

**Die Rolle der  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Aktivierung in hämatopoetischen Zellen  
bei der Expression pro-inflammatorischer Zytokine in JAK2-V617F-  
positiven Myeloproliferativen Neoplasien**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von M.Sc. Conny Katrin Baldauf  
geb. am 27.03.1996 in Freiberg

Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Fischer

Prof. Dr. med. Christian Brandts

eingereicht am: 30.07.2024

verteidigt am: 23.04.2025



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	XIII
Zusammenfassung.....	15
Abstract.....	16
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1 Myeloproliferative Neoplasien (MPN).....</b>	<b>17</b>
1.1.1 Mutationen.....	17
1.1.2 Symptome.....	19
1.1.3 Therapiemöglichkeiten.....	20
1.1.4 Rolle der Inflammation bei MPN.....	21
1.1.5 Besondere Rolle des IL-1 bei MPN.....	22
<b>1.2 Inflammation und Interleukin-1.....</b>	<b>26</b>
1.2.1 IL-1 $\beta$ .....	27
1.2.2 IL-1 $\alpha$ .....	34
<b>1.3 Integrine.....</b>	<b>39</b>
1.3.1 <i>Inside-out</i> Signalgebung.....	41
1.3.2 <i>Outside-in</i> Signalgebung.....	45
<b>1.4 „Fluorescent labeled inhibitor of caspases“ (FLICA).....</b>	<b>48</b>
<b>1.5 Charakterisierung des verwendeten Mausmodells.....</b>	<b>49</b>
<b>2 Zielstellung.....</b>	<b>51</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>52</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>52</b>
<b>3.2 Verwendete Modelle.....</b>	<b>63</b>
3.2.1 Vav1-Cre-JAK2 Mausmodell.....	63
3.2.2 32D JAK2-WT/EPOR und JAK2-V617F/EPOR Zellen als Zellkulturmodell.....	64
<b>3.3 Western-Blot Analysen.....</b>	<b>65</b>
3.3.1 Zellstimulation für die Untersuchung der Integrin outside-in Signalgebung.....	65
3.3.2 Herstellung von Zelllysaten für Western-Blot Analysen.....	66
3.3.3 Herstellung von Zelllysaten für Western-Blot Analysen spezifisch für den separaten NF $\kappa$ B-Nachweis im Zytoplasma und im Zellkern.....	67
3.3.4 Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	67
3.3.5 SDS-PAGE.....	68
3.3.6 Western-Blot.....	68
<b>3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....</b>	<b>69</b>
3.4.1 Herstellung von Zelllysaten und Zellkulturüberständen für ELISA.....	69

3.4.2	Durchführung .....	70
<b>3.5</b>	<b>Durchflusszytometrie .....</b>	<b>70</b>
3.5.1	Oberflächenfärbung zur Identifizierung verschiedener Zellpopulationen .....	71
3.5.2	Reinheitsfärbung .....	71
3.5.3	Intrazelluläre Zytokinfärbung .....	72
3.5.4	Oberflächenfärbung von IL-1 $\alpha$ .....	72
<b>3.6</b>	<b>„Fluorescent labeled inhibitor of caspases“ (FLICA) Assay .....</b>	<b>72</b>
<b>3.7</b>	<b>Integrin-Cluster-Analysen .....</b>	<b>73</b>
<b>3.8</b>	<b>RNA-Analysen.....</b>	<b>74</b>
3.8.1	Generierung der qPCR-Proben von isolierten primären Zellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells .....	74
3.8.2	Generierung der qPCR-Proben von 32D JAK2/EPOR Zellen.....	75
3.8.3	RNA-Isolation .....	76
3.8.4	RNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mittels Nanodrop .....	76
3.8.5	Reverse Transkription.....	76
3.8.6	Quantitative Real-Time PCR (qPCR) .....	77
3.8.7	RNA-Sequenzierung.....	77
<b>3.9</b>	<b>DNA-Methylierungsanalysen.....</b>	<b>78</b>
<b>3.10</b>	<b><i>In vivo</i> anti-Integrin-Behandlung im Mausmodell .....</b>	<b>79</b>
3.10.1	Multiplex-Zytokinanalyse .....	80
<b>3.11</b>	<b>Statistische Berechnungen .....</b>	<b>80</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>81</b>
<b>4.1</b>	<b>Charakterisierung relevanter hämatopoetischer Zellpopulationen im Vav1-Cre x JAK2 Mausmodell bezüglich IL-1 Expression und Caspase-1 Aktivität .....</b>	<b>81</b>
4.1.1	Konstitutive, intrazelluläre IL-1 Expression in unstimulierten Knochenmarkzellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells .....	81
4.1.2	Konstitutive Caspase-1 Aktivität in unstimulierten Knochenmarkzellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells.....	85
4.1.3	Einfluss von Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 auf die Caspase-1 Aktivität in primären Zellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells .....	88
<b>4.2</b>	<b>VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in hämatopoetischen Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells.....</b>	<b>91</b>
4.2.1	VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in isolierten hämatopoetischen Progenitorzellen .....	92
4.2.2	VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in isolierten B-Zellen .....	93
4.2.3	VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in isolierten Monozyten .....	94
4.2.4	VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in isolierten Granulozyten .....	95
<b>4.3</b>	<b>VCAM-1/ICAM-1-Stimulation reguliert IL-1<math>\beta</math> Proteinexpression in hämatopoetischen Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells.....</b>	<b>102</b>

4.3.1	Einfluss von Adhäsion auf die intrazelluläre Expression und Sekretion von IL-1 $\beta$ Protein in isolierten hämatopoetischen Lin <sup>-</sup> und Lin <sup>+</sup> Zellen .....	102
4.3.2	Einfluss von Adhäsion auf die intrazelluläre Expression und Sekretion von IL-1 $\beta$ Protein in isolierten B-Zellen .....	104
4.3.3	Einfluss von Adhäsion auf die intrazelluläre Expression und Sekretion von IL-1 $\beta$ Protein in isolierten Granulozyten .....	105
<b>4.4</b>	<b>Charakterisierung Integrin-induzierter Outside-in Signalwege in myeloischen 32D JAK2/EPOR Progenitorzellen .....</b>	<b>109</b>
4.4.1	Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 induziert outside-in Signaling .....	110
4.4.2	Integrin-vermittelte Adhäsion induziert Zytokin mRNA-Expression in 32D JAK2/EPOR Zellen .....	115
4.4.3	Integrin-vermittelte Adhäsion erhöht die Proteinkonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine in 32D JAK2/EPOR Zellen .....	132
4.4.4	Integrin-vermittelte Adhäsion induziert Pyroptose in 32D JAK2/EPOR Zellen .....	138
4.4.5	Fehlende Sezernierung von reifem IL-1 $\alpha$ und IL-1 $\beta$ nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 von 32D JAK2/EPOR Zellen .....	139
<b>4.5</b>	<b>In vivo Hemmung der Aktivierung von <math>\beta_1/\beta_2</math>-Integrinen und deren Auswirkungen auf die Serum IL-1<math>\alpha</math> Konzentration im MPN-Mausmodell .....</b>	<b>140</b>
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>142</b>
<b>5.1</b>	<b>Charakterisierung hämatopoetischer Zellpopulationen im Vav1-Cre x JAK2 Mausmodell bezüglich ihrer IL-1 Expression und ihrer Caspase-1 Aktivität .....</b>	<b>142</b>
<b>5.2</b>	<b>Einfluss von Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 auf die Caspase-1 Aktivität in primären Zellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells .....</b>	<b>144</b>
<b>5.3</b>	<b>VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert outside-in Signaling in 32D JAK2/EPOR Zellen und in Knochenmarkzellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells .....</b>	<b>146</b>
<b>5.4</b>	<b>VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in hämatopoetischen Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells .....</b>	<b>148</b>
<b>5.5</b>	<b>Einflussfaktoren der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine in 32D JAK2/EPOR Zellen .....</b>	<b>150</b>
5.5.1	Immobilisierung von Liganden ist notwendig für die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine .....	151
5.5.2	Beteiligung verschiedener Signalwege in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine .....	151
5.5.3	$\beta_1$ -Integrin-VCAM-1-Interaktion induziert mRNA-Expression .....	152
<b>5.6</b>	<b>VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert die IL-1 Proteinexpression in 32D JAK2/EPOR Zellen .....</b>	<b>154</b>
<b>5.7</b>	<b>Integrin-Stimulation induziert IL-1<math>\alpha</math> Oberflächenexpression in 32D JAK2/EPOR Zellen. ....</b>	<b>154</b>
<b>5.8</b>	<b>VCAM-1/ICAM-1-Stimulation hat keinen Einfluss auf die IL-1 Proteinexpression in hämatopoetischen Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells .....</b>	<b>155</b>
5.8.1	Integrin-vermittelte Adhäsion kann Translation begünstigen .....	155
5.8.2	Mögliche Regulationsmechanismen der mRNA-Stabilität und Translation durch ARE-bindende Proteine .....	156
5.8.3	Mögliche Regulationsmechanismen der mRNA-Stabilität und Translation durch microRNAs .....	157

5.8.4	Mögliche Regulationsmechanismen der Translation durch lncRNAs .....	157
5.8.5	Mögliche Regulationsmechanismen der IL-1 Verfügbarkeit durch Ubiquitinierung ....	158
<b>5.9</b>	<b>Fehlende Sezernierung von reifem IL-1<math>\alpha</math> und IL-1<math>\beta</math> nach Stimulation von 32D JAK2/EPOR Zellen mit immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1.....</b>	<b>159</b>
5.10	Die Applikation von anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin Antikörpern reduzierte die erhöhte IL-1 $\alpha$ Serumkonzentration im Vav1-Cre x JAK2 <sup>VF/+</sup> Mausmodell .....	161
5.11	Die Bedeutung von IL-1 $\alpha$ bei JAK2-V617F-mutierten MPN .....	162
<b>6</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>164</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>165</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>212</b>
	<b>Ehrenerklärung .....</b>	<b>2144</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
ActD	Actinomycin D
Alum	Aluminiumkristalle
APS	Ammonium Persulfate
ARE	AU-reiche Elemente
ARF	engl.: <i>ADP-ribosylation factor</i>
ASAP1	ARF-GTPase aktivierendes Protein
ASS	Acetylsalicylsäure
BCR	B-Zell-Rezeptor (engl.: <i>B cell receptor</i> )
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i> )
BMDC	dendritischer Zellen des Knochenmarks (engl.: <i>bone marrow dendritic cells</i> )
CALR	Calreticulin
CEL	chronische eosinophile Leukämie
CFU	koloniebildender Einheiten (engl.: <i>colony forming unit</i> )
CFU-GM	koloniebildender Einheiten der myeloischen Zellen
CFU-MK	koloniebildender Einheiten der megakaryozytären Zellen
CHIP	Klonale Hämatopoese mit unbestimmtem Potential (engl.: <i>clonal hematopoiesis of indeterminate potential</i> )
CLP	gesamte lymphatische Progenitoren
CML	chronische myeloische Leukämie
CMP	gesamte myeloische Progenitoren
CNL	chronische neutrophile Leukämie
DAG	Diacylglycerol
DC	dendritische Zellen
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphate
DFZ	Durchflusszytometer
DNP	Dinitrophenyl
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPO	Erythropoetin
EPOR	Erythropoetinrezeptor
ERK	engl.: <i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ErP	Erythrozytenprogenitoren
Ery	Erythrozyten
ESCRT	engl.: <i>endosomal sorting complexes required for transport</i>

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ET	essentielle Thrombozythämie
EV	extrazelluläre Vesikel
EZM	extrazelluläre Matrix
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FDR	Falschentdeckungsrate (engl.: <i>false discovery rate</i> )
FKS	Fetales Kälberserum
FLICA	engl.: <i>fluorescent labeled inhibitor of caspases</i>
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl.: <i>Forward-scatter</i> )
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
GMP	granulozytäre-monozytäre Progenitoren
GO	Genontologie (engl.: <i>gene ontology</i> )
GSDMD	Gasdermin D
GSEA	Genmengen Anreicherungsanalyse (engl.: <i>gene set enrichment analysis</i> )
h	Stunde
HAX1	HS1-assoziiertes Protein X-1
HBSS	engl.: <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HRP	Meerrettichperoxidase (engl.: <i>horseradish peroxidase</i> )
HSC	hämatopoetische Stammzellen
HU	Hydroxyurea
ICAM-1	engl.: <i>intercellular adhesion molecule – 1</i>
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
IKK	Inhibitor-Komplex der $\kappa$ B Kinasen
IL	Interleukin
IL-1R	IL-1-Rezeptor
IL-1Ra	IL-1-Rezeptor-Antagonist
IL-1RacP	IL-1R-Hilfsprotein (engl.: <i>IL-1 receptor accessory protein</i> )
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ITAMs	Immunorezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungs-Motive
JAK2	Januskinase 2
JAK2 <sup>+/+</sup>	homozygote Vav-Cre x JAK2 <sup>+/+</sup> Wildtyp-Maus
JAK2 <sup>VF/+</sup>	heterozygote Vav-Cre x JAK2 <sup>VF/+</sup> Maus
JNK	engl.: <i>c-Jun N-terminale Kinasen</i>
Lin <sup>-</sup>	Gesamtheit aller Stamm- und Progenitorzellen (ohne Differenzierungsmarker)
lncRNA	Lange nicht-codierende RNA (engl.: <i>long non-coding RNA</i> )

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
LPS	Lipopolysaccharide
LSK	LT-HSC, ST-HSC und MPP; (Lin <sup>-</sup> , Sca-1 <sup>+</sup> , c-Kit <sup>+</sup> Zellen)
LT-HSC	engl.: <i>long-term hematopoietic stem cells</i>
MACS	Magnetische Zellseparation (engl.: <i>magnetic cell separation</i> )
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEP	megakaryozytäre-erythroide Progenitoren
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MK	Megakaryozyten
MKP	Megakaryozyten-Progenitoren
MMBC	engl.: <i>Infinium Mouse Methylation BeadChip</i>
MO	Makrophagen
MPL	Thrombopoietinrezeptor
MPN	Myeloproliferativen Neoplasien bzw. Neoplasien
MPN-U	unklassifizierte MPN
MPP	multipotente Progenitorzellen
MSC	mesenchymale Stromazellen
MSU	Monosodium urate
mvCpG	variabelsten CpGs (engl.: <i>most variable CpGs</i> )
NaF	Natriumfluorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaVO <sub>3</sub>	Natriumorthovanadat
NES	normalisierter Anreicherungs-Score (engl.: <i>normalized enrichment score</i> )
NET	neutrophile extrazelluläre Falle (engl.: <i>neutrophil extracellular traps</i> )
NLS	Nukleus-Lokalisierungssignal
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i> )
PCA	Hauptkomponentenanalyse (engl.: <i>principal component analysis</i> )
Pen/Strep	Penicilin/ Streptomycin
PDGF	Thrombozyten-assoziiertes Wachstumsfaktor
Ph	Philadelphia –Chromosom
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinasen
PIP2	Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat
PLT	Thrombozyten
PMF	Primäre Myelofibrose

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PV	Polyzythämia vera
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute (eng. <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
RUX	Ruxolitinib
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRP	Signalpeptid (engl.: <i>signal recognition particle</i> )
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl.: <i>side-scatter</i> )
STAT	engl.: <i>signal transducers and activators of transcription</i>
ST-HSC	engl.: <i>short-term hematopoietic stem cells</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl.: <i>T cell receptor</i> )
TEMED	N,N,N',N' Tetramethylethylene-1,2-diamine
TIR-Domäne	Toll/Interleukin-1-Rezeptor-Domäne
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TPO	Thrombopoetin
UTR	untranslatierter Bereich (engl.: <i>untranslated region</i> )
V	Volt
VCAM-1	engl.: <i>vascular cell adhesion molecule - 1</i>
VEGF	vaskulär-endothelialer Wachstumsfaktor
WB	Westen Blot
ÜS	Überstand

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die drei wichtigsten Treibermutationen der Philadelphia-Chromosom-negativen MPN induzieren eine Überaktivierung der Zytokinrezeptoren EPOR und MPL, sowie die konstitutive Aktivierung von deren <i>downstream</i> Signalwegen.....	18
Abbildung 2: Die besondere Rolle des IL-1 $\beta$ in der Entstehung und dem Fortschreiten einer JAK2-V617F-induzierten MPN. ....	25
Abbildung 3: Schematische Darstellung des IL-1R-Signalweges .....	27
Abbildung 4: IL-1 $\beta$ Reifung über die Inflammasom-Aktivierungsplattform.....	29
Abbildung 5: Schematische Darstellung möglicher nicht-konventioneller Sekretionsmechanismen des IL-1 $\beta$ in Abhängigkeit der Stimulusintensität. ....	30
Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des humanen IL-1 $\alpha$ .....	35
Abbildung 7: Lokalisation des IL-1 $\alpha$ in der Zelle .....	36
Abbildung 8: Darstellung der Stimulus-abhängigen IL-1 $\alpha$ Sekretionsmechanismen. ....	38
Abbildung 9: Gruppierung der $\beta_1$ - und $\beta_2$ -Integrine aufgrund ihrer Liganden. ....	41
Abbildung 10: JAK2-V617F-Mutation induziert <i>inside-out Signaling</i> und führt zu einer konstitutiv aktiven $\beta_1$ - und $\beta_2$ -Integrin-Konformation. ....	43
Abbildung 11: Integrin-Ligandenbindung und Clustering induziert eine Vielzahl verschiedener Signal- und Adaptermoleküle. ....	46
Abbildung 12: „ <i>Fluorescent labeled inhibitor of caspases</i> “ (FLICA)-Assay.. ....	49
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Rekombination der JAK2-V617F-Mutation und das Verpaarungsschema des verwendeten Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells.....	50
Abbildung 14: Schematische Darstellung der ELISA-Proben-Ernte.....	70
Abbildung 15: Schematische Darstellung des „ <i>Infinium Mouse Methylation BeadChip</i> (MMBC) <i>Array</i> “ (Illumina) zur Analyse von DNA-Methylierungsmustern. ....	80
Abbildung 16: Stammbaum der Hämatopoese und Darstellung der untersuchten Zellpopulationen .....	83
Abbildung 17: Erhöhte intrazelluläre IL-1 $\alpha$ und pro-IL-1 $\beta$ Expressionslevel in unstimulierten .. Progenitorzellen der Vav1-Cre x JAK2 <sup>VF/+</sup> Mäuse .....	85
Abbildung 18: IL-1 $\beta$ Expression und Prozessierung erfolgt in zwei Schritten und bedarf der Inflammasomaktivierung sowie aktiver Caspase-1. ....	87

Abbildung 19: Erhöhte konstitutive Caspase-1 Aktivität in unstimulierten Progenitorzellen der Vav1-Cre x JAK2 <sup>VF/+</sup> Mäuse.....	88
Abbildung 20: Schematische Hypothesendarstellung – Gibt es eine Verbindung zwischen den überaktivierten Integrinen und der Caspase-1 Aktivität?.....	90
Abbildung 21: Unterschiedlicher Einfluss einer VCAM-1/ICAM-1-Stimulation auf die Caspase-1 Aktivität in Progenitorzellen bzw. reifen Knochenmarkzellen von Vav1-Cre x JAK2 Mäusen.....	91
Abbildung 22: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Interaktion induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in isolierten Lin <sup>-</sup> Zellen aus Vav1-Cre x JAK2 Mäusen..	94
Abbildung 23: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Interaktion induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in isolierten B-Zellen aus Vav1-Cre x JAK2 Mäusen.....	95
Abbildung 24: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Interaktion induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in isolierten Monozyten aus Vav1-Cre x JAK2 <sup>+/+</sup> Mäusen.....	96
Abbildung 25: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Interaktion induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in isolierten Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2 Mäusen. ....	97
Abbildung 26: Analyse der RNA-Sequenzierung isolierter Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2 <sup>+/+</sup> und JAK2 <sup>VF/+</sup> Mäusen nach Stimulation mit immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1.....	99
Abbildung 27: Genexpressionsänderungen in isolierten Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2 Mäusen vor und nach Stimulation mit immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 .....	100
Abbildung 28: Methylierungsänderungen in isolierten Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2 Mäusen vor und nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1. .	102
Abbildung 29: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion reduziert intrazelluläres IL-1 $\beta$ in isolierten Lin <sup>-</sup> und Lin <sup>+</sup> Zellen von Vav1-Cre x JAK2 <sup>+/+</sup> Mäusen, aber induziert keine IL-1 $\beta$ Sekretion.....	104
Abbildung 30: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion erhöht intrazelluläres IL-1 $\beta$ in isolierten B-Zellen von Vav1-Cre x JAK2 <sup>+/+</sup> Mäusen, aber induziert keine IL-1 $\beta$ Sekretion.....	106
Abbildung 31: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion reduziert intrazelluläres IL-1 $\beta$ in Knochenmarks-Granulozyten der JAK2 <sup>VF/+</sup> Mäuse, aber induziert keine IL-1 $\beta$ Sekretion.....	107

Abbildung 32: Schematische Hypothesendarstellung - Kann die Adhäsion an VCAM-1/ICAM-1 als Induktions- bzw. Aktivierungssignal in der Inflammation-Aktivierungskaskade wirken und die Sekretion von IL-1 induzieren?.....	109
Abbildung 33: Die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 induziert $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin-spezifisches <i>outside-in Signaling</i> in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen....	112
Abbildung 34: Die Adhäsion induziert <i>outside-in Signaling</i> in primären, unselektierten Knochenmarkzellen.....	113
Abbildung 35: Postuliertes <i>outside-in Signaling</i> basierend auf den Western-Blot Analysen der Inhibitor-Untersuchungen.....	115
Abbildung 36: Die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 induziert mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine in 32D JAK2/EPOR Zellen.....	118
Abbildung 37: Die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 induziert verstärkte $\beta_1$ -Integrin Clusterbildung in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen..	119
Abbildung 38: Zytokin-spezifische Expressionskinetik von Adhäsions-induzierter mRNA-Expression in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen. ....	121
Abbildung 39: Der Unterschied in der <i>Il1</i> mRNA-Expression nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 zwischen 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen wird nicht durch die erhöhte Adhäsion von 32D JAK2-VF/EPOR Zellen verursacht..	123
Abbildung 40: Die $\beta_1$ -Integrin-VCAM-1-Interaktion ist ursächlich für eine Adhäsion-induziert <i>Il1a</i> und <i>Il1b</i> mRNA-Expression in JAK2-VF/EPOR 32D Zellen.....	125
Abbildung 41: Die $\beta_2$ -Integrin-vermittelten Signale fördern die $\beta_1$ -Integrin-induzierte mRNA-Expression zell-intrinsisch.....	126
Abbildung 42: Untersuchung Liganden-spezifischer Signalwege nach VCAM-1 und ICAM-1 Stimulation in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen. ....	127
Abbildung 43: Die Beteiligung unterschiedlicher Signalwege in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression.....	129
Abbildung 44: Der Einfluss von in der Klinik verwendeten Medikamenten auf die Adhäsions-induzierte Zytokin-mRNA-Expression.....	130
Abbildung 45: Schematische Darstellung der Beteiligung unterschiedlicher Signalwege in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression von <i>Il1</i> . ....	131
Abbildung 46: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion induziert überwiegend mRNA Neusynthese in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen .....	132

Abbildung 47: Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 induziert einen Anstieg von IL-1 $\alpha$ und IL-1 $\beta$ auf Proteinebene in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen.....	134
Abbildung 48: Anstieg des membranständigen IL-1 $\alpha$ auf 32D JAK2-VF/EPOR Zellen nach 24 h Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1.....	136
Abbildung 49: Bestätigung des Vorhandenseins von IL-1 $\beta$ in reifer (17 kDa) und Pro-Form (31 kDa).....	137
Abbildung 50: Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 aktiviert Caspase-1 und induziert Pyroptose in 32D JAK2/EPOR Zellen. ....	139
Abbildung 51: Die anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Behandlung hemmt die erhöhte IL-1 $\alpha$ Serumkonzentrationen in Vav1-Cre x JAK2VF/+ Mäusen.....	142
Abbildung 52: Schematische Zusammenfassung VCAM-1/ICAM-1-Stimulation-induzierter Signalwege in hämatopoetischen Zellen des Vav1-Cre x JAK2-VF Mausmodells und den 32D JAK2/EPOR Zellen .....	161

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die wichtigsten Treibermutationen und ihre prozentuale Verteilung (Median) in ausgewählten MPN-Entitäten (basierend auf <sup>7-16</sup> ).....	17
Tabelle 2: Herkunft der verwendeten Chemikalien.....	52
Tabelle 3: Verwendete Inhibitoren und Aktivatoren.....	53
Tabelle 4: Verwendete Testkits.....	53
Tabelle 5: Herkunft der verwendeten Materialien.....	54
Tabelle 6: Herkunft der verwendeten Geräte.....	55
Tabelle 7: Verwendete Software.....	55
Tabelle 8: Zusammensetzung von Standardlösungen und Puffer.....	56
Tabelle 9: Verwendete Antikörper zur <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> anti-Integrin-Behandlung.....	58
Tabelle 10: Biotinylierte Antikörper für die Negativselektion von Knochenmark-Granulozyten mittels magnetischer Streptavidin-Partikel (MACS).....	58
Tabelle 11: Biotinylierte Antikörper für die Negativselektion von Lin <sup>-</sup> Zellen aus dem Knochenmark mittels magnetischer Streptavidin-Partikel (MACS).....	58
Tabelle 12: Biotinylierte Antikörper für die Negativselektion von B-Zellen aus der Milz mittels magnetischer Streptavidin-Partikel (MACS).....	59
Tabelle 13: Spezifische Antikörper zur Färbung von Oberflächenstrukturen und intrazellulärer Zytokine für die Analyse im Durchflusszytometer (DFZ).....	59
Tabelle 14: Verwendete Western-Blot-Antikörper.....	60
Tabelle 15: Verwendete Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie.....	62
Tabelle 16: Charakterisierung des verwendeten Fluoreszenzmikroskopie-Systems.....	62
Tabelle 17: Verwendete Primer in der qPCR zum Nachweis inflammatorischer Zytokin mRNA in murinen Zellen.....	62
Tabelle 18: Optimierung der verwendeten Inhibitor-Konzentrationen.....	65
Tabelle 19: Antikörperbehandlung zur Untersuchung der Liganden-Spezifität.....	66
Tabelle 20: Plattenbeschichtung zur Untersuchung Liganden-abhängiger Signalaktivierung.....	66
Tabelle 21: Zusätzliche Stimulanzen für die Generierung von ELISA-Proben.....	69
Tabelle 22: Identifikation verschiedener Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker-expression.....	71

Tabelle 23: Verwendete Antikörper zur Reinheitsfärbung isolierter Zellpopulationen .....	71
Tabelle 24: Experimentelles Zeitverlaufsschema zur Inhibierung der RNA-Neusynthese mittels Actinomycin D (ActD) .....	77
Tabelle 25: Zusammensetzung des Reverse-Transkriptase-Master-Mixes .....	78
Tabelle 26: qPCR-Programm zum Nachweis pro-inflammatorischer Zytokin-mRNA- Expression in murinen Zellen.....	78
Tabelle 27: Zusammenfassung der Wirkung verschiedener Signalmolekülinhibitoren auf das Adhäsions-induzierte <i>outside-in Signaling</i> in 32D JAK2-VF/EPOR 32D Zellen.. .... .....	114

## Zusammenfassung

Inflammatorische Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese und der Progression von JAK2-V617F-mutierten Myeloproliferativen Neoplasien. Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer Hochregulation von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  im Serum von MPN-Patienten führen, sind bisher weitestgehend unklar. Frühere Untersuchungen unserer Forschungsgruppe zeigten, dass die JAK2-V617F-Mutation zu einer konstitutiv aktivierten  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Konformation auf hämatopoetischen Zellen führt und damit zu einer verstärkten Bindung an die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob die aberrante Integrinaktivierung auf hämatopoetischen Zellen eine funktionelle Rolle in der Induktion von inflammatorischen Zytokinen bei MPN spielt. Zunächst wurden verschiedene hämatopoetische Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 MPN-Mausmodells bezüglich ihrer intrazellulären IL-1 $\alpha$  und pro-IL-1 $\beta$  Konzentrationen, sowie ihrer Caspase-1 Aktivität untersucht. Dabei wurden Progenitorzellen, CD41 $^+$  (Megakaryozyten) und B-Zellen als wesentliche Quelle dieser Zytokine im JAK2-V617F-mutierten Mausmodell identifiziert. Erstmals wurde eine zelltyp-spezifische, durch Zelladhäsion an VCAM-1/ICAM-1-induzierte Caspase-1 Aktivierung gezeigt. Eine JAK2-V617F-spezifische Aktivierung nach Stimulation mit VCAM-1/ICAM-1 wurde dabei lediglich in CD41 $^+$  Zellen nachgewiesen und deutet dabei auf eine besondere Rolle der CD41 $^+$  Zellen in der MPN-Pathogenese hin. Interessanterweise induzierte die Adhäsion an mVCAM-1/mICAM-1 die Hochregulation der Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine wie *Il1a*, *Il1b*, *Il6* und *Tnf* in verschiedenen hämatopoetischen Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 MPN-Mausmodells und in einem MPN-Zellkulturmodell (32D JAK2/EPOR Zellen). In 32D JAK2/EPOR-Zellen wurde dies durch die JAK2-V617F-Mutation verstärkt, während die Adhäsions-induzierte Hochregulation der mRNA-Expression in den primären Zellen überwiegend JAK2-V617F-unabhängig erfolgte. Wir konnten darstellen, dass dies auf eine Aktivierung des Integrin *outside-in Signaling* unter Beteiligung der Signalknoten FAK, Syk, NF $\kappa$ B und PI3K/AKT zurückzuführen ist. Dabei erfolgte die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression hauptsächlich über die  $\beta_1$ -Integrin-VCAM-1 Interaktion und wurde lediglich durch die  $\beta_2$ -Integrin-ICAM-1-Interaktion verstärkt. Abweichende, jedoch nicht additiv wirkende, Signalwege wurden dabei beobachtet. Im Gegensatz zu den hämatopoetischen Zellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells konnte in den 32D JAK2/EPOR Zellen auch auf Proteinebene erhöhte inflammatorische Zytokinspiegel nach Stimulation mit immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1 nachgewiesen werden, die durch die JAK2-V617F-Mutation verstärkt wurden. Interessanterweise konnten die signifikant erhöhten IL-1 $\alpha$  Konzentrationen im Serum der Vav1-Cre x JAK2 $^{VF/+}$  durch eine anti- $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Behandlung supprimiert werden. Zusammengefasst zeigen die hier vorgestellten Daten eine funktionelle Bedeutung der Zelladhäsion an VCAM-1/ICAM-1 für die Induktion inflammatorischer Zytokine bei MPN.

## Abstract

Inflammatory cytokines play an essential role in the pathogenesis of JAK2-V617F mutated myeloproliferative neoplasm and in disease progression. The underlying molecular mechanisms of elevated pro-inflammatory cytokines as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in MPN-patient serum are currently unknown. Earlier observations of our group showed constitutively activated  $\beta_1/\beta_2$ -integrin conformation and increased ligand binding to VCAM-1 and ICAM-1 as a result of JAK2-V617F mutation in granulocytes. We hypothesized that aberrant integrin activation on hematopoietic cells may play a functional role in induction of pro-inflammatory cytokines in MPN. To evaluate this, various hematopoietic cell populations in the Vav1-Cre x JAK2-V617F MPN mouse model were analyzed according to intracellular IL-1 $\alpha$  and pro-IL-1 $\beta$  content and caspase-1 activity. In addition to megakaryocytes and B-cells, progenitor cells were identified as an important source of inflammatory cytokines. Also for the first time, a celltyp-specific VCAM-1/ICAM-1-stimulation-induced mechanism of caspase-1 activation was shown. In CD41 $^+$  cells, this was specific for JAK2-V617F mutated cells suggesting an important role of CD41 $^+$  cells in pathogenesis of MPN. Interestingly, adhesion on immobilized mVCAM-1/mICAM-1 induced gene expression pro-inflammatory cytokines as *Il1a*, *Il1b*, *Il6* and *Tnf* in different hematopoietic cell populations isolated from the Vav1-Cre x JAK2-V617F MPN mouse model and in the MPN cell culture model (32D JAK2/EPOR cells). In 32D JAK2/EPOR cells, expression was increased by the JAK2-V617F mutation, while the adhesion-induced mRNA expression was JAK2-V617F independent in the majority of cell populations. We successfully demonstrated the involvement of integrin outside-in signaling involving the signaling nodes FAK, Syk, NF $\kappa$ B and PI3K/AKT. mRNA expression of inflammatory cytokines was selectively induced by  $\beta_1$ -integrin-VCAM-1 interaction and was further increased by  $\beta_2$ -integrin-ICAM-1 interaction. Different signaling pathways involved were detected, but showed no additive effects. In 32D JAK2/EPOR cells, stimulation using immobilized mVCAM-1/mICAM-1 also led to an increase of pro-inflammatory cytokines on a protein level, which was further increased by the JAK2-V617F mutation. In contrast, in hematopoietic cells from the Vav1-Cre x JAK2 mouse model, no VCAM-1/ICAM-1 induced increase of pro-inflammatory cytokine levels was detectable. Nevertheless, interestingly, elevated IL-1 $\alpha$  serum concentrations found in Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> mice were inhibited by anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -integrin antibody treatment. In summary, the presented data show the functional relevance of cell adhesion on VCAM-1 and ICAM-1 in inflammatory cytokines in JAK2-V617F mutated cells.

# 1 Einleitung

## 1.1 Myeloproliferative Neoplasien (MPN)

Myeloproliferative Neoplasien (MPN) umfassen multiple, maligne hämatopoetische Erkrankungen, die mit einer verstärkten, klonalen Proliferation hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen einhergehen.<sup>1,2</sup> Die klassischen MPN umfassen dabei die chronische myeloische Leukämie (CML; BCR-ABL1-positiv), die Polycythemia vera (PV), die Essentielle Thrombozythämie (ET) und die Primäre Myelofibrose (PMF).<sup>1,2</sup> Die klassischen MPN-Entitäten haben im Durchschnitt eine Inzidenz von 1,15 – 4,99 /100.000 Einwohner,<sup>3</sup> wobei Schwankungen zwischen den einzelnen Entitäten und zwischen verschiedenen Studien vorliegen.<sup>1,3,4</sup> Zu den nicht-klassischen MPN zählen die chronische neutrophile Leukämie (CNL), die chronische eosinophile Leukämie (CEL) und die unklassifizierte MPN (MPN-U).<sup>1</sup> Diese treten sehr selten auf und wurden daher im Folgenden nicht näher betrachtet.

