. Lee, J. Yang, D. Panigrahy, K.J. van Vliet, und M.A. Moses. 2010. The anti-angiogenic peptide, loop 6, binds insulin-like growth factor-1 receptor. *J. Biol. Chem.* 285:41886–41895.
- Franklin, R.A., W. Liao, A. Sarkar, M.V. Kim, M.R. Bivona, K. Liu, E.G. Pamer, und M.O. Li. 2014. The Cellular and Molecular Origin of Tumor-associated Macrophages. *Science* 344:921–925.
- Frede, S., C. Stockmann, P. Freitag, und J. Fandrey. 2006. Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem. J.* 396:517–527.

- Frei, A.P., O.-Y. Jeon, S. Kilcher, H. Moest, L.M. Henning, C. Jost, A. Plücker, J. Mercer, R. Aebbersold, E.M. Carreira, und B. Wollscheid. 2012. Direct identification of ligand-receptor interactions on living cells and tissues. *Nat. Biotechnol.* 30:997–1001.
- French, A.P., S. Mills, R. Swarup, M.J. Bennett, und T.P. Pridmore. 2008. Colocalization of fluorescent markers in confocal microscope images of plant cells. *Nature Protocols* 3:619–628.
- Frimpong, A., E.D.A. Owusu, J.A. Amponsah, E. Obeng-Aboagye, W. van der Puije, A.F. Frempong, K.A. Kusi, und M.F. Ofori. 2022. Cytokines as Potential Biomarkers for Differential Diagnosis of Sepsis and Other Non-Septic Disease Conditions. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12:901433.
- Gane, J.M., R.A. Stockley, und E. Sapey. 2016. TNF- α Autocrine Feedback Loops in Human Monocytes: The pro- and anti-inflammatory roles of the TNF- α receptors support the concept of selective TNFR1 blockade in vivo. *J. Immunol. Res.* 2016:1079851.
- Giannopoulos, G., Pavlakis, K., Parasi, A., Kavatzas, N., Tiniakos, D., Karakosta, A., Tzanakis, N., & Peros, G. (2008). The expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and their tissue inhibitor 2 in pancreatic ductal and ampullary carcinoma and their relation to angiogenesis and clinicopathological parameters. *Anticancer Res.* 28(3B), 1875–1881.
- Gianluigi Giannelli, Carlo Bergamini, Felice Marinosci, Emilia Fransvea, Michele Quaranta, Luigi Lupo, Oronzo Schiraldi, und Salvatore Antonaci. 2002. Clinical role of MMP-2/TIMP-2 imbalance in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer.* 97:425–431.
- Gohji, K., N. Fujimoto, J. Ohkawa, A. Fujii, und M. Nakajima. 1998. Imbalance between serum matrix metalloproteinase-2 and its inhibitor as a predictor of recurrence of urothelial cancer. *Br. J. Cancer* 77:650–655.
- Gómez-Rial, J., M.J. Currás-Tuala, I. Rivero-Calle, A. Gómez-Carballa, M. Cebey-López, C. Rodríguez-Tenreiro, A. Dacosta-Urbieto, C. Rivero-Velasco, N. Rodríguez-Núñez, R. Trastoy-Pena, J. Rodríguez-García, A. Salas, und F. Martín-Torres. 2020. Increased Serum Levels of sCD14 and sCD163 Indicate a Preponderant Role for Monocytes in COVID-19 Immunopathology. *Front. Immunol* 11:560381.
- Gomis-Rüth, F.X., K. Maskos, M. Betz, A. Bergner, R. Huber, K. Suzuki, N. Yoshida, H. Nagase, K. Brew, G.P. Bourenkov, H. Bartunik, und W. Bode. 1997. Mechanism of inhibition of the human matrix metalloproteinase stromelysin-1 by TIMP-1. *Nature* 389:77–81.
- Gouyer, V., M. Conti, P. Devos, F. Zerimech, M.-C. Copin, E. Crème, A. Wurtz, H. Porte, und G. Huet. 2005. Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 is an independent predictor of prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma who undergo resection with curative intent. *Cancer* 103:1676–1684.

- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, und R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36:59–74.
- Griffith, T.S., S.R. Wiley, M.Z. Kubin, L.M. Sedger, C.R. Maliszewski, und N.A. Fanger. 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *J. Exp. Med.* 189:1343–1354.
- Groblewska, M., B. Mroczko, M. Gryko, A. Pryczynicz, K. Guzińska-Ustymowicz, B. Kędra, A. Kemon, und M. Szmitkowski. 2014. Serum levels and tissue expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) in colorectal cancer patients. *Tumor Biol.* 35:3793–3802.
- Groft, L.L., H. Muzik, N.B. Rewcastle, R.N. Johnston, V. Knäuper, M.A. Lafleur, P.A. Forsyth, und D.R. Edwards. 2001. Differential expression and localization of TIMP-1 and TIMP-4 in human gliomas. *Br. J. Cancer* 85:55–63.
- Grünwald, B., V. Harant, S. Schaten, M. Frühschütz, R. Spallek, B. Höchst, K. Stutzer, S. Berchtold, M. Erkan, O. Prokopchuk, M. Martignoni, I. Esposito, M. Heikenwalder, A. Gupta, J. Siveke, P. Saftig, P. Knolle, D. Wohlleber, und A. Krüger. 2016. Pancreatic Premalignant Lesions Secrete Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1, Which Activates Hepatic Stellate Cells Via CD63 Signaling to Create a Premetastatic Niche in the Liver. *Gastroenterology* 151:1011-1024.e7.
- Grünwald, B., B. Schoeps, und A. Krüger. 2019. Recognizing the Molecular Multifunctionality and Interactome of TIMP-1. *Trends Cell Biol.* 29:6–19.
- Gu, X., M. Fu, Y. Ding, H. Ni, W. Zhang, Y. Zhu, X. Tang, L. Xiong, J. Li, L. Qiu, J. Xu, und J. Zhu. 2014. TIMP-3 expression associates with malignant behaviors and predicts favorable survival in HCC. *PloS one* 9: e106161.
- Guha, M., und N. Mackman. 2001. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13:85–94.
- Guha, M., M.A. O’Connell, R. Pawlinski, A. Hollis, P. McGovern, S.F. Yan, D. Stern, und N. Mackman. 2001. Lipopolysaccharide activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and tumor necrosis factor alpha expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression. *Blood* 98:1429–1439.
- Gyawali, B., K. Ramakrishna, und A.S. Dhamoon. 2019. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med.* 7:2050312119835043.

- Hagemann, T., B. Gunawan, M. Schulz, L. Füzesi, und C. Binder. 2001. mRNA expression of matrix metalloproteases and their inhibitors differs in subtypes of renal cell carcinomas. *Eur. J. Cancer*. 37:1839–1846.
- Hamilton, J.A. 2008. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature Reviews. Immunology* 8:533–544.
- Hansel, D.E., A. Rahman, S. Wehner, V. Herzog, C.J. Yeo, und A. Maitra. 2003. Increased expression and processing of the Alzheimer amyloid precursor protein in pancreatic cancer may influence cellular proliferation. *Cancer Res.* 63:7032–7037.
- Harris, A.L. 2002. Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews. Cancer* 2:38–47.
- Hashimoto, G., T. Aoki, H. Nakamura, K. Tanzawa, und Y. Okada. 2001. Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *FEBS letters* 494:192–195.
- Haveman, J. 1999. The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth. J. Med.* 55:132–141.
- Hayakawa, T., K. Yamashita, K. Tanzawa, E. Uchijima, und K. Iwata. 1992. Growth-promoting activity of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) for a wide range of cells A possible new growth factor in serum. *FEBS letters* 298:29–32.
- Hayashi, T., K. Fujita, S. Nojima, Y. Hayashi, K. Nakano, Y. Ishizuya, C. Wang, Y. Yamamoto, T. Kinouchi, K. Matsuzaki, N. Kawamura, K. Jingshi, A. Kawashima, A. Nagahara, T. Ujike, M. Uemura, R. Imamura, E. Morii, und N. Nonomura. 2017. Peripheral blood monocyte count reflecting tumor-infiltrating macrophages is a predictive factor of adverse pathology in radical prostatectomy specimens. *The Prostate* 77:1383–1388.
- Hayes, J.M., M.R. Wormald, P.M. Rudd, und G.P. Davey. 2016. Fc gamma receptors: glycobiology and therapeutic prospects. *J. Inflamm. Res.* 9:209–219.
- Heinicke, E., U. Kumar, und D.G. Munoz. 1992. Quantitative Dot-blot assay for proteins using enhanced chemiluminescence. *J. Immunol. Methods* 152:227–236.
- Heinrichs, D., M. Knauel, C. Offermanns, M.-L. Berres, A. Nellen, L. Leng, P. Schmitz, R. Bucala, C. Trautwein, C. Weber, J. Bernhagen, und H.E. Wasmuth. 2011. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) exerts antifibrotic effects in experimental liver fibrosis via CD74. *PNAS.* 108:17444–17449.

- Hermann, C.D., B. Schoeps, C. Eckfeld, E. Munkhbaatar, L. Kniep, O. Prokopchuk, N. Wirges, K. Steiger, D. Häußler, P. Knolle, E. Poulton, R. Khokha, B.T. Grünwald, I.E. Demir, und A. Krüger. 2021. TIMP1 expression underlies sex disparity in liver metastasis and survival in pancreatic cancer. *J. Exp. Med.* 218: e20210911.
- Hernandez-Barrantes, S., Y. Shimura, P.D. Soloway, Q.A. Sang, und R. Fridman. 2001. Differential roles of TIMP-4 and TIMP-2 in pro-MMP-2 activation by MT1-MMP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281:126–130.
- Herr, C., S. Mang, B. Mozafari, K. Guenther, T. Speer, M. Seibert, S.K. Srikakulam, C. Beisswenger, F. Ritzmann, A. Keller, R. Mueller, S. Smola, D. Eisinger, M. Zemlin, G. Danziger, T. Volk, S. Hoersch, M. Krawczyk, F. Lammert, T. Adams, G. Wagenpfeil, M. Kindermann, C. Marcu, Z.W.D. Ataya, M. Mittag, K. Schwarzkopf, F. Custodis, D. Grandt, H. Schaefer, K. Eltges, P.M. Lepper, und R. Bals. 2021. Distinct patterns of blood cytokines beyond a cytokine storm predict mortality in COVID-19. *J. Inflamm. Res.* 14:4651–4667.
- Heymann, F., C. Trautwein, und F. Tacke. 2009. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 8:307–318.
- Hilska, M., P.J. Roberts, Y.U. Collan, V.J.O. Laine, J. Kössi, P. Hirsimäki, O. Rahkonen, und M. Laato. 2007. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, -2, -7 and -13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, -2, -3 and -4 in colorectal cancer. *Int. J. Cancer* 21:714–723.
- Höckel, M., und P. Vaupel. 2001. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:266–276.
- Hoe, H.-S., K.J. Lee, R.S.E. Carney, J. Lee, A. Markova, J.-Y. Lee, B.W. Howell, B.T. Hyman, D.T.S. Pak, G. Bu, und G.W. Rebeck. 2009. Interaction of reelin with amyloid precursor protein promotes neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* 29:7459–7473.
- Hoffmann, U., T. Bertsch, E. Dvortsak, C. Liebetrau, S. Lang, V. Liebe, G. Huhle, M. Borggreffe, und M. Brueckmann. 2006. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors are elevated in severe sepsis: prognostic value of TIMP-1 in severe sepsis. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl.* 38:867–872.
- Holten-Andersen, M.N., I.J. Christensen, H.J. Nielsen, R.W. Stephens, V. Jensen, O.H. Nielsen, S. Sørensen, J. Overgaard, H. Lilja, A. Harris, G. Murphy, und N. Brünner. 2002. Total levels of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 in plasma yield high diagnostic sensitivity and specificity in patients with colon cancer. *Clin. Cancer Res.* 8:156–164.