### 1.1.1 Mutationen

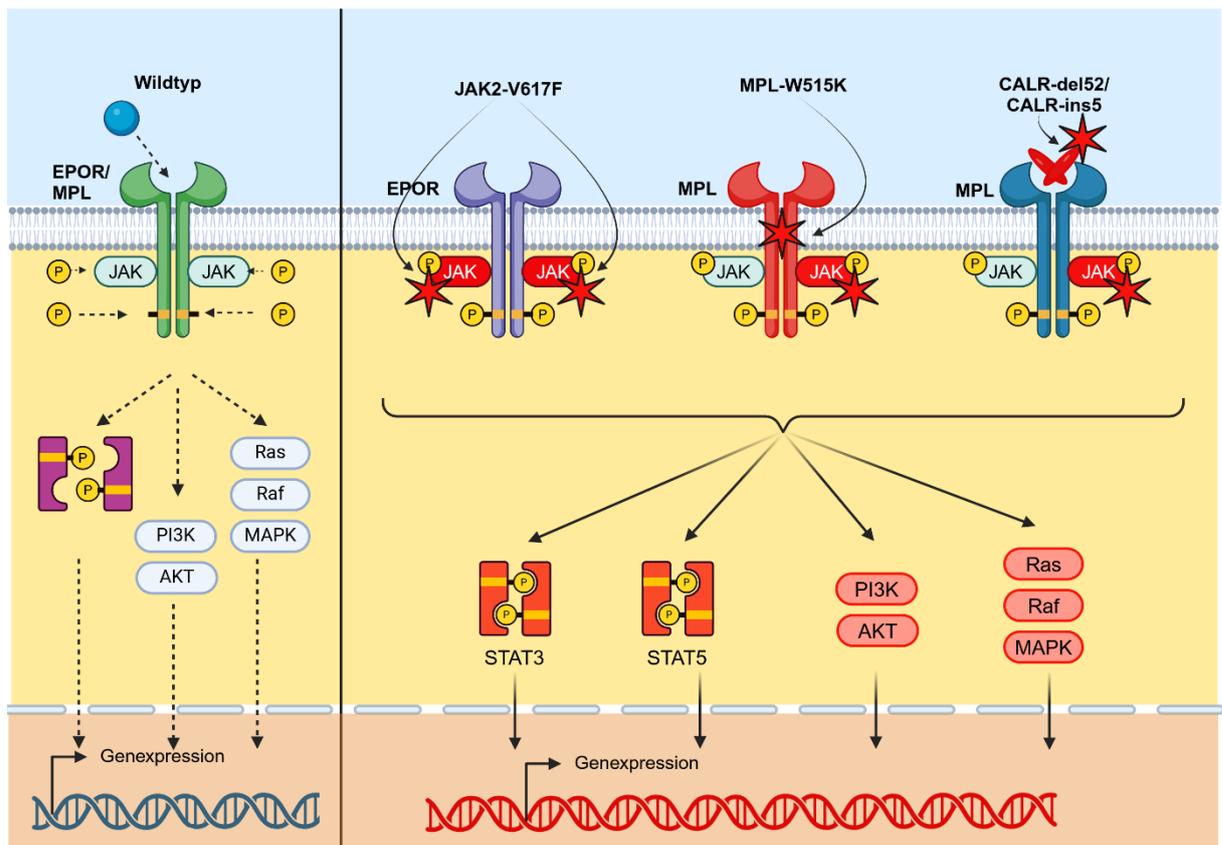
Bei den MPN sind verschiedene Treibermutationen beschrieben. Mutationen in den Genen der Januskinase 2 (JAK2), des Calretikulins (CALR) oder des Thrombopoetinrezeptors (MPL) gelten bei den Philadelphia-Chromosom-negativen MPN als genetischer Auslöser für die Entwicklung einer MPN (siehe Tabelle 1).<sup>1,5</sup> Die CML ist die einzige Philadelphia-Chromosom-positive MPN und wird durch eine Gentranslokation und dem damit resultierenden BCR-ABL-Fusionsprotein verursacht.<sup>2</sup> Diese wird im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter betrachtet.

**Tabelle 1: Die wichtigsten Treibermutationen und ihre prozentuale Verteilung (Median) in ausgewählten MPN-Entitäten (basierend auf <sup>6-15</sup>)**

	<b>JAK2-V617F</b>	<b>CALR (del52, ins5)</b>	<b>MPL (W515K/L/A/G/S/R)</b>	<b>ohne/ unbekannte Mutation</b>
<b>PV</b>	95,0 %	-	-	-
<b>ET</b>	54,3 %	25,5 %	4,3 %	12,5 %
<b>PMF</b>	56,4 %	18,7 %	7,0 %	6,8 %

Durch die Treibermutationen im Stammzellkompartiment kommt es zu einer Überaktivierung des JAK-STAT- und weiteren assoziierten Signalwegen (siehe Abbildung 1).<sup>16</sup> Die konstitutive JAK-STAT Aktivierung gilt dabei als Charakteristikum der MPN-Erkrankungen.<sup>17,18</sup> Die JAK-Familie umfasst 4 Tyrosinkinase, die mit der zytoplasmatischen Domäne von Zytokinrezeptoren wie dem Erythropoetinrezeptor (EPOR) oder dem Thrombopoetinrezeptor (MPL) interagieren können.<sup>19-21</sup> Diese Rezeptoren sind an der Regulation der Erythropoese<sup>22,23</sup>, Thrombopoese<sup>24</sup> bzw. Granulopoese<sup>25,26</sup> beteiligt.<sup>27</sup> In physiologischer Umgebung ist das Vorhandensein der entsprechenden Liganden (EPO, TPO) für die Rezeptoraktivierung und

das *downstream* JAK-STAT-Signaling notwendig, wohingegen die Mutationen zu einer Liganden-unabhängigen Überaktivierung führen.<sup>17</sup>



**Abbildung 1: Die drei wichtigsten Treibermutationen der Philadelphia-Chromosom-negativen MPN induzieren eine Überaktivierung der Zytokinrezeptoren EPOR und MPL, sowie die konstitutive Aktivierung von deren *downstream* Signalwegen.** Der Wildtyp (grün) EPOR und MPL sind EPO- bzw. TPO-abhängig. Nur durch eine Ligandenbindung wird der Rezeptor aktiviert und die STAT, PI3K-AKT und Ras-Raf-MAPK- Signalwege werden induziert. Die JAK2-V617F-Mutation in der JAK2 Kinase, die Mutationen MPL-W515K und CALR-del52 sowie CALR-ins5 induzieren eine Liganden-unabhängige Aktivierung von JAK-STAT, PI3K-AKT und Ras-Raf-MAPK- Signalwegen. Die Mutationen sind mit einem roten Stern gekennzeichnet. (erstellt mit Biorender.com)

Die am häufigsten nachgewiesene Treibermutation ist die JAK2-V617F-Mutation in der Januskinase 2. 65,0 - 100 % der PV-Patienten haben eine JAK2-V617F-Mutation, während diese nur in etwa 23,0 – 74,1 % der ET bzw. 35,0 - 76,9 % der PMF-Patienten nachweisbar ist.<sup>6-15</sup> Diese somatische Mutation wurde 2005 von mehreren Gruppen gleichzeitig identifiziert.<sup>6-9</sup> Die JAK2-V617F-Mutation ist ebenfalls in CHIP-Patienten (Klonale Hämatopoese mit unbestimmtem Potential), die noch keinen MPN-Phänotyp aufweisen, nachweisbar.<sup>28,29</sup>

JAK2 ist eine *Non-Receptor*-Tyrosinkinase, die aufgrund ihrer Rezeptorassoziation eine bedeutende Rolle in der Hämatopoese spielt.<sup>19</sup> Die Kinase besteht aus vier Domänen: der JH1 - Tyrosinkinase Domäne, der JH2 - Pseudokinsedomäne mit inhibitorischem Effekt auf die Kinsedomäne, der SH2-ähnlichen Domäne (bindet phosphorylierte Tyrosine) und der

FERM-Domäne (Interaktion mit dem Zytokinrezeptor).<sup>30</sup> Die JAK2-V617F-Mutation befindet sich in der Pseudokinasedomäne.<sup>8,9</sup> Bei der Mutation kommt es zu einem Austausch von Guanin zu Thymin und damit zu einem Aminosäureaustausch von Valin zu Phenylalanin an Position 617 (V617F).<sup>6-9</sup> Unter physiologischen Bedingungen besitzt die Pseudokinase eine autoinhibitorische Wirkung,<sup>31</sup> die aufgrund der beschriebenen somatischen *Gain-of-Function* Mutation verloren geht.<sup>6,7,9,30</sup> Es resultiert eine konstitutive Aktivierung der JAK2-Kinase,<sup>6,7,9,30,32</sup> eine starke Fehlregulation, sowie die Aktivierung weiterer nachfolgender Signalwege (wie ERK<sup>6,32</sup> und AKT<sup>6</sup>) und Transkriptionsfaktoren (wie STAT5<sup>6,7,9,32</sup>).

Es wurden viele verschiedene Mutationen im MPL-Gen gefunden.<sup>18,33</sup> Beispielsweise führt der Aminosäureaustausch an Position 515 des MPL-Genes zu einem spontanen, zytokin-unabhängigen Zellwachstum.<sup>34</sup> Der Aminosäureaustausch führt zur Dimerisierung und Liganden-unabhängigen Aktivierung des MPL sowie der *downstream* JAK2-STAT5 Signalwege.<sup>35-38</sup>

CALR ist ein Chaperon, welches aufgrund einer 52-bp Deletion (del52) bzw. 5-bp Insertion (ins5) in den extrazellulären Raum transloziert und dort eine TPO-unabhängige Aktivierung des TPO-Rezeptors mit Aktivierung von JAK2-STAT3/5-PI3K und MAPK Signalwegen induziert.<sup>17,33,39,40</sup> Bisher sind über 50 Mutationen bekannt, die zu 80 % eine 52-bp Deletion (del52) bzw. 5-bp Insertion (ins5) darstellen.<sup>41,42</sup>

Die genannten Treibermutationen sind im Mausmodell in der Lage einen MPN-Phänotyp zu induzieren.<sup>37,43,44</sup> Zusätzliche Mutationen haben ebenfalls einen Einfluss auf die Biologie der MPN-Erkrankungen. Diese Mutationen sind nicht auf MPN beschränkt und können alleinstehend keine MPN induzieren. Dazu gehören Mutationen in Genen der epigenetischen Regulation wie *TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1* und *EZH2*.<sup>45-47</sup> Weiterhin können Mutationen im mRNA-Splicing-Apparat oder in Genen der Signaltransduktion MPN-Erkrankungen beeinflussen.<sup>45,46</sup>

### 1.1.2 Symptome

Die einzelnen Entitäten sind mit teilweise überlappenden oder voneinander abweichenden klinischen Parametern und konstitutionellen Symptomen assoziiert. Eine PV ist beispielsweise gekennzeichnet durch eine erhöhte Hämoglobin-Konzentration (Mann: > 16.5 g/dL; Frau: > 16,0 g/dL) im Blut, einen erhöhten Hämatokrit (Mann: > 49 %; Frau: > 48 %) und einer gesteigerten Erythrozytenmasse (>+25 %).<sup>48,49</sup> Eine Thrombozytose (Thrombozyten  $\geq 450 \times 10^9/L$ ) hingegen ist charakteristisch für eine ET<sup>48,50</sup> und eine Knochenmarkfibrose (Retikulin und/oder Collagen Fibrose) für eine PMF.<sup>48,51</sup> Alle drei klassischen MPN-Entitäten können ein erhöhtes thrombotisches Risiko aufweisen<sup>52-54</sup>, eine Splenomegalie entwickeln<sup>55-57</sup> und selten auch zu Blutungen führen<sup>58,59</sup>. Thromboembolische Ereignisse wie Schlaganfall,

Herzinfarkt und die tiefe Beinvenenthrombose stellen dabei eine der häufigsten Todesursachen dar.<sup>60,61</sup>

Alle Entitäten gehen mit einer chronischen Inflammation einher.<sup>62–65</sup> Patienten zeigen oft eine starke Symptombelastung mit konstitutionellen Symptomen wie Fatigue, Fieber, abdominale Schmerzen, Nachtschweiß, Konzentrationsprobleme, Schwindel, Anorexie und Gewichtsverlust.<sup>14,66–68</sup> Zudem besteht das substantielle Risiko, dass es zu einer leukämischen Transformation kommt, bei der sich eine sekundäre, akute myeloische Leukämie aus der MPN heraus entwickelt.<sup>69</sup> Die Symptome sind oft sehr heterogen<sup>69</sup> und werden von dem Geschlecht und dem Alter<sup>66</sup> beeinflusst.

Für die klinische Diagnose der einzelnen Entitäten müssen alle drei Hauptkriterien oder zwei Haupt- und ein Nebenkriterium erfüllt sein (siehe Leitlinien<sup>49–51</sup>). Diese umfassen den Nachweis von Treibermutationen, Blutbildparametern und/oder morphologische Befunde.

### 1.1.3 Therapiemöglichkeiten

Aufgrund fehlender kurativer Behandlungsmöglichkeiten (außer der allogenen Stammzelltransplantation) sind die Behandlungsziele überwiegend palliativ. Dabei soll die Lebensqualität durch die Reduktion klinischer Symptome verbessert und das Risiko thrombotischer Ereignisse gesenkt werden.<sup>49,70,71</sup>

Die Therapiestrategien reichen dabei von „*watch-and-wait*“ (siehe Leitlinien<sup>49–51</sup>), über Phlebotomie<sup>70,71</sup>, Acetylsalicylsäure (ASS)<sup>72</sup>, und zytoreduktive Therapien wie Hydroxyurea<sup>73</sup>, pegyliertes-IFN- $\alpha$ <sup>74–80</sup> bis hin zu JAK2-Inhibitoren wie Ruxolitinib<sup>78,81–85</sup> und Fedratinib<sup>86</sup>. Dabei sind jedoch die jeweiligen Zulassungen im Falle der JAK2-Inhibitoren für die einzelnen Entitäten zu berücksichtigen. Eine Splenektomie<sup>87–89</sup> wird nur noch sehr selten durchgeführt. Eine allogene Stammzelltransplantation (diskutiert in <sup>90</sup>) wird nur in Fällen mit hohem Progressionsrisiko und nur nach sorgfältiger Abwägung durchgeführt. Die Stammzelltransplantation stellt allerdings die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit dar.<sup>90,91</sup>

Bei der Ruxolitinib-Behandlung (JAK1/2-Inhibitor)<sup>92</sup> konnte eine Verbindung zwischen einer reduzierten inflammatorischen Zytokinkonzentration und einer verbesserten Lebensqualität durch Hemmung klinischer Symptome nachgewiesen werden.<sup>93</sup> Dies deutet erneut auf eine essentielle Rolle inflammatorischer Zytokine bei MPN-Patienten hin. Nicht-medikamentöse Therapien, die Bewegungsförderung, Yoga und mediterrane Ernährung enthalten, zeigten ebenfalls einen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf und das inflammatorische Milieu.<sup>94–100</sup> Barbui et al. lieferte eine detailliertere Therapieübersicht.<sup>71</sup>

### 1.1.4 Rolle der Inflammation bei MPN

Neben den Treibermutationen<sup>6–9,17,18,33,39,40,101</sup>, zusätzlichen Mutationen<sup>45–47</sup>, dem Alter<sup>102</sup> und dem Geschlecht<sup>103</sup> haben weitere Faktoren einen essentiellen Einfluss auf die MPN-Erkrankung und die einhergehenden Symptome. Der Inflammation wird dabei eine bedeutende Rolle in der MPN-Pathogenese zugeschrieben.<sup>62,64,65,93,104–110</sup>

Im Serum von MPN-Patienten liegen erhöhte pro-inflammatorische Zytokinpiegel vor.<sup>62–65</sup> Darunter sind die Interleukine (IL) IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 und IL-12, sowie der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) verstärkt nachweisbar.<sup>62–64</sup> Weiterhin liegen Wachstumsfaktoren wie Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Thrombozyten-assoziiertes Wachstumsfaktor (PDGF) und vaskulär-endotheliales Wachstumsfaktor (VEGF) erhöht vor.<sup>62–64</sup> Anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 sind dabei im Vergleich zu gesunden Kontrollen ebenfalls erhöht.<sup>62–65</sup> Die Zytokinlevel der verschiedenen MPN-Entitäten sind sowohl überschneidend als auch unterschiedlich. Teilweise liegen Korrelationen mit der Prognose und/oder der Mutations-Allellast vor.<sup>63</sup>

Die Hemmung hoher pro-inflammatorischer Zytokinlevel geht mit einer Hemmung von Allgemein-Symptomen wie Kachexie, Schwächegefühl und Nachtschweiß einher<sup>93</sup>, was auf eine Beteiligung pro-inflammatorischer Zytokine bei der Ausbildung konstitutioneller Symptome hindeutet.<sup>111</sup> Ebenso liegt eine Korrelation einiger erhöhter Zytokinlevel mit verschiedenen Blutbildparametern vor.<sup>64</sup> Sie begünstigen JAK2-V617F-mutierte, hämatopoetische Stammzellen bzw. myeloische Vorläuferzellen durch deren selektive Expansion.<sup>112</sup> Der Wachstumsvorteil der mutierten Zellen resultiert aus einer verstärkten oder aber verminderten Reaktion gegenüber verschiedenen Stimuli wie z.B. Zytokine (EPO).<sup>113,114</sup> Es wird diskutiert, ob dies die Entstehung mutierter Klone begünstigt oder induzieren kann.<sup>114</sup> Zusätzlich werden die nicht-malignen Zellen gehemmt. JAK2-WT Zellen liegen im Vergleich zu JAK2-V617F-mutierte Zellen verstärkt in der G0-Phase des Zellzyklus<sup>115,116</sup> vor und zeigen eine gesteigerte Apoptose,<sup>116</sup> was das Wachstum nicht-maligner Zellen vermindert. Jüngste Untersuchungen von Rai et al. zeigten, dass Inflammation einen Wechsel von einer CHIP zu einer MPN mit Phänotyp induzieren kann.<sup>107</sup>

Eine Akkumulation inflammatorischer Zytokine sowie reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) im hämatopoetischen Stammzellkompartiment wird beispielsweise durch aktivierte Leukozyten und Thrombozyten verursacht.<sup>117</sup> Die Expression inflammatorischer Marker erfolgt dabei durch maligne und nicht-maligne Zellen.<sup>118</sup> Dabei werden lediglich IL-1 $\beta$ , IL1-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra), und CXCL10 durch die JAK2-V617F-Mutation selbst induziert.<sup>119</sup> Die zusätzlichen Mutationen wie *DNMT3A*, *TET2*, *SRSF2*, *SF3B1* Mutationen könnten die Inflammation über NF $\kappa$ B zusätzlich fördern.<sup>120</sup>

Die vorliegende Inflammation ist ebenfalls beim Fortschreiten der Erkrankung beteiligt. Sie fördert Nervenschädigung in der Stammzellnische<sup>106,107,109</sup>, Fibrose<sup>106–108,121</sup>, Osteosklerose<sup>106</sup> und eine TP53-assoziierte klonale Dominanz<sup>110</sup>, welche eine leukämische Transformation begünstigen könnte.

Unter anderem wurden IL-6<sup>122,123</sup>, TGF- $\beta$ <sup>121</sup> und TNF- $\alpha$ <sup>124,125</sup> im Kontext von JAK2-V617F-mutierten MPN näher untersucht. In Abhängigkeit des verwendeten Mausmodells wurden teilweise abweichende Ergebnisse beobachtet. So hat IL-6 einen Einfluss auf PF4-Cre-JAK2-VF-induzierte MPN<sup>122</sup>, aber keinen Einfluss auf eine bestehende MPN im Vav1-Cre x JAK2-VF Mausmodell<sup>123</sup>. Das TGF- $\beta$ -*Signaling* in mesenchymalen Stromazellen (MSC) ist essentiell für die Entwicklung einer Myelofibrose in JAK2-V617F-mutierten MPN-Modellen, hat aber keinen Einfluss auf die Blutbildparameter.<sup>121</sup> TNFR1 und TNFR2-Signalgebung in JAK2-V617F-positiven MPN wurden ebenfalls untersucht. Es wurden dabei unterschiedliche Bedeutungen der einzelnen Rezeptoren auf die Blutbildparameter (wie Hämatokrit und Leukozytenzahl) und die Splenomegalie beobachtet.<sup>124</sup> TNFR-*Signaling* scheint dabei nicht essentiell für die Entstehung einer JAK2-V617F-mutierten MPN zu sein. Es hat jedoch einen Einfluss auf die Thrombozyten(PLT)- und Megakaryozyten(MK)-Zahl sowie die TPO-Konzentration.<sup>125</sup>

### 1.1.5 Besondere Rolle des IL-1 bei MPN

In den vergangenen Jahren wurde entdeckt, dass Interleukin-1 (IL-1) eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der MPN spielt. In den meisten Studien liegt IL-1 $\beta$  im Serum von MPN-Patienten erhöht vor.<sup>62,63,65,126</sup> Dabei liegt eine Korrelation zwischen den signifikant erhöhten IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Konzentrationen (Protein- und mRNA-Ebene) und der JAK2-V617F Allellast in den Granulozyten vor.<sup>106,108,119</sup> Diese konnte unabhängig von der Entität nachgewiesen werden.<sup>106,108,119</sup> IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind zwei der wenigen Zytokine, die mit der JAK2-V617F Allellast korrelieren.<sup>119</sup> IL-1Ra ist ebenfalls in allen MPN Entitäten signifikant auf mRNA- und Proteinebene erhöht und korreliert ebenfalls mit der Allellast isolierter Granulozyten.<sup>106,119</sup> Zudem korreliert die Konzentration des IL-1 $\beta$  und des IL-1Ra mit der Neutrophilenanzahl im Blut.<sup>119</sup>

Es wurde ebenfalls gezeigt, dass JAK2-V617F-mutierte Zellen ursächlich sind für die erhöhten IL-1 $\beta$  Konzentrationen im Knochenmark und im Plasma von JAK2-V617F-mutierten Mäusen.<sup>107</sup> JAK2-V617F-mutierte hämatopoetische Zellen<sup>106</sup>, insbesondere Monozyten, MK und *long-term hematopoietic stem cells* (LT-HSC) Zellen werden dabei als Haupt-IL-1 $\beta$ -Quelle vermutet.<sup>107</sup> Unter anderem hemmt eine IL-1 $\beta$ - bzw. IL-1-Rezeptor-I(IL-1RI)-Deletion die inflammatorische Genexpressionssignatur in JAK2-V617F-mutierten LT-HSC.<sup>107</sup>

*In vitro* fördert IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  die Bildung koloniebildender Einheiten (engl. *colony forming unit*, CFU) der myeloischen (CFU-GM) und der megakaryozytären Linien (CFU-MK).<sup>108</sup> Allerdings ist der Anteil von CFU-GM und CFU-MK aus dem Knochenmark von JAK2-V617F-Mäusen bereits ohne zusätzliche Stimulation signifikant höher verglichen mit JAK2-WT-Mäusen.<sup>108</sup> Die exogene Administration von IL-1 $\beta$  in JAK2-V617F *Knockin* Mäusen resultierte in einer erhöhten Neutrophilenanzahl, einer reduzierten Erythrozytenanzahl und einer verminderten Hämoglobinkonzentration im Blut.<sup>108</sup> Im Knochenmark dieser Mäuse konnten vermehrt myeloische Zellen, *short-term hematopoietic stem cells* (ST-HSC) und LSK Zellen (Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>) sowie vermindert erythrozytäre Zellen nachgewiesen werden.<sup>108</sup> LSK Zellen umfassen dabei LT-HSC, ST-HSC und multipotente Progenitoren (MPP). Die IL-1 $\beta$  Verabreichung hatte keinen Einfluss auf den Anteil CD41<sup>+</sup>-positiver Zellen (MK) im Knochenmark, obwohl IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  *in vitro* die Proliferation der megakaryozytärer Zellen förderten.<sup>108</sup> Appliziertes IL-1 $\beta$  hatte *in vivo* keinen Effekt auf eine bestehende Splenomegalie, induzierte jedoch über IL-1RI-*Signaling* die Retikulinfibrose im Knochenmark JAK2-V617F mutierter Mäuse.<sup>108</sup> Im Gegensatz dazu induziert IL-1 $\beta$  keine Fibrose in JAK2-WT-Mäusen.<sup>108</sup>

Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\beta$  die frühe Expansion von JAK2-V617F-mutierten Klonen sowie die Umwandlung einer CHIP zu einem MPN-Krankheitsbild fördert.<sup>107</sup> Die hämatopoetischen Stammzellen (engl.: *hematopoietic stem cell*; HSC) benötigen dabei das IL-1 $\beta$  für eine optimale Expansion. Im Vergleich zu gesunden Mäusen zeigten JAK2-V617F-mutierte Mäuse ohne Phänotyp Entwicklung (CHIP) dabei lediglich signifikant erhöhte IL-1 $\beta$  Level im Knochenmark, nicht aber im Plasma.<sup>107</sup> Mäuse mit MPN-Phänotyp hingegen verfügten über signifikant erhöhte IL-1 $\beta$  Level im Knochenmark und im Plasma.<sup>107</sup>

Ein vollständiger IL-1 $\beta$  *Knockout* in allen hämatopoetischen Zellpopulationen sowie Endothelzellen resultierte in ScI;Cre;V617F Mäusen (nicht transplantiert) lediglich in einer Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine im Knochenmark, nicht aber in einer veränderten Expansion der MPN-Zellen.<sup>106</sup> Im Gegensatz dazu zeigten Rai et al. mit Hilfe eines Transplantationsmodells, dass eine IL-1 $\beta$  Deletion in den hämatopoetischen Stammzellen ausreichend ist, um MPN-assoziierte Parameter zu reduzieren.<sup>106</sup> Neben einer reduzierten Anzahl von Thrombozyten, bipotenten Megakaryozyten-Erythroiden-Vorläufern (pre-MegE) sowie Megakaryozyten im Knochenmark konnten verringerte IL-1 $\beta$  Konzentrationen im Knochenmark und im Plasma nachgewiesen werden.<sup>106</sup> Das Milzvolumen nahm geringfügig ab, die extramedulläre Hämatopoese wurde reduziert und die zerstörte Struktur wurde verbessert.<sup>106</sup> Ebenso wurde durch die Transplantation von JAK2-VF;IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> Zellen die Knochenmarkfibrose vermindert.<sup>106</sup> Das IL-1 *Signaling* wurde dadurch ebenfalls reduziert.<sup>106</sup>

IL-1RI- und IL-1R-Hilfsprotein (engl.: *IL-1 receptor accessory protein*; IL-1RAcP) sind notwendige Rezeptoren für eine erfolgreiche IL-1-Signalgebung.<sup>127</sup> Der prozentuale Anteil IL-

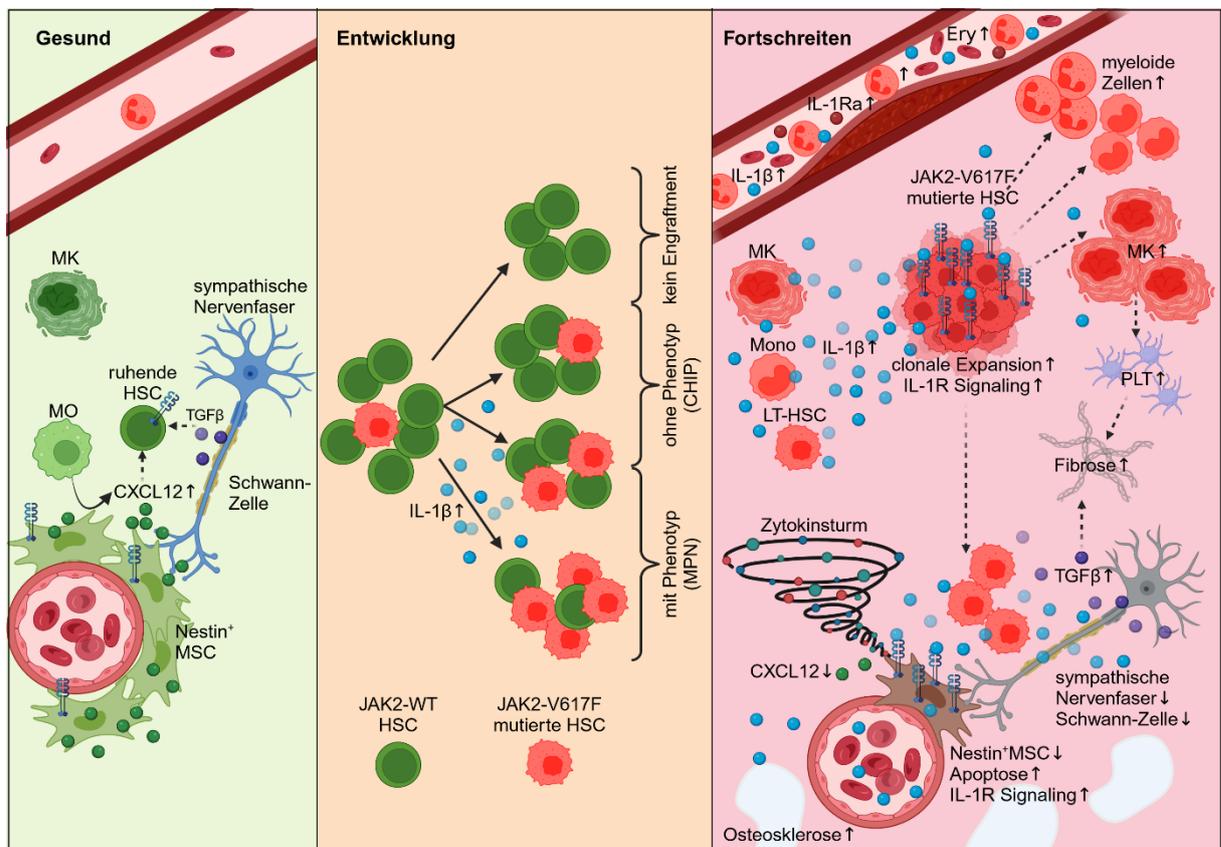
IL-1RI- und IL-1RAcP-positiver hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen ist im peripheren Blut von MPN-Patienten signifikant erhöht (Ausnahme granulozytäre-monozytäre Progenitoren (GMP)).<sup>106</sup> Eine Korrelation der IL-1-Rezeptoren mit der JAK2-V617F-Allellast der Granulozyten lag nur in den HSC und zwischen dem IL-1RAcP und den CMP sowie Megakaryozyten-Progenitoren (MKP) vor.<sup>106</sup> Rai et al. untersuchten HSC, pre-MegE und MKP Zellen von *SciCreER;JAK2-V617F* Mäusen und beschrieben eine starke Hochregulation des IL-1-*Signaling* auf mRNA-Ebene in diesen Zellpopulationen.<sup>106</sup>

In *Mx1Cre* Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Deletion des IL-1RI als auch die anti-IL-1R-Behandlung im homozygoten *JAK2<sup>VF/VF</sup>* Modell zu einer deutlichen Verbesserung der *JAK2-V617F*-fehlgeleiteten Blutparameter führte.<sup>128</sup> Zudem konnten *Gr1<sup>+</sup>*, *Mac1<sup>+</sup>* und *CD41<sup>+</sup>* Zellen, sowie Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark und der Milz von *IL-1RI<sup>ckKO</sup>; Jak2<sup>VF/VF</sup>* Mäusen im Vergleich zu *Jak2<sup>VF/VF</sup>* Mäusen signifikant gehemmt werden.<sup>128</sup> Die zusätzliche IL-1RI-Deletion in *JAK2-V617F*-mutierten Mäusen hemmt dabei ebenfalls die IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Konzentration sowie das Milzgewicht und den Fibrosegrad im Knochenmark.<sup>128</sup> Diese Daten deuten darauf hin, dass das IL-1RI-*Signaling* in Stromazellen für die *JAK2-V617F*-induzierte Knochenmarkfibrose notwendig ist, jedoch keinen signifikanten Effekt auf die Expansion der hämatopoetischen Stammzellen hat.<sup>128</sup> Im Transplantationsmodell von Rai et al. führte die zusätzliche IL-1RI-Deletion ebenfalls zu einer reduzierten Fibrose, einer verminderten Osteosklerose und einer verbesserten Milzstruktur.<sup>107</sup> Zusammenfassend scheint IL-1RI-*Signaling* in hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen bedeutend für die *JAK2-V617F*-induzierte MPN zu sein.<sup>107</sup>

IL-1 $\beta$  verursacht ebenfalls Schäden in der Knochenmarksnische der *JAK2-V617F*-mutierten Mäuse. So ist die Anzahl der primitiven Stromazellen, sowie die Dichte von sympathischen Nervenfasern und Schwann-Zellen in der Knochenmarksnische von *JAK2-V617F*-transplantierten Mäusen signifikant reduziert.<sup>106,107</sup> Dies resultiert in einer signifikanten Reduktion von Nestin-positiven Knochenmarks-MSCs,<sup>106,107</sup> was wiederum mit einem Fortschreiten einer Myelofibrose einhergeht. Eine anti-IL-1 $\beta$ -Antikörperbehandlung<sup>107</sup> oder eine IL-1 $\beta$ -Deletion<sup>106</sup> in den *JAK2-V617F*-mutierten Mäusen konnten diese reduzierten Zellzahlen jedoch weitestgehend normalisieren. Dies lässt auf einen Einfluss des IL-1 $\beta$  auf die Schäden in der Knochenmarksnische schließen.<sup>107</sup> Weiterhin induziert IL-1 $\beta$  die Transkription proinflammatorischer Marker, Collagen (*Col3a1*) und Genen, die mit einer myeloischen Differenzierung assoziiert sind, was das Fortschreiten einer *JAK2-V617F*-induzierter MPN begünstigen könnte.<sup>108</sup>

Zhang et al.<sup>129</sup> und Liberale et al.<sup>130</sup> zeigten zudem in anderen Modellen, dass ein aktives Inflammasom als auch IL-1 $\beta$  venöse bzw. arterielle Thrombosen fördern kann. Dies könnte auf

eine weitere bedeutende Rolle der stark erhöhten Inflammation (insbesondere IL-1 $\beta$ ) in weiteren MPN-assoziierten Symptomen wie der verstärkten Thrombusbildung hindeuten.