- Holten-Andersen, M.N., R.W. Stephens, H.J. Nielsen, G. Murphy, I.J. Christensen, W. Stetler-Stevenson, and N. Brüner. 2000. High preoperative plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels are associated with short survival of patients with colorectal cancer. *Clin. Cancer Res.* 6:4292–4299.
- Honkavuori, M., Talvensaaari-Mattila, A., Puistola, U., Turpeenniemi-Hujanen, T., & Santala, M. (2008). High serum TIMP-1 is associated with adverse prognosis in endometrial carcinoma. *Anticancer Res.*, 28(5A), 2715–2719.
- Honkavuori-Toivola, M., Santala, M., Soini, Y., Turpeenniemi-Hujanen, T., & Talvensaaari-Mattila, A. (2013). Combination of strong MMP-2 and weak TIMP-2 immunostainings is a significant prognostic factor in endometrial carcinoma. *Disease Markers*, 35(4), 261–266
- Hu, X., D. Li, W. Zhang, J. Zhou, B. Tang, and L. Li. 2012. Matrix metalloproteinase-9 expression correlates with prognosis and involved in ovarian cancer cell invasion. *Arch. Gynecol. Obstet.* 286:1537–1543.
- Huang, L.-W., A.P. Garrett, D.A. Bell, W.R. Welch, R.S. Berkowitz, and S.C. Mok. 2000. Differential expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protein and mRNA in epithelial ovarian tumors. *Gynecol. Oncol.* 77:369–376.
- Hundhausen, C., D. Misztela, T.A. Berkhout, N. Broadway, P. Saftig, K. Reiss, D. Hartmann, F. Fahrenholz, R. Postina, V. Matthews, K.-J. Kallen, S. Rose-John, and A. Ludwig. 2003. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 102:1186–1195.
- Iniesta, P., A. Morán, C. de Juan, A. Gómez, F. Hernando, C. García-Aranda, C. Frías, A. Díaz-López, F.-J. Rodríguez-Jiménez, J.-L. Balibrea, and M. Benito. 2007. Biological and clinical significance of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* 17:217–223.
- Itoh, Y., and H. Nagase. 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.* 270:16518–16521.
- Ivanova, E.A., and A.N. Orekhov. 2016. Monocyte Activation in Immunopathology: Cellular Test for Development of Diagnostics and Therapy. *J. Immunol. Res.* 2016:4789279.

- Iyer, S., S. Wei, K. Brew, and K.R. Acharya. 2007. Crystal structure of the catalytic domain of matrix metalloproteinase-1 in complex with the inhibitory domain of tissue inhibitor of metalloproteinase-1. *J. Biol. Chem.* 282:364–371.
- Jafarzadeh, A., P. Chauhan, B. Saha, S. Jafarzadeh, and M. Nemati. 2020. Contribution of monocytes and macrophages to the local tissue inflammation and cytokine storm in COVID-19: Lessons from SARS and MERS, and potential therapeutic interventions. *Life Sci.* 257:118102.
- Jain, A., R. Liu, Y.K. Xiang, and T. Ha. 2012. Single-molecule pull-down for studying protein interactions. *Nat. Protoc.* 7:445–452.
- Jakubzick, C., E.L. Gautier, S.L. Gibbings, D.K. Sojka, A. Schlitzer, T.E. Johnson, S. Ivanov, Q. Duan, S. Bala, T. Condon, N. van Rooijen, J.R. Grainger, Y. Belkaid, A. Ma'ayan, D.W.H. Riches, W.M. Yokoyama, F. Ginhoux, P.M. Henson, and G.J. Randolph. 2013. Minimal differentiation of classical monocytes as they survey steady-state tissues and transport antigen to lymph nodes. *Immunity* 39:599–610.
- Jakubzick, C.V., G.J. Randolph, and P.M. Henson. 2017. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nat. Rev. Immunol.* 17:349–362.
- Stracke, J. O., Hutton, M., Stewart, M., Pendás, A. M., Smith, B., López-Otin, C., Murphy, G., & Knäuper, V. (2000). Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *The J. Biol. Chem.*, 275(20), 14809–14816.
- Janeway, C.A., and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 20:197–216.
- Jerabek-Willemsen, M., T. André, R. Wanner, H.M. Roth, S. Duhr, P. Baaske, and D. Breitsprecher. 2014. MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *J. Mol. Struct.* 1077:101–113.
- Jiang, X., X. Huang, J. Li, Y. Shi, and L. Zhou. 2000. Relationship between tissue inhibitors of metalloproteinase and metastasis and prognosis in breast cancer. *Zhonghua wai ke za zhi* 38:291-3, 19.
- Jiang, Y., I.D. Goldberg, and Y.E. Shi. 2002. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21:2245–2252.
- Jin, J., J. Lin, A. Xu, J. Lou, C. Qian, X. Li, Y. Wang, W. Yu, and H. Tao. 2021. CCL2: An Important Mediator Between Tumor Cells and Host Cells in Tumor Microenvironment. *Front. Oncol.* 11:722916.

- Jung, K., L. Nowak, M. Lein, F. Priem, D. Schnorr, und S.A. Loening. 1997. Matrix metalloproteinases 1 and 3, tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and the complex of metalloproteinase-1/tissue inhibitor in plasma of patients with prostate cancer. *Int. J. Cancer* 74:220–223.
- Jung, K.-K., X.-W. Liu, R. Chirco, R. Fridman, und H.-R.C. Kim. 2006. Identification of CD63 as a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 interacting cell surface protein. *EMBO J.* 25:3934–3942.
- Jung, S.S., S. Gauthier, und N.R. Cashman. 1999. β -Amyloid precursor protein is detectable on monocytes and is increased in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 20:249–257.
- Jung, Y.-S. 2014. A novel function of TIMP1/CD63 signaling in the regulation of tumor metabolism. *FASEB J.* 28.
- Kaija, H.M., T. Särkioja, M.-L. Kortelainen, J.T. Vuoristo, H.V. Huikuri, und K.S. Porvari. 2012. Stress-specific responses of p21 expression: implication of transcript variant p21 alt-a in long-term hypoxia. *J. Cell. Biochem.* 113:544–552.
- Kallakury, B.V.S., S. Karikhalli, A. Haholu, C.E. Sheehan, N. Azumi, und J.S. Ross. 2001. Increased Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases 1 and 2 Correlate with Poor Prognostic Variables in Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7:3113–3119.
- Kang, K.-H., S.-Y. Park, S.B. Rho, und J.-H. Lee. 2008. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 interacts with angiotensin II type 2 receptor and additively inhibits angiogenesis. *Cardiovasc. Res.* 79:150–160.
- Kapsoritakis, A.N., A.I. Kapsoritaki, I.P. Davidi, V.D. Lotis, A.C. Manolakis, P.I. Mylonis, A.T. Theodoridou, A.E. Germanis, und S.P. Potamianos. 2008. Imbalance of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) - 1 and - 4 serum levels, in patients with inflammatory bowel disease. *BMC Gastroenterol.* 8:55.
- Karimi, A., P. Shobeiri, A. Kulasinghe, und N. Rezaei. 2021. Novel systemic inflammation markers to predict COVID-19 prognosis. *Front. Immunol.* 12.
- Karlmark, K.R., F. Tacke, und I.R. Dunay. 2012. Monocytes in health and disease - Minireview. *J. Microbiol. Immunol.* 2:97–102.
- Kashiwagi, M., M. Tortorella, H. Nagase, und K. Brew. 2001. TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5). *J. Biol. Chem.* 276:12501–12504.
- Kiefer, J., J. Zeller, B. Bogner, I.A. Hörbrand, F. Lang, E. Deiss, O. Wwinner, M. Fricke, S. Kreuzaler, E. Smudde, M. Huber-Lang, K. Peter, K.J. Woollard, und S.U. Eisenhardt. 2021. An unbiased flow

cytometry-based approach to assess subset-specific circulating monocyte activation and cytokine profile in whole blood. *Front. Immunol.* 12:641224.

Kim, Y.-S., S.-H. Kim, J.-G. Kang, und J.-H. Ko. 2012. Expression level and glycan dynamics determine the net effects of TIMP-1 on cancer progression. *BMB Rep.* 45:623–628.

Kiss, M., A.A. Caro, G. Raes, und D. Laoui. 2020. Systemic Reprogramming of monocytes in cancer. *Front. Oncol.* 10:1399.

Klasen, C., K. Ohl, M. Sternkopf, I. Shachar, C. Schmitz, N. Heussen, E. Hobeika, E. Levit-Zerdoun, K. Tenbrock, M. Reth, J. Bernhagen, und O. El Bounkari. 2014. MIF promotes B cell chemotaxis through the receptors CXCR4 and CD74 and ZAP-70 signaling. *J. Immun.* 192:5273–5284.

Kleeff, J., M. Korc, M. Apte, C. La Vecchia, C.D. Johnson, A.V. Biankin, R.E. Neale, M. Tempero, D.A. Tuveson, R.H. Hruban, und J.P. Neoptolemos. 2016. Pancreatic cancer. *Nat. Rev. Dis. Primers* 2:16022.

Klein, G., L. Dombos, und B. Gothoskar. 1972. Sensitivity of Epstein-Barr virus (EBV) producer and non-producer human lymphoblastoid cell lines to superinfection with EB-virus. *Int. J. Cancer* 10:44–57.

Klenotic, P.A., F.L. Munier, L.Y. Marmorstein, und B. Anand-Apte. 2004. Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is a binding partner of epithelial growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 (EFEMP1). Implications for macular degenerations. *J. Biol. Chem.* 279:30469–30473.

Kluger, H.M., K. Hoyt, A. Bacchiocchi, T. Mayer, J. Kirsch, Y. Kluger, M. Sznol, S. Ariyan, A. Molinaro, und R. Halaban. 2011. Plasma Markers for Identifying Patients with Metastatic Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 17:2417–2425.

Knäuper, V., H. Will, C. López-Otin, B. Smith, S.J. Atkinson, H. Stanton, R.M. Hembry, und G. Murphy. 1996. Cellular mechanisms for human procollagenase-3 (MMP-13) activation. Evidence that MT1-MMP (MMP-14) and gelatinase a (MMP-2) are able to generate active enzyme. *J. Biol. Chem.* 271:17124–17131.

Kobuch, J., H. Cui, B. Grünwald, P. Saftig, P.A. Knolle, und A. Krüger. 2015. TIMP-1 signaling via CD63 triggers granulopoiesis and neutrophilia in mice. *Haematologica* 100:1005–1013.

Komura, T., Y. Sakai, K. Harada, K. Kawaguchi, H. Takabatake, H. Kitagawa, T. Wada, M. Honda, T. Ohta, Y. Nakanuma, und S. Kaneko. 2015. Inflammatory features of pancreatic cancer highlighted by monocytes/macrophages and CD4+ T cells with clinical impact. *Cancer Sci.* 106:672–686.

- Kossakowska, A.E., D.R. Edwards, C. Prusinkiewicz, M.C. Zhang, D. Guo, S.J. Urbanski, T. Grogan, L.A. Marquez, und A. Janowska-Wieczorek. 1999. Interleukin-6 Regulation of Matrix Metalloproteinase (MMP-2 and MMP-9) and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase (TIMP-1) Expression in Malignant Non-Hodgkin's Lymphomas. *Blood* 94:2080–2089.
- Kotzsch, M., J. Farthmann, A. Meye, S. Fuessel, G. Baretton, V.C. Tjan-Heijnen, M. Schmitt, T. Luther, F.C. Sweep, V. Magdolen, und P.N. Span. 2005. Prognostic relevance of uPAR-del4/5 and TIMP-3 mRNA expression levels in breast cancer. *Eur. J. Cancer*. 41:2760–2768.
- Kuhn, P.-H., H. Wang, B. Dislich, A. Colombo, U. Zeitschel, J.W. Ellwart, E. Kremmer, S. Rossner, und S.F. Lichtenthaler. 2010. ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* 29:3020–3032.
- Kumari, N., B.S. Dwarakanath, A. Das, und A.N. Bhatt. 2016. Role of interleukin-6 in cancer progression and therapeutic resistance. *Tumor Biol.* 37:11553–11572.
- Kveiborg, M., J. Jacobsen, M.-H. Lee, H. Nagase, U.M. Wewer, und G. Murphy. 2010. Selective inhibition of ADAM12 catalytic activity through engineering of tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (TIMP-2). *Biochem. J.* 430:79–86.
- Kwon, S.J., J.J. Song, und Y.J. Lee. 2005. Signal pathway of hypoxia-inducible factor-1alpha phosphorylation and its interaction with von Hippel-Lindau tumor suppressor protein during ischemia in MiaPaCa-2 pancreatic cancer cells. *Clin. Cancer Res* 11:7607–7613.
- Lambert, E., L. Bridoux, J. Devy, E. Dassé, M.-L. Sowa, L. Duca, W. Hornebeck, L. Martiny, und E. Petitfrère-Charpentier. 2009. TIMP-1 binding to proMMP-9/CD44 complex localized at the cell surface promotes erythroid cell survival. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:1102–1115.
- Lambert, E., E. Dassé, B. Haye, und E. Petitfrère. 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 49:187–198.
- Laßek, M., J. Weingarten, U. Einsfelder, P. Brendel, U. Müller, und W. Volkandt. 2013. Amyloid precursor proteins are constituents of the presynaptic active zone. *J. Neurochem.* 127:48–56.
- Ławicki, S., M. Zajkowska, E.K. Głażewska, G.E. Będkowska, und M. Szmitkowski. 2017. Plasma levels and diagnostic utility of VEGF, MMP-2 and TIMP-2 in the diagnostics of breast cancer patients. *Biomarkers* 22:157–164.
- Le, Q., A.R. Leonti, T.T. Tang, S. Castro, C. Nourigat-Mckay, L. Perkins, R.E. Ries, J.L. Smith, T.A. Hylkema, L. Pardo, C. Abrahams, K. Bedard, A. Molina, L. Eidenschink Brodersen, M.R. Loken, und

- S. Meshinchi. 2021. Therapeutic Targeting of CD74 with STRO-001 Antibody-Drug Conjugate in AML and ALL. *Blood* 138:509.
- Lee, S., K.K. Desai, K.A. Iczkowski, R.G. Newcomer, K.J. Wu, Y.-G. Zhao, W.W. Tan, M.D. Roycik, and Q.-X.A. Sang. 2006. Coordinated peak expression of MMP-26 and TIMP-4 in preinvasive human prostate tumor. *Cell Res.* 16:750–758.
- Lein, M., K. Jung, C. Laube, T. Hbner, B. Winkelmann, C. Stephan, S. Hauptmann, B. Rudolph, D. Schnorr, und S.A. Loening. 2000. Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* 85:801–804.
- Lempinen, M., I. Lyytinen, A. Nordin, T. Tervahartiala, H. Mäkisalo, T. Sorsa, und H. Isoniemi. 2013. Prognostic value of serum MMP-8, -9 and TIMP-1 in patients with hepatocellular carcinoma *Ann. Med.* 45:482–487.
- Leng, L., C.N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R.A. Mitchell, und R. Bucala. 2003. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J. Exp. Med.* 197:1467–1476.
- Lewis, C., und C. Murdoch. 2005. Macrophage Responses to Hypoxia. *Am. J. Clin. Pathol.* 167:627–635.
- Lichtinghagen, R., P.B. Musholt, M. Lein, A. Römer, B. Rudolph, G. Kristiansen, S. Hauptmann, D. Schnorr, S.A. Loening, und K. Jung. 2002. Different mRNA and Protein Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1 in Benign and Malignant Prostate Tissue. *Eur. Urol.* 42:398–406.
- Lin, J.-S., und E.-M. Lai. 2017. Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. *Methods Mol. Biol.* 1615:211–219.
- Liotta, L.A., K. Tryggvason, S. Garbisa, I. Hart, C.M. Foltz, und S. Shafie. 1980. Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284:67–68.
- Lippitz, B.E., und R.A. Harris. 2016. Cytokine patterns in cancer patients: A review of the correlation between interleukin 6 and prognosis. *Oncoimmunology* 5: e1093722.
- Liss, M., N. Sreedhar, A. Keshgegian, G. Sauter, M.R. Chernick, G.C. Prendergast, und U.M. Wallon. 2009. Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-4 Is Elevated in Early-Stage Breast Cancers with Accelerated Progression and Poor Clinical Course. *Am. J. Clin. Pathol.* 175:940–946.
- Liu, Q., J. Zhang, H. Tran, M.M. Verbeek, K. Reiss, S. Estus, und G. Bu. 2009. LRP1 shedding in human brain: roles of ADAM10 and ADAM17. *Mol. Neurodegener.* 4:17.

Liu, Q.Q., A. Cheng, Y. Wang, H. Li, L. Hu, X. Zhao, T. Wang, und F. He. 2020. Cytokines and their relationship with the severity and prognosis of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a retrospective cohort study. *BMJ open* 10: e041471.

Liu, X.-W., M.M. Bernardo, R. Fridman, und H.-R.C. Kim. 2003. Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 protects human breast epithelial cells against intrinsic apoptotic cell death via the focal adhesion kinase/phosphatidylinositol 3-kinase and MAPK signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 278:40364–40372.

Liu, Y.E., M. Wang, J. Greene, J. Su, S. Ullrich, H. Li, S. Sheng, P. Alexander, Q.A. Sang, und Y.E. Shi. 1997. Preparation and characterization of recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase 4 (TIMP-4). *J. Biol. Chem.* 272:20479–20483.

Lizarraga, F. Espinosa, M. Ceballos-Cancino, G., Vazquez-Santillan, K. Bahena-Ocampo, I., Schwarz-Cruz y Celis, A., Vega-Gordillo, M., Garcia Lopez, P., Maldonado, V. und Melendez-Zajgla, J. 2016. Tissue inhibitor of metalloproteinases-4 (TIMP-4) regulates stemness in cervical cancer cells. *Mol. Carcinog.* 55:1952–1961.

Lizarraga, F., Espinosa, M., Maldonado, V. und Melendez-Zajgla, J. 2005. Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-4 is Expressed in Cervical Cancer Patients. *Anticancer research* 25:623–627.

Lluri, G., G.D. Langlois, P.D. Soloway, und D.M. Jaworski. 2008. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) regulates myogenesis and beta1 integrin expression in vitro. *Exp. Cell. Res.* 314:11–24.

Loechel, F., J.W. Fox, G. Murphy, R. Albrechtsen, und U.M. Wewer. 2000. ADAM 12-S cleaves IGFBP-3 and IGFBP-5 and is inhibited by TIMP-3. *BBRC* 278:511–515.

Löffek, S., O. Schilling, und C.-W. Franzke. 2011. Series “matrix metalloproteinases in lung health and disease”: Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur. Respir. J.* 38:191–208.

Lorente, L., M.M. Martín, L. Labarta, C. Díaz, J. Solé-Violán, J. Blanquer, J. Orbe, J.A. Rodríguez, A. Jiménez, J.M. Borreguero-León, F. Belmonte, J.C. Medina, M.C. Llimiñana, J.M. Ferrer-Agüero, J. Ferreres, M.L. Mora, S. Lubillo, M. Sánchez, Y. Barrios, A. Sierra, und J.A. Páramo. 2009. Matrix metalloproteinase-9, -10, and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases-1 blood levels as biomarkers of severity and mortality in sepsis. *Crit. Care* 13:R158.

Louche, A., S.P. Salcedo, und S. Bigot. 2017. Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays. *Methods Mol. Biol.* 1615:247–255.

Lu, P., V.M. Weaver, und Z. Werb. 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell. Biol.* 196:395–406.

- Łukaszewicz-Zajac, M., M. Gryko, S. Pączek, M. Szmitkowski, B. Kędra, und B. Mroczko. 2019. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and its tissue inhibitor 2 (TIMP-2) in pancreatic cancer (PC). *Oncotarget* 10:395–403.
- Łukaszewicz-Zajac, M., B. Mroczko, K. Guzińska-Ustymowicz, A. Pryczynicz, M. Gryko, A. Kemon, B. Kędra, und M. Szmitkowski. 2013. Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and their tissue inhibitor 2 (TIMP-2) in gastric cancer patients. *Adv. Med. Sci.* 58:235–243.
- Ma, J., und A. Jemal. 2013. The rise and fall of cancer mortality in the USA: why does pancreatic cancer not follow the trend? *Future Oncol.* 9:917–919.
- Manenti, L., P. Paganoni, I. Floriani, F. Landoni, V. Torri, A. Buda, G. Taraboletti, R. Labianca, D. Belotti, und R. Giavazzi. 2003. Expression levels of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinases 2 and 9 and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 and 2 in the plasma of patients with ovarian carcinoma. *Eur. J. Cancer* 39:1948–1956.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, und F. Balkwill. 2008. Cancer-related inflammation. *Nature* 454:436–444.
- Mantovani, A., P. Allavena, S. Sozzani, A. Vecchi, M. Locati, und A. Sica. 2004. Chemokines in the recruitment and shaping of the leukocyte infiltrate of tumors. *Semin. Cancer Biol.* 14:155–160.
- Mantovani, A., T. Schioppa, C. Porta, P. Allavena, und A. Sica. 2006. Role of tumor-associated macrophages in tumor progression and invasion. *Cancer Metastasis Rev.* 25:315–322.
- Martin, P., R.R. Furman, S. Rutherford, J. Ruan, S. Ely, J. Greenberg, M. Coleman, S.J. Goldsmith, und J.P. Leonard. 2015. Phase I study of the anti-CD74 monoclonal antibody milatuzumab (hLL1) in patients with previously treated B-cell lymphomas. *J. Leuk. Lymphoma* 56:3065–3070.
- Masaki Mori, Koshi Mimori, Noriaki Sadanaga, Hiroshi Inoue, Yoichi Tanaka, Ken-ichi Mafune, Hiroaki Ueo, und Graham F. Barnard. 2000. Prognostic impact of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in esophageal carcinoma. *Int. J. Cancer* 88:575–578.
- Masjedi, A., V. Hashemi, M. Hojjat-Farsangi, G. Ghalamfarsa, G. Azizi, M. Yousefi, und F. Jadidi-Niaragh. 2018. The significant role of interleukin-6 and its signaling pathway in the immunopathogenesis and treatment of breast cancer. *Biomed. Pharmacother.* 108:1415–1424.
- Maskos, K., R. Lang, H. Tschesche, und W. Bode. 2007. Flexibility and variability of TIMP binding: X-ray structure of the complex between collagenase-3/MMP-13 and TIMP-2. *J. Mol. Biol.*, 366(4), 1222–1231.