**Abbildung 2: Die besondere Rolle des IL-1 $\beta$  in der Entstehung und dem Fortschreiten einer JAK2-V617F-induzierten MPN.** Im gesunden Knochenmark (links) führt die CXCL12 Expression von Nestin<sup>+</sup> mesenchymalen Stromazellen (MSC) dazu, dass ruhende hämatopoetische Stammzellen (HSC) im Knochenmark verbleiben. Dies wird unterstützt durch die TGF $\beta$  Expression von Schwann-Zellen an den sympathischen Nervenfasern, die wichtig sind für das Überleben der MSC. Makrophagen (MO) fördern die CXCL12 Sekretion. IL-1 $\beta$  ist in der Lage das Engraftment eines mutierten Klons, als auch die frühe Expansion dieses Klons zu fördern (mittlere Abbildung). Zudem fördert es eine Phänotyp-Entwicklung und damit einen Übergang einer CHIP zu einer MPN. Hat sich eine MPN entwickelt fördert IL-1 $\beta$  und IL-1-Signaling das Fortschreiten der Erkrankung (rechts). Dabei führen signifikant erhöhte IL-1 Level im Knochenmark und im Plasma zu einem Anstieg von myeloischen Zellen, Megakaryozyten (MK), Thrombozyten (PLT) im Knochenmark und einer erhöhten Granulozytenzahl im Blut. IL-1 $\beta$  wird dabei von MK, Monozyten (Mono) und HSC exprimiert. Das IL-1 $\beta$  führt zu einer verstärkten Apoptose von sympathischen Nervenfasern und Schwann-Zellen. Damit einhergehend ist der Verlust von Nestin<sup>+</sup> MSC und einer reduzierten CXCL12 Konzentration im Knochenmark. Ebenso hat IL-1 einen Einfluss auf Osteosklerose, Fibrose und Splenomegalie. Die IL-1R-Expression und das IL-1-Signaling ist in verschiedenen HSC, pre-MegE, MKP und MSC stark hochreguliert und führt in den MSC-Zellen zu einem Zytokinsturm. Der IL1-Rezeptor-Antagonist (IL-1Ra) im Plasma und die Erythrozytenzahl (Ery) im peripheren Blut sind in JAK2-V617F-mutierten Mäusen signifikant erhöht. (basierend auf <sup>106-109</sup>, erstellt mit BioRender.com)

Zusammenfassend scheint IL-1 $\beta$  den Übertritt von einer CHIP zu einer MPN-Erkrankung zu induzieren<sup>107</sup>, sowie das Fortschreiten der Erkrankung zu begünstigen<sup>106-108</sup> (siehe Abbildung 2). Die HSC scheinen dabei eine besondere Rolle zu spielen. HSC und Progenitorzellen scheinen ebenfalls über eine verstärkte Expression beider IL-1-Rezeptoren (IL-1RI und

IL1RAcP) als auch deren verstärktes IL-1-Signaling zu verfügen.<sup>106</sup> Zudem wird ein Zusammenhang der erhöhten IL-1 $\beta$  Konzentrationen mit der extramedullären Hämatopoese, der zerstörten Milzstruktur und der Knochenmarkfibrose vermutet.<sup>106–108</sup>

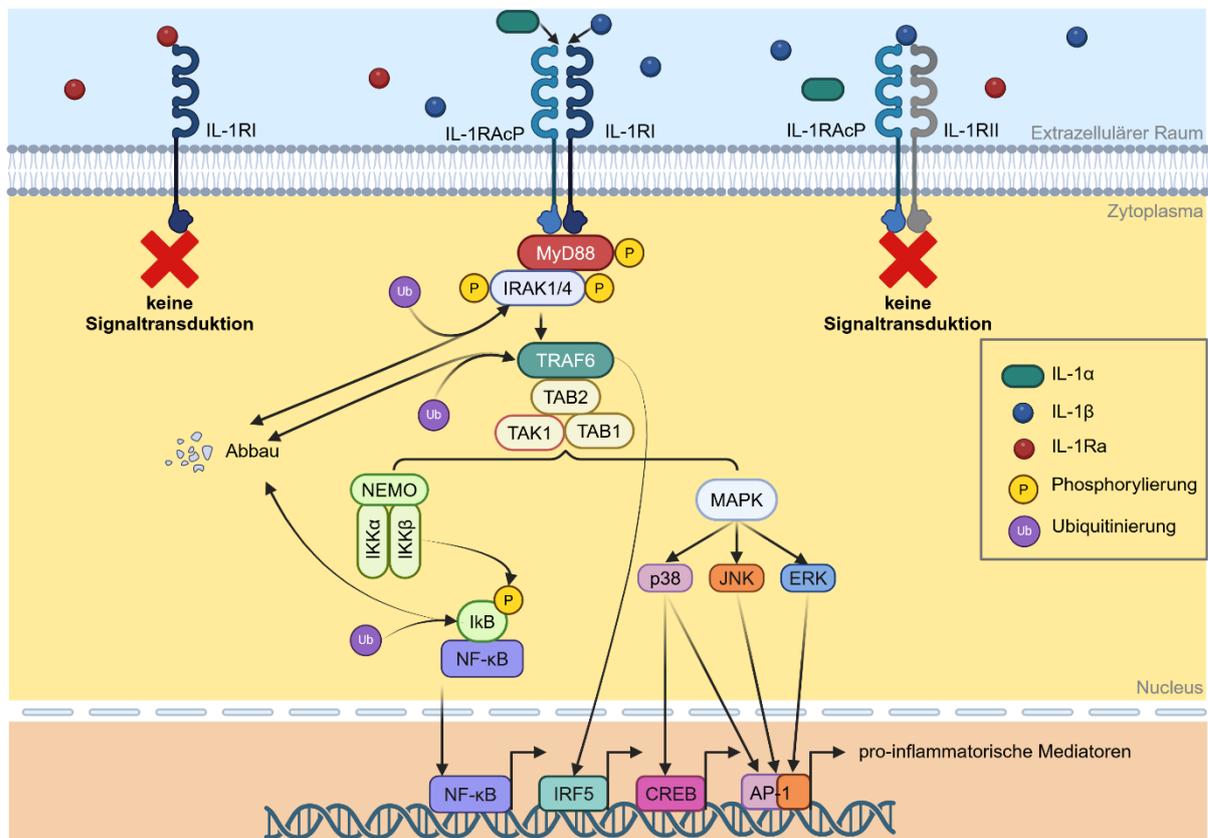
Daher wird IL-1 $\beta$  als Schlüsselmolekül und möglicher therapeutischer Ansatzpunkt der MPN betrachtet. Allain-Maillit et al. beschrieben IL-1 $\beta$  und IL-1Ra als eine der weniger Zytokine, die sowohl mit der JAK2-V617F Allellast korrelieren, als auch durch die Mutation selbst induziert werden.<sup>119</sup> Wie es genau zu dieser IL-1 $\beta$  Expressionsinduktion kommt, ist allerdings noch unklar. Aufgrund der Schlüsselfunktion von IL-1 ist die Erforschung des IL-1 induzierenden Mechanismus von sehr großer Bedeutung.

## 1.2 Inflammation und Interleukin-1

Zur Interleukin-1 Superfamilie gehören 11 Mitglieder: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1Ra, IL-18, IL-33, IL-36 $\alpha$ , IL-36 $\beta$ , IL-36 $\gamma$ , IL-36Ra, IL-37 und IL-38.<sup>131,132</sup> Im Folgenden werden die beiden IL-1 Subformen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  näher beschrieben. Bei IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  handelt es sich um stark pro-inflammatorische<sup>133</sup>, pyrogene<sup>134–137</sup>, sowie pleiotrope<sup>133,138</sup> Zytokine, die autokrin und parakrin wirken können.<sup>139–141</sup> IL-1 $\alpha$  kann zusätzlich juxtakrin wirken.<sup>142</sup> Sie sind im angeborenen<sup>143–146</sup> und erworbenen<sup>147–151</sup> Immunsystem von sehr großer Bedeutung. Stark erhöht IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Serumkonzentrationen liegen in vielen Tumoren und Autoimmunerkrankungen vor.<sup>152–156</sup>

Beide Moleküle verfügen über unterschiedliche cDNA mit lediglich 27 % Homologie.<sup>157</sup> Jedoch sind sie sich strukturell und funktionell sehr ähnlich.<sup>158–160</sup> Sie binden beide<sup>161</sup> den IL-1RI-IL-1RAcP-Rezeptorkomplex und können den kanonischen NF $\kappa$ B Signalweg induzieren.<sup>127</sup> Das Adapterprotein MYD88 wird dabei an den aktivierten Rezeptorkomplex rekrutiert<sup>162</sup> und bindet die Toll/Interleukin-1-Rezeptor (TIR-) Domäne.<sup>163</sup> Durch die Oligomerisierung von MYD88 wird IRAK-4 sowie IRAK-1 rekrutiert.<sup>164</sup> Diese interagieren miteinander.<sup>165</sup> IRAK und TRAF-6 lösen sich vom Rezeptorkomplex ab, binden im Zytoplasma TAB-2 und bilden den TRAF-6-TAB-2-TAK-1-TAB-1-Komplex (siehe Abbildung 3).<sup>166</sup> IRAK-1 und TRAF-6 werden anschließend ubiquitiniert und degradiert.<sup>167,168</sup> IRAK<sup>166</sup> sowie die Ubiquitinierung von TRAF-6<sup>169,170</sup> spielen eine entscheidende Rolle bei der TAK-1 Aktivierung. Durch TAK-1 und eine Autophosphorylierung wird der Inhibitor-Komplex der  $\kappa$ B Kinasen (IKK; bestehend aus IKK $\alpha$ , IKK $\beta$ , IKK $\gamma$ ) aktiviert.<sup>167,171</sup> Dadurch wird I $\kappa$ B phosphoryliert sowie ubiquitiniert und proteasomal abgebaut.<sup>167</sup> TAK1 ist somit an der I $\kappa$ B Kinase-vermittelten NF- $\kappa$ B-Aktivierung beteiligt.<sup>172</sup> TAK-1 kann zudem die Aktivierung von Mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPKs) wie p38 und JNK regulieren.<sup>173,174</sup> Der Einfluss von TAK1 auf die ERK-Aktivierung ist dabei umstritten.<sup>173,174</sup> So können IL-1- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  verschiedene Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B, SP-1, CREB und AP-1 aktivieren<sup>172,175–177</sup> und die Genexpression von vornehmlich inflammatorischen Markern<sup>108,178–181</sup> induzieren. Dieser Mechanismus ist streng auf mehreren Ebenen reguliert.

Beispielsweise wird durch die Bindung des IL-1 an den IL-1RII die Signalweiterleitung unterbunden.<sup>182,183</sup> IL-1Ra ist ein IL-1R-Antagonist.<sup>184,185</sup> Dieser bindet ebenfalls den IL-1RI<sup>186</sup> und verhindert eine erfolgreiche Signaltransduktion.<sup>184,185</sup> Ebenso erfolgt eine Regulation der IL-1 Expression auf mRNA und Proteinebene.<sup>187-189</sup>



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des IL-1R-Signalweges.** IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  binden beide an den IL-1R-Komplex, bestehend aus IL-1RI und IL-1RAcP. Die Bindung aktiviert den kanonischen NF $\kappa$ B-Signalweg über MyD88, die IRAK-Familie, TRAF6 und TAK1. Die Aktivierung von TAK-1 resultiert in der Degradierung des NF $\kappa$ B-Inhibitors (I $\kappa$ B) und somit der Translokation des NF $\kappa$ B in den Nukleus. Über die MAPK-Signalwege und p38, JNK und ERK können weitere Transkriptionsfaktoren wie CREB und AP-1 aktiviert werden. Über IRAK-1 und TRAF6 kann ebenfalls IRF5 in den Zellkern translozieren und die Genexpression fördern.<sup>194</sup> Alle induzierten Transkriptionsfaktoren resultieren in der Transkription pro-inflammatorischer Faktoren und Markern. Die Ubiquitinierung und der Abbau spielt in diesen Signalwegen eine entscheidende regulatorische Rolle. Die Bindung an den IL-1RII oder des IL-1Ra an den IL-1RI verhindert eine Signalweiterleitung. (erstellt mit BioRender.com)

## 1.2.1 IL-1 $\beta$

### 1.2.1.1 IL-1 $\beta$ Expression

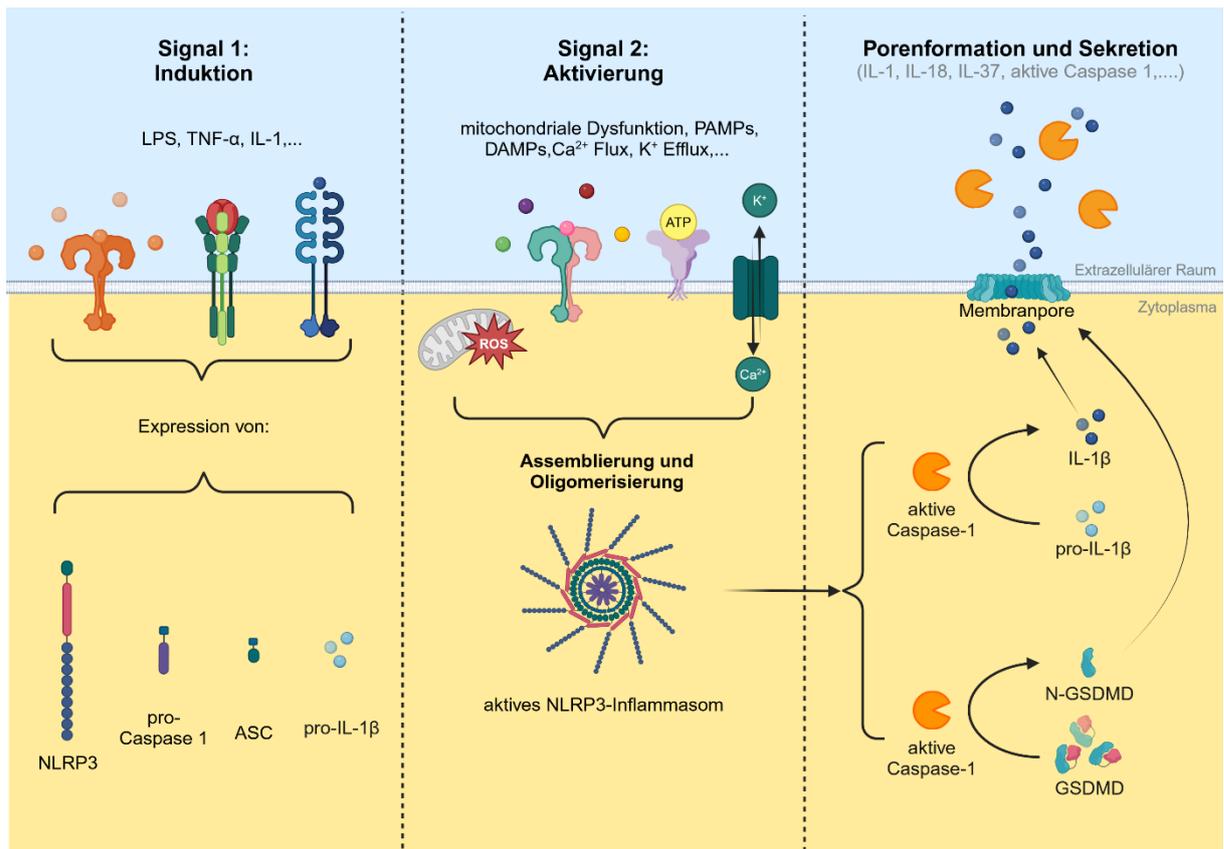
IL-1 $\beta$  wird zunächst als 31 kDa große Pro-Form mit 269 Aminosäuren exprimiert.<sup>157</sup> Dabei liegt lediglich eine 50 %ige Homologie zwischen humanem und murinem IL-1 $\beta$  vor.<sup>157</sup> Die Expression erfolgt ausschließlich nach Stimulus.<sup>190,191</sup> Unter anderem können LPS<sup>192-194</sup>, TNF $\alpha$ <sup>195</sup> und IL-1 $\alpha$ /IL-1 $\beta$ <sup>196</sup> selbst die Expression von pro-IL-1 $\beta$  induzieren. Diese Stimuli aktivieren NF $\kappa$ B, welches die Konsensus-Promotorregion (-296 bis -286bp) des IL-1 $\beta$

Promotors bindet und die Transkription des pro-IL-1 $\beta$  induziert.<sup>197</sup> Transkriptionsfaktoren wie C/EBP $\beta$ , PU.1 und AP-1 wird ebenfalls eine Beteiligung an der IL-1 $\beta$  Transkription zugeschrieben.<sup>198,199</sup> Dabei interagiert PU.1 direkt mit der genomischen DNA und C/EBP $\beta$ , wodurch die Transkriptionsmaschinerie rekrutiert wird.<sup>200,201</sup> PU.1 induziert eine LPS-induzierte Umstrukturierung der distalen Enhancer durch Chromatin-Modifikationen, welche für Initialisierungsereignisse der IL-1 $\beta$  von Bedeutung sind.<sup>202</sup>

Translatiertes pro-IL1 $\beta$  ist nicht biologisch aktiv und bedarf einer proteolytischen Spaltung in reifes, biologisch aktives IL-1 $\beta$ .<sup>161</sup> Die aktive Form hat ein Molekulargewicht von 17 kDa.<sup>157</sup> Das Pro-Peptid scheint lediglich eine regulatorische Funktion zu haben. So beschrieb Hailey et al., dass das N-terminale Pro-Peptid das pro-IL-1 $\beta$  vor der finalen Faltung schützt.<sup>203</sup> Pro-IL-1 $\beta$  ist einfacher zugänglich für Proteasen und schützt den C-Terminus.<sup>203</sup> Erst nach vollständiger Spaltung kommt es zu einer sehr schnellen, finalen Faltung des C-Terminus in das reife, aktive IL-1 $\beta$ .<sup>203</sup>

### 1.2.1.2 IL-1 $\beta$ Reifung

Die Spaltung erfolgt vornehmlich durch aktive Caspase-1.<sup>204–206</sup> Diese ist Teil einer Aktivierungsplattform, die als Inflammasom bezeichnet wird.<sup>207</sup> Die Plattform besteht aus einem Inflammasom-Protein, einem Adapterprotein und einer Caspase.<sup>208,209</sup> Ein sogenanntes „Induktions-Signal“ initiiert dabei parallel zur *Il1b* mRNA den Anstieg der *Nlrp3* und *Casp1* mRNA (siehe Abbildung 4).<sup>210,211</sup> In Abhängigkeit der vorliegenden Stimuli können unterschiedliche Inflammasome wie NLRP1<sup>212</sup>, NLRP3<sup>213</sup>, NLRP6<sup>214</sup>, NLRP7<sup>215</sup>, NLRP12<sup>216</sup>, NLRC4<sup>217</sup>, AIM2<sup>218</sup>, IFI16<sup>219</sup> und RIG-I<sup>220</sup> induziert werden. Das am besten beschriebene Inflammasom ist dabei das NLRP3 Inflammasom.<sup>221</sup> Während der Induktions-Phase kommt es zu einer Phosphorylierung (S194) des NLRP3 durch LPS-TLR4-induziertes JNK.<sup>222</sup> Diese Phosphorylierung ist essentiell für die Deubiquitinierung, Selbstassoziation und die Assemblierung der Aktivierungsplattform.<sup>222</sup> Der Deubiquitinierung des NLRP3 wird eine große regulatorische Bedeutung bei der Aktivierung zugeschrieben.<sup>223,224</sup> Durch ein zweites Aktivierungs-Signal (z.B. Nigericin, ATP) kommt es zu einem K<sup>+</sup>-Efflux und/oder einer ROS-Induktion, die eine Aktivierung des Inflammasomkomplexes induziert.<sup>225–228</sup> Der Komplex aktiviert ebenfalls die Caspase-1<sup>207</sup>, welche anschließend in der Lage ist, pro-IL-1 $\beta$  an Aminosäureposition 116 zu spalten.<sup>229</sup>



**Abbildung 4: IL-1 $\beta$  Reifung über die Inflammasom-Aktivierungsplattform.** Die Reifung erfolgt in zwei Schritten. Das Signal 1 induziert die Expression aller notwendigen Bestandteile und kann durch unterschiedliche Signale wie LPS, TNF- $\alpha$  und IL-1 erfolgen (hier beispielhaft für NLRP3 gezeigt). Durch ein zweites Signal kommt es durch Assemblierung und Oligomerisierung zur Aktivierung des Inflammasoms. Dabei sind ebenfalls unterschiedliche Stimuli möglich, die jedoch mit einem K<sup>+</sup>-Efflux und ROS-Produktion assoziiert sind. Caspase-1 ist ebenfalls Bestandteil des Inflammasomkomplexes und wird aktiviert. Aktive Caspase-1 kann sowohl pro-IL-1 $\beta$  in seine reife, biologisch aktive Form als auch GSDMD spalten. Der N-Terminus des GSDMD (N-GSDMD) kann Poren in der Zellmembran bilden, über die reifes IL-1 $\beta$  sezerniert werden kann. (erstellt mit BioRender.com)

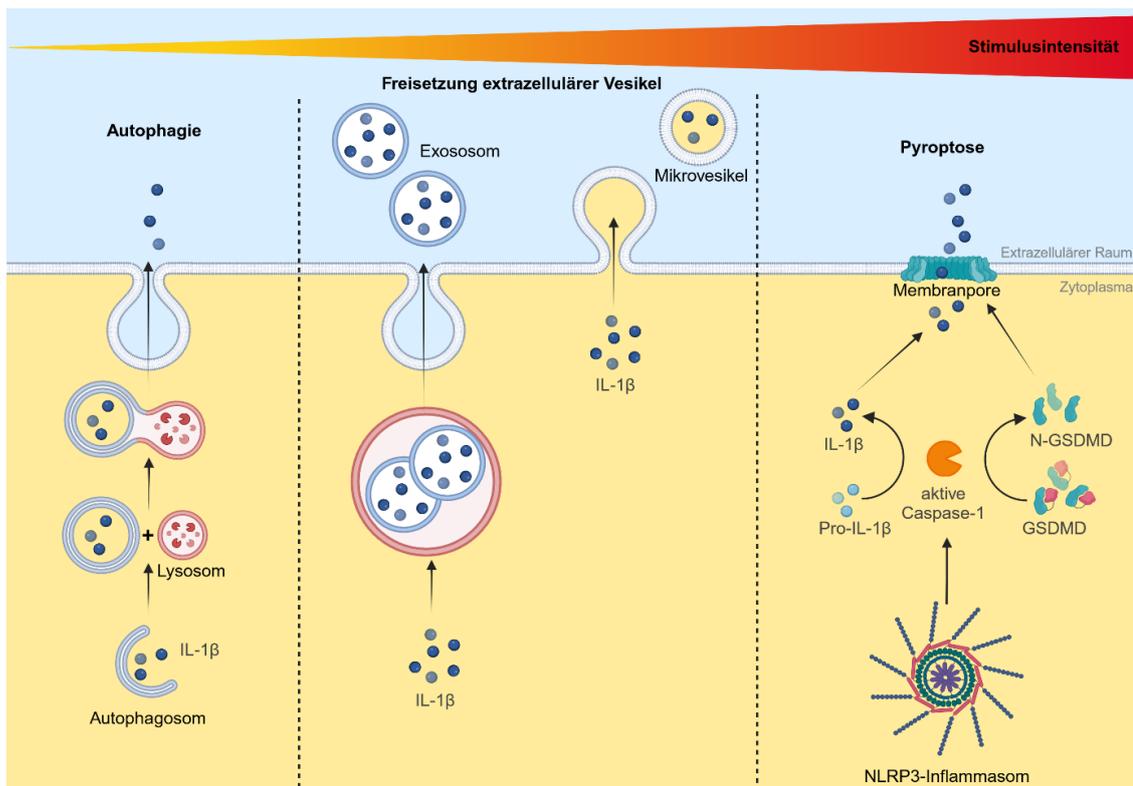
Die Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  kann aber auch durch eine Vielzahl anderer Proteasen erfolgen. Dazu gehören unter anderem: Elastase, Cathepsin G, Collagenase,<sup>230</sup> Chymase<sup>231</sup>, Granzym A<sup>232,233</sup>, und Proteinase-3<sup>234,235</sup>. Durch beispielsweise NETose (Freisetzung von *Neutrophil Extracellular Traps*; NET) kann eine Freisetzung von Proteasen aus den neutrophilen Granula erfolgen.<sup>236</sup> NETose dient daher ebenfalls als Reifungsplattform von IL-1 Familienmitgliedern.<sup>237</sup> In anderen Krankheitsmodellen und *in vitro* Experimenten wurde zudem gezeigt, dass IL-1 $\beta$  über das IL-1R-Signaling<sup>238</sup> NETose<sup>239</sup> induzieren kann. Weiterhin kann IL-1 $\beta$  Autophagie<sup>240–242</sup> und thrombotische Ereignisse<sup>130</sup> induzieren, die neben NETose<sup>243,244</sup> ebenfalls wichtige Faktoren im MPN-Kontext<sup>52–54,243,245</sup> sind.

### 1.2.1.3 IL-1 $\beta$ Sekretionsmechanismen

Reifes IL-1 $\beta$  verfügt nicht über das für die konventionelle Sekretion notwendige Signalpeptid (engl.: *signal recognition particle*; SRP)<sup>246</sup> und kann somit nicht über das Endo-Membran-System, bestehend aus dem endoplasmatischen Retikulum und dem Golgi-Apparat, sekretiert

werden.<sup>246</sup> Demnach erfolgt die Sekretion von IL-1 $\beta$  über unkonventionelle Signalwege. Der Sekretionsmechanismus ist dabei von vielen Faktoren abhängig. Die Art des Stimulus, dessen Stärke und Dauer, die Gegebenheiten der Mikroumgebung (Temperatur, pH-Wert<sup>247</sup>, Redox-Gleichgewicht<sup>248,249</sup>, Osmolarität<sup>250</sup>) und der Zelltyp selbst haben einen großen Einfluss auf den Sekretionsmechanismus.<sup>251</sup> Es gibt eine große Vielzahl von Stimuli, die zur Freisetzung von IL-1 führen (Übersicht in <sup>252</sup>).

In der Literatur ist vergleichsweise wenig über exakte Signalwege bekannt. Viele Studien sind gegenläufig und der Zelltyp scheint eine große Rolle bei der Art der unkonventionellen Sekretion zu spielen. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind multipel und oft nicht vollständig geklärt. Es gibt demnach nicht den einen gut beschriebenen, allgemeingültigen Mechanismus. Lopez-Castejon et al.<sup>252</sup> unterteilten die verschiedenen Sekretionsmechanismen in drei Kategorien: 1) Rettung und Umleitung, 2) Geschützte Freisetzung, 3) Terminale Freisetzung. Diese können Bereiche eines Stimulus-Spektrums zugeordnet werden (siehe Abbildung 5).<sup>252</sup> Lopez-Castejon et al. vermuteten, dass nur bei der stärksten Signalintensität die IL-1 $\beta$  Freisetzung mit dem Zelltod assoziiert ist.<sup>252</sup>



**Abbildung 5: Schematische Darstellung möglicher nicht-konventioneller Sekretionsmechanismen des IL-1 $\beta$  in Abhängigkeit der Stimulusintensität.** Stimulus und zelltyp-spezifische Unterschiede wurden in der Darstellung nicht berücksichtigt. IL-1 $\beta$  kann über Autophagie, Freisetzung extrazellulärer Partikel (wie Exosome und Mikrovesikel) oder Pyroptose sezerniert werden. Die Pyroptose-vermittelte Freisetzung ist dabei mit dem Zelltod assoziiert. (adaptiert nach Lopez-Castejon et al.<sup>252</sup>; erstellt mit BioRender.com)

### 1.2.1.3.1 Rettung und Umleitung von IL-1 $\beta$ - Autophagie

IL-1 $\beta$  liegt hauptsächlich im Zytosol vor.<sup>253</sup> Ein kleiner Anteil wird jedoch in endolysosomalen Vesikeln vor tryptischem Abbau geschützt.<sup>246</sup> Lysosomen sind für den Abbau zelleigener Stoffe oder aber den Transport dieser zuständig.<sup>254,255</sup> So kann allerdings auch IL-1 $\beta$ , welches eigentlich degradiert werden sollte, durch die Aktivierung von Exozytose „gerettet“ und freigesetzt werden.

Einige Gruppen vermuten, dass Autophagie der zugrundeliegende Mechanismus ist, wie das IL-1 in die Lysosomen gelangt.<sup>246,256</sup> Dabei scheinen die Ergebnisse und Schlussfolgerungen in unterschiedlichen Zellpopulationen jedoch gegenläufig zu sein. Harris et al. zeigten, dass eine Inhibierung der Autophagie nach LPS- und ATP-Stimulation von Makrophagen zur Freisetzung und eine Aktivierung der Autophagie zum Abbau von IL-1 $\beta$  führten.<sup>256</sup> Wohingegen Iula et al. in humanen Neutrophilen zeigten, dass bei einem identischen, experimentellen Design die Inhibierung der Autophagie zu einer verminderten IL-1 $\beta$  Freisetzung führte und die Autophagie-Aktivierung die Freisetzung von reifem IL-1 $\beta$  förderte.<sup>257</sup> Übereinstimmend wurde jedoch in beiden Arbeiten gezeigt, dass eine Co-Lokalisation von IL-1 $\beta$  und LC3B als Autophagosom-Marker nach Stimulation mit LPS und ATP vorlag und Autophagie bei der Sekretion eine Rolle spielte.<sup>256,257</sup> In neutrophilen Granulozyten konnten die IL-1 $\beta$  enthaltene Autophagosome in der Nähe der Zellmembran und teilweise in der Nähe der Zellpole nachgewiesen werden. Dies stützt die These einer Autophagie-abhängigen Sekretion.<sup>257</sup>

Die zugrundeliegenden Mechanismen sind somit noch nicht vollständig geklärt und scheinen zelltyp-spezifische Unterschiede aufzuweisen. Iula et al. konnten in humanen Neutrophilen zusätzlich Assoziationen von IL-1 $\beta$  mit neutrophilen, azurophilen Granula zeigen, die ebenfalls einen Einfluss auf die Sekretion von reifem und pro-IL-1 $\beta$  haben.<sup>257</sup> Diese enthalten eine Vielzahl von Serinproteasen, die in der Lage sind IL-1 $\beta$  zu spalten,<sup>257,258</sup> an der Induktion von Autophagie beteiligt sind und Caspase-1 inaktivieren können.<sup>258</sup> Die Caspase wird durch sich selbst, durch die Proteasen oder in Autophagolysosomen schnell inaktiviert.<sup>258</sup> Caspase-1 ist dennoch für die Sekretion notwendig, jedoch allein nicht ausreichend.<sup>258</sup> Aktive Caspase-1 spaltet GSDMD. Eine Co-Lokalisation des GSDMD N-Terminus mit azurophilen Granula und LC3+ Autophagosomen wurde in Neutrophilen nach LPS/ATP Stimulation gezeigt.<sup>259</sup> Dabei konnte keine Porenbildung in der Zellmembran, sondern nur in der Membran der neutrophilen, azurophilen Granula nachgewiesen werden, was zur Freisetzung der Granula führte.<sup>259</sup> Genauere bzw. weitere Mechanismen sind noch unbekannt. Die Co-Lokalisation von ASC und LC3B<sup>258</sup> deutet ebenfalls auf eine Verbindung zwischen Inflammasom und Autophagie hin.

### 1.2.1.3.2 Geschützte Freisetzung über extrazelluläre Vesikel

Eine weitere Möglichkeit der IL-1 $\beta$  Freisetzung besteht über extrazelluläre Vesikel (EV). Diese werden in zwei Hauptgruppen unterteilt<sup>260</sup>: den Exosome mit einer Größe von ca. 30 -100 nm und Ektosome (Mikrovesikel) mit 100 – 1000 nm.<sup>261</sup>

Mackenzie et al. beschrieben erstmals die IL-1 $\beta$  Sekretion über die schnelle Abspaltung von Mikrovesikeln von der Plasmamembran in THP-1 Zellen (humane monozytäre Zelllinie) nach LPS/ATP- Stimulation.<sup>262</sup> In den Mikrovesikeln befanden sich sowohl pro-IL-1 $\beta$  als auch reifes, biologisch aktives IL-1 $\beta$ .<sup>262</sup> Dieser Vorgang scheint in den THP-1 Zellen Ca<sup>2+</sup>-abhängig zu sein.<sup>262</sup>

Anders als in Monozyten scheint die Abspaltung von EV zur Freisetzung von prozessiertem IL-1 $\beta$  in LPS und ATP stimulierten Makrophagen Ca<sup>2+</sup>-unabhängig zu sein.<sup>263</sup> Qu et al. zeigten, dass in den EV neben reifem IL-1 $\beta$  auch ASC und aktive Caspase-1 enthalten waren.<sup>263</sup> Die Sekretion von IL-1 $\beta$  korrelierte mit der LAMP-1 und MHC-II Freisetzung, weshalb auf multivesikuläre Körperchen (MVB) aus recycelten Endosomen geschlossen wurde.<sup>263,264</sup> Liao et al. bezeichneten dies als exosomale Freisetzung.<sup>265</sup> Proteinsynthese, Proteasomaktivität, NF $\kappa$ B-Signaling, aktive Caspase-1 und Pannexin1 scheinen eine Rolle bei der LPS/ATP-induzierten Sekretion von IL-1 $\beta$  zu spielen.<sup>263</sup> Ein K<sup>+</sup>-Efflux ist ebenfalls von Bedeutung.<sup>263</sup> Genaue Mechanismen konnten jedoch noch nicht gezeigt werden.<sup>265</sup>

Exosome sind EV mit einer Lipiddoppelschicht mit endosomalem Ursprung.<sup>266</sup> Exosome können über die Expression von Alix, CD9, CD63, CD81, HSP70, Tsg101, Annexin, Flotillin, HSP90 charakterisiert werden.<sup>266-269</sup> Für die exosomale IL-1 $\beta$  Freisetzung ist ein aktives Inflammasom notwendig.<sup>270</sup> Dabei scheint jedoch die Bedeutung der Caspase-Aktivität zelltypspezifisch zu sein.<sup>263,265</sup>

Volllänge-Gasdermin D (GSDMD) interagiert mit HSP90 und CDC37.<sup>265,271</sup> Es kommt zur Rekrutierung von NEDD4 (E3-Ligase), wodurch die Polyubiquitinierung von pro-IL-1 $\beta$  katalysiert wird.<sup>265,271</sup> Zudem interagiert GSDMD (C-Terminus des Volllänge-Proteins) mit der IQ-Domäne des IQGAP1.<sup>265</sup> IQGAP1 hingegen rekrutiert Tsg101.<sup>265</sup> Tsg101 gehört dabei zum ESCRT (engl.: *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) System.<sup>272</sup> Dieses System wurde bereits als wichtiges System zur Exosombildung und Verpackung enthaltener Proteine beschrieben.<sup>273</sup> Die Aktivierung ist dabei Ca<sup>2+</sup>-abhängig.<sup>274</sup>

Die Lokalisation von ubiquitiniertem pro-IL-1 $\beta$  in CD63<sup>+</sup> Exosomen ist IQGAP1-abhängig.<sup>265</sup> Demzufolge verknüpft GSDMD die Polyubiquitinierung von pro-IL-1 $\beta$ <sup>271</sup> und die Translokation ins Exosom über die Interaktion mit IQGAP1 mit dem ESCRT System.<sup>265</sup>

Hypotone Umgebung und hohe ATP-Level scheinen die Exozytose der endolysomalen Vesikel zu fördern, während hypertone Bedingungen und hohe  $Mg^{2+}$  Konzentrationen diese hemmen.<sup>264</sup>

### 1.2.1.3.3 Terminale Freisetzung – Pyroptose

Pyroptose gilt als terminaler Sekretionsmechanismus von IL-1 $\beta$ . Dabei handelt es sich um einen pro-inflammatorischen Zelltod.<sup>275</sup> Dafür sind zunächst die beiden unter 1.2.1 beschriebenen Signale notwendig. Das Induktions-Signal führt zu einer erhöhten Expression der wichtigen Inflammasom-Bestandteile (wie *Nlrp3*, *Casp1*) sowie von *Il1b*.<sup>210,211</sup> Zunächst werden Caspase-1<sup>276</sup> und IL-1 $\beta$ <sup>157</sup> als Pro-Form exprimiert. Das weiterhin benötigte Adapterprotein Asc wird konstitutiv exprimiert und bedarf keines Induktions-Signals.<sup>211,277</sup>

Erst durch ein zweites, aktivierendes Signal kommt es zur Assemblierung aller Inflammasom-Bestandteile und dessen Aktivierung. Dieses Signal kann beispielsweise durch extrazelluläres ATP<sup>263,278</sup>, Toxine wie Nigericin<sup>279,280</sup>, Monosodium urate (MSU) Kristalle, Cholesterolkristalle<sup>281</sup>, Silicakristalle und Aluminiumsalze<sup>282</sup> induziert werden.<sup>190</sup> Weitere Inflammasome wie das *Nlrp1b*, *Nlrc4* und *Aim2* können ebenfalls durch eine Vielzahl von bakteriellen Infektionen aktiviert werden (Übersicht in <sup>252</sup>). Das aktive Inflammasom kann die pro-Caspase spalten und diese somit aktivieren.<sup>207</sup> Aktive Caspase-1 ist anschließend wie beschrieben in der Lage pro-IL-1 $\beta$ <sup>206</sup> in seine reife und biologisch aktive Form zu spalten. Zudem kann aktive Caspase-1 Gasdermin D spalten.<sup>283</sup> Der N-Terminus des Gasdermin D ist in der Lage 10 - 18 nm große Poren in der Plasmamembran zu bilden (Ausnahme: neutrophile Granulozyten<sup>259</sup>), über die Metabolite, Ionen aber auch Makromoleküle, wie die reifen Zytokine (bis 20 kDa), die Zellen passiv verlassen können.<sup>284,285</sup> Aufgrund der Poren kann es zu einem Anschwellen und einem „Platzen“ der Zellen kommen. Diese Art von Zelltod wird als Pyroptose bezeichnet.<sup>283,284,286,287</sup>

### 1.2.1.4 Die Interaktion zwischen IL-1 und CD41<sup>+</sup> Zellen

Viele Studien legen eine wichtige Verbindung zwischen IL-1 und CD41<sup>+</sup> Zellen nahe. IL-1 und CD41<sup>+</sup> können sich dabei gegenseitig regulieren. IL-1 $\beta$  ist beispielsweise in der Lage CD41-Oberflächenexpression<sup>288</sup> sowie die Expansion und Differenzierung der megakaryozytären Linie bis hin zur PLT-Freisetzung zu verstärken.<sup>289,290</sup> Eine Korrelation zwischen IL-1 $\beta$  Konzentration und PLT-Anzahl wurde beschrieben.<sup>291</sup> Der Transkriptionsfaktor PU.1 kann IL-1 induzieren, wird aber ebenfalls von ihm aktiviert. So resultiert die chronische Einwirkung von IL-1 $\beta$  auf HSC in Abhängigkeit der PU.1 Level in unterschiedlichen Auswirkungen auf die Hämatopoese. Eine verstärkte CD41<sup>+</sup>-Expansion (niedrige PU.1 Level) oder eine Verstärkung der myeloischen sowie Hemmung der lymphatischen Linie (hohe PU.1 Level) sind die Folge.<sup>290,292</sup> Dies ist übereinstimmend mit der krankhaft veränderten Hämatopoese JAK2-

V617F-positiver MPN.<sup>5</sup> Weiterhin sind PLT entweder indirekt t<sup>291</sup> oder aktivierte PLT direkt an der IL-1 Sekretion beteiligt.<sup>293</sup> Über IL-1RI-Signaling und p38 werden PLT voraktiviert und zeigten eine verstärkte pro-thrombotische Reaktion auf Agonisten und eine verstärkte Adhäsion an Collagen und Fibrinogen.<sup>288</sup> Dies könnte ebenfalls mit einem erhöhten Risiko eines thrombotischen Ereignisses in JAK2-V617F-positiven MPN korrelieren.<sup>52-54</sup> Zudem kann IL-1 $\alpha$  die Membranpermeabilität von MK stören und so zu einer MK-Ruptur und PLT-Freisetzung führen.<sup>294</sup> Dabei scheinen die MK mit einem Anstieg der *Il1a* mRNA-Level von besonderer Bedeutung zu sein.<sup>295</sup> Demnach sind CD41<sup>+</sup> Zellen und IL-1 eng miteinander verbunden.