- Masson, D., N. Rioux-Leclercq, P. Fergelot, F. Jouan, S. Mottier, S. Théoleyre, K. Bach-Ngohou, J.-J. Patard, and M.G. Denis. 2010. Loss of expression of TIMP3 in clear cell renal cell carcinoma *Eur. J. Cancer* 46:1430–1437.
- Matsuda, S., Y. Matsuda, and L. D’Adamio. 2009. CD74 interacts with APP and suppresses the production of Abeta. *Mol. Neurodegener.* 4:41.
- Matthews, V., B. Schuster, S. Schütze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K.-J. Kallen, and S. Rose-John. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J. Biol. Chem.* 278:38829–38839.
- Mengos, A.E., D.A. Gastineau, and M.P. Gustafson. 2019. The CD14+HLA-DRlo/neg Monocyte: An Immunosuppressive Phenotype That Restrains Responses to Cancer Immunotherapy. *Front. immunol* 10:1147.
- Miller, M.A., R.J. Sullivan, and D.A. Lauffenburger. 2017. Molecular Pathways: Receptor Ectodomain Shedding in Treatment, Resistance, and Monitoring of Cancer. *Clin. Cancer Res.* 23:623–629.
- Miron, N., M.-M. Miron, V.G.I. Milea, and V. Cristea. 2010. Proinflammatory cytokines: an insight into pancreatic oncogenesis. *Roum Arch Microbiol Immunol.* 69:183–189.
- Mochizuki, S., M. Shimoda, T. Shiomi, Y. Fujii, and Y. Okada. 2004. ADAM28 is activated by MMP-7 (matrilysin-1) and cleaves insulin-like growth factor binding protein-3. *BBRC* 315:79–84.
- Möller-Hackbarth, K., C. Dewitz, O. Schweigert, A. Trad, C. Garbers, S. Rose-John, and J. Scheller. 2013. A disintegrin and metalloprotease (ADAM) 10 and ADAM17 are major sheddases of T cell immunoglobulin and mucin domain 3 (Tim-3). *J. Biol. Chem.* 288:34529–34544.
- Monaco, G., B. Lee, W. Xu, S. Mustafah, Y.Y. Hwang, C. Carré, N. Burdin, L. Visan, M. Ceccarelli, M. Poidinger, A. Zippelius, J. Pedro de Magalhães, and A. Larbi. 2019. RNA-Seq Signatures Normalized by mRNA Abundance Allow Absolute Deconvolution of Human Immune Cell Types. *Cell Rep.* 26:1627-1640.e7.
- Montazersaheb, S., S.M. Hosseiniyan Khatibi, M.S. Hejazi, V. Tarhriz, A. Farjami, F. Ghasemian Sorbeni, R. Farahzadi, and T. Ghasemnejad. 2022. COVID-19 infection: an overview on cytokine storm and related interventions. *Viol J* .19.
- Moreira, J.M., M. Høeberg, U. Ulrik Lademann, B. Viuff, L.V. Jensen, J. Stenvang, S.B. Nygård, M.S. Ørum-Madsen, M.V. Vistesén, A.T. Fuglsang, S. Liu, and N. Brüner. 2015. Abstract P5-07-08: Identification and characterization of a new TIMP-1 binding protein. *Cancer Res.* 75: P5-07-08-P5-07-08.

- Morrison, C.J., und Overall, C.M. 2006. TIMP independence of matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation by membrane type 2 (MT2)-MMP is determined by contributions of both the MT2-MMP catalytic and hemopexin C domains. *J. Biol. Chem.* 281:26528–26539.
- Morrison, C.J., Butler, G.S. Bigg, H.F. Roberts, C.R. Soloway, P.D. und Overall. C.M 2001. Cellular activation of MMP-2 (Gelatinase A) by MT2-MMP occurs via a TIMP-2-independent pathway. *J. Biol. Chem.* 276:47402–47410.
- Mroczko, B., M. Groblewska, M. Gryko, B. Kedra, und M. Szmitkowski. 2010. Diagnostic usefulness of serum interleukin 6 (IL-6) and C-reactive protein (CRP) in the differentiation between pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *J. Clin. Lab. Anal.* 24:256–261. doi:10.1002/jcla.20395.
- Mroczko, B., M. Lukaszewicz-Zajac, U. Wereszczynska-Siemiatkowska, M. Groblewska, M. Gryko, B. Kedra, G. Jurkowska, und M. Szmitkowski. 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* 38:613–618.
- Müller, U.C., T. Deller, und M. Korte. 2017. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature reviews. Neuroscience* 18:281–298.
- Murdoch, C., M. Muthana, und C.E. Lewis. 2005. Hypoxia regulates macrophage functions in inflammation. *J. Immunol.* 175:6257–6263.
- Murphy, G. 2011. Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome biology* 12:233.
- Murphy, G., T.E. Cawston, und J.J. Reynolds. 1981. An inhibitor of collagenase from human amniotic fluid. Purification, characterization and action on metalloproteinases. *Biochem. J.* 195:167–170.
- Murphy, G., A. Houbrechts, M.I. Cockett, R.A. Williamson, M. O’Shea, und A.J. Docherty. 1991. The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity. *Biochemistry* 30:8097–8102.
- Murphy, G., und H. Nagase. 2008. Progress in matrix metalloproteinase research. *Mol. Asp.Med.* 29:290–308.
- Muzzillo, D.A., M. Imoto, Y. Fukuda, Y. Koyama, S. Saga, Y. Nagai, und T. Hayakawa. 1993. Clinical evaluation of serum tissue inhibitor of metalloproteinases-1 levels in patients with liver diseases. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 8:437–441.
- Mylona, E., C. Magkou, I. Giannopoulou, G. Agrogiannis, S. Markaki, A. Keramopoulos, und L. Nakopoulou. 2006. Expression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP)-3 protein in

invasive breast carcinoma: Relation to tumor phenotype and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* 8:1–8.

Nagao, A., M. Kobayashi, S. Koyasu, C.C.T. Chow, and H. Harada. 2019. HIF-1-Dependent Reprogramming of Glucose Metabolic Pathway of Cancer Cells and Its Therapeutic Significance. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

Nagase, H., R. Visse, and G. Murphy. 2006. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc. Res.* 69:562–573.

Nakamura, M., E. Ishida, K. Shimada, M. Kishi, H. Nakase, T. Sakaki, and N. Konishi. 2005. Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab. Invest.* 85:165–175.

Nakopoulou, L., I. Tsirmpa, P. Alexandrou, A. Louvrou, C. Ampela, S. Markaki, and P.S. Davaris. 2003. MMP-2 Protein in Invasive Breast Cancer and the Impact of MMP-2/TIMP-2 Phenotype on Overall Survival. *Breast Cancer Res. Treat.* 77:145–155.

Nukarinen, E., O. Lindström, K. Kuuliala, L. Kylänpää, V. Pettilä, P. Puolakkainen, A. Kuuliala, M. Hämäläinen, E. Moilanen, H. Repo, and J. Hästbacka. 2016. Association of Matrix Metalloproteinases - 7, -8 and -9 and TIMP -1 with Disease Severity in Acute Pancreatitis. A Cohort Study. *PLOS ONE* 11: e0161480.

Oh, W.K., R. Vargas, S. Jacobus, K. Leitzel, M.M. Regan, P. Hamer, K. Pierce, S. Brown-Shimer, W. Carney, S.M. Ali, P.W. Kantoff, and A. Lipton. 2011. Elevated plasma tissue inhibitor of metalloproteinase-1 levels predict decreased survival in castration-resistant prostate cancer patients. *Cancer* 117:517–525.

Okada, Y., S. Watanabe, I. Nakanishi, J. Kishi, T. Hayakawa, W. Watorek, J. Travis, and H. Nagase. 1988. Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases. *FEBS letters* 229:157–160.

Ólafsson, E.B., E.C. Ross, M. Varas-Godoy, and A. Barragan. 2019. TIMP-1 promotes hypermigration of Toxoplasma-infected primary dendritic cells via CD63-ITGB1-FAK signaling. *J. Cell. Sci.* 132.

Olingy, C.E., H.Q. Dinh, and C.C. Hedrick. 2019. Monocyte heterogeneity and functions in cancer. *J. Leukoc. Biol.* 106:309–322.

Orekhov, A.N., V.A. Orekhova, N.G. Nikiforov, V.A. Myasoedova, A.V. Grechko, E.B. Romanenko, D. Zhang, and D.A. Chistiakov. 2019. Monocyte differentiation and macrophage polarization. *VP* 2019, 3:10

- Pasciuto, E., T. Ahmed, T. Wahle, F. Gardoni, L. D'Andrea, L. Pacini, S. Jacquemont, F. Tassone, D. Balschun, C.G. Dotti, Z. Callaerts-Vegh, R. D'Hooge, U.C. Müller, M. Di Luca, B. de Strooper, und C. Bagni. 2015. Dysregulated ADAM10-Mediated Processing of APP during a Critical Time Window Leads to Synaptic Deficits in Fragile X Syndrome. *Neuron* 87:382–398.
- Paumier, J.-M., N.A. Py, L. García-González, A. Bernard, D. Stephan, L. Louis, F. Checler, M. Khrestchatsky, K. Baranger, und S. Rivera. 2019. Proamyloidogenic effects of membrane type 1 matrix metalloproteinase involve MMP-2 and BACE-1 activities, and the modulation of APP trafficking. *FASEB J.* 33:2910–2927.
- Pennanen, H., O. Kuittinen, Y. Soini, und T. TURPEENNIEMI-HUJANEN. 2004. Clinicopathological correlations of TIMP-1 and TIMP-2 in Hodgkin's lymphoma. *Eur. J. Haematol.* 72:1–9.
- Perides, G., E.R. Weiss, E.S. Michael, J.M. Laukkanen, J.S. Duffield, und M.L. Steer. 2011. TNF-alpha-dependent regulation of acute pancreatitis severity by Ly-6C(hi) monocytes in mice. *J. Biol. Chem.* 286:13327–13335.
- Petra Volland, Sophie Besig, Roland Rad, Thomas Braun, Dorothee M. Baur, Aurel Perren, Rupert Langer, Heinz Höfler, und Christian Prinz. 2009. Correlation of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase Expression in Ileal Carcinoids, Lymph Nodes and Liver Metastasis with Prognosis and Survival. *NEN* 89:66–78.
- Pettersen, E.F., T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, und T.E. Ferrin. 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25:1605–1612.
- Pietruszewska, W., J. Kobos, M. Gryczyński, T. Durko, und K. Bojanowska-Poźniak. 2008. Analysis of TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3 expression as a prognostic factor of laryngeal cancer progression. *Otolaryngol Pol.* 62:380–387.
- Plevin, R.E., M. Knoll, M. McKay, S. Arbabi, und J. Cuschieri. 2016. The Role of Lipopolysaccharide Structure in Monocyte Activation and Cytokine Secretion. *Shock* 45:22–27.
- Poelaert, B.J., S.M. Knoche, A.C. Larson, P. Pandey, P. Seshacharyulu, N. Khan, H.C. Maurer, K.P. Olive, Y. Sheinin, R. Ahmad, A.B. Singh, S.K. Batra, S. Rachagani, und J.C. Solheim. 2021. Amyloid Precursor-like Protein 2 Expression Increases during Pancreatic Cancer Development and Shortens the Survival of a Spontaneous Mouse Model of Pancreatic Cancer. *Cancers* 13.
- Porrello, A., P.L. Leslie, E.B. Harrison, B.K. Gorentla, S. Kattula, S.K. Ghosh, S.H. Azam, A. Holtzhausen, Y.L. Chao, M.C. Hayward, T.A. Waugh, S. Bae, V. Godfrey, S.H. Randell, C. Oderup, L.

- Makowski, J. Weiss, M.D. Wilkerson, D.N. Hayes, H.S. Earp, A.S. Baldwin, A.S. Wolberg, und C.V. Pecot. 2018. Factor XIIIa-expressing inflammatory monocytes promote lung squamous cancer through fibrin cross-linking. *Nat. Commun.* 9:1988.
- Poruk, K.E., M.A. Firpo, C.L. Scaife, D.G. Adler, L.L. Emerson, K.M. Boucher, und S.J. Mulvihill. 2013. Serum osteopontin and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 as diagnostic and prognostic biomarkers for pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 42:193–197.
- Potter, C., und A.L. Harris. 2004. Hypoxia Inducible Carbonic Anhydrase IX, Marker of Tumour: Hypoxia, Survival Pathway and Therapy Target. *Cell Cycle* 3:159–162.
- Powe, D.G., J.L. Brough, G.I. Carter, E.M. Bailey, W.G. Stetler-Stevenson, Turner, und R.E. Hewitt. 1997. TIMP-3 mRNA expression is regionally increased in moderately and poorly differentiated colorectal adenocarcinoma. *Br. J. Cancer* 75:1678–1683
- Prokopchuk, O., B. Grünwald, U. Nitsche, C. Jäger, O.L. Prokopchuk, E.C. Schubert, H. Friess, M.E. Martignoni, und A. Krüger. 2018. Elevated systemic levels of the matrix metalloproteinase inhibitor TIMP-1 correlate with clinical markers of cachexia in patients with chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *BMC cancer* 18:128.
- Pulido-Olmo, H., E. Rodríguez-Sánchez, J.A. Navarro-García, M.G. Barderas, G. Álvarez-Llamas, J. Segura, M. Fernández-Alfonso, L.M. Ruilope, und G. Ruiz-Hurtado. 2017. Rapid, Automated, and Specific Immunoassay to Directly Measure Matrix Metalloproteinase-9-Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1 Interactions in Human Plasma Using AlphaLISA Technology: A New Alternative to Classical ELISA. *Front. Immunol.* 8:853.
- Pulukuri, S.M., S. Patibandla, J. Patel, N. Estes, und J.S. Rao. 2007. Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors. *Oncogene* 26:5229–5237.
- Puthenveetil, R., C.-J. Lee, und A. Banerjee. 2020. Production of Recombinant Transmembrane Proteins from Mammalian Cells for Biochemical and Structural Analyses. *Curr Protoc Cell Biol* 87:e106.
- Qi, J.H., Q. Ebrahim, N. Moore, G. Murphy, L. Claesson-Welsh, M. Bond, A. Baker, und B. Anand-Apte. 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* 9:407–415.
- Rao, V.S., K. Srinivas, G.N. Sujini, und G.N.S. Kumar. 2014. Protein-protein interaction detection: methods and analysis. *Int J Proteomics* 2014:147648.
- Reder, A.T., K. Genç, P.V. Byskosh, und A.M. Porrini. 1998. Monocyte activation in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 4:162–168.

- Reiss, K., und P. Saftig. 2009. The “a disintegrin and metalloprotease” (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* 20:126–137.
- Remacle, A., McCarthy, K., Noël, A., Maguire, T., McDermott, E., O’Higgins, N., Foidart, J.M. und Duffy, M.J. 2000. High levels of TIMP-2 correlate with adverse prognosis in breast cancer. *Int. J. Cancer.* 89:118–121.
- Ries, C. 2014. Cytokine functions of TIMP-1. *CMLS* 71:659–672.
- Rivera, L.B., und G. Bergers. 2015. Intertwined regulation of angiogenesis and immunity by myeloid cells. *Trends Immunol.* 36:240–249
- Roche, P.A., M.S. Marks, und P. Cresswell. 1991. Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* 354:392–394.
- Rorive, S., X.M. Lopez, C. Maris, A.-L. Trepant, S. Sauvage, N. Sadeghi, I. Roland, C. Decaestecker, und I. Salmon. 2010. TIMP-4 and CD63: new prognostic biomarkers in human astrocytomas. *Mod. Pathol.* 23:1418–1428.
- Ross, J.S., P. Kaur, C.E. Sheehan, H.A.G. Fisher, R.A. Kaufman, und B.V.S. Kallakury. 2003. Prognostic Significance of Matrix Metalloproteinase 2 and Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 2 Expression in Prostate Cancer. *Mod. Pathol.* 16:198–205.
- Rossol, M., H. Heine, U. Meusch, D. Quandt, C. Klein, M.J. Sweet, und S. Hauschildt. 2011. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit. Rev. Immunol.* 31:379–446.
- Ryan, S. 2017. Serum sCD163 as a biomarker of adipose tissue inflammation in obstructive sleep apnoea patients: limits and perspectives. *Eur. Respir. J.* 50.
- Sakata, K., K. Shigemasa, N. Nagai, und K. Ohama. 2000. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary. *Int. J. Oncol.* 17:673–754.
- Schelter, F., B. Halbgewachs, P. Bäumler, C. Neu, A. Görlach, F. Schrötzlmair, und A. Krüger. 2011. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1-induced scattered liver metastasis is mediated by hypoxia-inducible factor-1 α . *Clin. Exp. Metastasis* 28:91–99.
- Schelter, F., J. Kobuch, M.L. Moss, J.D. Becherer, P.M. Comoglio, C. Boccaccio, und A. Krüger. 2010. A disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) mediates DN30 antibody-induced shedding of the met surface receptor. *J. Biol. Chem.* 285:26335–26340.

- Schmedtje, J.F., Y.S. Ji, W.L. Liu, R.N. DuBois, und M.S. Runge. 1997. Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *The J. Biol. Chem.* 272:601–608. d
- Schoeps, B., C. Eckfeld, L. Flüter, S. Keppler, R. Mishra, P. Knolle, F. Bayerl, J. Böttcher, C.D. Hermann, D. Häußler, und A. Krüger. 2021b. Identification of invariant chain CD74 as a functional receptor of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1). *J. Biol. Chem.* 297.
- Schoeps, B., C. Eckfeld, O. Prokopchuk, J. Böttcher, D. Häußler, K. Steiger, I.E. Demir, P. Knolle, O. Soehnlein, D.E. Jenne, C.D. Hermann, und A. Krüger. 2021a. TIMP1 Triggers Neutrophil Extracellular Trap Formation in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 81:3568–3579.
- Schröder, B. 2016. The multifaceted roles of the invariant chain CD74-More than just a chaperone. *Biochim. Biophys. Acta* 1863:1269–1281.
- Schrohl, A.-S., I.J. Christensen, A.N. Pedersen, V. Jensen, H. Mouridsen, G. Murphy, J.A. Foekens, N. Brunner, und M.N. Holten-Andersen. 2003. Tumor tissue concentrations of the proteinase inhibitors tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) are complementary in determining prognosis in primary breast cancer. *Mol. Cell Proteomics.* 2:164–172.
- Scilabra, S.D., M. Pighi, V. Pravatá, T. Schätzl, S.A. Müller, L. Troeberg, und S.F. Lichtenthaler. 2018. Increased TIMP-3 expression alters the cellular secretome through dual inhibition of the metalloprotease ADAM10 and ligand-binding of the LRP-1 receptor. *Sci. Rep.* 8:1–13.
- Sehnal, D., S. Bittrich, M. Deshpande, R. Svobodová, K. Berka, V. Bazgier, S. Velankar, S.K. Burley, J. Koča, und A.S. Rose. 2021. Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. *Nucleic Acids Res.* 49: W431-W437.
- Semenza, G.L. 2002. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem. Pharmacol.* 64:993–998.
- Semenza, G.L. 2009. Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1. *Semin. Cancer Biol.* 19:12–16.
- Seo, D.-W., S.H. Kim, S.-H. Eom, H.J. Yoon, Y.-R. Cho, P.-H. Kim, Y.K. Kim, J.-W. Han, T. Diaz, B. Wei, und W.G. Stetler-Stevenson. 2008. TIMP-2 disrupts FGF-2-induced downstream signaling pathways. *Microvasc. Res.* 76:145–151.
- Seubert, B., B. Grünwald, J. Kobuch, H. Cui, F. Schelter, S. Schaten, J.T. Siveke, N.H. Lim, H. Nagase, N. Simonavicius, M. Heikenwalder, T. Reinheckel, J.P. Sleeman, K.-P. Janssen, P.A. Knolle, und A.

- Krüger. 2015. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice. *Hepatology* 61:238–248.
- Sharif, O., V.N. Bolshakov, S. Raines, P. Newham, and N.D. Perkins. 2007. Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC Immunology* 8:1.
- Shi, C., und E.G. Pamer. 2011. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 11:762–774.
- Shinojima, T., Q. Yu, S.K. Huang, M. Li, R. Mizuno, E.T. Liu, D.S.B. Hoon, und L. Lessard. 2012. Heterogeneous epigenetic regulation of TIMP3 in prostate cancer. *Epigenetics* 7:1279–1289.
- Shive, C.L., W. Jiang, D.D. Anthony, und M.M. Lederman. 2015. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS* 29:1263–1265.
- Shrivastava, P., und M. Bhatia. 2010. Essential role of monocytes and macrophages in the progression of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol* 16:3995–4002.
- Siegel, R.L., K.D. Miller, H.E. Fuchs, und A. Jemal. 2022. Cancer statistics, 2022. *CA: Cancer J. Clin* 72:7–33
- Silva, R.L.L., M.B. Santos, P.L.S. Almeida, T.S. Barros, L. Magalhães, R.A. Cazzaniga, P.R.M. Souza, N.F. Luz, J. França-Costa, V.M. Borges, D.S. Lima-Junior, M.W. Lipscomb, M.S. Duthie, S.G. Reed, R.P. Almeida, und A.R. Jesus. 2017. sCD163 levels as a biomarker of disease severity in leprosy and visceral leishmaniasis. *PLOS Negl. Trop. Dis.* 11: e0005486.
- Sohail, A., Q. Sun, H. Zhao, M.M. Bernardo, J.-A. Cho, und R. Fridman. 2008. MT4-(MMP17) and MT6-MMP (MMP25), A unique set of membrane-anchored matrix metalloproteinases: properties and expression in cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 27:289–302.
- Soloway, P.D., C.M. Alexander, Z. Werb, und R. Jaenisch. 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* 13:2307–2314.
- Sondag, C.M., und C.K. Combs. 2004. Amyloid precursor protein mediates proinflammatory activation of monocytic lineage cells. *J. Biol. Chem.* 279:14456–14463.
- Sondag, C.M., und C.K. Combs. 2006. Amyloid precursor protein cross-linking stimulates beta amyloid production and pro-inflammatory cytokine release in monocytic lineage cells. *J. Neurochem.* 97:449–461.

- Sondag, C.M., und C.K. Combs. 2010. Adhesion of monocytes to type I collagen stimulates an APP-dependent proinflammatory signaling response and release of Abeta1-40. *J. Neuroinflammation* 7:22.
- Song, G., S. Xu, H. Zhang, Y. Wang, C. Xiao, T. Jiang, L. Wu, T. Zhang, X. Sun, L. Zhong, C. Zhou, Z. Wang, Z. Peng, J. Chen, und X. Wang. 2016. TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 35:1–12.
- Song, T., C. Dou, Y. Jia, K. Tu, und X. Zheng. 2015. TIMP-1 activated carcinoma-associated fibroblasts inhibit tumor apoptosis by activating SDF1/CXCR4 signaling in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* 6:12061–12079.
- Song, Y., F. DiMaio, R.Y.-R. Wang, D. Kim, C. Miles, T. Brunette, J. Thompson, und D. Baker. 2013. High-resolution comparative modeling with RosettaCM. *Structure* 21:1735–1742.
- Sozen, B., S. Ozturk, A. Yaba, und N. Demir. 2015. The p38 MAPK signalling pathway is required for glucose metabolism, lineage specification and embryo survival during mouse preimplantation development. *Mech. Dev.* 138 Pt 3:375–398.
- Sreekanthreddy, P., H. Srinivasan, D.M. Kumar, M.B. Nijaguna, S. Sridevi, M. Vrinda, A. Arivazhagan, A. Balasubramaniam, A.S. Hegde, B.A. Chandramouli, V. Santosh, M.R. Rao, P. Kondaiah, und K. Somasundaram. 2010. Identification of Potential Serum Biomarkers of Glioblastoma: Serum Osteopontin Levels Correlate with Poor Prognosis. *Epidemiol. Biomarkers Prev.* 19:1409–1422.
- Stamenkovic, I. 2000. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin. Cancer Biol.* 10:415–433.
- Stein, R., M.J. Mattes, T.M. Cardillo, H.J. Hansen, C.-H. Chang, J. Burton, S. Govindan, und D.M. Goldenberg. 2007. CD74: a new candidate target for the immunotherapy of B-cell neoplasms. *Clin. Cancer Res.* 13:5556s-5563s.
- Stuede, J.S., G. Maskarinec, E. Erber, M. Verheus, B.Y. Hernandez, J. Killeen, und J.M. Cline. 2010. Mammographic Density and Matrix Metalloproteinases in Breast Tissue. *Cancer Microenviron.* 3:57–65.
- Stratmann, B., M. Farr, und H. Tschesche. 2001. MMP-TIMP interaction depends on residue 2 in TIMP-4. *FEBS letters* 507:285–287.
- Su, C.-W., B.-F. Su, W.-L. Chiang, S.-F. Yang, M.-K. Chen, und C.-W. Lin. 2017. Plasma levels of the tissue inhibitor matrix metalloproteinase-3 as a potential biomarker in oral cancer progression. *Int. J. Med. Sci.* 14:37–44.