## 1.2.2 IL-1 $\alpha$

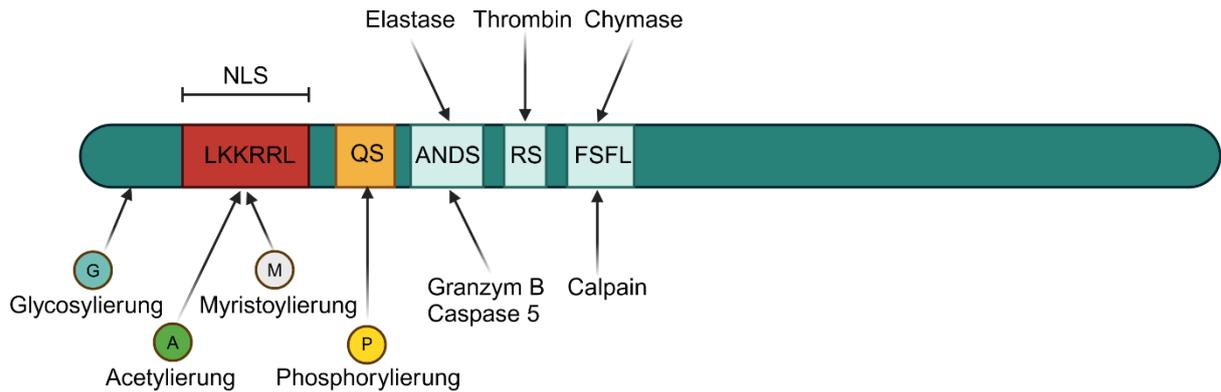
### 1.2.2.1 IL-1 $\alpha$ Expression

IL-1 $\alpha$  wird konstitutiv<sup>296-298</sup> in einer Vielzahl von nicht-hämatopoetischen und hämatopoetischen Zellen wie beispielweise Keratinozyten<sup>296,297,299</sup>, Epithelzellen<sup>298,300</sup>, Monozyten<sup>251,301</sup>, Makrophagen<sup>251</sup>, neutrophile Granulozyten<sup>251</sup>, dendritische Zellen<sup>188,190,251</sup> und T-Zellen<sup>302</sup> exprimiert. Die Basalexpression ist vergleichsweise gering, kann jedoch durch unterschiedliche Stimuli wie beispielsweise LPS stark induziert werden.<sup>296-298</sup>

Der *Il1a* Promotor verfügt anstatt von regulatorischen Regionen wie der kanonischen TATA oder CAAT-Box über eine Sp1 Bindungsstelle in der 5'-upstream GC-Box (-47 bis -45 bp)<sup>303</sup>, die den IL-1 $\alpha$  Promotor aktiviert.<sup>304</sup> Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Expression von Housekeeping-Genen während der Hämatopoese vermittelt.<sup>305</sup> Die IL-1 $\alpha$  Expression kann durch die verschiedensten Stimuli zelltyp-spezifisch verstärkt werden. Die Stimuli-induzierte IL-1 $\alpha$  Expression erfolgt über Transkriptionsfaktoren wie AP-1<sup>306</sup>, SP-1<sup>303</sup> und NF $\kappa$ B<sup>307,308</sup>. NF $\kappa$ B bindet dabei die Konsensus-Promotorregion (-103 bis -70 bp), wird durch IL-1 $\alpha$  induziert und kann sich selbst sowie die IL-1 $\alpha$  Expression induzieren.<sup>309</sup>

Proximal des *Il1a* Promotors befindet sich eine Transkriptionsrepressor-Bindungsstelle<sup>303</sup>, die möglicherweise an der Stimulus-induzierten *Il1a* Transkription beteiligt ist. Zudem wurde in humanen T-Zellen ein Einfluss von Hyper- und Hypomethylierungen von CpG Nucleotiden in der Promotorregion beschrieben.<sup>302</sup> In Monozyten hingegen scheint die lange nicht-kodierende RNA (lncRNA) AS-IL-1a für die IL-1 Expression notwendig zu sein.<sup>211</sup>

IL-1 $\alpha$  wird ebenfalls als pro-IL-1 $\alpha$  Form mit 31 kDa exprimiert.<sup>157</sup> Unterschiedliche post-translationale Modifikationen, wie Glykosylierung (Asp64),<sup>310</sup> Phosphorylierung (Ser90)<sup>311,312</sup>, einer Myristoylierung (Lys82)<sup>313</sup> und Acetylierung (Lys82)<sup>313,314</sup> des IL-1 $\alpha$  wurden beschrieben (siehe Abbildung 6).



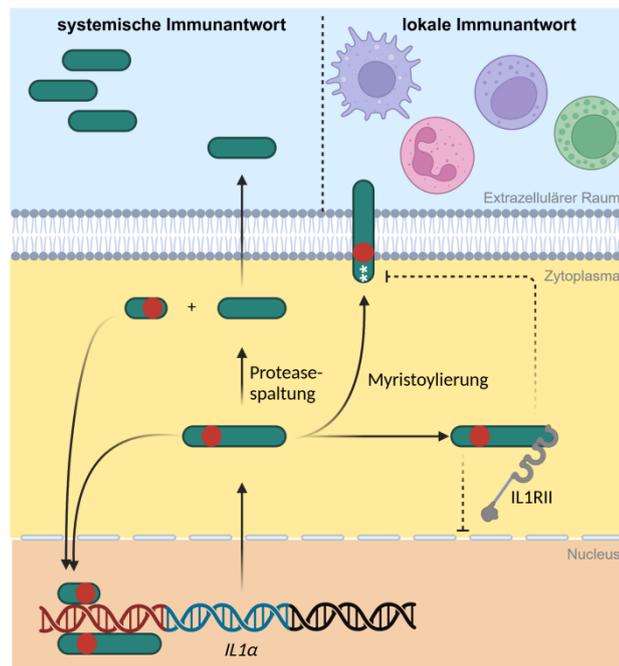
**Abbildung 6: Vereinfachte Darstellung des humanen IL-1 $\alpha$ .** IL-1 $\alpha$  wird als pro-IL-1 $\alpha$  exprimiert. Diese verfügt über ein Nucleus-Lokalisierungssignal (NLS) LKKRRL, welches die Translokation in den Nucleus ermöglicht. Zudem verfügt es über verschiedene Erkennungssequenzen für eine Vielzahl von Proteasen, die pro-IL-1 $\alpha$  in reifes IL-1 $\alpha$  spalten können. Post-translational kann IL-1 $\alpha$  unter anderem glykosyliert (G), acetyliert (A), myristoylierte (M) und phosphoryliert (P) werden. (modifiziert nach Chui et al.<sup>315</sup> und Malik et al.<sup>316</sup>, erstellt mit BioRender.com)

### 1.2.2.2 IL-1 $\alpha$ Lokalisation

IL-1 $\alpha$  ist eines der wenigen Zytokine, welches über verschiedene Lokalisationen (an der Plasmamembran<sup>301,317–320</sup>, im Zytoplasma<sup>321</sup>, im Zellkern<sup>322,323</sup>, sezerniert<sup>190,251</sup>) verfügt (siehe Abbildung 7). Pro-IL-1 $\alpha$  kann aufgrund einer Myristoylierung an die Plasmamembran translozieren<sup>313</sup> und membranständig als Oberflächenmarker exprimiert werden.<sup>301,317–320</sup> Es liegt ebenfalls glykosyliert vor und ist über eine Lektin-ähnliche Interaktion mit der Membran verbunden.<sup>310</sup> Diese Oberflächenexpression des IL-1 $\alpha$  wurde in Monozyten<sup>301,317</sup>, Makrophagen<sup>318,319</sup> und Thrombozyten<sup>320</sup> beobachtet. In dendritischen Zellen war die IL-1 $\alpha$  Oberflächenexpression Inflammasom-unabhängig.<sup>301</sup> Wohingegen in Makrophagen eine Beteiligung des IL-1RII bei der membranständigen IL-1 $\alpha$  Expression nachgewiesen wurde.<sup>226</sup> Da die Pro-Form bereits biologisch aktiv ist<sup>161</sup>, ist es in der Lage eine lokale Immunantwort über lokal vorliegende Immunzellen zu induzieren und aufrechtzuerhalten.<sup>324</sup> Dabei kann das IL-1 $\alpha$  juxakrin<sup>142</sup>, autokrin oder parakrin<sup>139</sup> wirken. Zudem wird eine Abspaltung des membranständigen pro-IL-1 $\alpha$  durch extrazelluläre Proteasen vermutet.<sup>324,325</sup>

Der proteolytische Verdau des pro-IL-1 $\alpha$  resultiert in einem N-terminalen Abschnitt (IL-1 $\alpha$ -NTP)<sup>324</sup> und dem C-terminalen reifen IL-1 $\alpha$  (17 bzw. 18 kDa).<sup>326,327</sup> Proteasen wie Calpain<sup>326,328,329</sup>, Elastase<sup>326</sup>, Chymase<sup>326</sup>, Granzym B<sup>326</sup>, Cathepsin G<sup>330</sup>, Proteinase-3<sup>330</sup>, Caspase-5<sup>331</sup>, Caspase-11<sup>331</sup> oder aber Thrombin<sup>327</sup> können pro-IL-1 $\alpha$  spalten. Den unterschiedlichen Spaltprodukten werden unterschiedliche Eigenschaften in Abhängigkeit des Spaltungsenzyms nachgesagt.<sup>161,326</sup> Sowohl pro-IL-1 $\alpha$  als auch reifes IL-1 $\alpha$  sind, wie bereits beschrieben, biologisch aktiv.<sup>161</sup> Es gibt jedoch kontroverse Aussagen, ob die reife Form über

eine stärkere Aktivität<sup>161</sup> verfügt oder diese identisch mit der Pro-Form ist.<sup>332</sup> Unterschiede könnten möglicherweise in Abhängigkeit der verschiedenen Spaltprodukte entstehen.



**Abbildung 7: Lokalisation des IL-1 $\alpha$  in der Zelle.** Pro-IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\alpha$ -NTP können aufgrund eines Nukleus-Lokalisierungssignals (rot) in den Zellkern translozieren und die Genexpression induzieren. Pro-IL-1 $\alpha$  kann ebenfalls aufgrund einer Myristoylierung und Glykosylierung an die Zellmembran translozieren, dort als Oberflächenmarker exprimiert werden und eine lokale Immunantwort induzieren. Die Bindung von pro-IL-1 $\alpha$  an den intrazellulären IL-1RII kann das pro-IL-1 $\alpha$  zurückhalten und eine nukleare bzw. membranständige Lokalisation unterbinden. Nach proteolytischer Spaltung kann reifes IL-1 $\alpha$  passiv sezerniert werden und eine systemische Immunantwort induzieren. (Modifiziert nach Chui et al.<sup>315</sup> und Malik et al.<sup>316</sup>, erstellt mit BioRender.com)

Die Pro-Form des IL-1 $\alpha$  verfügt über ein Nukleus-Lokalisierungssignal (NLS) LKKRRL<sup>322,323</sup>, welches sich vor allen bekannten Spaltstellen des pro-IL-1 $\alpha$  befindet.<sup>322</sup> Demnach kann sowohl pro-IL-1 $\alpha$  als auch IL-1 $\alpha$ -NTP in den Zellkern translozieren. Ein genauer Mechanismus ist bisher nicht bekannt. Es wird allerdings von einem aktiven Mechanismus ausgegangen.<sup>323</sup> Die Beteiligung einer durch genotoxischen Stress induzierten Acetylierung (Lys82) wird vermutet.<sup>314</sup> HS1-assoziiertes Protein X-1 (HAX1) bindet pro-IL-1 $\alpha$  sowie IL-1 $\alpha$ -NTP<sup>333,334</sup> und fördert die Translokation in den Nukleus.<sup>333</sup> Durch die direkte Bindung von pro-IL-1 $\alpha$  bzw. IL-1 $\alpha$ -NTP an Histonacetyltransferasen wie p300, PCAF und GCN5<sup>335,336</sup> kann die Transkription verschiedener Gene unabhängig vom IL-1RI-Signaling induziert werden.<sup>337</sup> Es wurde zudem gezeigt, dass IL-1 $\alpha$ -NTP Transkriptionsfaktoren wie SP-1, AP-1 und NF $\kappa$ B aktivieren<sup>337,338</sup> und sich dadurch selbst verstärken kann.<sup>303,306–308</sup> Das pro-IL-1 $\alpha$  kann zudem Chromatin<sup>339</sup> und weitere Proteine binden. Diese Interaktionen sind jedoch bisher wenig untersucht.<sup>315</sup>

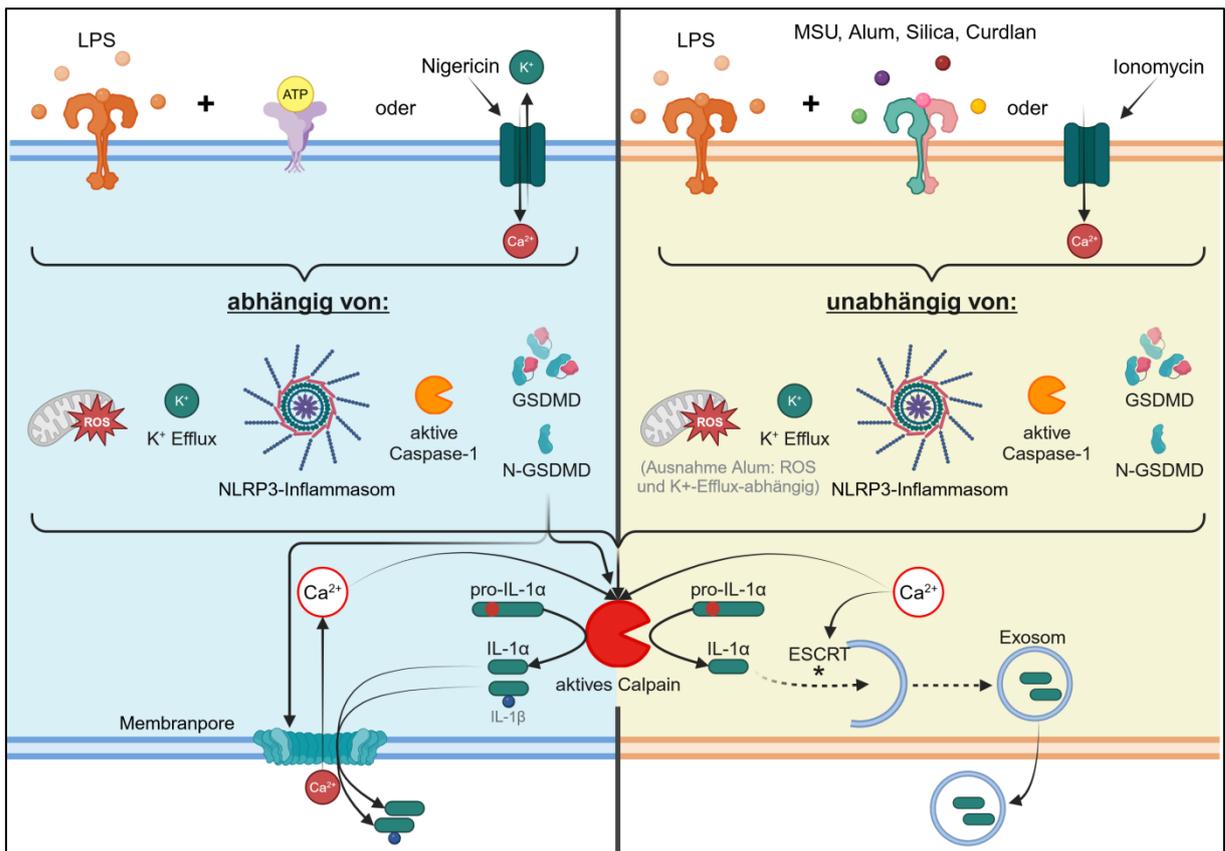
Der Bindung von pro-IL-1 $\alpha$  an den zytosolischen IL-1RII wird eine regulatorische Bedeutung zugeschrieben.<sup>321,333</sup> Durch die Bindung wird die Translokation des pro-IL-1 $\alpha$  in den Zellkern

inhibiert und eine Induktion einer pro-inflammatorischen Reaktion verhindert.<sup>321</sup> Aktive Caspase-1 kann diesen Komplex wieder dissoziieren und so das IL-1 wieder freisetzen.<sup>321</sup> Intrazelluläres IL-1 ist zudem limitiert durch proteasomalen Abbau nach Ubiquitinierung.<sup>188,189</sup>

### 1.2.2.3 IL-1 $\alpha$ Sekretionsmechanismen

Wenn IL-1 $\alpha$  in seine reife Form prozessiert wurde, kann es über unterschiedliche Sezernierungsmechanismen die Zelle verlassen und eine systemische Immunantwort hervorrufen. Es wird übereinstimmend in mehreren Studien eine passive Sekretion durch den Verlust der Membranintegrität und eine Zellyse beschrieben<sup>190,340,341</sup>, wobei noch keine genauen Mechanismen bekannt sind. Eine Sekretion wurde unter anderem in Abhängigkeit von S100A13<sup>342</sup>, Co-Sekretion mit IL-1 $\beta$ <sup>190,301,315,343</sup>, während Pyroptose<sup>190,340</sup> (näher unter 1.2.1.3.3 ausgeführt) oder Nekrose<sup>341</sup> beschrieben.

Es werden Caspase-1-abhängige und unabhängige Mechanismen in Abhängigkeit des vorliegenden Stimulus vermutet (siehe Abbildung 8).<sup>190,344</sup> So induzieren beispielsweise eine Vielzahl von Inflammasom-Aktivatoren neben IL-1 $\beta$  ebenfalls die Reifung und Sekretion von IL-1 $\alpha$ .<sup>88</sup> *Knockout* Experimente zeigten dabei in Abhängigkeit des Stimulus eine abweichende Rolle der Caspase-1<sup>190,344</sup> und des NLRP3 Inflammasoms<sup>190,251</sup>. Die zusätzliche Stimulation LPS-aktivierter dendritischer Zellen des Knochenmarks (engl.: *bone marrow dendritic cells*; BMDC) mit beispielsweise ATP oder Nigericin führte zu einer Caspase-1- und NLRP3-abhängigen IL1 $\alpha$  Reifung und Sekretion. Diese Mechanismen waren jedoch nach zusätzlicher Stimulation mit Silica oder MSU unabhängig von diesen beiden Proteinen.<sup>190</sup> Bei den Caspase-1-abhängigen Mechanismen wird vermutet, dass aktive Caspase-1 möglicherweise vergleichbar mit Caspase-3 Calpastatin (endogener Calpain-Inhibitor) spaltet und so die Proteaseaktivität des Calpain steigert<sup>344,345</sup> oder aber ein Caspase-1-vermittelter Mechanismus vorliegt, der unabhängig der Caspase-Aktivität<sup>190</sup> ist. Weiterhin konnte von Groß et al.<sup>190</sup> gezeigt werden, dass in Abhängigkeit des Stimulus, auch K<sup>+</sup>-Efflux- und ROS-unabhängige Sekretionsmechanismen des IL-1 $\alpha$  existieren. Jedoch scheinen diese in Abhängigkeit von Ca<sup>2+</sup> zu sein.<sup>190,328,344,346</sup> Daten unterschiedlicher Arbeitsgruppen zeigten, dass Ca<sup>2+</sup>-Influx für eine Inflammasom-unabhängige IL-1 $\alpha$  Prozessierung und Sekretion ausreichend ist.<sup>190,328,344</sup> Dies ist übereinstimmend mit einem konzentrations-abhängigen Anstieg von sekretiertem, reifem IL-1 $\alpha$  nach einer Ionomycin (Ca<sup>2+</sup>-Ionophor) Stimulation LPS-voraktivierter BMDC.<sup>190</sup> Ionomycin kann dabei ebenfalls die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Protease Calpain aktivieren.<sup>190</sup> Wie bereits oben beschrieben, ist diese an der Spaltung von pro-IL-1 $\alpha$  beteiligt. Wie die Ca<sup>2+</sup>-vermittelte Sekretion erfolgt, ist unklar.



**Abbildung 8: Darstellung der Stimulus-abhängigen IL-1 $\alpha$  Sekretionsmechanismen.** Die Unterteilung erfolgt anhand der Abhängigkeit oder Unabhängigkeit Inflammasom-assoziiierter Moleküle. Die zusätzliche Stimulation von LPS-vorstimulierten Zellen mit ATP oder Nigericin (K-Ionophor) führt zu einer Inflammasom-, Caspase-1- und GSDMD-abhängigen IL-1 $\alpha$  Reifung und Sekretion. ROS-Level und K<sup>+</sup>-Efflux spielen dabei ebenfalls eine Rolle. Partikel-ähnliche Co-Stimulation zu LPS-aktivierten Zellen hingegen führt überwiegend zu einer ROS-, K<sup>+</sup>-Efflux-, Inflammasom-, Caspase-1- und GSDMD-unabhängigen IL-1 $\alpha$  Reifung und Sekretion. Zu den partikulären Stimuli gehören Mononatriumurat Kristalle (MSU), industrielle Silica-Partikel (Silica), Curdlan und Aluminium (Alum). Aluminium bildet mit seiner ROS- und K<sup>+</sup>-Efflux-abhängigen Prozessierung von IL-1 $\alpha$  eine Ausnahme. Alle Aktivatoren können die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Calpain-Protease aktivieren. Das Ca<sup>2+</sup> könnte dabei extrazelluläres Ca<sup>2+</sup> sein, welches durch einen Ionophore-induzierten Ca<sup>2+</sup>-Influx (z.B. durch Nigericin, Ionomycin) in die Zelle gelangt oder durch die Porenformation in die Zelle eingeströmt ist. IL-1 kann in reifer, aber auch in der Pro-Form sekretiert werden. Die genauen Mechanismen sind noch unklar. Eine Sekretion über GSDMD-Poren oder über Exosomen wurde in Abhängigkeit der Zellpopulation bisher beschrieben. Die Exosome könnten wie bei der IL-1 $\beta$  Sekretion über ESCRT-Komplexe gebildet werden. Dies wurde im genauen Kontext der IL-1 $\alpha$  Sekretion jedoch noch nicht untersucht (\*). Eine Co-Sekretion von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde mehrfach beschrieben. (basierend auf <sup>190,251,340,344</sup>, erstellt mittels BioRender.com)

Scheinbar liegen ebenfalls zelltyp-spezifische Unterschiede vor. So wurde die IL-1 $\alpha$  Sekretion in Makrophagen<sup>251,340</sup> und dendritischen Zellen<sup>251</sup> nach LPS und ATP bzw. Nigericin Stimulation als GSDMD-abhängig beschrieben. Untersuchungen von Tsuchiya et al. und Kollegen<sup>340</sup> zeigten dabei, dass LPS / Nigericin-Stimulation von Makrophagen Caspase-1 aktiviert, welche Gasdermin D spaltet. P30 des gespaltenen GSDMD bildet Poren in der Zellmembran und führt so zu einem Verlust der Membranintegrität.<sup>340</sup> Die GSDMD Poren ermöglichen einen Ca<sup>2+</sup>-Influx, der für die Calpain-Aktivierung und IL-1 $\alpha$  Reifung notwendig ist.<sup>340</sup> Der Ca<sup>2+</sup>-Influx über die GSDMD-Poren oder weiteren membranpermeabilisierenden

Mechanismen wie Ferroptose kann die Bildung des ESCRT-III Komplexes induzieren.<sup>340,347</sup> Dieser Komplex wurde bereits unter 1.2.1.3.2 als mögliches System zur exosomalen Verpackung von IL-1 $\beta$  für die Sekretion beschrieben. Es wurde nicht näher untersucht, ob die GSDMD-abhängige IL-1 $\alpha$  Sekretion direkt über die Poren erfolgt oder über abweichende Mechanismen, wie beispielsweise über Exosome. In dendritischen Zellen wurde eine direkte Interaktion von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  beschrieben<sup>301</sup>, welche für die Sekretion von reifem IL-1 $\alpha$  essentiell zu sein scheint.<sup>301,343</sup>

Anders als in Makrophagen und dendritischen Zellen wurde in neutrophilen Granulozyten keine LPS/ATP-induzierte Sekretion des IL-1 $\alpha$  nachgewiesen.<sup>251</sup> Jedoch wurde eine NLRP3- und GSDMD-unabhängige IL-1 $\alpha$  Sekretion nach Curdlan (unlösliches  $\beta$ -Glucan) Stimulation beschrieben.<sup>251</sup> Curdlan induziert ebenfalls die GSDMD-Spaltung und erhöht die Membranpermeabilität.<sup>251</sup> Dennoch werden kein Zelltod und auch keine GSDMD-vermittelte IL-1 $\alpha$ -Sekretion induziert.<sup>251</sup> Hingegen wurde eine Co-Lokalisation des IL-1 $\alpha$  mit Exosomenmarker (CD63) und eine exosomale Sekretion beschrieben.<sup>251</sup> Das in extrazelluläre Vesikel (EV) befindliche IL-1 $\alpha$  war dabei im Gegensatz zum IL-1 $\beta$  biologisch aktiv.<sup>251</sup>

Demnach liegen zelltyp- und stimulus-abhängige Sekretionsmechanismen des IL-1 $\alpha$  vor, die jedoch noch näher charakterisiert werden müssen.

#### 1.2.2.4 IL-1 $\alpha$ Wirkung

IL-1 $\alpha$  kann hämatopoetische Zellen rekrutieren.<sup>190,251,348,349</sup> Unter anderem wurde gezeigt, dass IL-1 $\alpha$  (IL-1 $\beta$  deutlich geringer) beispielsweise neutrophile Granulozyten in Peritonitis-Mausmodellen<sup>190,251</sup> und sterilen Inflammationsmodellen<sup>349</sup> rekrutiert. IL-1 $\alpha$  fördert die Myelopoese<sup>350</sup> und hat nach Thrombin-Spaltung ebenfalls einen Effekt auf die Thrombopoese<sup>327</sup>. Sezerniertes, reifes IL-1 $\alpha$  kann demnach eine systemische Immunantwort induzieren.<sup>351–353</sup> Unter anderem kann IL-1 $\alpha$  *Signaling* zu Symptomen wie Fieber<sup>135,136</sup> führen.

Erhöhte IL-1 $\alpha$  Konzentrationen sind in einigen Tumorerkrankungen mit einem schlechteren Überleben der Patienten sowie Metastasierung assoziiert.<sup>354–356</sup> Daher zeigten einige Studien zur anti-IL-1 $\alpha$  Behandlung mittels monoklonaler Antikörper vielversprechende Ergebnisse in verschiedenen pro-inflammatorischen Erkrankungen.<sup>357–359</sup>

### 1.3 Integrine

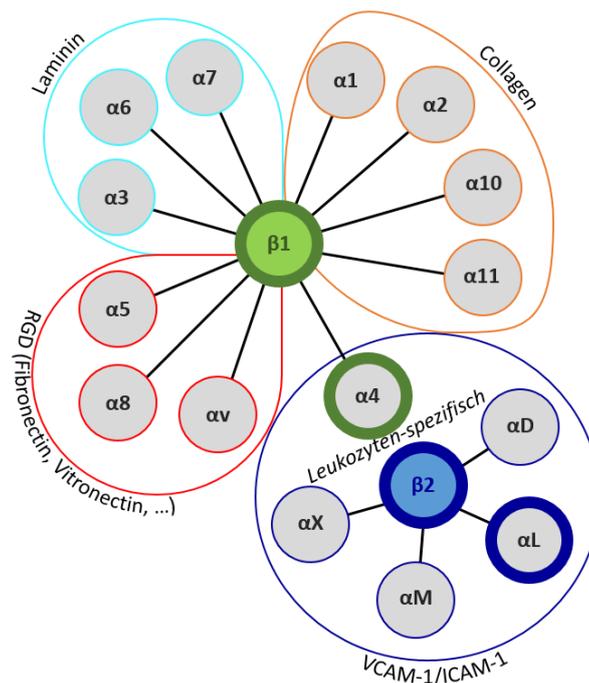
Integrine sind die bedeutendsten und am meisten erforschten Adhäsionsmoleküle<sup>360</sup> für die Zell-Zell-Interaktion<sup>361,362</sup>, die Interaktion mit der extrazellulären Matrix (EZM)<sup>363,364</sup> und dynamischen Prozessen wie Adhäsion, Migration und Extravasation.<sup>365,366</sup>

Integrine sind Transmembranmoleküle und werden als Heterodimer bestehend aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ - Untereinheit exprimiert.<sup>360,367,368</sup> Sie sind lediglich in Metazoen zu finden.<sup>369</sup> In

Säugerzellen sind 18  $\alpha$  und 8  $\beta$  Untereinheiten bekannt, welche insgesamt 24 verschiedene Integrine bilden können.<sup>360,368</sup> Die Liganden-Spezifität ist dabei sehr komplex<sup>370,371</sup> und wird maßgeblich von der  $\alpha$ -Kette bestimmt.<sup>372,373</sup> Die  $\beta$ -Kette ist aufgrund von zwei NPXY/F Motiven mit der Signalgebung und dem Zytoskelett verbunden.<sup>374</sup>

Jedes Integrin hat eine Vielzahl spezifischer Funktionen in einem sehr weitreichenden Spektrum. Darunter zählen Funktionen in der Entwicklung<sup>375–380</sup>, der Hämostase<sup>381</sup>, der Angiogenese<sup>382,383</sup> und während der Immunantwort<sup>384,385</sup> (einschließlich der Diapedese<sup>386,387</sup>). Sie spielen ebenfalls eine große Rolle in unterschiedlichen Tumor-<sup>388–392</sup> und Autoimmunerkrankungen<sup>393–399</sup>.

Integrine sind bidirektionale Signalmoleküle<sup>360</sup> und werden stark reguliert (Überblick in <sup>400</sup>). Sie werden zunächst in einer inaktiven, geschlossenen Konformation an der Zelloberfläche exprimiert.<sup>401–403</sup> Dabei liegen die  $\alpha$ - und  $\beta$ - Untereinheit der Integrine aufgrund von Salzbrücken assoziiert vor.<sup>404,405</sup> Die Ektodomäne ist dabei gebogen.<sup>401–403</sup> In dieser Konformation liegt eine deutlich geringere Ligandenaffinität<sup>401</sup> sowie keine bzw. deutlich verminderte Signalweiterleitung vor<sup>368,406</sup>. Erst durch ein sogenanntes „*inside-out*“ Signal, welches beispielsweise durch T-Zell-Rezeptor (TCR)<sup>407,408</sup> und B-Zell-Rezeptor (BCR)<sup>409,410</sup> Aktivierung sowie Zytokin-<sup>411</sup> und Chemokin-Signaling<sup>410</sup> aktiviert werden kann, kommt es zu einer Aktivierung der Integrine und einer verstärkten Adhäsion (näher unter 1.3.1 beschrieben). Dabei sind die Domänen nicht länger assoziiert, die Ektodomäne ist aufgerichtet und die Metallion-abhängige Liganden-Bindungsstelle ist zugänglich.<sup>401–403,412</sup> Diese erweiterte-offene Konformation verfügt über eine höhere Ligandenaffinität.<sup>401</sup> Integrine können anhand ihrer evolutionären Beziehungen, ihrer Liganden-Spezifität und der Leukozyten-spezifischen Expression in Gruppen unterteilt werden (Gruppierung der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine siehe Abbildung 9).<sup>360,413</sup> Die meisten Integrine erkennen dabei eine kurze Peptid-Sequenz wie RGD<sup>414</sup>, LDTS<sup>415</sup>, LDVP oder IDSP<sup>416</sup> des Liganden.