- Takawale, A., P. Zhang, V.B. Patel, X. Wang, G. Oudit, und Z. Kassiri. 2017. Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-1 Promotes Myocardial Fibrosis by Mediating CD63-Integrin β 1 Interaction. *Hypertension* 69:1092–1103.
- Tang, J., Y. Kang, L. Huang, L. Wu, und Y. Peng. 2020. TIMP1 preserves the blood-brain barrier through interacting with CD63/integrin β 1 complex and regulating downstream FAK/RhoA signaling. *Acta Pharm. Sin. B* 10:987–1003.
- Terpos, E., M.A. Dimopoulos, V. Shrivastava, K. Leitzel, D. Christoulas, M. Migkou, M. Gavriatopoulou, K. Anargyrou, P. Hamer, E. Kastiris, W. Carney, und A. Lipton. 2010. High levels of serum TIMP-1 correlate with advanced disease and predict for poor survival in patients with multiple myeloma treated with novel agents. *Leuk. Res.* 34:399–402.
- Thevenard, J., L. Verzeaux, J. Devy, N. Etique, A. Jeanne, C. Schneider, C. Hachet, G. Ferracci, M. David, L. Martiny, E. Charpentier, M. Khrestchatisky, S. Rivera, S. Dedieu, und H. Emonard. 2014. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 mediates endocytic clearance of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and promotes its cytokine-like activities. *PloS one* 9:e103839.
- Thomas, P., R. Khokha, F.A. Shepherd, R. Feld, und M.-S. Tsao. 2000. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J. Pathol.* 190:150–156.
- Toricelli, M., F.H.M. Melo, G.B. Peres, D.C.P. Silva, und M.G. Jasiulionis. 2013. Timp1 interacts with beta-1 integrin and CD63 along melanoma genesis and confers anoikis resistance by activating PI3-K signaling pathway independently of Akt phosphorylation. *Mol. Cancer* 12:22.
- Trovato, R., A. Fiore, S. Sartori, S. Canè, R. Giugno, L. Cascione, S. Paiella, R. Salvia, F. de Sanctis, O. Poffe, C. Anselmi, F. Hofer, S. Sartoris, G. Piro, C. Carbone, V. Corbo, R. Lawlor, S. Solito, L. Pinton, S. Mandruzzato, C. Bassi, A. Scarpa, V. Bronte, und S. Ugel. 2019. Immunosuppression by monocytic myeloid-derived suppressor cells in patients with pancreatic ductal carcinoma is orchestrated by STAT3. *J. Immunother. Cancer* 7:255.
- Tsagaraki, I., E.C. Tsilibary, und A.K. Tzinia. 2010. TIMP-1 interaction with α β 3 integrin confers resistance to human osteosarcoma cell line MG-63 against TNF- α -induced apoptosis. *Cell Tissue Res.* 342:87–96.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, und K. Tada. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer* 26:171–176.
- Turvey, S.E., und D.H. Broide. 2010. Innate immunity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125: S24-32.

- Uhlén, M., L. Fagerberg, B.M. Hallström, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, Å. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjöstedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A.-K. Szgyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.-H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J.M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, and F. Pontén. 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347:1260419.
- Urbaniak-Kujda, D., K. Kapelko-Slowik, I. Prajs, J. Dybko, D. Wolowiec, M. Biernat, M. Slowik, and K. Kuliczowski. 2016. Increased expression of metalloproteinase-2 and -9 (MMP-2, MMP-9), tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 (TIMP-1, TIMP-2), and EMMPRIN (CD147) in multiple myeloma. *Hematology* 21:26–33.
- Uribe-Querol, E., and C. Rosales. 2020. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front. Immunol.* 11:1066.
- Ushio, J., A. Kanno, E. Ikeda, K. Ando, H. Nagai, T. Miwata, Y. Kawasaki, Y. Tada, K. Yokoyama, N. Numao, K. Tamada, A.K. Lefor, and H. Yamamoto. 2021. Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: Epidemiology and Risk Factors. *Diagnostics* 11.
- Vidal, M., M.E. Cusick, and A.-L. Barabási. 2011. Interactome networks and human disease. *Cell* 144:986–998.
- Visscher, D.W., M. Höyhty, S.K. Ottosen, C.M. Liang, F.H. Sarkar, J.D. Crissman, and R. Fridman. 1994. Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence. *Int. J. Cancer* 59:339–344.
- Visse, R., and H. Nagase. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* 92:827–839.
- Vogelpoel, L.T.C., D.L.P. Baeten, E.C. de Jong, and J. den Dunnen. 2015. Control of cytokine production by human fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. *Front. Immunol.* 6:79.
- Wang, G.L., B.H. Jiang, E.A. Rue, and G.L. Semenza. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *PNAS.* 92:5510–5514.
- Wang, W.-M., G. Ge, N.H. Lim, H. Nagase, and D.S. Greenspan. 2006. TIMP-3 inhibits the procollagen N-proteinase ADAMTS-2. *Biochem. J.* 398:515–519.
- Weber, S., and P. Saftig. 2012. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* 139:3693–3709

- Welgus, H.G., G.P. Stricklin, A.Z. Eisen, E.A. Bauer, R.V. Cooney, und J.J. Jeffrey. 1979. A specific inhibitor of vertebrate collagenase produced by human skin fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 254:1938–1943.
- Wild, A., A. Ramaswamy, P. Langer, I. Celik, V. Fendrich, B. Chaloupka, B. Simon, und D.K. Bartsch. 2003. Frequent Methylation-Associated Silencing of the Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-3 Gene in Pancreatic Endocrine Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:1367–1373.
- Willenbrock, F., und G. Murphy. 1994. Structure-function relationships in the tissue inhibitors of metalloproteinases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150:S165-70.
- Williamson, R.A., F.A. Marston, S. Angal, P. Koklitis, M. Panico, H.R. Morris, A.F. Carne, B.J. Smith, T.J. Harris, und R.B. Freedman. 1990. Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP). *Biochem. J.* 268:267–274.
- Wood, M., K. Fudge, J.L. Mohler, A.R. Frost, F. Garcia, M. Wang, und M.E. Stearns. 1997. In situ hybridization studies of metalloproteinases 2 and 9 and TIMP-1 and TIMP-2 expression in human prostate cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 15:246–258.
- Woollard, K.J., und F. Geissmann. 2010. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions. *Nat. Rev. Cardiol.* 7:77–86.
- Wu, G., Y. Sun, K. Wang, Z. Chen, X. Wang, F. Chang, T. Li, P. Feng, und Z. Xia. 2016. Relationship between elevated soluble CD74 and severity of experimental and clinical ALI/ARDS. *Sci. Rep* 6:30067.
- Xiao, W., L. Wang, J. Howard, R. Kolhe, A.M. Rojiani, und M.V. Rojiani. 2019. TIMP-1-Mediated Chemoresistance via Induction of IL-6 in NSCLC. *Cancers* 11.
- Xu, L., A.Y. Hui, E. Albanis, M.J. Arthur, S.M. O’Byrne, W.S. Blaner, P. Mukherjee, S.L. Friedman, und F.J. Eng. 2005. Human hepatic stellate cell lines, LX-1 and LX-2: new tools for analysis of hepatic fibrosis. *Gut* 54:142–151.
- Gong, Y.L., Xu, G.M., Huang, W.D., und Chen. L.B. 2000. Expression of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of metalloproteinases and their local invasiveness and metastasis in Chinese human pancreatic cancer. *J. Surg. Oncol.* 73:95–99.
- Yeap, W.H., K.L. Wong, N. Shimasaki, E.C.Y. Teo, J.K.S. Quek, H.X. Yong, C.P. Diong, A. Bertolotti, Y.C. Linn, und S.C. Wong. 2016. CD16 is indispensable for antibody-dependent cellular cytotoxicity by human monocytes. *Sci. Rep.* 6:34310.
- Yee Koh, M., T.R. Spivak-Kroizman, und G. Powis. 2008. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem. Sci.* 33:526–534.

Yip, C., P. Foidart, A. Noël, und N.E. Sounni. 2019. MT4-MMP: The GPI-Anchored Membrane-Type Matrix Metalloprotease with Multiple Functions in Diseases. *Int J Mol Sci* 20

Ylisirniö, S., M. Höyhty, und T. Turpeenniemi-Hujanen. 2000. Serum matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitors of metalloproteinases -1, -2 in lung cancer—TIMP-1 as a prognostic marker. *Anticancer Res.* 20:1311–1316.

Yoshikawa, T., A. Tsuburaya, O. Kobayashi, M. Sairenji, H. Motohashi, S. Yanoma, und Y. Noguchi. 2000. Prognostic value of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 in plasma of patients with gastric cancer. *Cancer Lett.* 151:81–86

Yoshino, Y., T. Kageshita, M. Nakajima, M. Funakubo, und H. Ihn. 2008. Clinical relevance of serum levels of matrix metalloproteinase-2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in patients with malignant melanoma. *J. Dermatol.* 35:206–214.

Yu, W., Shuan-su C. Yu, Meng, Q. Brew, K und Woessner. J.F, 2000. TIMP-3 Binds to Sulfated Glycosaminoglycans of the Extracellular Matrix. *J. Biol. Chem.* 275:31226–31232.

Yukawa, N., T. Yoshikawa, M. Akaike, Y. Sugimasa, Y. Rino, M. Masuda, und T. Imada. 2007. Impact of plasma tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 on long-term survival in patients with colorectal cancer. *Oncology* 72:205–208.

Zhang, H., Q. Ma, Y.-W. Zhang, und H. Xu. 2012. Proteolytic processing of Alzheimer's β -amyloid precursor protein. *J. Neurochem.* 1:9–21.

Zhang, J., Y.-J. Cao, Y.-G. Zhao, Q.-X.A. Sang, und E.-K. Duan. 2002. Expression of matrix metalloproteinase-26 and tissue inhibitor of metalloproteinase-4 in human normal cytotrophoblast cells and a choriocarcinoma cell line, JEG-3. *Mol. Hum. Reprod.* 8:659–666.

Zhang, J., T. Wu, S. Zhan, N. Qiao, X. Zhang, Y. Zhu, N. Yang, Y. Sun, X.A. Zhang, D. Bleich, und X. Han. 2017. TIMP-1 and CD82, a promising combined evaluation marker for PDAC. *Oncotarget* 8:6496–6512.

Zhao, H., M.M. Bernardo, P. Osenkowski, A. Sohail, D. Pei, H. Nagase, M. Kashiwagi, P.D. Soloway, Y.A. DeClerck, und R. Fridman. 2004. Differential inhibition of membrane type 3 (MT3)-matrix metalloproteinase (MMP) and MT1-MMP by tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-2 and TIMP-3 regulates pro-MMP-2 activation. *J. Biol. Chem.* 279:8592–8601.

Zheng, H., und E.H. Koo. 2011. Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol. Neurodegener.* 6:27.

Zheng-Sheng Wu, Qiang Wu, Jiu-Hua Yang, Hong-Qun Wang, Xiang-Dong Ding, Feng Yang, and Xiao-Chun Xu. 2008a. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int. J. Cancer*. 122:2050–2056.