**Abbildung 9: Gruppierung der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine aufgrund ihrer Liganden.** Integrine setzen sich aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette zusammen. Die  $\alpha$ -Kette ist dabei entscheidend für die Liganden-Spezifität, während die  $\beta$ -Kette für die Signalweiterleitung notwendig ist. Im Rahmen dieser Arbeit liegt der Fokus auf  $\alpha_4\beta_1$  (grün) und  $\alpha_L\beta_2$  (blau) Integrinen, welche VCAM-1 und ICAM-1 binden. (angepasst an <sup>360,413</sup>)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich auf das  $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (VLA4) und die  $\beta_2$ -Integrine im Allgemeinen fokussiert. Dabei handelt es sich um Leukozyten-spezifische Integrine. Sie spielen eine bedeutende Rolle in der immunologischen Synapse und der Diapedese.<sup>417–420</sup> Es wurde zudem eine konstitutiv aktive Integrinkonformation und damit einhergehenden eine erhöhte Adhäsion an VCAM-1 und ICAM-1 aufgrund der JAK2-V617F-Mutation in murinen Zelllinien<sup>421,422</sup>, in isolierten Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen<sup>422</sup>, sowie in humanen Granulozyten JAK2-V617F-positiver MPN-Patienten<sup>421</sup> nachgewiesen. Ebenso wurde bereits eine Bedeutung beider Integrinklassen bei der Migration JAK2-V617F-mutierter Zellen in die Milz von CD45.1 Empfänger-mäusen gezeigt.<sup>422</sup>

### 1.3.1 Inside-out Signalgebung

Die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wie Zytokin-, Chemokin-, aber auch B- und T-Zell-Rezeptoren aktivieren beispielsweise PKC-PDK1<sup>423</sup>, PLC $\gamma$ -CalDAG-GEFI<sup>424,425</sup> oder ADAP/SKAP55<sup>407</sup>-Signalwege. Ebenfalls wird ein Anstieg von zytoplasmatischem Ca<sup>2+</sup><sup>424,426,427</sup> und Diacylglycerol (DAG)<sup>428</sup> induziert. Ca<sup>2+</sup> und DAG können Guanin-Austauschfaktoren wie CalDAG-GEFI aktivieren und damit die Umwandlung von Rap1-GDP zu Rap1-GTP induzieren.<sup>422,429</sup> CalDAG-GEFI und Rap1 werden als essentiell in der Integrinaktivierung

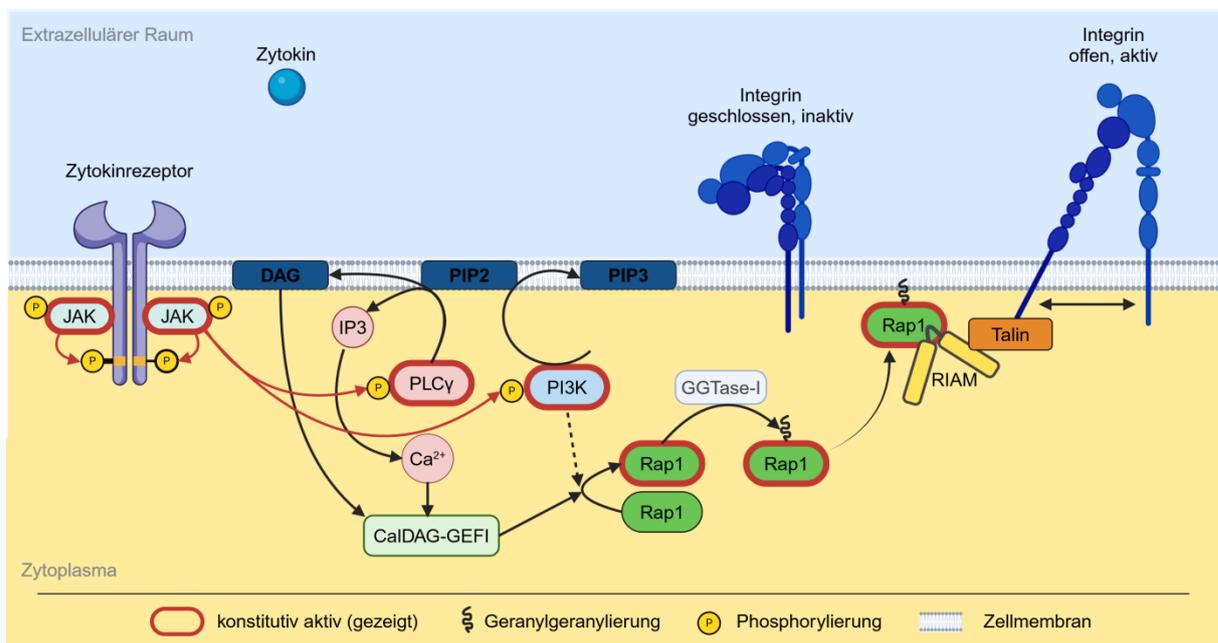
beschrieben.<sup>422,424,425,430-437</sup> Edelmann et al. beschrieben zudem die Beteiligung der PI3K Kinase bei der Rap1 Aktivierung.<sup>422</sup> Die Position der PI3K in der Signalkaskade wird jedoch divergent beschrieben.<sup>422,438,439</sup> Aktives Rap1 wird von GGTase-I post-translational mittels Geranylgeranylierung modifiziert.<sup>422,438,440</sup> Dabei handelt es sich um eine Lipid-Modifikation, die eine Verankerung eines Proteins in einer Plasma- oder Endomembran ermöglicht.<sup>441</sup> Das aktivierte und Lipid-modifizierte Rap1 transloziert an die intrazelluläre Domäne der  $\beta$ -Integrinkette an die Plasmamembran.<sup>422</sup> Rap1 rekrutiert durch die direkte Interaktion mit Talin<sup>442,443</sup> oder über das Adapterprotein RIAM<sup>443-445</sup> Talin-1 ebenfalls an die intrazelluläre Domäne. Durch die Bindung von Rap1 und RIAM an Talin<sup>444,446</sup>, kommt es zu einer Aufhebung der auto-inhibitorischen Konformation von Talin.<sup>445</sup> Talin kann ebenfalls durch Spaltung (bspw. durch Calpain)<sup>447</sup> oder durch Interaktion mit Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP2)<sup>448</sup> aktiviert werden. Aktives Talin kann über die N-terminale FERM-Domäne an den zytoplasmatischen Teil (membran-proximales NPXY-Motiv) der  $\beta$ -Untereinheit der Integrine binden.<sup>449-451</sup> Dadurch wird die Salzbrücke zwischen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Integrinkette unterbrochen.<sup>404,452</sup> Dies ermöglicht eine räumlichen Entfernung der Transmembrandomänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette, die Aufrichtung der Ektodomäne (Kopfdomäne)<sup>401-403</sup> und eine verstärkte Ligandenaffinität<sup>401</sup> durch die Öffnung der Ligandenbindungstasche.<sup>412</sup> Die I-EGF-Module der  $\beta$ -Kette scheinen bei der Integrinumstrukturierung während der Integrinaktivierung ebenfalls eine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>453</sup> Über die Kinetiken der Proteinassemblierung, Konformationsänderung und Phosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ -Kette ist jedoch bisher wenig bekannt.<sup>454-461</sup>

Kindlin (Kindlin-1/-2/-3) verfügt ebenfalls über eine FERM-Domäne, die sehr ähnlich der des Talin ist.<sup>462</sup> Jedoch binden diese das membran-distale NXXY-Motiv der  $\beta$ -Untereinheit.<sup>463-465</sup> Kindlin-Familienmitglieder werden als notwendig in der Integrinaktivierung beschrieben und wirken ebenfalls stabilisierend auf die aktive Integrinkonformation.<sup>463,464,466,467</sup> Sie sind jedoch allein nicht ausreichend, um eine Konformationsänderung zu induzieren.<sup>463,468</sup> Kindlin verstärkt zudem die Talin-Integrin-Bindung<sup>468,469</sup> und ist ebenfalls am „*outside-in*“ Signaling beteiligt.<sup>463</sup>

Cytohesin-1 wird hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen exprimiert und kann ebenfalls die zytoplasmatische Domäne der  $\beta_2$ -Integrinketten (nicht aber  $\beta_1$ -Integrinketten) binden.<sup>470</sup> Cytohesin-1 ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für ARF-GTPasen, welcher einen Einfluss auf die Adhäsion hat und ebenfalls am *outside-in* Signalwege beteiligt zu sein scheint.<sup>470-472</sup>

Im Fall der JAK2-V617F-Mutation führt bereits die konstitutiv aktivierte JAK2-Kinase zu einer konstitutiv aktiven, offenen Konformation der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine (siehe Abbildung 10). Dies wurde funktionell mittels signifikant erhöhter,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrin-vermittelter Adhäsion an VCAM-1/ICAM-1 in unstimulierten JAK2-V617F-mutierten Patienten-Granulozyten,<sup>421</sup> Maus-

Granulozyten (Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup>)<sup>422</sup> und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen<sup>421</sup> als auch mittels spezifischer Antikörper gegen die aktive Konformation von  $\beta_1$ -Integrinen<sup>422</sup> nachgewiesen. PLC $\gamma$  katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat (PIP2) zu Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP3).<sup>428,473,474</sup> IP3 führt zur Ca<sup>2+</sup> Freisetzung.<sup>427</sup> Es erfolgt eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige Rap1 Aktivierung über CalDAG-GEFI.<sup>422</sup> Rap1 liegt in JAK2-V617F-mutierten Granulozyten ebenfalls konstitutiv aktiviert vor.<sup>421,422</sup> Die PI3K wird durch die konstitutiv aktive JAK2-V617F Kinase überaktiviert<sup>475</sup> und scheint an der Aktivierung ebenfalls beteiligt zu sein.<sup>422</sup> In JAK2-V617F-mutierten Granulozyten ist aktives Rap1 bereits vermehrt an der Zellmembran lokalisiert.<sup>422</sup>



**Abbildung 10: JAK2-V617F-Mutation induziert *inside-out* Signaling und führt zu einer konstitutiv aktiven  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrin-Konformation.** Die JAK2-V617F-mutierte Kinase ist bereits ohne externen Stimulus konstitutiv aktiv und führt zu einer Überaktivierung von PI3K und PLC $\gamma$ . Dies resultiert in einem Anstieg von Diacylglycerol (DAG) und intrazellulärem Ca<sup>2+</sup>. Beide können Guanin-Austauschfaktoren (CalDAG-GEFI) aktivieren. Aktives CalDAG-GEFI katalysiert die Umwandlung von Rap1-ADP zu Rap1-ATP. PI3K scheint daran ebenfalls beteiligt zu sein. In JAK2-V617F-mutierten Granulozyten liegt Rap1 konstitutiv aktiv vor. Geranylgeranyltransferasen wie GGTase-I können Rap1 post-translational modifizieren. Diese Modifikation ist notwendig für die Membranassoziation und Rekrutierung von RIAM sowie Talin. Aktives, an die  $\beta$ -Integrinkette-gebundenes Talin resultiert in einer offenen, aktiven Integrin-konformation. (erstellt mit BioRender.com)

Das klassische Integrin-*inside-out*-Aktivierungsmodell muss jedoch aufgrund thermodynamischer Unterschiede zwischen den Integrinkonformationen überdacht werden.<sup>476-478</sup> Gemäß Sun et al. wären unphysiologische Mengen Talin notwendig, um die benötigte Energiemenge für eine stabile Konformationsänderung zu induzieren.<sup>477,479</sup> Daher wird ein abweichender Mechanismus vermutet.

Neben den Proteinen Talin<sup>449,451,480</sup>, Kindlin<sup>468,481</sup> und Rap-GTPasen<sup>431,482,483</sup>, welche als unerlässlich für die Ausbildung der Integrin-vermittelten Adhäsion gelten, werden mechanische Kräfte als regulatorisch-notwendig beschrieben.<sup>484–488</sup> Das sogenannte „Integrin-Adhäsom“<sup>489,490</sup> umfasst eine Vielzahl von Proteinen am Adhäsions-Komplex. Einige Proteine sind dabei mechanosensitiv (z.B. FAK<sup>486,491</sup>, Talin<sup>492–494</sup>, Vinculin<sup>495</sup>). Eine Krafteinwirkung kann in diesen Proteinen zu einer Konformationsänderung oder veränderten post-translationalen Modifikation führen, die in einer abweichenden Kraftübertragung und Signalgebung resultieren kann.<sup>486,491</sup> Aufgrund dessen und weiteren experimentellen Hinweisen bezüglich der freien Energien wird davon ausgegangen, dass Talin und Kindlin kleine mechanische Kräfte auf den Integrin-Liganden-Komplex übertragen und so das thermodynamische Gleichgewicht in Richtung der aktiven Konformation der Integrine verschieben.<sup>467,469,477,479,496</sup> Es werden jedoch unterschiedliche Kinetiken in Abhängigkeit der Integrine und deren Liganden vermutet.<sup>370,478</sup>

Neben der Ligandenbindung sind auch die Clusterbildung<sup>486,497–500</sup> und Scherkräfte<sup>485</sup> wichtig für den finalen Schritt der Integrinaktivierung und die Signalweiterleitung. Integrine können Cluster bilden, dabei kommt es zu einer räumlichen Ansammlung in sogenannten *Lipid rafts*.<sup>501</sup> Welche genauen Signale dafür notwendig sind, ist bislang nicht vollständig geklärt. Jedoch gibt es eine Vielzahl von Proteinen, Dimerisierungen und Interaktionen, die die Clusterbildung zu fördern scheinen.<sup>502–504</sup> Die Ausbildung von Integrin-Clustern ermöglicht eine multivalente Ligandenbindung und erhöht damit die Avidität.<sup>505</sup> Die Avidität beschreibt dabei die Gesamtstärke der zellulären Adhäsion und ergibt sich aus der Anzahl der Interaktionen (Valenz) und der Affinität der einzelnen Integrin-Liganden-Interaktionen.<sup>506</sup> Aufgrund der lokalen Anreicherung von Integrinen<sup>507</sup> und Proteinkomplexen<sup>508,509</sup> wird die Adhäsion durch Stabilisierung verstärkt. Das Clustering resultiert in der Ausbildung fokaler Adhäsionskomplexe<sup>502</sup>, welche mit Wachstumsfaktorrezeptoren assoziiert vorliegen<sup>500,510</sup>. Durch Clusterbildung sowie Re-Bindung abgelöster Integrine an ihre Liganden kann eine Adhäsion auch zeitlich verlängert werden.<sup>511</sup>

Die essentielle Bedeutung einiger weniger Proteine (z.B. Talin<sup>449,451,480</sup>, Kindlin<sup>468,481</sup>, Rap-GTPasen<sup>431,482,483</sup>), sowie mechanischer Kräfte<sup>485</sup> wurden für die *inside-out* Signalgebung der Integrine beschrieben. Dennoch scheint es weiterhin eine Vielzahl offener Fragen zu geben. Die Signalwege zur Aktivierung (*inside-out*) als auch der intrazellulären Weiterleitung (*outside-in*) überschneiden sich<sup>463,512–514 371,426–428</sup>, was eine genaue Analyse erschwert. Zudem scheint es Unterschiede in der Signalgebung in Abhängigkeit der Integrin-Aktivierungssignale, des Integrins selbst und der untersuchten Zellpopulation zu geben.<sup>407,431,482</sup> Integrine können sich ebenfalls untereinander gegenseitig aktivieren oder inhibieren<sup>507,515,516</sup>, was einen weiteren regulatorischen Mechanismus darstellt.

### 1.3.2 *Outside-in* Signalgebung

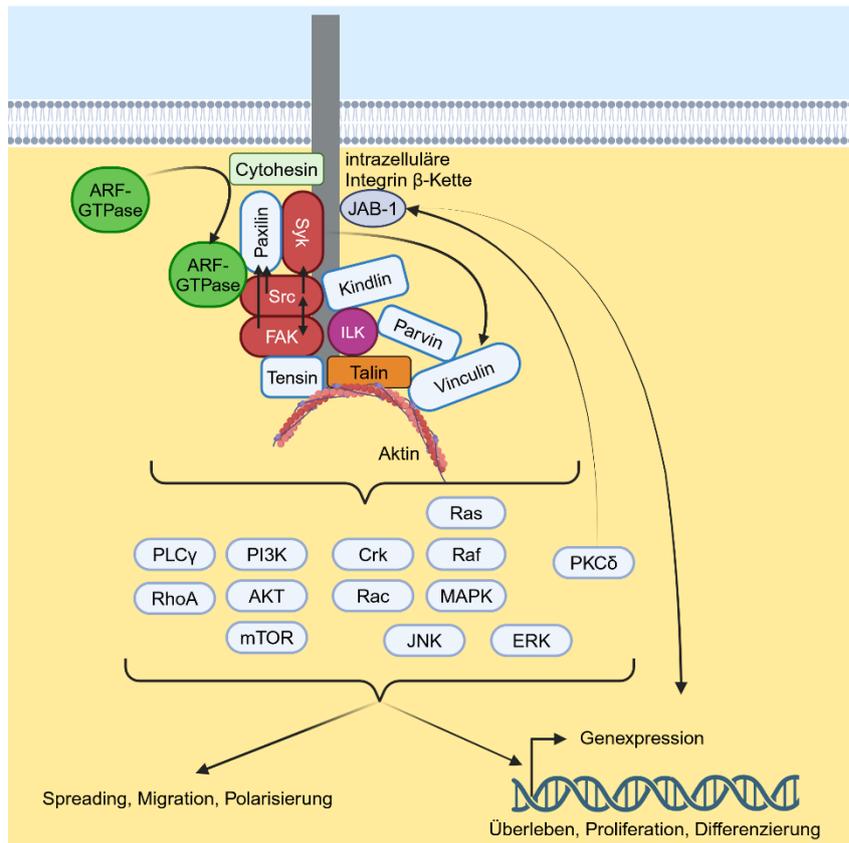
Die aktive, offene Konformation der Integrine ermöglicht eine Ligandenbindung<sup>401</sup> sowie die Ausbildung von Integrin-Clustern<sup>502</sup>. Somit können sogenannte „*outside-in*“ Signale induziert werden.<sup>497,517</sup> Diese sind sehr komplex und abhängig von den Integrinen, der Zellpopulation<sup>363,419,454,518–520</sup> und den wirkenden Zugkräften<sup>485,521</sup>. So können in einer Zellpopulation unterschiedliche Signalwege aktiviert werden.<sup>419</sup> Diese induzieren unter anderem Proliferation, Migration und Differenzierung der adhärennten Zellen.<sup>522,523</sup>

Die Signalweiterleitung kann in 3 Abschnitte untergliedert werden<sup>519</sup>: Die unmittelbare Wirkung (0-10 min) resultiert in einer verstärkten Tyrosinphosphorylierung.<sup>524–528</sup> Während die kurzzeitige Adhäsion (10-60 min) zur Umorganisation des Zytoskeletts, Zell-*Spreading* und Polarisierung führt<sup>529</sup>, induziert die langanhaltende Adhäsion (>60 min) Veränderungen in der Signalgebung und der Genexpression.<sup>519,530,531</sup> Diese können unter anderem das Zellüberleben<sup>532–534</sup>, die Proliferation<sup>534,535</sup> und die Differenzierung<sup>533,536,537</sup> beeinflussen.

Signalmoleküle wie Syk, Src und FAK sind zu Beginn der Adhäsionsausbildung von großer Bedeutung.<sup>528,538</sup> Für eine spätere Verstärkung der Adhäsion und Versteifung der Zellen sind anschließend eine RhoA-Aktivität<sup>539,540</sup> sowie das Zusammenspiel verschiedener Integrin-klassen<sup>507,515</sup> notwendig.

Als „Integrin-Adhäsom“ wird ein dynamischer Makromolekülkomplex bezeichnet, der durch die Rekrutierung von einer Vielzahl von Adapter-, Struktur- und Signalmolekülen an den Integrin-Liganden-Komplex entsteht.<sup>489,490</sup> Es wird als mechanische Kopplung zwischen dem Integrin-System und dem Aktinomyosin-System betrachtet und ist in Modulen in einer dreidimensionalen Struktur organisiert.<sup>541</sup> Vertikal schließen sich dem Integrin-Aktivierungs- und Signalisierungsmodul an der Plasmamembran, das Kraftübertragungsmodul und schließlich ein Aktin-Regulationsmodul an.<sup>541</sup> Horizontal hingegen bilden die Integrine Nanocluster mit unterschiedlichen Integrinaktivitäten und mechanischen Eigenschaften.<sup>542,543</sup> Zunächst wurden 156 Proteine im „Integrin-Adhäsom“ beschrieben.<sup>490</sup> Doch mittlerweile sind 2.412 involvierte Komponenten bekannt.<sup>489</sup>

Im Folgenden werden einige der wichtigsten Interaktionen meist ohne Berücksichtigung der den Analysen zugrundeliegenden Integrine und Zellpopulationen beschrieben. Eine grobe Übersicht der induzierten Signalwege ist dazu in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Integrin-Ligandenbindung und Clustering induziert eine Vielzahl verschiedener Signal- und Adaptermoleküle.** Dabei kann Cytohesin, ein GEF von ARF-GTPasen, direkt an die  $\beta$ -Kette des Integrin binden und ARF-GTPasen aktivieren. Diese rekrutieren Paxillin und Src-Kinasen. FAK und Src-Kinasen können sowohl Paxillin als auch sich gegenseitig phosphorylieren und resultieren in einer maximalen Aktivierung. Syk bindet an phosphoryliertes Paxillin, Src-Kinasen und direkt an die  $\beta$ -Kette. Es erfolgt die Rekrutierung von Vinculin an den Adhäsions-Komplex. Vinculin bindet Talin und ist über Parvin mit dem ILK-Multidomänkomplex verbunden. Dieser bindet Talin, die  $\beta$ -Kette und Kindlin, welches aufgrund einer Src-vermittelten Phosphorylierung ebenfalls an der  $\beta$ -Kette als auch an Src-Kinasen assoziiert vorliegt. Tensin, Vinculin und Aktin dienen der Stabilisierung aufgrund von Quervernetzungen und bilden eine Kontaktstelle zum Aktinzytoskelett. Ausgehend von dem FAK-Src- und ILK-Komplex sowie Syk, kommt es zur Aktivierung einer Vielzahl von Signal- und Adaptermolekülen, unter anderem PLC $\gamma$ , PI3K, Crk, MAPK-Signalwegen, Rac und RhoA. Diese resultieren in Veränderungen im Zell-Spreading-, Migrations- und Polarisierungsverhalten sowie der Induktion einer Genexpression, die das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der Zelle betreffen. JAB-1 ist ebenfalls als Integrin-assoziiert beschrieben und kann nach PKC $\delta$ -vermittelter Phosphorylierung in den Zellkern translozieren und ebenfalls als Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktors wirken. (erstellt mit BioRender.com)

Eines der ersten Proteine an der Adhäsionsstelle ist Paxillin, welches wahrscheinlich über *ADP-ribosylation factor* (ARF)-GTPasen an die fokale Adhäsion rekrutiert wird.<sup>302,544</sup> ARF-GTPasen können ebenfalls über das ARF-GTPase aktivierende Protein (ASAP1) mit Src-Kinasen interagieren.<sup>545</sup> Weiterhin kann die Fokale Adhäsionskinase (FAK) die Lokalisation von Src-Kinasen und Paxillin beeinflussen.<sup>546</sup> Src und FAK können anschließend Paxillin aktivieren, welches anschließend als molekulare Plattform dient.<sup>546-548</sup> Beispielsweise bindet phosphoryliertes Syk an aktives Paxillin, was zur Rekrutierung des mechanosensitiven Vinculins an die mechanisch-freigelegte Bindungsstelle von Talin führt.<sup>503,549,550</sup> Durch die

Interaktion von Vinculin mit der  $\beta$ -Integrinkette, Talin und Aktin wird die Adhäsion stabilisiert und die Kraftwirkung verstärkt.<sup>487,550–552</sup>

Die Src-Kinasen verfügen über weitere entscheidende Mechanismen. Src Kinasen wurden in  $\beta_2$ -Integrin-induzierter Signalgebung in Granulozyten als essentiell beschrieben.<sup>553–557</sup> Src-Kinasen werden ebenfalls an das „Integrin-Adhäsom“ rekrutiert<sup>558</sup> und können direkt  $\beta$ -Integrinketten konstitutiv binden<sup>559</sup>. Sie können das NXXY-Motiv der  $\beta$ -Kette phosphorylieren<sup>560,561</sup> und so Integrin-Bindungspartner kontrollieren<sup>374,560,562</sup>. Wie bereits beschrieben, dient das NXXY-Motiv unter anderem als Bindungsstelle für Kindlin.<sup>463–465</sup> Kindlin ist dabei wie Talin sowohl an der *inside-out* als auch an der *outside-in* Signalgebung beteiligt.<sup>463</sup> Kindlin bildet einen FAK-geförderten Komplex mit Src-Kinasen und wird von diesen aktiviert.<sup>563</sup> Aktiviertes Kindlin kann die Talin-vermittelte Integrinaktivierung verstärken und den ILK-Komplex an das „Integrin-Adhäsom“ lokalisieren.<sup>463,563</sup> Dabei handelt es sich um ein Multidomänprotein, welches  $\beta_1$ - und  $\beta_3$ -Integrine über den IPP-Komplex (ILK-PINCH-Parvin)<sup>564</sup> bzw. über ILK-Paxillin-Vinculin<sup>551,565,566</sup> mit Aktin verbinden kann. Es dient ebenfalls als Ausgangspunkt unterschiedlicher Signalwege.<sup>564,567,568</sup>

FAK bindet ebenfalls direkt an die  $\beta$ -Integrinkette.<sup>569</sup> FAK befindet sich unterhalb von Src-Kinasen<sup>570</sup> und Syk in der Signalkaskade, welche ebenfalls durch das Clustering assoziiert vorliegen.<sup>571</sup> Die Interaktion von FAK mit den Src-Kinasen resultiert in einer maximalen, gegenseitigen Aktivierung beider Kinasen.<sup>570,572</sup> Der FAK-Src-Komplex gilt als Schlüsselstelle für das *outside-in Signaling* und Ausgangspunkt vieler verschiedener Signalwege (siehe Legate et al. <sup>519</sup>). Unter anderem aktiviert der FAK-Src Komplex den PAK1-MEK1-MAPK<sup>527</sup>, den PI3K- AKT<sup>573</sup>, den Ras-MEK-MAPK<sup>572</sup>, Rac1<sup>574</sup> und den CAS-CRK-JNK-Signalweg<sup>575</sup>. FAK stellt auch einen möglichen Kontaktpunkt zwischen Integrin-vermittelter und Wachstumsfaktoren-vermittelter Signalgebung dar.<sup>576,577</sup> Die Wachstumsfaktor-vermittelte Signalgebung scheint die Integrin-Signalgebung zu verstärken.<sup>500,577</sup> Die Adhäsions-induzierten Signalwege über FAK, Syk sowie den ILK-Komplex führen zu Veränderungen in der Adhäsion<sup>513,553,578,579</sup>, der Migration<sup>553,578,580</sup>, im Zellzyklus<sup>581</sup>, der Proliferation<sup>534,535</sup>, im Zellüberleben<sup>532–534</sup>, in der Differenzierung<sup>533,536</sup>, der Phagozytose<sup>553,578</sup>, der ROS-Produktion<sup>553,578</sup> und/oder der Degranulation<sup>553,578</sup> in Abhängigkeit der Zellpopulation und der Integrine.

Syk scheint in  $\beta_2$ -Integrin-induzierter Signalgebung in Granulozyten eine fundamentale Rolle zu spielen.<sup>528,553,578</sup> Syk kann  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -Integrine über SH2-Domänen binden (unabhängig von Phosphotyrosin)<sup>553,582–584</sup> und ist in vielen wichtigen Integrin-vermittelten Funktionen (Adhäsion, Phagozytose, Migration, ROS-Produktion und Degranulation)<sup>553,578</sup> involviert. Syk verfügt ebenfalls über eine regulatorische Funktion. So zeigten Willeke et al.<sup>528</sup>, dass die Inhibierung von Syk in Fibrinogen- $\beta_2$ -Integrin-vermittelter Adhäsion zwar zu einer Runterregulation einer Vielzahl von Signalmolekülen, jedoch auch zu einer verstärkten Adhäsion

aufgrund einer verstärkten Clusterbildung führt. Dies deutet darauf hin, dass Syk das Clustering von  $\beta_2$ -Integrinen negativ reguliert, so die Avidität kontrolliert und den Bildungszyklus selbst beeinflussen kann.<sup>528</sup> Syk kann weiterhin Signalwege über PLC $\gamma$ <sup>510</sup> und RhoGDI2/RhoGTPasen<sup>585</sup> aktivieren.

Es wird davon ausgegangen, dass einige Proteine wie Syk und Src-Kinasen bereits in geringen Mengen mit der inaktiven, zytoplasmatischen Domäne der  $\beta$ -Kette assoziiert sind.<sup>528,559,582</sup> Nur durch die Integrinaktivierung und Clusterbildung wird die Assoziation verstärkt und die Aktivierung der Proteine erfolgt.<sup>528,559,582</sup> Andere Gruppen beschrieben die Notwendigkeit von Immunorezeptor-Tyrosin-basierten-Aktivierungs-Motiven (ITAMs) zur Aktivierung der Kinasen.<sup>554,586</sup> In diesem Modell phosphorylieren Src-Kinasen die ITAMs, an die Syk binden und weitere Signale induzieren kann.<sup>554</sup>

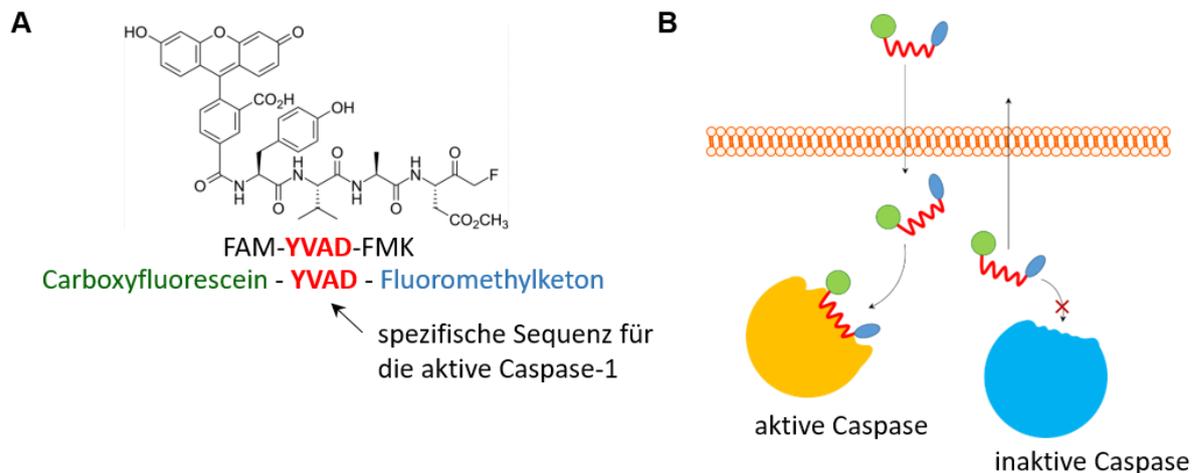
JAB-1 ist ein Co-Aktivatoren des c-Jun Transkriptionsfaktors und kann ebenfalls direkt an die  $\beta$ -Integrinkette binden.<sup>587</sup> Durch die PKC $\delta$  vermittelte Phosphorylierung der zytoplasmatischen Integrindomäne transloziert JAB-1 in den Zellkern und bindet dort JAB-1-abhängiges, phosphoryliertes c-jun.<sup>472,587</sup> Parallel kann über PKC $\delta$ -phosphoryliertes Cytohesin, ERK1/2 und Elr-1 c-Fos im Zellkern induziert werden.<sup>472,588</sup> Gemeinsam bilden c-Jun und c-Fos den AP-1 Transkriptionsfaktor<sup>588,589</sup>, welcher durch Adhäsion aktiviert wird.<sup>472,587</sup>

Viele der genannten Proteine verfügen über eine Vielzahl von Funktionen und wurden teilweise mit unterschiedlichen Lokalisationen beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich nur auf eine kleine Anzahl von Proteinen beschränkt. Es gibt zusätzlich noch eine Vielzahl weiterer regulatorischer Moleküle wie Filamin A<sup>590,591</sup>, RACK1<sup>592</sup>, Calpain-1<sup>593,594</sup>, c-Cbl<sup>595,596</sup>, GTPasen (Rac, Cdc42 und RhoA)<sup>597</sup>, die oft auch mehrere Proteine positiv bzw. negativ beeinflussen können.

#### **1.4 „Fluorescent labeled inhibitor of caspases“ (FLICA)**

Bei dem „*Fluorescent Labeled Inhibitor of CASpases*“ (FLICA) Assay handelt es sich um eine fluoreszenz-basierte Analyseverfahren zum direkten Nachweis aktiver Caspasen in lebenden Zellen.<sup>598–600</sup> Der Assay beruht auf einem spezifischen Peptid, welches nur das aktive Zentrum der zu untersuchenden Caspase kovalent bindet.<sup>598,599</sup> Somit werden keine Nebeneffekte wie bei herkömmlichen Nachweismethoden analysiert, sondern die aktive Caspase direkt nachgewiesen. Das Peptid-Fluoromethylketon (FMK) (Inhibitor) ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie Carboxyfluorescein (FAM) markiert (siehe Abbildung 12A).<sup>598,599,601</sup> Aufgrund des Fluoromethylketon ist der Komplex zellpermeabel<sup>598,599</sup> und bindet aufgrund der spezifischen Sequenz lediglich die aktive Form der Caspasen, während ungebundene Moleküle die Zelle wieder verlassen (siehe Abbildung 12B).<sup>601</sup> Aufgrund des Fluoreszenzfarbstoffes kann ein Nachweis mittels Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie erfolgen.<sup>598,601</sup> Im

Rahmen dieser Arbeit wurde FAM-YVAD-FMK verwendet, welches spezifisch aktive Caspase-1 nachweist.<sup>206,602</sup> Neben dem Caspase-1 Nachweis können ebenfalls Aussagen bezüglich Pyroptose getroffen werden.<sup>603,604</sup> Durch die zusätzliche Verwendung von Lebend-Tot-Farbstoffen kann zwischen lebenden Zellen, die zwar noch intakt sind, aber bereits über aktive Caspase-1 verfügen und pyroptotischen Zellen unterschieden werden. Nur in pyroptotischen Zellen, die bereits Poren in der Membran besitzen, kann der Lebend-Tot-Farbstoff eintreten und die Zelle färben.<sup>286</sup>



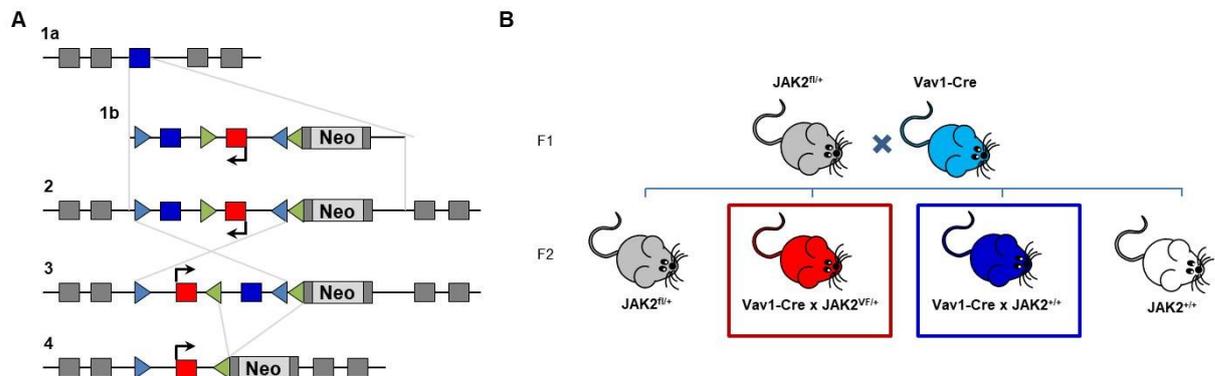
**Abbildung 12: “Fluorescent labeled inhibitor of caspases” (FLICA)-Assay. (A)** Aufbau des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten FAM-YVAD-FMK. Carboxyfluorescein (FAM) markiertes Peptid-Fluoromethylketon (Inhibitor) enthält die YVAD-Sequenz, welches spezifisch aktive Caspase-1 kovalent bindet. Über das Carboxyfluorescein kann eine direkte durchflusszytometrische Analyse der aktiven Caspase in der lebenden Zelle durchgeführt werden. **(B)** Schematische Darstellung des FLICA-Funktionsprinzips. Der FLICA-Komplex ist zellpermeabel und bindet nur aktive Caspase. Ungebundene Komplexe verlassen die Zelle wieder.

## 1.5 Charakterisierung des verwendeten Mausmodells

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das von Mullally et al. beschriebene MPN-Mausmodell verwendet.<sup>43</sup> Dabei handelt es sich um ein konditionales *Knockin*-Mausmodell auf C57BL/J6 Hintergrund, welches einer humanen PV entspricht.<sup>43,422</sup>

Durch das verwendete Cre-LoxP-System kann ein konditionales *Knockin* der JAK2-V617F-Mutation in allen hämatopoetischen Zellen sowie Endothelzellen realisiert werden. Dazu wurden Mäuse, die die LoxP-flankierte JAK2-V617F-Mutation in inverser Orientierung tragen, mit Vav1-Cre transgenen Mäusen gekreuzt (siehe Abbildung 13A). Dabei steht die Expression der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des Vav1 Promotors, wodurch es nur in hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen zur Expression der Rekombinase kommt. Durch die Kreuzung beider Genotypen kommt es zur Vav1-zellspezifischen Inversion des geflochtenen *Knockin* Allels (JAK2-V617F) und zum Ausschluss des Wildtyp-Exons. Die entstehenden heterozygoten Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse (JAK2<sup>VF/+</sup>) entwickeln zu 100 % eine letale MPN.<sup>43</sup>

Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäuse werden bei den Untersuchungen als Kontrolle verwendet (siehe Abbildung 13B).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der Rekombination der JAK2-V617F-Mutation und das Verpaarungsschema des verwendeten Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells. (A)** Geflochte Mäuse (fl) enthalten ein JAK2-WT Konstrukt (blau) in Leserichtung, sowie LoxP-Elemente und die JAK2-V617F-Mutation (rot) in inverser Orientierung (1-2). Durch die Kreuzung dieser Mäuse mit Vav-1-Cre Mäusen kommt es zu einer Cre-Expression unter dem Vav1-Promotor. Die Cre-Rekombinase erkennt die LoxP-Stellen und invertiert (2-3) das Konstrukt, sodass Die Mutation nun in Leserichtung ist und entfernt die WT-Sequenz. **(B)** Lediglich die rot markierten Mäuse entwickeln einen PV-ähnlichen Phänotyp und können für die Untersuchungen verwendet werden. Die blau markierten Mäuse exprimieren die Cre-Rekombinase, tragen aber keine JAK2-V617F-Mutation. Diese werden als Wildtyp-Kontrolle verwendet.

Das Mausmodell ist charakterisiert durch eine gesteigerte, extramedulläre Erythropoese in der Milz und einer Splenomegalie.<sup>43,123,124,422</sup> Diese wird unter anderem durch eine erythroide und milde megakaryozytäre Hyperplasie in der roten Pulpa der Milz verursacht,<sup>43</sup> welche zudem zu einer Veränderung der Milzarchitektur führt.<sup>43,123,124</sup> Des Weiteren ist eine gesteigerte Anzahl CD71<sup>+</sup> Ter119<sup>+</sup> erythroider Vorläuferzellen in der Milz und im Knochenmark vorhanden,<sup>43</sup> was ebenfalls zu einem erhöhten Hämatokrit führt.<sup>43,124,422</sup> Zudem weisen die Megakaryozyten im Knochenmark atypische Kernmerkmale auf, sowie eine vermehrte Emperipoese.<sup>43</sup> Eine gesteigerte Anzahl CD41<sup>+</sup>-positiver Zellen liegt ebenfalls im Knochenmark dieser Mäuse vor, während die Thrombozyten-Anzahl in diesem Mausmodell nicht verändert<sup>43</sup> oder sogar vermindert ist.<sup>124</sup> Die Leukozyten hingegen sind stark erhöht,<sup>43,124,422</sup> wobei das Verhältnis der Makrophagen- und Granulozyten-Zellzahl zur Gesamtzellzahl identisch bleibt.<sup>43</sup> Anders als bei anderen JAK2-V617F-Mausmodellen liegt keine Retikulin-fibrose vor.<sup>43</sup> Aufgrund des starken Phänotyps beträgt das durchschnittliche Überleben dieser Mäuse ca. 146 Tage.<sup>43</sup>

## 2 Zielstellung

Bei der Entstehung einer MPN<sup>107</sup>, sowie dem Fortschreiten der Erkrankung<sup>106,107,109,121</sup> wird der Inflammation eine bedeutende Rolle zugeschrieben. Die Ursache erhöhter pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF bei MPN ist jedoch noch wenig untersucht. Die häufigste Treibermutation ist die JAK2-V617F-Mutation.<sup>6-15</sup> Diese aktiviert aberrante Signalwege<sup>6,32</sup>, die unter anderem in dem Übergang der niedrig-affinen in die hoch-affine Konformation von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrinen und in einer erhöhten Bindung von hämatopoetischen Zellen an die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 resultieren.<sup>421,422</sup> Integrine sind in einer Vielzahl von immunologischen und inflammatorischen Prozessen beteiligt.<sup>365,366,605</sup> Über die Adhäsions-induzierte Regulation der Expression inflammatorischer Zytokine und die genauen Mechanismen ist jedoch bisher wenig bekannt.<sup>362,531,606-614</sup> Auf Grundlage der Literatur wurden folgende Hypothesen aufgestellt:

- 1) Neben Makrophagen und Monozyten sind hämatopoetische Progenitorzellen an der erhöhten IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Expression in JAK2-V617F-mutierten MPN beteiligt.
- 2) Die  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Überaktivierung der JAK2-V617F-mutierten Zellen induziert die Expression pro-inflammatorischer Zytokine auf mRNA- und Proteinebene nach Adhäsion an VCAM-1 und ICAM-1.
- 3) FAK und Syk sind bedeutende Signalmoleküle im *outside-in Signaling* der  $\beta_1/\beta_2$ -Integrine und sind an der Adhäsions-induzierten Zytokinexpression beteiligt.
- 4) Die  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Aktivierung ist an den signifikant erhöhten Zytokin- Serumkonzentrationen von IL-1 $\alpha$  im MPN-Mausmodell (Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup>) beteiligt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit standen folgende Ziele:

- 1) Charakterisierung der Expression der pro-inflammatorischen Schlüsselzytokine IL-1 $\alpha$  und pro-IL-1 $\beta$  sowie der aktiven Caspase-1 in einem Panel repräsentativer hämatopoetischer Zellpopulationen im Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> MPN-Mausmodell.
- 2) Charakterisierung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine (insbesondere IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) auf mRNA und Proteinebene nach  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-vermittelter Bindung an die Adhäsionsmoleküle VCAM-1/ICAM-1. Dafür sollte ein repräsentatives Panel hämatopoetischer Zellpopulationen aus dem MPN-Mausmodell sowie ein MPN-Zellkulturmodell (32D JAK2/EPOR Zellen) untersucht werden.
- 3) Typisierung der zugrundeliegenden Signal-Mechanismen im 32D JAK2/EPOR Zellkultur-Modell.
- 4) *In vivo* Testung einer anti- $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Behandlung (Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> MPN-Mausmodell), um die Bedeutung der Integrinüberaktivierung auf die hochregulierten Serumspiegel inflammatorischer Zytokine zu charakterisieren.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

Alle verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Herkunft der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Kat-Nr.
0,9 % NaCl-Lösung	Fresenius	1312813
<i>Albumin fraction V (BSA)</i>	Roth	8076.4
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth	9592.3
Aqua	B. Braun	0082479E
Asparaginsäure	Roth	1690.2
Bio-Rad <i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bradford-Reagenz)</i>	BioRad	500-0006
Bromphenol Blau	Roth	A512.1
Cell-Tak	Corning™	10317081
Chlorophorm	Roth	3313.1
Complete	Sigma	11697498001
EGTA	Roth	3054.2
BD Pharm Lyse™ <i>Lysing Buffer (Erythrozytenlyse)</i>	BD Bioscience	555899
Ethanol	Fischar	27669
Ethanol	Chemsolute	2246.1000
<i>Fixation/Permeabilization Solution Kit</i>	BD Bioscience	554714
Fetales Kälberserum (FKS)	gibco	10270-106
Formaldehydlösung (4%)	Fischar	27279
Glycin	Roth	3908.2
Hank's <i>Balanced Salt Solution (HBSS)</i>	gibco	14175-053
HEPES	Roth	HN77.5
Hoechst 33342	ImmunoChemistry Technologies	639
ICAM-1 (rekombinant, Maus)	Leinco Technologies	I-587
Isopropanol	Roth	7343.1
L-Glutamin	gibco	25030-024
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich	L2880-10MG
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth	0261.1
Methanol	Roth	CP43.3
Milchpulver	Roth	T145.3
NaCl	Roth	3957.1
Natriumfluorid (NaF)	Roth	P756.1
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Roth	HN01.3
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Aldrich	450243-10G
Natriumpyruvat	Life Technologies	11360-039
Nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies	11140-035
<i>PageRuler - Prestained Protein Ladder</i>	Thermo Scientific	26616
Penicilin/ Streptomycin (Pen/Strep)	Life Technologies	15070063
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	gibco	14190-094
PhosSTOP™	Sigma Aldrich	4906837001
Pierce ECL ( <i>HRP Substrate Peroxide Solution + HRP Substrate Luminol Reagent</i> )	Millipore	WBKLS0500
Plasmocin	Invivogen	ant-mpp
Rotiphorese Gel 30 (37,5:1) (Acrylamid)	Roth	3029.1
RPMI 1640	gibco	21875091

Chemikalie	Hersteller	Kat-Nr.
Schwefelsäure (2N)	Roth	X873.1
SDS	Serva	20765.03
Streptavidin <i>Particles Plus</i> - DM	BD Bioscience	557812
TEMED	Roth	2367,3
Tris	Serva	37180.05
Triton® X100	Serva	39795.01
Trizol® Reagent	ambion®	15596018
Trypanblau	Sigma Aldrich	T8154
Tween®20	Serva	39796.01
<i>UltraPure™ Distilled water</i> (RNase-freies Wasser)	Invitrogen	10977-035
VCAM-1 (rekombinant, Maus)	Leinco Technologies	V125
β-Mecaptoethanol	Sigma Aldrich	60-24-2

Für die genauere Charakterisierung der untersuchten zellulären Mechanismen wurden unterschiedliche Aktivatoren benötigt und verschiedene Inhibitoren untersucht. Diese sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

**Tabelle 3: Verwendete Inhibitoren und Aktivatoren**

Inhibitor/ Aktivator	Hersteller	Kat-Nr.
Actinomycin D	Merck	A9415-2MG
Adenosin-5'-triphosphat Dinatriumsalz Hydrat (ATP)	Sigma Aldrich	A6419-1g
Hydroxyurea	Sigma	H8627-1G
Rekombinanter IL-1RA	Biolegend	769704
JSH-23	Selleckchem	S7351
Nigericin	AdipoGen	AG-CN2-0020-M005
Piceatannol	Selleckchem	S3026
PP2	Selleckchem	S7008
R406	Selleckchem	S2194
Ruxolitinib	Selleckchem	S1378
Saracatinib	Selleckchem	S1006
Wortmannin	Selleckchem	S2758
Y15	Selleckchem	S5321

Die verwendeten Test Kits zum Nachweis aktiver Caspase-1, IL-1 Expression, für die reverse Transkription, die qPCR und zur Isolation von DNA sowie RNA sind der Tabelle 4 zu entnehmen.

**Tabelle 4: Verwendete Testkits**

Kit	Hersteller	Kat-Nr.
FAM-FLICA(R) Caspase-1 Assay Kit	ImmunoChemistry Technologies	ICT-97
<i>High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems™ (ThermoFisher Scientific)	4368814
<i>IL-1 alpha Mouse Uncoated ELISA Kit with Plates</i>	Invitrogen	88-5019-22
<i>IL-1 beta Mouse Uncoated ELISA Kit with Plates</i>	Invitrogen	88-7013-22
<i>PowerUp™ SYBERTM Green Master Mix</i>	Applied Biosystems™ (ThermoFisher Scientific)	A25742
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen	51104
Rneasy Mini Kit	Qiagen	74104

Weiterhin verwendete Materialien sind in Tabelle 5 erfasst. Pipetten unterschiedlicher Volumina wurden von der Firma Eppendorf verwendet.

**Tabelle 5: Herkunft der verwendeten Materialien**

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Kat.-No.</b>
<b>3kDa Amicon Ultra-0,5 Zentrifugen-Filtereinheit</b>	Merck	UFC500396
<b>24 Well Zellkulturplatte</b>	VWR	734-0067
<b>96 Well Mikrotiterplatten für Tecan</b>	Roth	9293.1
<b>96 Well Mikrotiterplatten steril</b>	VWR	735-2099
<b>96 w. PCR plate, semi-skirted</b>	BRAND	781376
<b>Amersham™ Protran™ 0,45 µm NC</b>	GE Healthcare Life Science	10600007
<b>Amersham™ Protran™ 0,2 µm NC</b>	cytiva	1060094
<b>BD IMag™ Streptavidin Particles Plus - DM</b>	BD Bioscience	557812
<b>Cell Strainer 70 µm Nylon</b>	FALCON	352350
<b>CELLSTAR® TUBES 15 ml</b>	Greiner bio-one	188271
<b>CELLSTAR® TUBES 50 ml</b>	Greiner bio-one	227261
<b>Culture-Insert 2 Well in µ-Dish 35<sup>mm</sup></b>	ibidi®	81176
<b>Deckgläser für Zählkammer</b>	Roth	L189.1
<b>epT.I.P.S.® Standard 50-1000 µl</b>	Eppendorf	0030 000.919
<b>epT.I.P.S.® Standard/Bulk 0,1-10 µl</b>	Eppendorf	0030 000.811
<b>epT.I.P.S.® Standard/Bulk 2-200 µl</b>	Eppendorf	0030 000.870
<b>FACS Röhrchen ohne Deckel</b>	VWR	734-0000
<b>Glas Pasteur Pipetten (230mm)</b>	BRAND	747720
<b>Magnetührstäbchen</b>	Roth	XA17.1
<b>Micro blood collection tubes</b>	Thermo Fisher Scientific	02-668-10
<b>Micro-Magnetührstäbchen</b>	Roth	PK76.1
<b>Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell, 4-gel, for 1.0 mm thick handcast gels, with Mini Trans-Blot® Module</b>	BioRad	1658035FC
<b>Mörser + Pistille</b>	Roth	XL97.1
<b>Neubauer-Zählkammer</b>	Marienfeld Germany	1036091
<b>Pipettenspitzen farblos 1250 µl</b>	Biozym	721031
<b>Reaktionsgefäß 1,5 ml</b>	Eppendorf	0030 120.086
<b>Reaktionsgefäß 2,0 ml</b>	Eppendorf	0030 120.094
<b>Reaktionsgefäß 0,5 ml</b>	SARSTEDT	72.704
<b>Serologische Pipetten 10,0 ml</b>	Costar®	4488
<b>Serologische Pipetten 25,0 ml</b>	Costar®	4489
<b>Serologische Pipetten 5,0 ml</b>	FALCON	357543
<b>Texwipe Wischtücher</b>	VWR	115-0469
<b>Whatman™</b>	GE Healthcare Life Science	10427812
<b>Zentrifugationseinheit ROTI®Spin, MINI-3</b>	CL12.1	CL12.1

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 6 aufgelistet und die zugehörige Software ist in Tabelle 7 dokumentiert.

**Tabelle 6: Herkunft der verwendeten Geräte**

Gerät	Hersteller
Blutschrank	Binder
Chemilumineszenz-Detektionsgerät	Peqlab Biotechnologie GmbH (VWR)
Cytek® Northern Lights™	Cytek®
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC21	Vacuubrand
Heizblock - Digitaler Blockheizer HX-1	Peqlab Biotechnologie GmbH (VWR)
Heraeus FRESCO 17 Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Multifuge 3SR+ Zentrifuge	Thermo Scientific
Heraeus Multifuge X3R Zentrifuge	Thermo Scientific
MACSiMAG™ Separator	Biotec
Magnetrührer - Color Squid	IKA
Nanodrop	Analytik Jena
neoMag® Magnetrührer ohne Heizung	neoLab®
peqSTAR	VWR Peqlab
Photometer - Sunrise™	TECAN
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	BioRad
QuantStudio3 Real-Time-PCR-System	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
Sterilbank - Maxisafe 2020	Thermo Scientific
Vortexer	VWR
Waage	KERN®
BD FACS Canto II	BD Biosciences

**Tabelle 7: Verwendete Software**

Software	Gerät	Hersteller
BD FACSDiva 8.0.1	BD FACS Canto II	BD Bioscience
FlowJo™ 10.10.0	BD FACS Canto II, Cytek® Northern Lights™	BD Bioscience
Fusion 15.18	Chemilumineszenz-Detektionsgerät	Peqlab Biotechnologie GmbH (VWR)
GSEA v4.3.2	-	Broad Institut
ImageJ	-	Wayne Rasband
Magellan	Sunrise™ Photometer	TECAN
GraphPad Prism 7.04	-	GraphPad Software
QuantStudio™ v1.5.2	QuantStudio3 Real-Time-PCR-System	Applied Biosystems™ (Thermo Fisher Scientific)
SpectroFlo® 3.0.3	Cytek® Northern Lights™	Cytek®

Die Zusammensetzung der Standardlösungen und Puffer sind in Tabelle 8 gemäß der durchgeführten Methode erfasst. Die Herkunft der dabei eingesetzten Chemikalien ist Tabelle 2 zu entnehmen.

**Tabelle 8: Zusammensetzung von Standardlösungen und Puffer**

Zellkultur	
<b>Zusätze</b>	
PBS	200 ml
β-Mercaptoethanol	35 µl
HEPES-Puffer (1 M; pH7,2)	100 ml
Natriumpyrovat (100 mM)	100 ml
L-Glutamin (200 mM)	100 ml
Nichtessentielle Aminosäuren	60 ml
Asparaginsäure	20 ml
<b>RPMI+ (Standard)</b>	
RPMI-Medium	500 ml
FKS	50 ml
Pen/Strep	5 ml
Plasmocin	100 µl
Zusätze	29 ml
<b>Starvationmedium (0,5 %FKS)</b>	
RPMI-Medium	500 ml
FKS	2,5 ml
PenStrep	5 ml
Plasmocin	100 µl
Zusätze	29 ml
Zelllyse	
<b>Komplettierter Lyse-Puffer A (WB)</b>	
Japan-Lyse-Puffer	1,0 ml
Complete	40 µl
NaF	10 µl
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1 µl
<b>Japan-Lyse-Puffer (WB)</b>	
HEPES-Puffer	50 nM
Glycerin	10 %
NaCl	150 nM
Triton X100	1 %
MgCl <sub>2</sub>	1,5 nM
EGTA	5 nM
ddH <sub>2</sub> O	
<b>Komplettierter Lyse-Puffer B (WB NFκB)</b>	
HEPES-Puffer	10 mM (pH7,9)
KCL	10 mM
EDTA	0,1 mM
Complete	40 µl
NP40	40 µl
<b>Komplettierter Lyse-Puffer C (WB NFκB)</b>	
HEPES-Puffer	20 mM (pH7,9)
NaCl	0,4 M
Glycerin	10 %
EDTA	1 mM
Complete	40 µl
<b>Lyse-Puffer (ELISA)</b>	
PBS	
Triton-X-100	1 %
Complete	1 %

SDS-PAGE		
<b>Trenngel,</b>	<b>4x 10 %</b>	<b>2x 12 %</b>
ddH <sub>2</sub> O	13,6 ml	3,3 ml
Acrylamid	13,2 ml	4 ml
Tris (1,5 M; pH8,8)	10 ml	2,5 ml
10 % SDS	400 µl	100 µl
10 % APS	400 µl	100 µl
TEMED	40 µl	10 µl
<b>Sammelgel</b>		
ddH <sub>2</sub> O	6,8 ml	
Acrylamid	1660 µl	
Tris 1,5 M pH8,8	1260 µl	
10 % SDS	100 µl	
10 % APS	100 µl	
TEMED	10 µl	
<b>10x SDS-Laufpuffer</b>		
Tris	60,5 g	
Glycin	288 g	
SDS	20 g	
dH <sub>2</sub> O	2 l	
<b>1x SDS-Laufpuffer</b>		
10x SDS-Laufpuffer	100 ml	
dH <sub>2</sub> O	900 ml	
<b>4x SDS-Probenpuffer</b>		
Tris	6,25 ml	
Glycerin	25 ml	
SDS	2 g	
β-Mercaptoethanol	10 ml	
Bromphenol Blau	wenig	
<b>2x SDS-Probenpuffer</b>		
Urea	4 M	
SDS	2 %	
Tris	62,5 mM	

Western-Blot (WB)		
<b>10x WB-Transferpuffer</b>		
Tris	32 g	
Glycin	144 g	
dH <sub>2</sub> O	1 l	
<b>1x WB-Transferpuffer</b>		
10x WB-Transferpuffer	100 ml	
dH <sub>2</sub> O	800 ml	
Methanol	200 ml	
<b>10x TBS-Puffer</b>		
Tris (1 M)	100 ml	
NaCl (5 M)	300 ml	
Tween®20	5 ml	

<b>Stripping-Puffer</b>	
Tris HCL	62,5 mM
SDS	2%
β-Mercaptoethanol	0,7 %
<b>Blockierungslösung</b>	
Milchpulver	5 %
TBS-Puffer (1x)	

Im Folgenden sind die verwendeten *InVivo*MAb Antikörper für die anti-inflammatorische anti-Integrin-Behandlung (siehe Tabelle 9) und die biotinylierten Antikörper für die Granulozyten-Isolation (siehe Tabelle 10), die Lin<sup>-</sup> Zell-Isolation (siehe Tabelle 11) sowie die B-Zell-Isolation (siehe Tabelle 12) aufgelistet.

**Tabelle 9: Verwendete Antikörper zur *in vivo* und *in vitro* anti-Integrin-Behandlung**

Antikörper	Klon	Isotyp	Hersteller	Kat-Nr.
<b>Anti-VLA4-Antikörper (β1-Integrin)</b>	PS/2	Ratte IgG2b κ	BioXCell	BE0071
<b>IgG-Isotyp-Kontrolle (für anti-VLA4)</b>	LTF-2	Ratte IgG2b κ	BioXCell	BE0090
<b>Anti-CD18-Antikörper (β2-Integrin)</b>	GAME-46	Ratte IgG1 κ	BD Pharmingen™	555280
<b>IgG-Isotyp-Kontrolle (für anti-CD18)</b>	R3-34	Ratte IgG1 κ	BD Pharmingen™	553921

**Tabelle 10: Biotinylierte Antikörper für die Negativselektion von Knochenmark-Granulozyten mittels magnetischer Streptavidin-Partikel (MACS)**

Oberflächenmolekül	Klon	Hersteller	Kat-Nr.
<b>CD5</b>	5.3-7.3	BioLegend	100604
<b>B220</b>	RA3-6B2	BioLegend	103204
<b>CD49b</b>	HMa2	ebioscience	13-0491-85
<b>ckit</b>	2B8	BioLegend	105803
<b>F4/80</b>	BM8	BioLegend	123105
<b>Ter119</b>	Ter119	BioLegend	116204

**Tabelle 11: Biotinylierte Antikörper für die Negativselektion von Lin<sup>-</sup> Zellen aus dem Knochenmark mittels magnetischer Streptavidin-Partikel (MACS)**

Oberflächenmolekül	Klon	Hersteller	Kat-Nr.
<b>Gr1</b>	RB-8C5	BioLegend	108404
<b>B220</b>	RA3-6B2	BioLegend	103204
<b>CD11b (Mac1)</b>	M1/70	BioLegend	101204
<b>CD3</b>	17A2	BioLegend	100244
<b>CD4</b>	GK1.5	BioLegend	100404
<b>CD5</b>	5.3-7.3	BioLegend	100604
<b>CD8</b>	53-6.7	BioLegend	100704
<b>Ter119</b>	Ter119	BioLegend	116204
<b>CD127 (IL-7Rα)</b>	A7R34	BioLegend	135006

**Tabelle 12: Biotinylierte Antikörper für die Negativselektion von B-Zellen aus der Milz mittels magnetischer Streptavidin-Partikel**

Oberflächenmolekül	Klon	Hersteller	Kat-Nr.
CD3	17A2	BioLegend	100244
CD4	GK1.5	BioLegend	100404
CD8	53-6.7	BioLegend	100704
Gr1	RB-8C5	BioLegend	108404
ckit	2B8	BioLegend	105803
F4/80	BM8	BioLegend	123105
Ter119	Ter119	BioLegend	116204

Die Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper für durchflusszytometrische Analyse sind der Tabelle 13 zu entnehmen.

**Tabelle 13: Spezifische Antikörper zur Färbung von Oberflächenstrukturen und intrazellulärer Zytokine für die Analyse im Durchflusszytometer (DFZ). (Dil = Verdünnung)**

	Struktur	Klon	Fluoreszenzfarbstoff	Dil	Hersteller	Kat-Nr.
<b>Oberflächenfärbung</b>	CD3	17A2	Pacific Blue	1:100	Biolegend	100214
	CD3	17A2	PE	1:100	Biolegend	100205
	CD9	MZ3	PerCP-Cy5.5	1:25	Biolegend	124817
	CD11b	M1/70	PerCP	1:100	Biolegend	101229
	CD16/32	93	APC-Cy7	1:100	Biolegend	101327
	CD16/32	93	BV510	1:100	Biolegend	101333
	CD19	6D5	FITC	1:100	Biolegend	115506
	CD19	6D5	BV711	1:100	Biolegend	115555
	CD34	MEC14.7	Pe-Dazzle	1:33	Biolegend	119329
	CD41	MWRReg30	BV421	1:100	Biolegend	133912
	c-kit (CD117)	2B8	PerCP	1:33	Biolegend	105821
	SLAM (CD150)	TC15-12F12.2	PE-Cy7	1:100	Biolegend	115913
	Ly-6A/E (Sca-1)	D7	Alexa Fluor® 700	1:50	Biolegend	108141
	Ly6-C	HK1.4	BV421	1:100	Biolegend	128032
	Ly6-G	1AS	BV510	1:100	Biolegend	127633
	F4/80	BM8	PE-Cy7	1:100	Biolegend	123113
	Ter119	TER-119	AF700	1:100	Biolegend	116220
	<i>lineage cocktail</i>	17A2; RB6-8C5; RA3-6B2; Ter-119; M1/70;	Pacific Blue	1:5	Biolegend	133310
	<b>Intrazellulär Färbung</b>	IL-1 $\alpha$	ALF-161	PE	1:100	Biolegend
IL-1 $\beta$ (pro-Form)		NJTEN3	FITC	1:100	Invitrogen	11-7114-82
Armenian Hamster IgG Isotyp-Kontrolle (IL-1 $\alpha$ )		HTK888	PE	1:100	Biolegend	400907
FITC Rat IgG1k Isotyp-Kontrolle (pro-IL-1 $\beta$ )		RTK2071	FITC	1:100	Biolegend	400406

Abschließend sind alle verwendeten Antikörper zum Nachweis spezifischer Signalmoleküle mittels Western-Blot und deren Phosphorylierungszustand in Tabelle 14 zusammengefasst.

**Tabelle 14: Verwendete Western-Blot-Antikörper**

Antikörper	Epitop	Größe in kDa	Ursprungsorganismus	Verdünnung	Hersteller	Kat-Nr.
<b>Primärantikörper</b>						
anti-pFAK (Tyr397)	Tyr397	125	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	9330T
Anti-pFAK (Tyr577)	Tyr577	125	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	9330T
anti-FAK	Gesamtprotein	125	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	9330T
anti-pSTAT3	Ser727	79, 86	Maus	1:500	Cell Signaling	9134S
anti-STAT3	Peptid um AS Gln692	79, 86	Maus	1:500	Cell Signaling	9139S
anti-pSyk	Tyr519/520	72	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	2710S
anti-Syk	N-terminus	72	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	1235S
anti-pSrc (Tyr192)	Tyr192	58	Kaninchen	1:1000	LS Bio	LS-C199194
anti-pSrc (Tyr192)	Tyr192	58	Kaninchen	1:1000	LS Bio	LS-C199194
anti-pSrc (Tyr416)	Tyr416	60	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	6943S
anti-pSrc (Tyr505)	Tyr505	56	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	2751S
anti-Hck	Met22-Asp80 Hck	59	Ratte	1:500	R&D	MAB3915
anti-Lyn	N-terminus	56	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	2796T
anti-pNFkB	Ser536	65	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	3033
anti-NFkB	Peptid um Glu498	65	Kaninchen	1:500	Cell Signaling	8242

Antikörper	Epitop	Größe in kDa	Ursprungsorganismus	Verdünnung	Hersteller	Kat-Nr.
anti-pAKT	Ser473	60	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9271
anti-pERK	Thr202/204	42, 44	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	4370S
anti-ERK	C-terminus	42, 44	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9102S
anti-pp38	Tyr180/182	43	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	4631S
anti-p38	Gesamtprotein	43	Kaninchen	1:1000	Cell Signaling	9212S
anti-NLRP3	aa 1-93	120	Maus	1:1000	Adipogen	AG-20B-0014
anti-ASC	N-termin	25	Kaninchen	1:1000	Adipogen	AG-25B-0006
anti-Caspase-1	Gesamtprotein	50, 20	Maus	1:1000	Adipogen	AG-20B-0042
anti-IL-1 $\beta$	pro-IL-1 $\beta$ , reifes IL-1 $\beta$	17, 31	Kaninchen	1:250	Abcam	ab283818
anti-GAPDH	Gesamtprotein	36	Maus	1:2500	Meridian Life Science	H86504M
<b>Sekundärantikörper</b>						
anti-Maus-IgG $\kappa$ -HRP	IgG $\kappa$	-	rekombinant	1:2000 (für GAPDH 1:4000)	Santa Cruz	sc2005
anti-Kaninchen-IgG-HRP	IgG	-	Ziege	1:2000	Cell Signaling	7074S
anti-Ratte	IgG	-	Kaninchen	1:2000	Invitrogen	A18915

Für den Nachweis von  $\beta_1$ -Integrin-Cluster wurden die folgenden Antikörper (Tabelle 15) sowie ein Zeiss Axiovert 200m Mikroskop mit den in Tabelle 16 zusammengefassten Ausstattung verwendet.

**Tabelle 15: Verwendete Antikörper für die Fluoreszenzmikroskopie**

Struktur	Klon	Fluoreszenz-farbstoff	Dil	Hersteller	Kat-Nr.
<b>CD29</b>	HMβ1-1	AlexaFluor488®	10 µg/ml	Biologend	102211
<b>Hamster IgG</b>	polyklonal	AlexaFluor488®	1:200	Jackson ImmunoResearch Europe Ltd	127-545-160

**Tabelle 16: Charakterisierung des verwendeten Fluoreszenzmikroskopie-Systems**

Gerät	Name	Hersteller
<b>Mikroskop</b>	Zeiss Axiovert 200m	Carl Zeiss
<b>Lichtquelle</b>	Zeiss Colibri2	Carl Zeiss
<b>Strukturierte Beleuchtung</b>	Zeiss Apotome2	Carl Zeiss
<b>Filtersatz (FS)</b>	FS62 HE EGFP ET Filterset (AHF) F49-470 470/40 ET Bandpass 1 Stk F48-495 Strahlenteiler T 495 LPXR 1 Stk F47-525 525/50 ET Bandpass 1 Stk	Carl Zeiss
<b>Kamera</b>	AxioCam MRM	Carl Zeiss
<b>Kreuztisch</b>	motorischer Märzhäuser Kreuztisch	Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG
<b>Objektiv</b>	Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil	Carl Zeiss
<b>Software</b>	AxioVision 4.8 CellProfiler 4.2.1	Carl Zeiss Broad Institute

Die für die qPCR verwendeten Primerpaare sind in der Tabelle 17 zusammengefasst und wurden von Eurofins hergestellt. Die Ausgangskonzentration der Primer beträgt 10 pmol/µl.

**Tabelle 17: Verwendete Primer in der qPCR zum Nachweis inflammatorischer Zytokin mRNA in murinen Zellen.** Die Orientierung der Primer ist mit FW (vorwärts) und RW (rückwärts) gekennzeichnet.

Gen	Orientierung	Primer-Sequenz
<i>Il1a</i>	FW	5'-TCTCAGATTCACAACACTGTTTCGTG-3'
	RW	5'-AGAAAATGAGGTCGGTCTCACTA-3'
<i>Il1b</i>	FW	5'-TTGACGGACCCCAAAGATG-3'
	RW	5'-AGAAGGTGCTCATGTCCTCA-3'
<i>Il6</i>	FW	5'-CTGCAAGAGACTTCCATCCAG-3'
	RW	5'-AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG-3'
<i>Tnf</i>	FW	5'-GGTGCCTATGTCTCAGCCTCTT-3'
	RW	5'-GCCATAGAAGTATGATGAGAGGGAG-3'
<i>Cxcl10</i>	FW	5'-AGTGCTGCCGTCATTTTCTG-3'
	RW	5'-ATTCTCACTGGCCCGTCAT-3'
<i>Hprt</i>	FW	5'-GGACAGGACTGAAAGACTTG-3'
	RW	5'-CGTTGACTGATCATTACAGTAGC-3'

## 3.2 Verwendete Modelle

### 3.2.1 Vav1-Cre-JAK2 Mausmodell

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das konstitutionelle Vav1-Cre x JAK2-V617F *Knockin* Mausmodell verwendet (näher charakterisiert unter 1.5). Für die Untersuchungen wurden heterozygote Vav1-Cre-JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse verwendet und Vav1-Cre-JAK2<sup>+/+</sup> Mäuse wurden als Kontrolle untersucht.

Alle Tierexperimente wurden im Rahmen des Tierversuchsantrages „KHAE/G/01-1417/16“ und des „Rahmencuzuchtantrages 2-1726“ durchgeführt und von der Landesbehörde Sachsen-Anhalt genehmigt. Die Experimente wurden von geschultem Personal durchgeführt. Die Milz sowie Ilium, Femur, Fibula und Tibia wurden den getöteten Mäusen entnommen, Knochenmarkzellen isoliert und untersucht.

#### 3.2.1.1 Zellisolation aus der Milz

Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde die Milz durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) gedrückt. Das Zellsieb wurde anschließend mit 20 ml PBS +1 % FKS gespült. Die Zellen wurden 5 min bei 1.400 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Erythrozytenlyse erfolgte mittels 5 ml BD Pharm Lyse™ *Lysing Buffer*. Die Zellen wurden bei 1.400 rpm 5 min zentrifugiert und mit einem weiteren Waschschrift mit 10 ml PBS +1 % FKS (1.400 rpm 5 min) wurde die Lyse abgestoppt. Die Zellsuspension wurde erneut gefiltert, um Zellaggregate zu entfernen. Die zentrifugierten Zellen (1.400 rpm, 5 min) wurden in Starvationmedium (0,5 % FKS) aufgenommen. Abschließend wurden die lebenden Zellen in einer Neubauerzählkammer in einer geeigneten Verdünnung in Trypanblau gezählt.

#### 3.2.1.2 Zellisolation aus dem Knochenmark

Für die Zellisolation aus dem Knochenmark wurde verbliebenes Gewebe von Ilium, Femur, Fibula und Tibia vollständig entfernt. Die gereinigten Knochen wurden in 10 ml PBS + 1 % FKS in einem Mörser vollständig zerdrückt. Die vorhandenen Knochenfragmente und Partikel wurden durch ein Zellsieb (Porengröße 70 µm) entfernt. Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 1.400 rpm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in 5 ml Erythrozytenlyse aufgenommen. Nach einem Zentrifugationsschritt (1.400 rpm 5 min) wurden die Zellen mit 10 ml PBS +1 % FKS gewaschen, erneut gefiltert und in Starvationmedium bzw. RPMI+ (10 % FKS) aufgenommen. Es erfolgte eine Zellzahlbestimmung.

#### 3.2.1.3 Isolation spezifischer Zellpopulationen

Die Isolation ausgewählter Zellpopulationen erfolgte über eine negative Selektion mittels magnetischer Zellseparation (MACS) über magnetische Streptavidin-Partikel (BD IMag™

Streptavidin *Particles Plus* – DM). Dazu wurden die isolierten Knochenmarkzellen bzw. Milzzellen mit biotinylierten Antikörpern (gemäß Tabelle 10 -Tabelle 12) inkubiert. Diese binden charakteristische Oberflächenmoleküle aller Zellpopulationen mit Ausnahme der im Fokus stehenden B-Zellen (aus der Milz) bzw. Granulozyten oder Lin- Zellen (aus dem Knochenmark). *Lineage negative* (Lin-) Zellen stellen dabei die Gesamtheit der hämatopoetischen Progenitor- und Stammzellen dar und umfassen alle Zellen, die negative sind für die Differenzierungsmarker CD3, CD45R/B220, CD11b, Ly6C/Ly6G und Ter119.