Zheng-Sheng Wu, Qiang Wu, Jiu-Hua Yang, Hong-Qun Wang, Xiang-Dong Ding, Feng Yang, and Xiao-Chun Xu. 2008b. Prognostic significance of MMP-9 and TIMP-1 serum and tissue expression in breast cancer. *Int. J. Cancer*. 122:2050–2056.

Zhou, Y., B. Fu, X. Zheng, D. Wang, C. Zhao, Y. Qi, R. Sun, Z. Tian, X. Xu, and H. Wei. 2020. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. *Natl. Sci. Rev.* 7:998–1002.

Zhu, L., H. Yu, S.-Y. Liu, X.-S. Xiao, W.-H. Dong, Y.-N. Chen, W. Xu, and T. Zhu. 2015. Prognostic value of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one* 10: e0124230.

Zhu, P.C., Y. Sun, R. Xu, Y. Sang, J. Zhao, G. Liu, L. Cai, C. Li, and S. Zhao. 2003. The interaction between ADAM 22 and 14-3-3zeta: regulation of cell adhesion and spreading. *BBRC* 301:991–999.

Ziegler-Heitbrock, L. 2007. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 81:584–592.

Ziello, J.E., I.S. Jovin, and Y. Huang. 2007. Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J. Biol. Med.* 80:51–60.

Zucker, S., C.E. Schmidt, A. Dufour, R.C. Kaplan, H.I. Park, and W. Jiang. 2009. ProMMP-2: TIMP-1 complexes identified in plasma of healthy individuals. *Connect. Tissue Res.* 50:223–231.

9. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. Achim Krüger** für die engagierte und prägende Betreuung meiner Doktorarbeit. Mir wurde von ihm stets das Vertrauen und die Freiheit gegeben, Projekte eigenständig zu planen und umzusetzen. Gleichzeitig hatte er zu jeder Zeit ein offenes Ohr für auftretende experimentelle und thematische Schwierigkeiten und unterstützte somit das Gelingen dieser Arbeit maßgeblich. Die ideenreichen und hypothesengetriebenen Denkanstöße während der wöchentlichen Laborbesprechung und während der Ausarbeitung von Manuskripten, wissenschaftlichen Anträgen und Vorträgen waren für mich sehr lehrreich. Ich bedanke mich weiterhin dafür, dass ich die Möglichkeit hatte, an der *Winterschool* in Tiers teilzunehmen. Ich bin froh um jegliche wegweisende Erfahrung, die ich in dieser gemeinsamen Zeit sammeln konnte.

Ich möchte mich bei den weiteren Mitgliedern meines Thesis Komitees, **Herrn Prof. Dr. Martin Klingenspor** und **Frau Dr. Selina Keppler** für die interessanten und hilfreichen Hilfestellungen und Anregungen während meiner Komitee-*Meetings* bedanken.

Ich danke **Herrn Prof. Dr. Percy Knolle** für die wertvollen Vorschläge während der *Research Seminare* und jeder Unterstützung, die er mir während und nach meiner Zeit im Institut angeboten hat.

Ein besonderer persönlicher Dank gilt **Herrn Dr. Benjamin Schoeps**. Er hat mich sowohl als kompetenter und motivierender Betreuer während meines Forschungspraktikums und während meiner Masterarbeit, als auch als engagierter und vertrauensvoller Kollege während meiner Doktorarbeit zu jeder Zeit unterstützt und ganz besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich danke ihm für die experimentelle Durchführung der Tierversuche, für die Unterstützung bei den Recherchetätigkeiten für das publizierte Interaktom-*Review*, für die effiziente Zusammenarbeit bei der Ausarbeitung des gemeinsamen CD74-Manuskripts und bei jeglicher Hilfe im Laboralltag. Auch bei der Ideenfindung und Ausarbeitung des Monozyten-Manuskripts war er eine unverzichtbare Bereicherung. Die Hilfe und Geduld, die er mir stets entgegengebracht hat, ist keinesfalls verständlich und hat mich mental sehr unterstützt.

Weiterhin danke ich besonders meinem Kollegen **Herrn Dr. Chris Hermann**, der mich jederzeit durch seine professionellen und hilfreichen Ratschläge und Ideen unterstützt hat. Chris fand immer eine Erklärung für ein Problem, konnte stets den Überblick über alle Projekte behalten und diese jederzeit durch seine Erfahrungen, seine weitreichenden Kenntnisse und durch seine klare und präzise Arbeitsweise bereichern. Ich danke ihm weiterhin für die Mitarbeit und die Ideen bei der Ausarbeitung des Interaktom-*Reviews*, für die aufwändigen und entscheidenden Transkriptom-Analysen für das

DANKSAGUNG

Monozyten-Manuskript, für die Durchführung des sCD163 ELISAs und für die Durchführung der Tierversuche.

Herrn Julian Frädrieh, der leider erst spät als geschätzter Kollege unser Team bereichert hat, danke ich ganz besonders für die fruchtbaren Diskussionen am Arbeitsplatz, für die grandiose Hilfe während der *Revision* des Monozyten-Papers und für jeden *Input*, den er zu meinen Projekten beigetragen hat. Im Speziellen danke ich ihm für die Durchführung der *Gene Set Enrichment Analyses*, die maßgeblich zum Gelingen des Monozyten-Manuskriptes beigetragen haben und auch meine Doktorarbeit sehr bereichert haben. Die kurze gemeinsame Zeit war mir jederzeit eine Freude und hat Spaß gemacht.

Herrn Daniel Häußler danke ich für die durchgehende Unterstützung während der Doktorarbeit, jeglichen *Input* während den Laborbesprechungen, die tolle Unterstützung im Laboralltag und für die Hilfe bei der Durchführung von Experimenten. Ich danke ihm für die Durchführung des *Labellings* von TIMP-1 für konfokale Aufnahmen von Ko-Lokalisierungen, für die Durchführung von ELISAs für das Monozyten-Manuskript, für die Recherchetätigkeiten im Zuge der Vorbereitung des Interaktom-*Reviews*, für die Durchführung von molekularen *Docking* Experimenten im Zuge des Interaktom-*Reviews*, des CD74- und das Monozyten-Manuskripts, und für die Hilfe bei der Durchführung von Tierversuchen. Ebenfalls danke ich ihm für die Produktion und Reinigung von rekombinanten humanen TIMP-1-Varianten.

Frau Katja Honert danke ich für die wirklich sehr wertvolle Unterstützung bei jeder Angelegenheit im Labor. Durch ihre jahrelange Erfahrung hat sie den Laboralltag maßgeblich erleichtert. Besonders danke ich ihr für die Hilfe bei der Kultivierung von Zelllinien und bei der Herstellung von genetisch manipulierten Zellen.

Frau Dr. Susanne Schaten danke ich für ihre hilfreichen Beiträge während der Laborbesprechungen, und für die Einarbeitung, Betreuung und Planung von Mausverpaarungen.

Frau Dr. Selina Keppler, Frau Dr. Ritu Mishra, Herrn Felix Bayerl, und Herrn Dr. Jan Böttcher danke ich für die tolle Hilfe bei der konfokalen Mikroskopie und die wertvollen Ratschläge, die sie mir hierbei gegeben haben.

Frau Laura Flüter danke ich für die Durchführung der Ko-Immunpräzipitation und die tolle mentale und freundschaftliche Unterstützung während ihrer Zeit als Masterstudentin hier im Institut.

Frau Daniela Abele danke ich für die Hilfe bei der Durchführung der *Pull Down Assays*.

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. Hans Hauner danke ich für die Unterstützung während des Verfassens des Monozyten-Manuskripts. **Frau Simone Heisz** danke ich für die Durchführung des humanen IL-6 ELISAs im Zuge des Monozyten-Manuskripts.

Frau Dr. Olga Prokopchuk danke ich für die Hilfe während der Laborbesprechungen, für die Herstellung des Kontakts zu Prof. Dr. Hans Hauner und Frau Simone Heisz, und für die Bereitstellung von biologischen Patientenmaterialien.

Herrn Prof. Dr. Ihsan Ekin Demir danke ich für die hilfreichen Ratschläge bezüglich des Monozyten-Manuskripts.

Herrn Prof. Dr. Stefan Lichtenthaler danke ich für die Bereitstellung der neuronalen SH-SY5Y Zellen, **Herrn Prof. Dr. Ghislain Opdenakker** danke ich für die Bereitstellung der THP-1^{WT}, THP-1^{KO} und Namalwa Zellen.

Herrn Josef Straßlmair (Sepp) danke ich für die wirklich freundliche und hilfreiche Unterstützung im Laboralltag, die meine Arbeit sehr erleichtert hat.

Ich danke zudem den **Tierpflegern des ZPF** für jede Unterstützung bei der Pflege von Mäusen und der guten Kommunikation, die während der gesamten Zeit der Doktorarbeit stattgefunden hat.

Weiterhin danke ich meinen aktuellen Büro-Kollegen **Frau Emely Springer, Frau Merit Kümper, Frau Katharina Niewalda, Frau Greta Blome, Herrn Maksim Petruk, Herrn Lars-Henrik Joost** und **Herrn Jonas Engler** für die schöne gemeinsame Zeit am Ende meiner Tätigkeit am Institut. Ihr habt die Zeit wirklich zu etwas Besonderem gemacht.

Allen **Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des IMI**, die eine sehr hilfreiche Unterstützung vor allem bei der Durchführung von durchflusszytometrischen Analysen und Immunzellisolationen waren, danke ich sehr. Speziell **Frau Savvoula Michailidou** danke ich für die professionelle und freundliche Unterstützung bei allen administrativen Angelegenheiten.

Zuletzt möchte ich mich ausdrücklich bei meinen wundervollen Eltern **Anja** und **Michael** und bei meinen tollen Geschwistern **Tabitha** und **Raphael** bedanken, die mich zu jeder Zeit so liebevoll unterstützt und mich ermutigt haben, meinen Wünschen nachzugehen und meine Ziele zu erreichen. Ebenso danke ich meinem engen Freundeskreis für die geduldige und ermutigende Begleitung während der gesamten Zeit.