Die Antikörper wurden in einer 1:250 Verdünnung und einem Gesamtvolumen von 1,0 ml eingesetzt. Die Antikörperinkubation erfolgte für 45 min bei 4 °C unter ständiger Durchmischung. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS +1 % FKS gewaschen. Die Streptavidin-Partikel (150 µl) wurden in 5 ml PBS +1 % FKS aufgenommen und die magnetische Separation erfolgte mittels MACSiMAG™ Separator. Die Streptavidin-Partikel wurden anschließend mit den markierten Zellen in einem Volumen von 6,0 ml für weitere 45 min bei 4 °C und kontinuierlicher Durchmischung inkubiert. Zwischen dem Biotin der bereits gebundenen Antikörper und dem Streptavidin der magnetischen Streptavidin-Partikel entsteht eine kovalente Bindung, welche eine Separation der mit Antikörper markierten Zellen ermöglicht. Um die Effizienz der Isolation zu erhöhen und alle unerwünschten Zellen zu entfernen, wurden Zellen dreimal für 6 min auf dem MACSiMAG™ Separator inkubiert und die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Abschließend wurden die verbliebenen Zellen zentrifugiert, in 1 ml Starvationmedium (0,5 % FKS) aufgenommen, in einer Neubauerzählkammer in einer geeigneten Verdünnung in Trypanblau gezählt und einer Reinheitsfärbung zugeführt (siehe Tabelle 23).

### **3.2.2 32D JAK2-WT/EPOR und JAK2-V617F/EPOR Zellen als Zellkulturmodell**

Weiterhin wurden 32D Zellen für mechanistische Untersuchungen verwendet. Dabei handelt es sich um murine, myeloische, wachstumsfaktor-abhängige Vorläuferzellen, die stabil mit JAK2-WT bzw. JAK2-V617F (JAK2-VF) sowie Erythropoetin-Rezeptor (EPOR) transfiziert wurden. Die Zellen werden in RPMI+ Medium (siehe Tabelle 8) kultiviert. Die JAK2-WT Zellen benötigen zusätzlich 11.E. EPO/ ml Medium. Die Zellen wurden aller drei Tage passagiert, wenn sie nicht für ein Experiment benötigt wurden.

### 3.3 Western-Blot Analysen

#### 3.3.1 Zellstimulation für die Untersuchung der Integrin *outside-in* Signalgebung

Eine 24-Well-Suspensions-Zellkulturplatte wurde einen Tag vor dem Experiment mit 3 µg/ml murinem, rekombinantem VCAM-1 (mVCAM-1) und ICAM-1 (mICAM-1) in 200 µl PBS beschichtet. Als unstimulierte Kontrolle wurde 1 % BSA verwendet (unspezifische Bindung). Die Platten wurden über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

32D JAK2-WT/EPOR und JAK2-VF/EPOR Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend in Starvationmedium (0,5 % FKS) aufgenommen. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen /ml eingestellt und für 2 h *gestarved*.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden vorsichtig auf die beschichtete Platte überführt. Die Platte wurde kurz an zentrifugiert, sodass die Zellen sich am Boden der Platte befinden. Die Zellen wurden für 15 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Für alle Experimente wurden Triplikate angefertigt (falls nicht anders gekennzeichnet).

##### 3.3.1.1 Konzentrationsoptimierung untersuchter Inhibitoren

Um die Beteiligung unterschiedlicher Signalmoleküle in dem Adhäsions-induziertem *Signaling* zu testen, wurden verschiedene Signalmolekülinhibitoren untersucht. Zur Optimierung der verwendeten Inhibitor-Konzentration, wurden alle Inhibitoren in 3 verschiedenen Konzentrationen bezüglich ihrer Wirkung auf die Adhäsions-induzierte *outside-in* Signalgebung untersucht. Dafür wurden die 32D JAK2-WT/EPOR und JAK2-VF/EPOR Zellen für 15 min mit 3 verschiedenen Inhibitor-Konzentrationen (siehe Tabelle 18) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> prä-inkubiert, bevor sie für weiter 15 min wie unter 3.3.1 beschrieben auf der beschichteten Platte inkubiert wurden.

**Tabelle 18: Optimierung der verwendeten Inhibitor-Konzentrationen**

	Inhibitor	Zielmolekül	Konzentration			Ausgewählte Konzentration für weitere Experimente
			1	2	3	
1	<b>Wortmannin</b>	PI3K	10 nM	50 nM	100 nM	50 nM
2	<b>Piceatannol</b>	Syk	30 µM	60µM	90 µM	30 µM
3	<b>Y15</b>	FAK	5 µM	25 µM	50 µM	25 µM
4	<b>JSH-23</b>	NFκB	10 µM	50 µM	100 µM	50 µM
5	<b>PP2</b>	Src-Kinasen	1 µM	5 µM	10 µM	5 µM
6	<b>Saracatinib</b>	Src-Kinasen	0,1 µM	0,5 µM	1 µM	0,5 µM
7	<b>R406</b>	Syk	40 nM	80 nM	400 nM	400 nM

Anhand der hemmenden Wirkung der Inhibitoren wurden die in Tabelle 18 definierten Konzentrationen der Inhibitoren für weitere Experimente festgelegt.

### 3.3.1.2 Überprüfung der Liganden-Spezifität

Um zu überprüfen, ob eine  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin spezifische *outside-in* Signalgebung nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 vorliegt, wurde der Einfluss von anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$  Antikörpern auf die Signalgebung untersucht. Die 32D JAK2-WT/EPOR und JAK2-VF/EPOR Zellen wurden für 10 min mit Fc-Block auf Eis und anschließend mit 15 min mit 5  $\mu\text{g/ml}$  anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$  Antikörpern bzw. der zugehörigen IgG-Isotyp-Kontrolle (siehe Tabelle 9, Tabelle 19) bei 37 °C (5 %  $\text{CO}_2$ ) prä-inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für weiter 15 min wie unter 3.3.1 beschrieben auf der beschichteten Zellkulturplatte inkubiert.

**Tabelle 19: Antikörperbehandlung zur Untersuchung der Liganden-Spezifität**

	<b>Probe</b>	<b>Stimulanz</b>	<b>Adhäsion an</b>
1	unstimuliert	-	1 % BSA
2	Adhäsion	-	3 $\mu\text{g/ml}$ mVCAM-1/ICAM-1
3	Adhäsion + anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ Antikörper	je 5 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper - anti- $\alpha_4\beta_1$ (VLA4) - anti- $\beta_2$ (CD18)	3 $\mu\text{g/ml}$ mVCAM-1/ICAM-1
4	Adhäsion + IgG-Kontrolle	je 5 $\mu\text{g/ml}$ Antikörper - Isotyp Kontrollen	3 $\mu\text{g/ml}$ mVCAM-1/ICAM-1

### 3.3.1.3 Unterschiede in der Liganden-abhängigen Signalaktivierung

Um mögliche Unterschiede in der Signalgebung nach  $\beta_1$ -VCAM-1 bzw.  $\beta_2$ -ICAM-1 Interaktion zu untersuchen, wurden die beiden Liganden in separaten *Wells* einer 24-*Well*-Suspensions-Zellkulturplatte beschichtet. Die Zellen wurden, wie unter 3.3.1 beschrieben, prozessiert und auf der gemäß Tabelle 20 beschichteten Zellkulturplatte 15 min bei 37 °C inkubiert.

**Tabelle 20: Plattenbeschichtung zur Untersuchung Liganden-abhängiger Signalaktivierung**

	<b>Probe</b>	<b>Beschichtung</b>
1	unstimuliert	1 % BSA
2	Adhäsion (mVCAM-1 + mICAM-1)	3 $\mu\text{g/ml}$ mVCAM-1/ICAM-1
3	Adhäsion an mVCAM-1	3 $\mu\text{g/ml}$ mVCAM-1
4	Adhäsion an mICAM-1	3 $\mu\text{g/ml}$ mICAM-1

### 3.3.2 Herstellung von Zelllysaten für Western-Blot Analysen

Nach der Stimulation wurden die Überstände der Zellen vorsichtig abgenommen und in vorgekühlte Reaktionsgefäße mit 1 ml kaltem PBS überführt. Der Zellkulturüberstand wurde bei 1.800 rpm für 5 min 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Währenddessen wurden die adhärenen Zellen direkt in der Zellkulturplatte lysiert. Dafür wurden je *Well* 200  $\mu\text{l}$

des komplettierten Lyse-Puffers A (siehe Tabelle 8) direkt auf die adhärenen Zellen gegeben und durch Resuspension von der Zellkulturplatte abgelöst. Die Zellyse wurde mit den Zellen des Zellkulturüberstandes vereinigt und über Nacht bei -80 °C lysiert. Abschließend wurden die Zellen bei 13.300 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt oder bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

### **3.3.3 Herstellung von Zelllysaten für Western-Blot Analysen spezifisch für den separaten NFκB-Nachweis im Zytoplasma und im Zellkern**

Nach der Stimulation wurden die Überstände der Zellen vorsichtig abgenommen und in vorgekühlte Reaktionsgefäße mit 1 ml kaltem PBS überführt. Der Zellkulturüberstand wurde bei 1.800 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Währenddessen wurden die adhärenen Zellen direkt in der Zellkulturplatte lysiert. Dafür wurden je *Well* 200 µl des komplettierten Lyse-Puffers B (siehe Tabelle 8) direkt auf die adhärenen Zellen gegeben und durch Resuspension von der Zellkulturplatte abgelöst. Die Zellyse wurde mit den Zellen des Zellkulturüberstandes vereinigt und 10 min auf Eis lysiert. Abschließend wurden die Zellen kurz gevortext und anschließend bei 12.500 rpm für 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand entspricht der zytosolischen Fraktion der lysierten Zellen und wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt sowie bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Das Pellet, bestehend aus Zellkernen und Zelldebris, wurde viermal mit 1 ml komplettierten Lyse-Puffers B (siehe Tabelle 8) gewaschen (13.300 rpm 5 min 4 °C) und der Überstand verworfen. Das verbleibende Pellet wurde in 30 µl des komplettierten Lyse-Puffers C (siehe Tabelle 8) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer abschließenden Zentrifugation bei 13.300 rpm für 5 min bei 4 °C wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entspricht dem Kernextrakt. Bis zum weiteren Gebrauch wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

### **3.3.4 Konzentrationsbestimmung nach Bradford**

Für eine gleichmäßige und vergleichbare Sodiumdodecylsulfat- Polyacryl-amid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein einheitlicher Probenauftrag notwendig. Um dies zu ermöglichen, wurden eine Proteinbestimmung mittels Bradford-Assay (Bio-Rad *Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Als Standardkurve wurde BSA (0 – 1,75 ng/ml) verwendet. Alle Proben wurden in einer Doppelbestimmung analysiert. Der Farbumschlag wurde mittels Photometer Sunrise™ bei 595 nm Absorptionswellenlänge und der Magellan-Software gemessen und die enthaltene Proteinkonzentration sowie das benötigte Probenvolumen entsprechend der Standardkurve berechnet.

### 3.3.5 SDS-PAGE

Die Proben wurden auf eine Proteinmenge von 30 µg in einem Auftragsvolumen von 30-50 µl mittels Probenlaufpuffer (4x, 2x) eingestellt. Die Denaturierung erfolgte für 5 min bei 95 °C. Es wurden 10 % ige SDS-Gele entsprechend der Zusammensetzung in Tabelle 8 gemäß dem diskontinuierlichen Lämmli-System mit Trenn- und Sammelgel gegossen. Für den Nachweis von reifem IL-1 wurden 12 %-ige SDS-Gele verwendet.

Für die SDS-PAGE wurde das Mini-PROTEAN Tetra Cell Gelelektrophorese-System der Firma BioRad mit 1x SDS-Laufpuffer verwendet. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wurde ein Proteinmarker (*PageRuler*) mitgeführt. Es wurde eine Spannung von 80 V für 25 min und anschließend 100 V für ca. 1:30 h angelegt. Mit Erreichen der Proteinlauffront am unteren Gelrand wurde die Spannung abgestellt und das SDS-Gel dem Proteintransfer (Western-Blot) zugeführt.

### 3.3.6 Western-Blot

Um die enthaltenen Proteine spezifisch nachweisen zu können, müssen diese auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen werden. Dies erfolgte in einer Western-Blot-Apparatur für Nass-*Blotting* (Mini Trans-Blot® Module). Es wurde 1x WB-Transferpuffer verwendet und kontinuierlich gekühlt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte bei 100 V für 90 min bzw. 30 min für den IL-1-Nachweis.

Um mehrere Proteine gleichzeitig untersuchen zu können, wurde die Membran entsprechend der Proteingrößen geschnitten. Alle unspezifischen Bindungen wurden mit 5 % Milch in TBS-Waschpuffer für 1 h bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Die Membranen wurden dreimal für 5 min mit TBS-Waschpuffer gewaschen und über Nacht in ihren entsprechenden primären Antikörpern zum Nachweis der phosphorylierten Proteine inkubiert. Die Antikörperinkubation erfolgte bei 4 °C unter ständiger Bewegung. Die verwendeten Antikörper sind der Tabelle 14 zu entnehmen. Am folgenden Tag wurden die Membranen erneut mit TBS-Waschpuffer gewaschen (dreimal 5 min) und anschließend mit dem entsprechenden Meerrettich-peroxidase-gekoppelten (HRP) Sekundär-Antikörper für 1 h bei RT unter ständiger Bewegung inkubiert. Die ungebundenen Antikörper wurden durch einen weiteren Waschschrift entfernt. Abschließend wurden die Membranen mit Pierce ECL Substrat für 1 min im Dunklen inkubiert und mittels Chemilumineszenz-Detektionsgerät entwickelt. Um ebenfalls die entsprechenden Gesamtproteinmengen nachzuweisen, wurden die gebundenen Antikörper über das Stripping-Verfahren (50 °C, 10 min, Strippingpuffer) abgelöst und unspezifische Bindungen an die Membranen erneut mit 5 % Milch blockiert. Die Membranen wurden über Nacht bei 4 °C mit den primären Antikörpern, die das Gesamtprotein detektieren, inkubiert. Alle anschließenden Schritte erfolgten wie bei dem Nachweis phosphorylierter Proteine (siehe oben; Sekundär-

Antikörper, ECL-Entwicklung). Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Die Signalverhältnisse zwischen dem phosphorylierten Protein und dem Gesamtprotein wurden unter Zuhilfenahme der Software ImageJ ermittelt und sind als p/t Ratio dargestellt.

### 3.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

#### 3.4.1 Herstellung von Zelllysaten und Zellkulturüberständen für ELISA

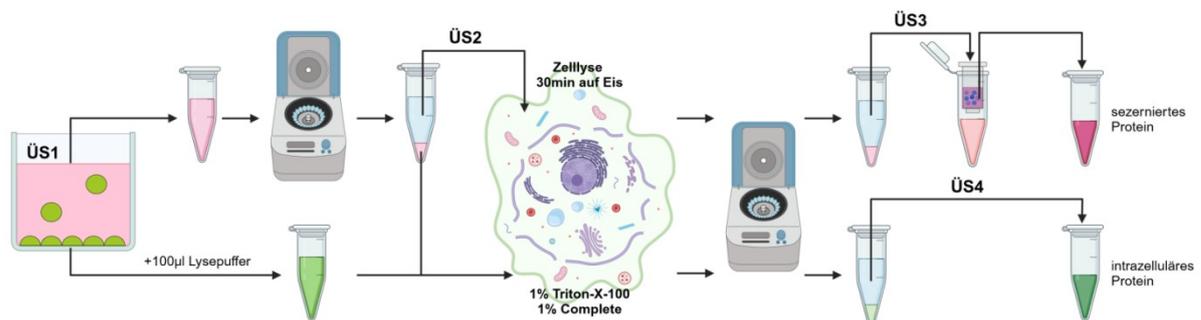
Für die Untersuchung von exprimiertem IL-1 auf Proteinebene wurden isolierte primäre Zellen oder 32D JAK2-WT/EPOR und JAK2-VF/EPOR Zellen verwendet. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 1 ml RPMI+ Medium auf die zuvor beschichteten 24-Well Suspensionsplatten gegeben, anzenrifugiert und insgesamt für 6 h inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Die zusätzlich hinzugefügten Stimulanzen sind der Tabelle 21 zu entnehmen. ATP wurde erst 1 h vor Ablauf der Inkubationszeit hinzugefügt und frisch gelöst. Alle weiteren Stimuli wurden direkt zu Beginn der Inkubation hinzugefügt.

**Tabelle 21: Zusätzliche Stimulanzen für die Generierung von ELISA-Proben**

	Bedingung	Stimulation	Beschichtung
<b>Primäre Zellen</b>			
1	Unstimuliert	-	1 % BSA
2	Adhäsion	-	3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1
3	Adhäsion + ATP	3mM ATP	3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1
4	Adhäsion + LPS	100 ng/ml LPS	3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1
5	LPS	100 ng/ml LPS	1 % BSA
6	LPS + ATP	100 ng/ml LPS + 3mM ATP	1 % BSA
7	Adhäsion + LPS + ATP	100 ng/ml LPS + 3mM ATP	3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1
<b>Zellkultur</b>			
1	Unstimuliert	DMSO	1 % BSA
2	Adhäsion	DMSO	3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1
3	Adhäsion + PP2	5 µM PP2	3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1
4	Adhäsion + Y15	25 µM Y15	3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1
5	Adhäsion + PP2 + Y15	5 µM PP2 + 25 µM Y15	3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1

Die ELISA-Proben-Ernte ist schematisch in Abbildung 14 dargestellt. Nach der Stimulation wurden die Überstände der Zellen vorsichtig abgenommen und in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt. Der Zellkulturüberstand wurde bei 1.800 rpm für 5 min 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Währenddessen wurden die adhärenen Zellen direkt in der Platte lysiert. Dafür wurden je Well 200 µl PBS +1 % Triton-X-100 +1 % Complete für den IL-1 $\alpha$  bzw. 100 µl für den IL-1 $\beta$  ELISA direkt auf die Zellen gegeben und durch Resuspenspendieren von der Platte abgelöst. Die Zelllysate wurde mit den Zellen des Zellkulturüberstandes gepoolt und 30 min auf Eis lysiert. Abschließend wurden die Zellen bei 13.300 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C bis zum weiteren Gebrauch gelagert.

Die Überstände des Zellkulturüberstandes wurden ebenfalls bei 13.300 rpm für 10 min zentrifugiert, um alle verbliebenen Zellen zu entfernen. Es erfolgte ebenfalls die Zugabe von 1 % Triton-X-100 und 1 % Complete, um EV zu lysieren und proteolytischen Abbau des IL-1 zu verhindern. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Überstände 10 min bei 13.300 rpm zentrifugiert. Der nun entstandene Überstand wurden direkt oder vor der Testung im ELISA mittels Zentrifugenröhrchen (3kDa Amicon Ultra-0,5 Zentrifugen-Filtereinheit, bzw. Zentrifugationseinheiten ROTI®Spin, MINI-3) auf 100 µl eingengt. Die so generierten Überstände wurden für die Untersuchung von sezerniertem IL-1 in den Zellkulturüberstand verwendet.



**Abbildung 14: Schematische Darstellung der ELISA-Proben-Ernte.** Der Zellkulturüberstand (ÜS1) wird vorsichtig abgenommen und zentrifugiert. Der Überstand ÜS2 wird mit Triton-X und Complete versetzt, um mögliche extrazelluläre Vesikel zu lysieren und zum Schutz vor proteolytischen Abbau. Adhärente Zellen wurden gemeinsam mit den Zellen des ÜS1 ebenfalls lysiert. Die Lyse erfolgte für 30 min auf Eis. Nach einer anschließenden Zentrifugation wurde das Volumen des ÜS3 reduziert, bevor dieser zum Nachweis von sezerniertem IL-1 verwendet wurde. Der ÜS4 diente dem Nachweis von intrazellulärem IL-1. (ÜS = Überstand)

### 3.4.2 Durchführung

Der anti-IL-1 $\alpha$  (*IL-1 alpha Mouse Uncoated ELISA Kit with Plates*) und der anti-IL-1 $\beta$  ELISA (*IL-1 beta Mouse Uncoated ELISA Kit with Plates*) wurden gemäß Herstellerangaben durchgeführt. Um maximale Sensitivität zu erreichen, erfolgte die Probeninkubation (100 µl) jedoch über Nacht bei 4 °C. Die enthaltenen Konzentrationen wurden anhand der mitgeführten Standardkurve berechnet. Beide ELISA erkennen gemäß persönlicher Kommunikation mit dem Hersteller die reife Form von IL-1 $\alpha$  bzw. IL-1 $\beta$ .

### 3.5 Durchflusszytometrie

Der Nachweis spezifischer Oberflächenmarker oder intrazellulärer Zytokine im Durchflusszytometer erfolgt mittels Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern (siehe Tabelle 13).

Zur Kompensation bzw. für das *Unmixing* der unterschiedlichen Fluoreszenzsignale wurden Einzelfärbungen angefertigt. Zur Berechnung der spezifischen mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) wurden die entsprechenden IgG-Isotyp-Färbungen (siehe Tabelle 13) erstellt bzw. die Zellen vor der Antikörperfärbung mit 2 µl Fc-Block (TruStain FcX™ PLUS) für 10 min auf Eis

inkubiert. Ungefärbte Zellen wurden zur Einstellung der Laserintensität und des SSC und FSC des Durchflusszytometers verwendet.

### 3.5.1 Oberflächenfärbung zur Identifizierung verschiedener Zellpopulationen

Ausgewählte Oberflächenmarker zur Identifizierung unterschiedlicher Zellpopulationen wurden gemäß Tabelle 13 für 15 min bei RT gefärbt. Überschüssiger Antikörper wurde durch einen Waschschrift mit PBS +1 % FKS (1.400 rpm für 5 min) entfernt. Die Zellen wurden gemäß ihrer Oberflächenmarker (Tabelle 22) analysiert.

**Tabelle 22: Identifikation verschiedener Zellpopulationen anhand ihrer Oberflächenmarker-expression**

	Zellpopulation	Marker
1	B-Zellen	CD19+, CD3-
2	T-Zellen	CD19-, CD3+
3	Granulozyten	CD19-, CD3-, CD11b+, Ly6C <sup>low</sup> , Ly6G <sup>high</sup>
4	Monozyten	CD19-, CD3-, CD11b+, Ly6C <sup>high</sup> , Ly6G-
5	Makrophagen	CD19-, CD3-, CD11b+, F4/80+
6	Erythrozyten	Ter119+
7	Lin <sup>-</sup> Zellen	Lin-
8	CD41 <sup>+</sup> Zellen	CD41+
9	LK-Zellen	Lin-, ckit+, Sca-1-
10	MEP	Lin-, ckit+, Sca-1-, FcγR-, CD34-
11	CMP	Lin-, ckit+, Sca-1-, FcγR-, CD34+
12	GMP	Lin-, ckit+, Sca-1-, FcγR+, CD34+
13	MKP	Lin-, ckit+, Sca-1-, FcγR-, CD150+, CD9+
14	LSK	Lin-, ckit+, Sca-1+

### 3.5.2 Reinheitsfärbung

Um die Reinheit der isolierten Zellpopulationen zu bestimmen, wurde ebenfalls eine Oberflächenfärbung gemäß Tabelle 23 durchgeführt. Es wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 100 µl PBS + 1 % FKS gefärbt. Alle Antikörper wurden 1:100 eingesetzt und 15 min bei RT inkubiert.

**Tabelle 23: Verwendete Antikörper zur Reinheitsfärbung isolierter Zellpopulationen**

	Granulozyten	Lin <sup>-</sup> Zellen	B-Zellen
1	anti-CD11b-PerCP	anti-Lin FITC	anti-CD3-APC-Cy7
2	anti-Ly6C-BV421	anti-ckit-APC-Cy7	anti-CD19-FITC
3	anti-Ly6G-BV510	anti-Sca-1-PerCP	anti-B220-APC

Alle ungebundenen Antikörper wurden durch einen Waschschrift mit PBS +1 % FKS (1.400 rpm für 5 min) entfernt. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer gemessen und anschließend anhand der Markereexpression analysiert.

### **3.5.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung**

Für die anschließende Färbung von intrazellulären Zytokinen wurden die Zellen mittels Cytofix/Cytoperm des „Fixations/Permeabilizations Solution Kits“ von BD Bioscience für 20 min bei 4 °C zunächst permeabilisiert, sowie die Oberfläche der Zellen fixiert. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle Waschschriffe mit dem im Kit enthaltenen PermWash-Waschpuffer (1:10). Die Antikörperinkubation zum Nachweis der spezifischen intrazellulären Zytokine oder der entsprechenden IgG Isotyp-Kontrollen erfolgte für 30 min bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen erneut mit PermWash (1:10) gewaschen und ungebundene Antikörper entfernt. Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die gefärbten Zellen in 150 µl PermWash (1:10) aufgenommen. Aufgrund eines Gerätewechsels wurden die reifen Zellen mittels BD FACSCanto II und die Vorläuferzellen mittels Cytek® Northern Lights™ analysiert. Die MFI-Werte der IgG-Isotyp-Kontrolle wurde von den MFI-Werten der spezifischen Antikörper subtrahiert und wird als spezifischer MFI dargestellt.

### **3.5.4 Oberflächenfärbung von IL-1α**

Um zu überprüfen, ob Adhäsion eine Translokation von IL-1α an die Oberfläche induziert, wurden 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen 24 h auf immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS +1 % FKS gewaschen, mit 2 µl Fc-Block für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend mit anti-IL-1α-PE für 15 min gefärbt. Die Zellen wurden gewaschen, in 200 µl PBS + 1% FKS aufgenommen und im Durchflusszytometer (Cytek® Northern Lights™) analysiert.

### **3.6 „Fluorescent labeled inhibitor of caspases“ (FLICA) Assay**

Zum Nachweis aktiver Caspase-1 wurde ein „*Fluorescent Labeled Inhibitor of CAspases*“ (FLICA) Assay verwendet (siehe 1.4). Dabei wurde FAM-YVAD-FMK, welcher spezifisch für aktive Caspase-1 ist, verwendet. In primären Knochenmarkzellen wurde der FLICA Assay als Screening-Assay verwendet und das Herstellerprotokoll geringfügig abgewandelt. Es wurden 500.000 Zellen in 1 ml RPMI+ für 3 h auf immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 (3 µg/ml) oder BSA (1 %) als Negativ-Kontrolle inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 100 ng/ml LPS und 5 µM Nigericin verwendet. Die FLICA-Sonde wurde von Beginn der Inkubation an in einer finalen Verdünnung von 1:50 des 30x FLICA Stocks zu den Zellen hinzugefügt. Alle 30 min erfolgte eine Durchmischung. Nach 3 h Inkubation wurden die Zellen mit 2 ml Apoptose-Waschpuffer (1:10) für 10 min bei 1400 rpm gewaschen. Zwischen dem 1. und 2. Waschschrift erfolgt die Oberflächenfärbung zur Bestimmung einzelner Zellpopulationen (siehe 3.5.1). Zur

Bestimmung der basalen Menge aktiver Caspase-1 in frisch isolierten Zellen wurde FLICA (1:50) zu den Zellen hinzugefügt und nach 1 h Inkubation bereits gewaschen, sowie die Zellen gemäß ihren Oberflächenmarkern angefärbt und analysiert. Abschließend wurden alle Zellen mittels Durchflusszytometrie (Cytex® Northern Lights™) analysiert.

In Zellkultur-Experimenten wurden 100.000 32D JAK2-WT/EPOR bzw. 32D JAK2-VF/EPOR Zellen in 300 µl RPMI+ eingesetzt. Auf Grund des geringen Volumens wurden 48-Well Platten verwendet. Die Zellen wurden für 6 h auf immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 oder 1 % BSA als Negativkontrolle inkubiert. Als Positivkontrolle wurde 100 ng/ml LPS und 5 µM Nigericin verwendet. Eine Stunde vor Ablauf der Zeit wurde FLICA (FAM-YVAD-FMK) 1:100 hinzugefügt. Um eine gleichmäßige Verteilung des FLICA zu gewährleisten, erfolgte aller 15 min eine vorsichtige Durchmischung. Vorexperimente zeigten, dass eine finale Verdünnung von 1:100 des 30x FLICA weiterhin zu einer klaren Separierung FLICA positiver und negativer Zellen führt.

Im Anschluss wurden die Zellen mit 2 ml im Kit enthaltenen Apoptose-Waschpuffer (1:10) geerntet und für 10 min bei 1400 rpm gewaschen. Es erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 1 ml Apoptose-Waschpuffer. Abschließend wurden 100 µl Apoptose-Waschpuffer den Zellen hinzugefügt, sowie die Zellen mit SYTOX™ Blue (1:3000) gefärbt, bevor sie mittels Durchflusszytometrie (Cytex® Northern Lights™) analysiert wurden. Die zusätzliche Färbung mit SYTOX™ Blue ermöglicht eine zusätzliche Differenzierung zwischen pyroptischen und lebenden Zellen, die aktive Caspase-1 besitzen.

### 3.7 Integrin-Cluster-Analysen

Für den Nachweis von Adhäsions-induzierter Clusterbildung von  $\beta_1$ -Integrinen wurden *Culture-Insert 2 Well* in  $\mu$ -Dishes<sup>35mm</sup> mit 70 µl 3µg/ml mVCAM-1/mICAM-1 über Nacht bei 4°C beschichtet. Als unspezifische Kontrolle wurden die *Wells* mit Cell-Tak für 45 min bei RT beschichtet. Dafür wurden 10 µl mit 105 µg/ml Cell-Tak in Aqua (B.Braun) eingesetzt und mit 20 µl 1 M NaHCO<sub>3</sub> überschichtet. Nach der Inkubation wurden die *Wells* zweifach mit 100 µl Aqua (B.Braun) gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen wurden mit PBS gewaschen (800 rpm 5 min; 1.400 rpm 5 min) auf 1 x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in Starvationmedium (0,5 % FKS) eingestellt und für 2 h bei 37 °C gestarved. Anschließend wurden die Zellen mit 0,6 µg/ml Hoechst 33342 für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach einem Waschschrift (1.400 rpm 5 min) wurden 30.000 Zellen / 70 µl auf beiden Beschichtungen ausgesät. Die Zellen wurden für 15 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend mittels Formaldehyd für 20 min bei RT fixiert. Dafür wurden 2 ml Formaldehyd in die  $\mu$ -Dishes gegeben und die *Culture-Insert 2 Wells* vorsichtig entnommen. Anschließend wurde das Formaldehyd entfernt und die  $\mu$ -Dishes dreifach mit PBS gewaschen.

Für die anti- $\beta_1$ -Integrin (CD29)-Färbung wurden die fixierten Zellen mit 200  $\mu$ l PBS + 10 % FKS mit 10  $\mu$ g/ml anti-CD29-AlexaFluor488® Antikörper (siehe Tabelle 15) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreifachem Waschen mit 1 ml PBS erfolgte eine zusätzliche Sekundärfärbung mit 1:200 anti-Hamster-AlexaFluor488® in 200  $\mu$ l PBS + 10 % FKS für 3 h bei RT. Abschließend wurden die fixierten Zellen erneut gewaschen und mittels Mountainmedium mit einem Deckglas versehen.

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde von Dr. rer. nat. Sönke Weinert (Klinik für Kardiologie und Angiologie, OVGU Magdeburg) mittels Zeiss Axiovert 200m (siehe Tabelle 16) und einer 63x Vergrößerung durchgeführt und unter Zuhilfenahme von der CellProfiler 4.2.1 Software ausgewertet.

Die relevante Bildebene des aufgenommenen Z-Stabes aller Bildausschnitte wurde anhand des Hintergrundes und des Fluoreszenzsignales ausgewählt und diese Bildebene als Einzelbild extrahiert. Mittels CellProfiler 4.2.1 wurden die Signale zur Identifikation der Zellen gegenüber Färbeartefakten mit einem Gaussfilter unscharf gerechnet (geblurtes Signal). Die Zellen wurden anhand eines Schwellenwerts und eines Größenfilters für den Durchmesser von 85-350 Pixel (dies entspricht ca. 8,5-35  $\mu$ m) identifiziert und eine Form-basierte Signal-trennung zur Teilung von miteinander verschmolzenen benachbarten Zellen durchgeführt. Die Zellen, die den Bildrand berühren oder bei denen die Zellsegmentierung fehlerhaft war, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Anschließend wurde das Fluoreszenzsignal der anti- $\beta_1$ -Integrin-Färbung am Originalbild über einen Schwellenwert identifiziert und ein „*declumping*“ durchgeführt (Cluster-Signal). Dies ermöglicht die Trennung der einzelnen Signale und das Filtern der detektierten Cluster nach deren Größe. Die Signale der identifizierten Zellen („geblurte„ Signale) wurden mit dem Cluster-Signal in Verbindung gesetzt. Dadurch konnten alle Artefakte, die sich außerhalb der Zelle befanden, von der Analyse ausgeschlossen werden. Es ermöglicht zudem die Analyse der Anzahl der Cluster pro Zelle und deren Intensitäten. Weitere analytische Parameter, wie die Fläche der Zellen in Pixel wurden ebenfalls ermittelt und ausgegeben.

## **3.8 RNA-Analysen**

### **3.8.1 Generierung der qPCR-Proben von isolierten primären Zellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells**

Um einen Einfluss der Adhäsion auf die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine zu untersuchen, wurden primäre Zellen gemäß 3.2.1.3 isoliert, auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und für 2 h in Starvationmedium (0,5 % FCS) gestarved. Die Zellen wurden anschließend auf mVCAM-1/ICAM-1 (3  $\mu$ g/ml) bzw. BSA (1 %) beschichtete 24-Well-Suspensions-Zellkulturplatte gegeben, kurz an zentrifugiert und für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 1 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 1 ml HBSS gewaschen. Der Zellkulturüberstand und der HBSS-Puffer wurden gemeinsam bei 1.800 rpm für 5 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die adhärenen Zellen in 1 ml Trizol lysiert und mit dem Zellpellet des Zellkulturüberstandes vereinigt. Im Anschluss wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **3.8.2 Generierung der qPCR-Proben von 32D JAK2/EPOR Zellen**

Um den Einfluss einer Interaktion mit immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1 auf die enthaltenen pro-inflammatorischen mRNA-Level näher zu untersuchen, wurden 32D JAK2-WT/EPOR und JAK2-VF/EPOR Zellen auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und ruhten für 1 h ohne Zugabe von EPO. Die Zellen wurden anschließend auf mVCAM-1/ICAM-1 (3 µg/ml) bzw. BSA (1 %) beschichteten 24-Well-Suspensions-Zellkulturplatten gegeben, kurz anzentrifugiert und für 3 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 3 h Inkubation wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 1 ml HBSS gewaschen. Der Zellkulturüberstand und der HBSS-Puffer wurden vereinigt und bei 1.800 rpm für 5 min zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden die adhärenen Zellen in 1 ml Trizol lysiert und mit dem Zellpellet des Zellkulturüberstandes vereinigt. Im Anschluss wurden die Proben bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

#### **3.8.2.1 Untersuchung unterschiedlicher Signalmoleküle und deren Rolle in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression**

Um die Beteiligung unterschiedlicher Signalmoleküle in der Adhäsions-vermittelten mRNA Zytokine Expression zu analysieren, wurden die Zellen mit verschiedenen Inhibitoren mit den in Tabelle 18 ausgewählten Konzentrationen für 15 min prä-inkubiert, bevor sie 3 h auf der beschichteten Zellkulturplatte inkubiert wurden (wie unter 3.8.2 beschrieben).

#### **3.8.2.2 Untersuchung zur mRNA-Stabilität und mRNA-Neusynthese**

Um zu überprüfen, ob erhöhte mRNA-Level nach Adhäsion aus neu generierter mRNA oder aus veränderter mRNA-Stabilität resultieren, wurde die Zellen mit 5 µg/ml Actinomycin D (ActD) inkubiert. Es wurde ein Zeitverlauf erstellt und Actinomycin D nach definierten Zeitpunkten vor Ablauf der 3 h Inkubationszeit hinzugefügt (siehe grüne Markierung in Tabelle 24). Die Zellernte erfolgte nach 3 h Gesamtinkubation, wie in 3.8.2 beschrieben.