10. ANHANG

Tabelle A1 Referenzen der TIMP-1 Interaktionspartner (**Abbildung 5, 21**)

TIMP-1	
Interaktionspartner	Referenz
ADAM-10	(Amour et al., 2000)
ADAM-TS4	(Hashimoto et al., 2001)
CD44	(Lambert et al., 2009)
CD63	(Jung et al., 2006)
CD82	(Zhang et al., 2017)
Integrin $\alpha V\beta 1$	(Tsagaraki et al., 2010)
Integrin $\beta 1$	(Jung et al., 2006)
LRP1	(Thevenard et al., 2014)
MMP-1	(Iyer et al., 2007)
MMP-10	(Batra et al., 2012)
MMP-13	(Knäuper et al., 1996)
MMP-17 (MT4-MMP)	(Sohail et al., 2008)
MMP-2	(Iyer et al., 2007)
MMP-25 (MT6-MMP)	(Sohail et al., 2008)
MMP-3	(Gomis-Rüth et al., 1997)
MMP-9	(Pulido-Olmo et al., 2017)
NE	(Okada et al., 1988)
Pro-MMP-2	(Zucker et al., 2009)
Pro-MMP-9	(Itoh und Nagase, 1995)
CD74	(Schoeps et al., 2021b)
APP	(Eckfeld et al., 2023)
APLP2	(Eckfeld et al., 2023)

Tabelle A2 Referenzen der TIMP-2 Interaktionspartner (**Abbildung 5, 21**)

TIMP-2	
Interaktionspartner	Referenz
ADAM-12	(Kveiborg et al., 2010)
ADAM-33	(Zhu et al., 2003)
IGF-1R	(Fernandez et al., 2010)
Integrin α III β 1	(Seo et al., 2008)
Integrin β 1	(Lluri et al., 2008)
LRP1	(Brew, 2019)
MMP-1	(Hamze et al., 2007)
MMP-10	(Batra et al., 2012)
MMP-13	(Maskos et al., 2007)
MMP-14 (MT1-MMP)	(Fernandez-Catalan et al., 1998; Zucker et al., 2009)
MMP-15 (MT2-MMP)	(Georgina S. Butler et al., 1997)
MMP-16 (MT3-MMP)	(Zhao et al., 2004)
MMP-19	(Jan O. Stracke et al., 2000)
MMP-2	(Jiang et al., 2002)
MMP-24 (MT5-MMP)	(Baranger et al., 2016)
MMP-25 (MT6-MMP)	(Sohail et al., 2008)
MMP-26	(Zhao et al., 2004)
MMP-3	(Hamze et al., 2007)
MMP-7	(Hamze et al., 2007)
MMP-8	(Farr et al., 1999)
MMP-9	(Hamze et al., 2007)
Pro-MMP-2	(Emmert-Buck et al., 1995)

Tabelle A3 Referenzen der TIMP-3 Interaktionspartner (**Abbildung 5, 21**)

TIMP-3	
Interaktionspartner	Referenz
ADAM-10	(Amour et al., 2000)
ADAM-12	(Loechel et al., 2000)
ADAM-17	(Amour et al., 2000)
ADAM-28	(Mochizuki et al., 2004)
ADAM-33	(Zhu et al., 2003)
ADAM-TS2	(Wang et al., 2006)
ADAM-TS4	(Kashiwagi et al., 2001)
ADAM-TS5	(Kashiwagi et al., 2001)
AGTR1	(Kang et al., 2008)
EFEMP1	(Klenotic et al., 2004)
Glykosaminoglykane	(Yu et al., 2000)
LRP1	(Scilabra et al., 2018)
MMP-1	(Hamze et al., 2007)
MMP-13	(Knäuper et al., 1996)
MMP-14 (MT1-MMP)	(English et al., 2006)
MMP-15 (MT2-MMP)	(Butler et al., 1997)
MMP-16 (MT3-MMP)	(Zhao et al., 2004)
MMP-17 (MT4-MMP)	(Yip et al., 2019)
MMP-2	(Butler et al., 1997)
MMP-25 (MT6-MMP)	(Sohail et al., 2008)
MMP-3	(Hamze et al., 2007)
MMP-7	(Hamze et al., 2007)
MMP-9	(Butler et al., 1997)
Pro-MMP-2	(Butler et al., 1997)
Pro-MMP-9	(Butler et al., 1997)
VEGFR	(Qi et al., 2003)

Tabelle A4 Referenzen der TIMP-4 Interaktionspartner (**Abbildung 5, 21**)

TIMP-4	
Interaktionspartner	Referenz
ADAM-17	(Amour et al., 2000)
ADAM-28	(Mochizuki et al., 2004)
ADAM-33	(Zhu et al., 2003)
ADAM-TS4	(Hashimoto et al., 2001)
CD63	(Rorive et al., 2010)
MMP-1	(Liu et al., 2003)
MMP-14 (MT1-MMP)	(Hernandez-Barrantes et al., 2001)
MMP-15 (MT2-MMP)	(Morrison und Overall, 2006)
MMP-16 (MT3-MMP)	(Butler et al., 1997)
MMP-19	(Stracke et al., 2000)
MMP-2	(Liu et al., 1997)
MMP-26	(Zhang et al., 2002)
MMP-3	(Liu et al., 1997)
MMP-7	(Liu et al., 1997)
MMP-8	(Stratmann et al., 2001)
MMP-9	(Liu et al., 1997)
Pro-MMP-2	(Morrison et al., 2001)

Tabelle A5 Referenzen der klinischen Beobachtungen zu TIMP-1 (**Abbildung 17**)

TIMP-1 (Gewebe)		
Ursprungsgewebe	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose
Gehirn	(Groft et al., 2001)	(Aaberg-Jessen et al., 2009)
Lunge	(Gouyer et al., 2005; Iniesta et al., 2007)	(Gouyer et al., 2005)
Knochenmark und Immunsystem	(Kossakowska et al., 1999)	/
GIT	(Song et al., 2016)	(Mori et al., 2000; Song et al., 2016)
Pankreas	(Y.L. Gong et al., 2000; Grünwald et al., 2016)	/
Leber und Gallenblase	(Song et al., 2015)	(Song et al., 2015)
Niere	(Kallakury et al., 2001)	(Kallakury et al., 2001)
Weiblich-assoziierte Gewebe	(Huang et al., 2000; Hu et al., 2012)	/
Brust	(Zheng-Sheng Wu et al., 2008a)	(Schrohl et al., 2003; Zheng-Sheng Wu et al., 2008a)
Männlich-assoziierte Gewebe	(Lichtinghagen et al., 2002)	(Wood et al., 1997)
Haut	(Airola et al., 1999)	(Airola et al., 1999)
TIMP-1 (Plasma)		
Ursprungsgewebe	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose
Gehirn	(Sreekanthreddy et al., 2010; Crocker et al., 2011)	(Crocker et al., 2011)
Lunge	(Ylisirniö et al., 2000)	(Ylisirniö et al., 2000)
Knochenmark und Immunsystem	(Terpos et al., 2010; Urbaniak-Kujda et al., 2016)	(Terpos et al., 2010)
GIT	(Holten-Andersen et al., 2000; Holten-Andersen et al., 2002)	(Yoshikawa et al., 2000; Yukawa et al., 2007)
Pankreas	(Poruk et al., 2013; Prokopchuk et al., 2018)	(Poruk et al., 2013; Prokopchuk et al., 2018)
Leber und Gallenblase	(Muzzillo et al., 1993)	(Lempinen et al., 2013)
Niere	(Lein et al., 2000; Dias et al., 2020)	(Dias et al., 2020)
Weiblich-assoziierte Gewebe	(Manenti et al., 2003; Honkavuori et al., 2008)	(Manenti et al., 2003; Honkavuori et al., 2008)
Brust	(Zheng-Sheng Wu et al., 2008b)	(Zheng-Sheng Wu et al., 2008b)
Männlich-assoziierte Gewebe	(Baker et al., 1994; Jung et al., 1997)	(Baker et al., 1994; Oh et al., 2011)
Haut	(Kluger et al., 2011)	(Kluger et al., 2011)

Tabelle A6 Referenzen der klinischen Beobachtungen zu TIMP-2 (**Abbildung 17**)

TIMP-2 (Gewebe)		
Ursprungsgewebe	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose
Gehirn	(Ara et al., 1998)	(Ara et al., 1998)
Lunge	(Gouyer et al., 2005; Iniesta et al., 2007; Zhu et al., 2015)	(Zhu et al., 2015)
Knochenmark und Immunsystem	/	/
GIT	(Łukaszewicz-Zajac et al., 2013)	(Pietruszewska et al., 2008)
Pankreas	(Giannopoulos et al., 2008)	(Giannopoulos S et al., 2008)
Leber und Gallenblase	(Kallakury et al., 2001)	(Kallakury et al., 2001)
Niere	(Kallakury et al., 2001)	(Kallakury et al., 2001)
Weiblich-assoziierte Gewebe	(Sakata et al., 2000)	(Nakopoulou et al., 2003; Honkavuori-Toivola et al., 2013)
Brust	(Visscher et al., 1994)	(Visscher et al., 1994; Remacle et al., 2000)
Männlich-assoziierte Gewebe	(Pulukuri et al., 2007)	(Ross et al., 2003)
Haut	/	/
TIMP-2 (Plasma)		
Ursprungsgewebe	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose
Gehirn	/	/
Lunge	(Ylisirniö et al., 2000; Drzewiecka-Jędrzejczyk et al., 2017)	(Drzewiecka-Jędrzejczyk et al., 2017)
Knochenmark und Immunsystem	(Pennanen et al., 2004; Urbaniak-Kujda et al., 2016)	/
GIT	(Mroczko et al., 2009; Groblewska et al., 2014)	(Groblewska et al., 2014)
Pankreas	(Łukaszewicz-Zajac et al., 2019)	(Łukaszewicz-Zajac et al., 2019)
Leber und Gallenblase	(Angulo et al., 2011)	(Gianluigi Giannelli et al., 2002; Angulo et al., 2011)
Niere	(Lein et al., 2000)	/
Weiblich-assoziierte Gewebe	(Manenti et al., 2003; Anne und Taina, 2010)	(Manenti et al., 2003)
Brust	(Ławicki et al., 2017)	/
Männlich-assoziierte Gewebe	(Baker et al., 1994; Gohji et al., 1998)	
Haut	(Yoshino et al., 2008)	/

Tabelle A7 Referenzen der klinischen Beobachtungen zu TIMP-3 (**Abbildung 17**)

TIMP-3 (Gewebe)		
Ursprungsgewebe	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose
Gehirn	(Bachman et al., 1999; Nakamura et al., 2005)	(Nakamura et al., 2005)
Lunge	(Thomas et al., 2000)	(Powe et al., 1997; Thomas et al., 2000)
Knochenmark und Immunsystem	/	/
GIT	(Powe et al., 1997; Petra Volland et al., 2009)	(Marja Hilska et al., 2007)
Pankreas	(Fendrich et al., 2005)	(Wild et al., 2003; Fendrich et al., 2005)
Leber und Gallenblase	(Gu et al., 2014)	(Gu et al., 2014)
Niere	(Bachman et al., 1999; Masson et al., 2010)	(Masson et al., 2010)
Weiblich-assoziierte Gewebe	(Catusus et al., 2013)	/
Brust	(Mylona et al., 2006; Steude et al., 2010)	(Kotzsch et al., 2005; Mylona et al., 2006)
Männlich-assoziierte Gewebe	(Shinojima et al., 2012)	/
Haut	(Das et al., 2016)	(Das et al., 2016)
TIMP-3 (Plasma)		
Ursprungsgewebe	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose
Gehirn	(Sreekanthreddy et al., 2010)	/
Lunge	/	/
Knochenmark und Immunsystem	/	/
GIT	/	/
Pankreas	/	/
Leber und Gallenblase	/	/
Niere	/	/
Weiblich-assoziierte Gewebe	(Cymbaluk-Płoska et al., 2018)	(Cymbaluk-Płoska et al., 2018)
Brust	/	/
Männlich-assoziierte Gewebe	/	/
Haut	(Su et al., 2017)	/

Tabelle A8 Referenzen der klinischen Beobachtungen zu TIMP-4 (**Abbildung 17**)

TIMP-4 (Gewebe)		
Ursprungsgewebe	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose
Gehirn	(Groft et al., 2001)	(Rorive et al., 2010)
Lunge	/	/
Knochenmark und Immunsystem	(Feng et al., 2013)	/
GIT	/	(Hilska et al., 2007)
Pankreas	(Bister et al., 2007)	/
Leber und Gallenblase	/	/
Niere	(Hagemann et al., 2001)	/
Weiblich-assoziierte Gewebe	(Lizarraga et al., 2005; Lizarraga et al., 2016)	(Lizarraga et al., 2005; Lizarraga et al., 2016)
Brust	(Jiang et al., 2000)	(Liss et al., 2009)
Männlich-assoziierte Gewebe	(Lee et al., 2006)	/
Haut	/	/
TIMP-4 (Plasma)		
Ursprungsgewebe	Tumor-assoziierte Expressionsveränderung	Spiegel assoziiert mit einer schlechten Prognose
Gehirn	/	/
Lunge	/	/
Knochenmark und Immunsystem	/	/
GIT	/	/
Pankreas	/	/
Leber und Gallenblase	/	/
Niere	/	/
Weiblich-assoziierte Gewebe	/	/
Brust	/	/
Männlich-assoziierte Gewebe	/	/
Haut	/	/