**Tabelle 24: Experimentelles Zeitverlaufsschema zur Inhibierung der RNA-Neusynthese mittels Actinomycin D (ActD)**

		Zugabe von 5 µg/ml Actinomycin D	Beschichtung
1	unstimuliert	-	1 % BSA
2	Adhäsion	-	3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1
3	Adhäsion + 30 min 5µg/ml ActD		30 min 3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1
4	Adhäsion + 60 min 5µg/ml ActD		60 min 3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1
5	Adhäsion + 180 min 5µg/ml ActD	180 min	3 µg/ml mVCAM-1/ICAM-1

### 3.8.3 RNA-Isolation

Die in Trizol lysierten Proben wurden aufgetaut und 5 min bei RT inkubiert. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl Chlorophorm und energisches Schütteln. Zum Absetzen wurden die Proben 2-3 min ruhen gelassen, bevor sie für 12.000g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert wurden. Die entstandene wässrige Phase enthält die RNA und wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch die Zugabe von 500 µl Isopropanol (kalt) wurde die RNA für 10 min bei RT gefällt. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation (15 min, 12.000g, 4 °C) verworfen und das Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen (5 min, 12.000g, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen. Das verbliebene Ethanol verdunstete für 15 min bei RT. Abschließend wurde das RNA-Pellet in 20 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und für 5 min bei 56 °C gelöst.

Die RNA-Isolation, die reverse Transkription und die qPCR wurden freundlicherweise von Corinna Fahldieck durchgeführt.

### 3.8.4 RNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung mittels Nanodrop

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit wurde ein Nanodrop (Analytik Jena) gemäß Herstellerangaben verwendet. Für RNA-Sequenzierung war eine Reinheit (A260/280) von 1,8-2,2 sowie mindestens 500 ng notwendig.

### 3.8.5 Reverse Transkription

Die isolierte RNA musste zunächst durch eine reverse Transkription in cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mittels „*High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*“ von AppliedBiosystems™. 1 µg der isolierten RNA wurde in 10 µl für 5 min bei 65 °C prä-inkubiert und anschließend mit dem Reverse-Transkriptase-Masternix (siehe Tabelle 25) vereinigt.

**Tabelle 25: Zusammensetzung des Reverse-Transkriptase-Master-Mixes**

	Reagenz	Volumen pro Probe
1	10x-Reverse-Transkriptase Puffer	2 µl
2	25x dNTP (je 100µM)	0,8 µl
3	10xRandom-Nonamer (100µM)	2 µl
4	RT (50U/µl)	1 µl
5	H <sub>2</sub> O	4,2 µl
6	1µg RNA	10 µl
<b>Gesamtvolumen pro Probe:</b>		<b>20 µl</b>

Im Thermocycler (peqSTAR) wurde eine 4-Schrittprogramm mit 10 min 25 °C, 60 min 37 °C, 5 min 85°C und abschließend 4 °C durchgeführt. Die entstandene cDNA wurde einer qPCR zugeführt oder bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 3.8.6 Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Für die qPCR wurde das QuantStudio 3 Real-Time-PCR-System (AppliedBiosystems™) und die dazugehörige QuantStudio™ Software verwendet. Für die Realtime-PCR wurden 2 µl der cDNA, 10 µl des „PowerUp™ SYBERTM Green“ Master Mixes (AppliedBiosystems™) und jeweils 0,4 µl des entsprechenden vorwärts und rückwärts Primer in insgesamt 20 µl eingesetzt. Die verwendeten Primerpaare für murines *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnf* und *Cxcl10* sind Tabelle 17 zu entnehmen. Als *Housekeeping* Gen wurde HPRT verwendet. Das PCR-Programm erfolgte gemäß Tabelle 26.

**Tabelle 26: qPCR-Programm zum Nachweis pro-inflammatorischer Zytokin-mRNA-Expression in murinen Zellen**

	Temperatur	Zeit	Wiederholungen
1	95 °C	10 min	1x
2	95 °C	5 sec	40 Zyklen
3	60 °C	20 sec	
4	72 °C	15 sec	
5	72 °C	10 min	
6	8 °C	∞	∞

Anhand der ermittelten CT-Werte wurden die enthaltenen mRNA-Level mittels  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode in den untersuchten Proben bestimmt und werden als *fold change* bezogen auf die unstimulierte Kontrolle dargestellt (falls nicht anders gekennzeichnet).

Die RNA-Isolation, die reverse Transkription und die qPCR wurden freundlicherweise von Corinna Fahldieck durchgeführt.

### 3.8.7 RNA-Sequenzierung

Isolierte Granulozyten (siehe 3.2.1.3) wurden ebenfalls wie unter 3.8.1 beschrieben stimuliert. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, mit 1 ml HBSS gewaschen und die

adhärenten Zellen in 350 µl RLT-Puffer des „RNeasy Mini Kit“ (Qiagen) lysiert. Die enthaltene RNA wurde mittels „RNeasy Mini Kit“ gemäß Herstellerangaben isoliert. Die isolierte RNA wurde in 30 µl RNase-freies Wasser aufgenommen und die RNA-Konzentration und Reinheit wie unter 3.8.4 beschrieben bestimmt.

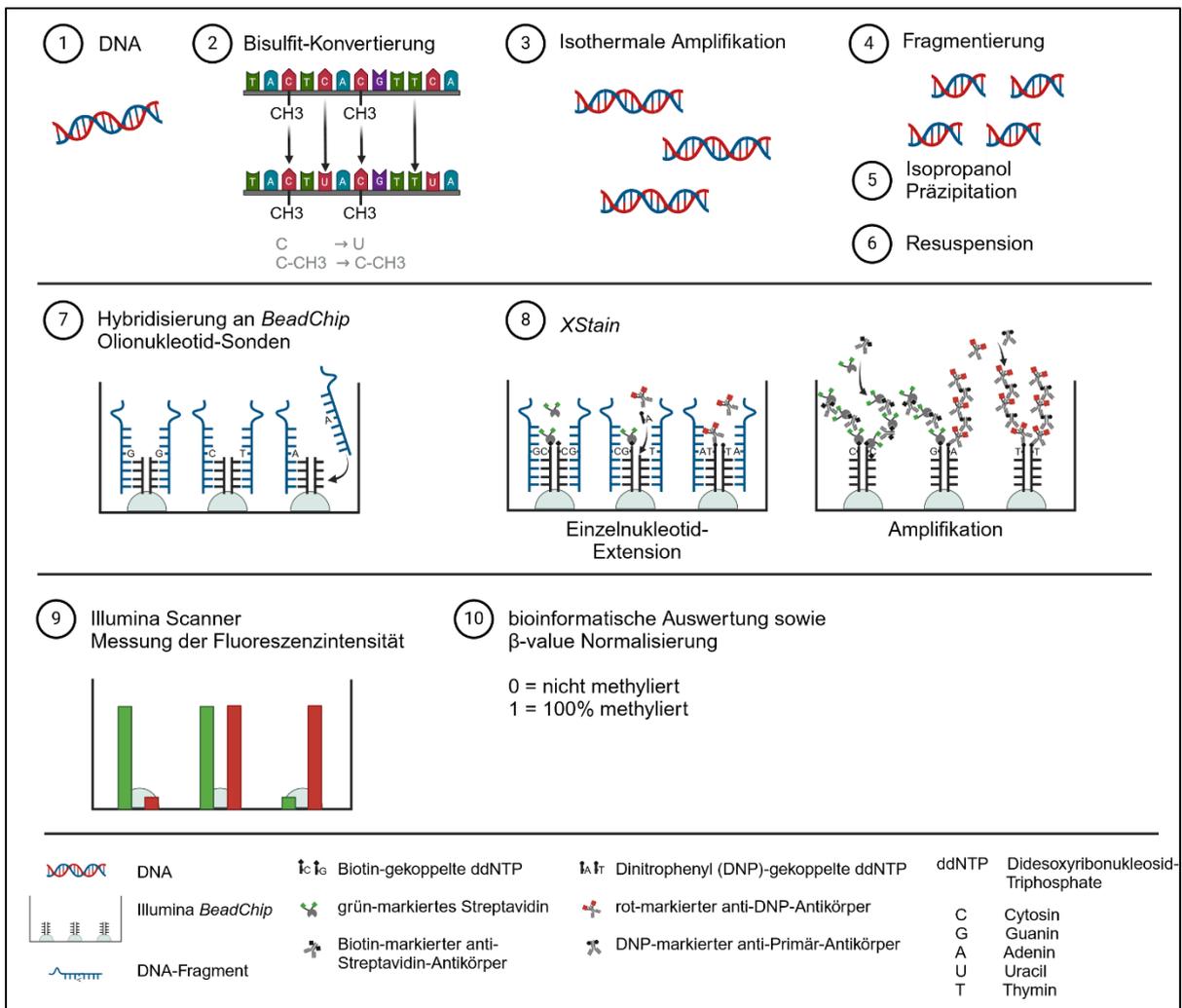
Eine RNA-Sequenzierung der RNA-Proben erfolgte durch Genewiz® von Azenta Life Science (GENEWIZ Germany GmbH). Die bioinformatische Analyse wurde ebenfalls von der Firma durchgeführt. Alle zusätzlichen Analysen wurden mittels R-Programmierung durchgeführt und sind an den gegebenen Stellen gekennzeichnet.

### **3.9 DNA-Methylierungsanalysen**

Isolierte Granulozyten wurden wie unter 3.8.1 beschrieben stimuliert. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, mit 1 ml HBSS gewaschen und die adhären Zellen in 200 µl PBS aufgenommen. Die enthaltene DNA wurde mittels DNA-Isolation (BLOOD) Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben isoliert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Nanodrop (Analytik Jena) gemäß Herstellerangaben.

Für die DNA-Methylierungsuntersuchungen wurden 800 ng/40µl DNA für den „*Infinium Mouse Methylation BeadChip (MMBC) Array*“ (Illumina) eingesetzt. Dies erfolgte in der *Microarray Core Facility* des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg. Eine schematische Darstellung des Methylierungsassays ist der Abbildung 15 zu entnehmen. Die Auswertung erfolgte freundlicherweise durch Dr. rer. nat. Mariam Hakobyan und PD Dr. med. Daniel Lipka am DKFZ mittels R-Programmierung. Dabei wurde das R Packet RnBeads (<https://doi.org/10.1038/nmeth.3115>) verwendet. Hintergrundrauschen, Geschlechtschromosomen und fehlende Werte wurden entfernt. Die CpGs der in Abbildung 27 dargestellten Heatmap wurden gefiltert und ebenfalls als Heatmap dargestellt.

Für globale Methylierungsanalysen wurden die 5000 variabelsten CpGs (mvCpGs; *most variable CpGs*) als Heatmap dargestellt. Die Referenzdaten muriner hämatopoetischer Zellpopulationen wurden unter <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2022.11.001> abgerufen.



**Abbildung 15: Schematische Darstellung des „Infinium Mouse Methylation BeadChip (MMBC) Array“ (Illumina) zur Analyse von DNA-Methylierungsmustern.** (1) Die zu analysierende DNA wird einer (2) Bisulfit-Konvertierung unterzogen. Dabei werden alle nicht-methylierten Cytosine in Uracil umgewandelt. (3) Über eine anschließende isothermale Amplifikation wird die konvertierte DNA vervielfältigt. Die (4) Endpunkt-Fragmentierung generiert DNA-Fragmente, die mittels (5) Isopropanol Präzipitation gereinigt und in einem für die Hybridisierung geeigneten Puffer (6) resuspendiert werden. (7) Die DNA-Fragmente hybridisieren komplementär mit den Oligonukleotid-Sonden des *BeadChips*. Im (8) *XStain*-Schritt erfolgt zunächst eine Einzelnukleotid-Extension mittels Biotin- bzw. Dinitrophenyl (DNP)-gekoppelten Didesoxyribonukleosid-Triphosphaten (ddNTP). Die DNA-Fragmente werden nicht länger benötigt und in einem Waschschritt entfernt. Die markierten ddNTPs werden mittels Fluoreszenzfarbstoff-markiertem Streptavidin bzw. markiertem anti-DNP-Antikörpern angefärbt. Eine Signalamplifikation erfolgt durch weitere Biotin- bzw. DNP-markierte Antikörper. (9) Abschließend werden die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen *Beads* im Illumina Scanner bestimmt und (10) eine bioinformatische Analyse durchgeführt. Nach  $\beta$ -value Normalisierung entspricht 0 – nicht-methyliert und 1 – vollständig (100%) methylierten CpGs. (erstellt mit Biorender.com; basierend auf Illumina)

### 3.10 *In vivo* anti-Integrin-Behandlung im Mausmodell

Um eine mögliche Verbindung zwischen JAK2-V617F-Mutations-bedingten konstitutiv aktiven Integrinen und erhöhten Zytokinkonzentrationen *in vivo* zu untersuchen, wurden Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup>-Mäuse mit anti-  $\alpha_4\beta_1$ - (VLA4) sowie anti-  $\beta_2$ - (CD18) Antikörper bzw. den entsprechenden Isotyp-Kontrollen (siehe Tabelle 9) behandelt. Im Alter von 10 Wochen wurden den Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup>-Mäusen einmalig 200  $\mu$ g anti-Integrin-Antikörper bzw. die

entsprechenden IgG-Isotyp-Kontrollen intraperitoneal (i.p.) injiziert. Acht Tage nach Injektion wurden die Tiere der finalen Analyse zugeführt. Es erfolgte unter anderem eine Blutabnahme zur Serumgewinnung. Um Effekte der Injektion selbst auf das Inflammationsmodell auszuschließen, wurden Vav1-Cre x JAK2<sup>V<sup>F</sup>/+</sup>-Mäuse und Vav1-Cre x JAK2<sup>+/-</sup>-Mäuse als weitere Kontrolle PBS injiziert.

### **3.10.1 Multiplex-Zytokinanalyse**

Nach Beendigung der Behandlung wurde Blut entnommen und in ein vorgekühltes Serumisulationsröhrchen überführt. Nach fünffachem Schwenken wurde das Blut für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Abschließend erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 13.300 rpm. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C bis zur Weiterbearbeitung gelagert. Die Serumproben wurden von der Firma EveTechnologies (Calgary, AB Canada) im „*Mouse Cytokine 32-Plex Assay*“ bezüglich enthaltener Zytokinlevel untersucht.

### **3.11 Statistische Berechnungen**

Alle Daten wurden als unabhängige Mehrfachbestimmungen mit  $n = \text{Anzahl der Proben}$  erhoben. Die statistische Auswertung der Daten sowie die Erstellung der Diagramme erfolgte unter Zuhilfenahme der Software GraphPad Prism Version 7.01. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie die entsprechenden Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen (Mean + SEM). Zur Signifikanztestung zwei vergleichbarer Gruppen wurde ein Mann-Whitney-Test (nicht-parametrisch, ungepaart, zweiseitig) oder ein ungepaarter t-Test mit Welch-Korrektur durchgeführt. Die in den Abbildungen enthaltenen Symbolisierungen kennzeichnen eine Signifikanz mit einer steigenden Wahrscheinlichkeit von \* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$  und \*\*\* =  $p < 0,001$ . Liegt keine Kennzeichnung bzw. „ns.“ vor, ist von keiner statistischen Signifikanz auszugehen ( $p > 0,05$ ).

## 4 Ergebnisse

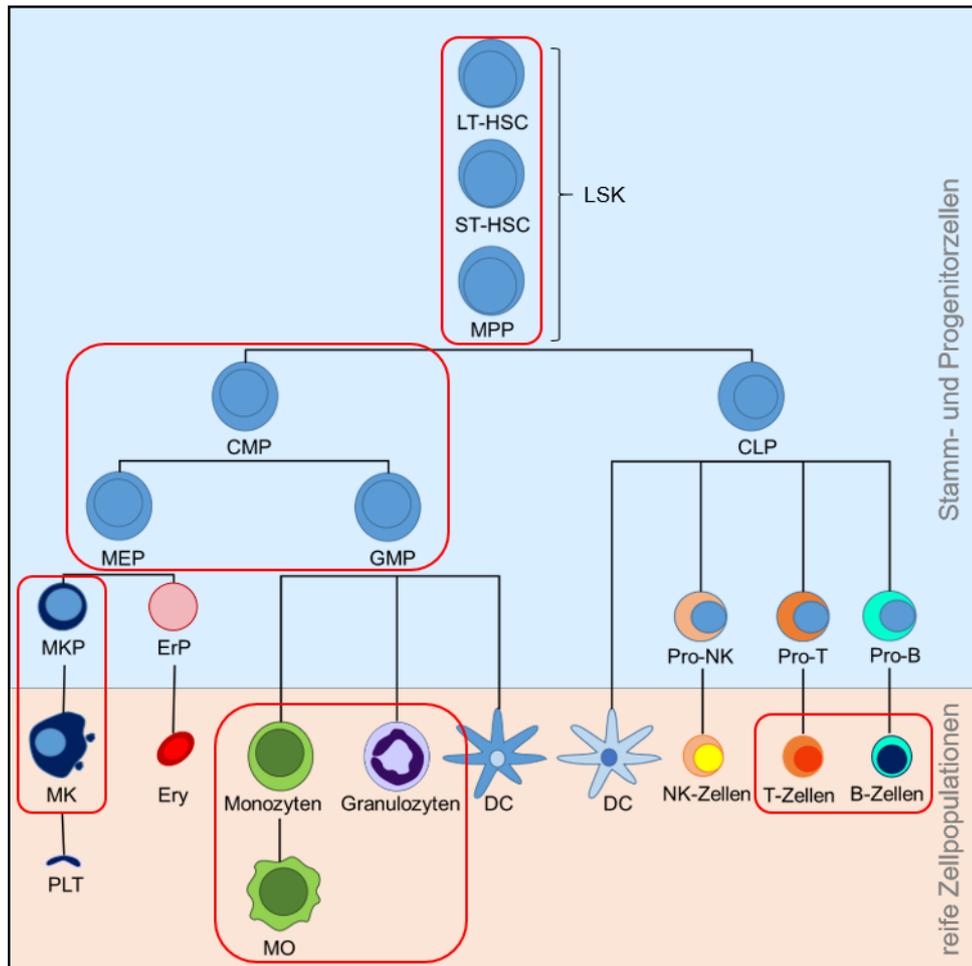
Die vorliegende Arbeit umfasst unter anderem Daten, die partiell bereits auf dem „65th ASH Annual Meeting“ 2023 in San Diego unter dem Titel „*JAK2-V617F Promotes up-Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines Including IL-1 upon Adhesion-Induced Activation of  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 Integrins.*“ (Baldauf CK, [...], Fischer T)<sup>615</sup> vorgestellt oder in Haage TR, Charakopoulos E, Bhuria V, Baldauf CK, [...], Fischer T „*Neutrophil-specific expression of JAK2-V617F or CALRmut induces distinct inflammatory profiles in myeloproliferative neoplasia*“<sup>616</sup> bereits publiziert wurden.

### 4.1 Charakterisierung relevanter hämatopoetischer Zellpopulationen im Vav1-Cre x JAK2 Mausmodell bezüglich IL-1 Expression und Caspase-1 Aktivität

#### 4.1.1 Konstitutive, intrazelluläre IL-1 Expression in unstimulierten Knochenmarkzellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells

Im Serum von JAK2-V617F-positiven Patienten und verschiedenen JAK2-V617F-mutierten Mausmodellen wurden hohe pro-inflammatorische Zytokinlevel unter anderem für IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  beschrieben.<sup>64,108,617–620</sup> Diese sind mit einer Vielzahl von Symptomen und klinischen Parametern assoziiert.<sup>64</sup> Für IL-1 wurde zudem ein Einfluss auf die Entstehung einer MPN, als auch auf das Fortschreiten der Erkrankung, in unterschiedlichen Mausmodellen beschrieben.<sup>62,63,106–108,128,621,622</sup> Das von uns untersuchte Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mausmodell, entspricht einer humanen PV-Erkrankung und wurde bereits unter 1.5 näher charakterisiert. Die JAK2-V617F-Mutation ist aufgrund der verwendeten Vav1-Cre in allen hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen exprimiert. Die Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse zeigten ebenfalls stark erhöhte pro-inflammatorische Zytokinlevel im Serum.<sup>124</sup> Dabei war IL-1 $\alpha$  signifikant erhöht, IL-1 $\beta$  jedoch unter der Nachweisgrenze des Testsystems.<sup>124</sup>

Verschiedene Arbeitsgruppen vermuten die neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Monozyten, Megakaryozyten und LT-HSC als Hauptproduzenten des IL-1.<sup>107,623,624</sup> Wir stellten die Hypothese auf, dass weitere Zellpopulationen wie myeloische Progenitorzellen ebenfalls an der Expression von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  beteiligt sein könnten. Daher wurde das Knochenmark von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (n = 3) isoliert und verschiedene Zellpopulationen bezüglich ihres intrazellulären IL-1 $\alpha$ - sowie pro-IL-1 $\beta$ -Gehaltes mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Die untersuchten Zellpopulationen sind in Abbildung 16 rot hervorgehoben und das experimentelle Design in Abbildung 17A dargestellt. Zur Charakterisierung der verschiedenen Zellpopulationen wurden etablierte Oberflächenmarker der Zellen verwendet. Die verwendete Gatingstrategie für die Progenitorzellpopulationen ist in Abbildung 17B beispielhaft dargestellt.



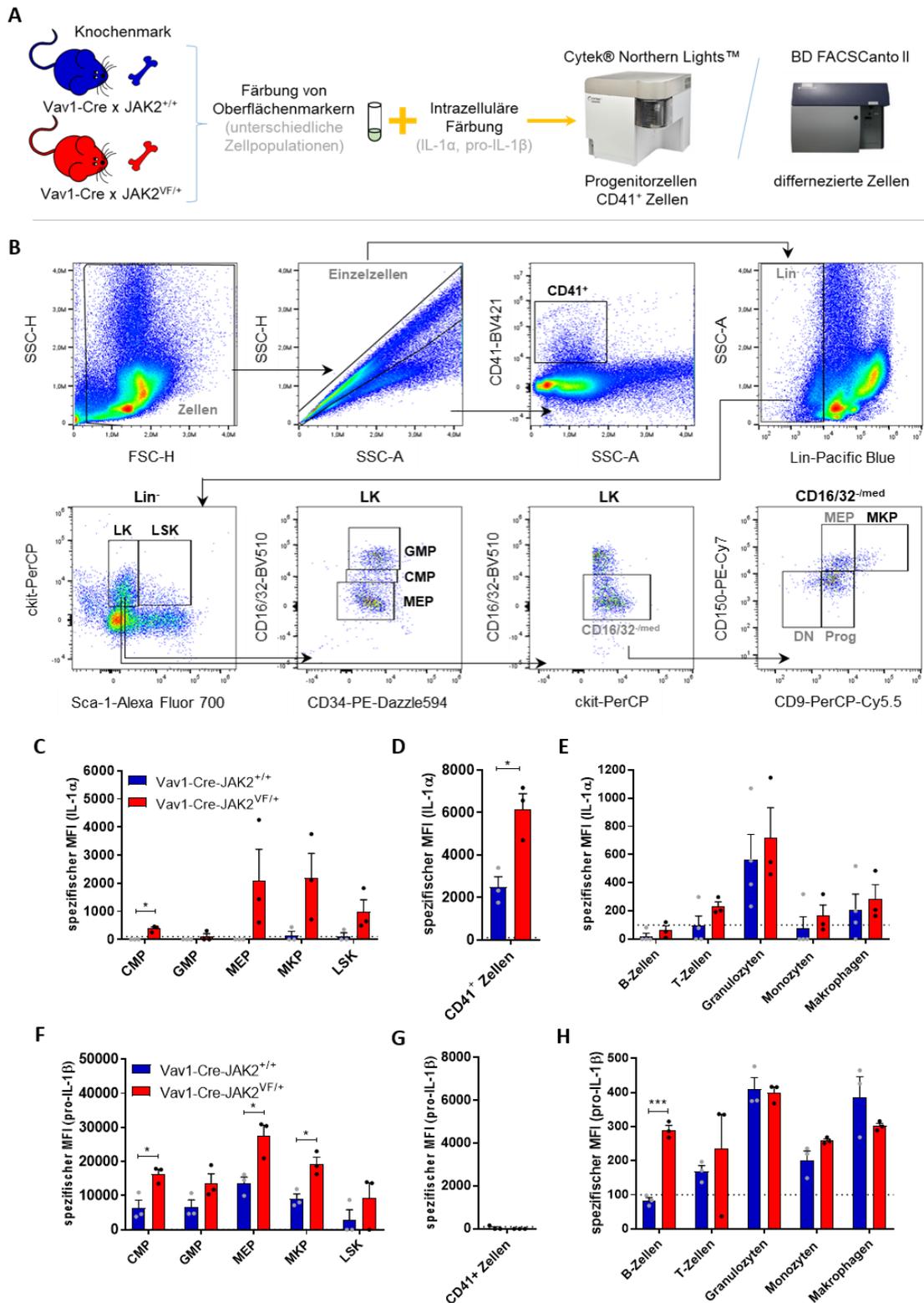
**Abbildung 16: Stammbaum der Hämatopoese und Darstellung der untersuchten Zellpopulationen.** Es wurden sowohl Progenitorzellen als auch reife Zellpopulationen untersucht. **Die untersuchten Zellpopulationen sind rot umrandet.** LT-HSC - *long-term hematopoietic stem cells* – ST-HSC – *short-term hematopoietic stem cells*, MPP - multipotente Progenitorzellen, LSK – Gesamtheit von LT-HSC, ST-HSC und MPP (Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup>), CMP - gesamte myeloische Progenitorzellen, MEP – megakaryozytäre-erythroide Progenitorzellen, GMP - granulozytäre-monozytäre Progenitorzellen, MKP – Megakaryozyten-Progenitorzellen, ErP – Erythrozytenprogenitorzellen, CLP – gesamte lymphatische Progenitorzellen, Pro-NK/T/B – Progenitorzellen der NK-/T-/B-Zellen, MK – Megakaryozyten, PLT – Thrombozyten, MO – Makrophagen, DC –Dendritische Zellen.

Die ermittelten spezifischen MFI-Werte des intrazellulären IL-1 $\alpha$  wiesen große Schwankungen auf. Dennoch konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\alpha$  vornehmlich in JAK2-V617F-mutierten Progenitorzellen exprimiert wird, nicht aber in der JAK2-WT Kontrolle (siehe Abbildung 17C). In den CMP der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> konnte ein signifikanter Anstieg des intrazellulären IL-1 $\alpha$  (p = 0,0267) im Vergleich zu den CMP der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäuse nachgewiesen werden. Zudem konnte die 2,47-fache Menge IL-1 $\alpha$  in CD41<sup>+</sup> Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> (p = 0,0199) erfasst werden (siehe Abbildung 17D). CD41<sup>+</sup>-Zellen entsprechen dabei Zellen der megakaryozytären Linie.<sup>625,626</sup> In den weiteren differenzierten Zellpopulationen konnten keine signifikanten Unterschiede des intrazellulären IL-1 $\alpha$  aufgrund der Mutation festgestellt werden. Die Granulozyten scheinen jedoch in dem vorliegenden Mausmodell, im Vergleich zu

anderen untersuchten, differenzierten Zellpopulationen des Knochenmarks, mehr IL-1 $\alpha$  zu exprimieren (siehe Abbildung 17E).

Für intrazelluläres pro-IL-1 $\beta$  konnten deutliche Unterschiede in den Progenitorzellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> und JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse gezeigt werden. In den JAK2-V617F-mutierten CMP ( $p = 0,0274$ ), MEP ( $p = 0,0308$ ) und MKP-Zellen ( $p = 0,0162$ ) konnten signifikant höhere Signale für pro-IL-1 $\beta$  im Vergleich zu JAK2<sup>+/+</sup> Zellen nachgewiesen werden. Pro-IL-1 $\beta$  war ebenfalls in den GMP und LSK-Zellen erhöht (siehe Abbildung 17F). Dies deutet auf eine besondere Rolle der JAK2-V617F-mutierten Progenitorzellen bei der Entwicklung einer pro-inflammatorischen Umgebung hin. Unter den verwendeten Experimentierbedingungen konnte pro-IL-1 $\beta$  weder in den CD41<sup>+</sup> Zellen der JAK2<sup>+/+</sup> noch JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17G).

In den untersuchten differenzierten Zellen konnte das stärkste pro-IL-1 $\beta$  Signal ebenfalls in den Granulozyten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17H). Daher werden die Granulozyten als reife Hauptproduzenten des IL-1 im Knochenmark im hier verwendeten Mausmodell vermutet. Dabei waren die spezifischen MFI-Werte in mutierten und nicht-mutierten Zellen jedoch vergleichbar. Dennoch zeigten JAK2-V617F-mutierte Monozyten leicht (1,3-fach) und B-Zellen signifikant erhöhte pro-IL-1 $\beta$  Messwerte (3,5-fach;  $p = 0,006$ ) im Vergleich zu den jeweiligen JAK2-WT Zellen (siehe Abbildung 17H).



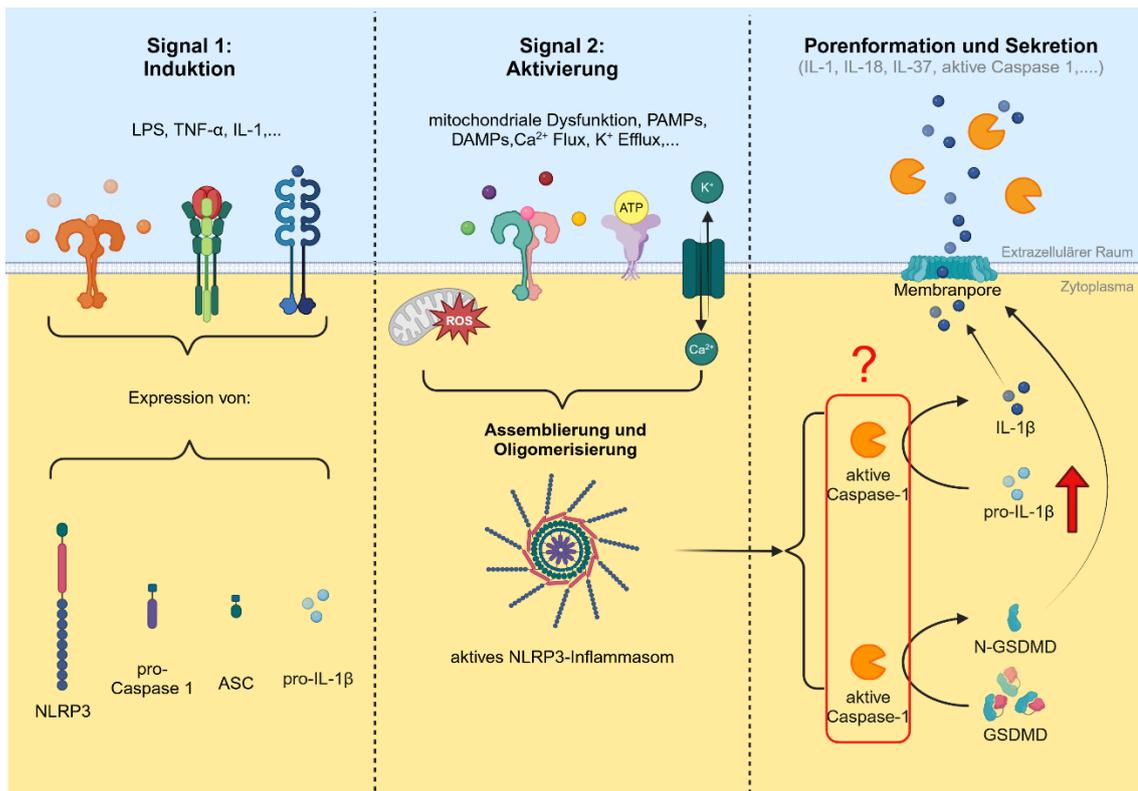
**Abbildung 17: Erhöhte intrazelluläre IL-1 $\alpha$  und pro-IL-1 $\beta$  Expressionslevel in unstimulierten Progenitorzellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse.** (A) Unstimulierte Knochenmarkszellen von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (blau; n = 3-4) und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (rot; n = 3) wurden mittels Durchflusszytometrie bezüglich ihrer intrazellulären (C-E) IL-1 $\alpha$  (reif) und (F-H) pro-IL-1 $\beta$  Expression untersucht. Anhand spezifischer Oberflächenmarker wurden unterschiedliche (C, F) Progenitorzellen (Gating-Strategie ist exemplarisch in (B) dargestellt), (D, G) CD41<sup>+</sup> Zellen und (E, H) weitere differenzierte Zellpopulationen analysiert. Die Stellung der untersuchten Zellpopulationen im Stammbaum der Hämatopoese ist in Abbildung 16 dargestellt. Die spezifischen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) sind als Mean + SEM dargestellt (n = 3-4). Welch's T-Test mit P\* < 0,05, P\*\* < 0,01, P\*\*\* < 0,001.

Ein Vergleich der intrazellulären IL-1 $\alpha$  sowie pro-IL-1 $\beta$  Messwerte zwischen den Progenitorzellen und ausdifferenzierten Zellpopulationen ist aufgrund der Verwendung zweier FACS-Geräte mit unterschiedlichen Detektorsystemen nicht möglich.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass JAK2-V617F-mutierte Progenitorzellpopulationen verstärkt intrazelluläres IL-1 $\alpha$  und pro-IL-1 $\beta$  im Vergleich zu JAK2-WT Zellen exprimieren. Daher stellen Progenitorzellen ebenfalls eine bedeutende Quelle des erhöhten IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in JAK2-V617F-induzierten MPN dar. In den reifen Zellpopulationen waren kaum mutationsbedingte Unterschiede des intrazellulären IL-1 detektierbar. Ausnahmen davon bildeten CD41<sup>+</sup> Zellen, B-Zellen und Monozyten, in denen ebenfalls erhöhte IL-1 $\alpha$  bzw. pro-IL-1 $\beta$  Level in den JAK2-V617F-mutierten Zellen nachweisbar waren und diese damit ebenfalls einen Betrag zu den eingangs erwähnten erhöhten IL-1 Leveln im Knochenmark und Plasma beitragen könnten. Da Unterschiede zwischen den untersuchten Zellpopulationen sowie zwischen IL-1 $\alpha$  und pro-IL-1 $\beta$  nachgewiesen wurden, werden zelltyp-spezifische Mechanismen zur Induktion der erhöhten IL-1 Expression in JAK2-V617F-mutierten Zellen vermutet, die sich ebenfalls zwischen IL-1 $\alpha$  und pro-IL-1 $\beta$  unterscheiden könnten.

#### **4.1.2 Konstitutive Caspase-1 Aktivität in unstimulierten Knochenmarkzellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells**

IL-1 $\beta$  ist in seiner Pro-Form nicht biologisch aktiv<sup>161</sup> und bedarf einer proteolytischen Spaltung. Diese kann unter anderem durch aktive Caspase-1 erfolgen. Rai et al.<sup>106</sup> zeigten signifikant erhöhte *CASP1* mRNA Level in PV-Patienten, daher postulierten wir, dass ebenfalls eine erhöhte Caspase-1 Aktivität zur Spaltung des verstärkt exprimierten pro-IL-1 $\beta$  vorliegt. Aktive Caspase-1 kann unter anderem pro-IL-1 $\beta$  spalten und ist für die biologische Aktivität und eine erfolgreiche Sezernierung des reifen IL-1 $\beta$  notwendig, bedarf aber einer komplexen Aktivierungskaskade (siehe Abbildung 18).<sup>206,207</sup> Vorhandene aktive Caspase-1 lässt demnach eine Spaltung von intrazellulärem pro-IL-1 $\beta$  vermuten. Der Nachweis erfolgte dabei mittels FLICA-Assay.

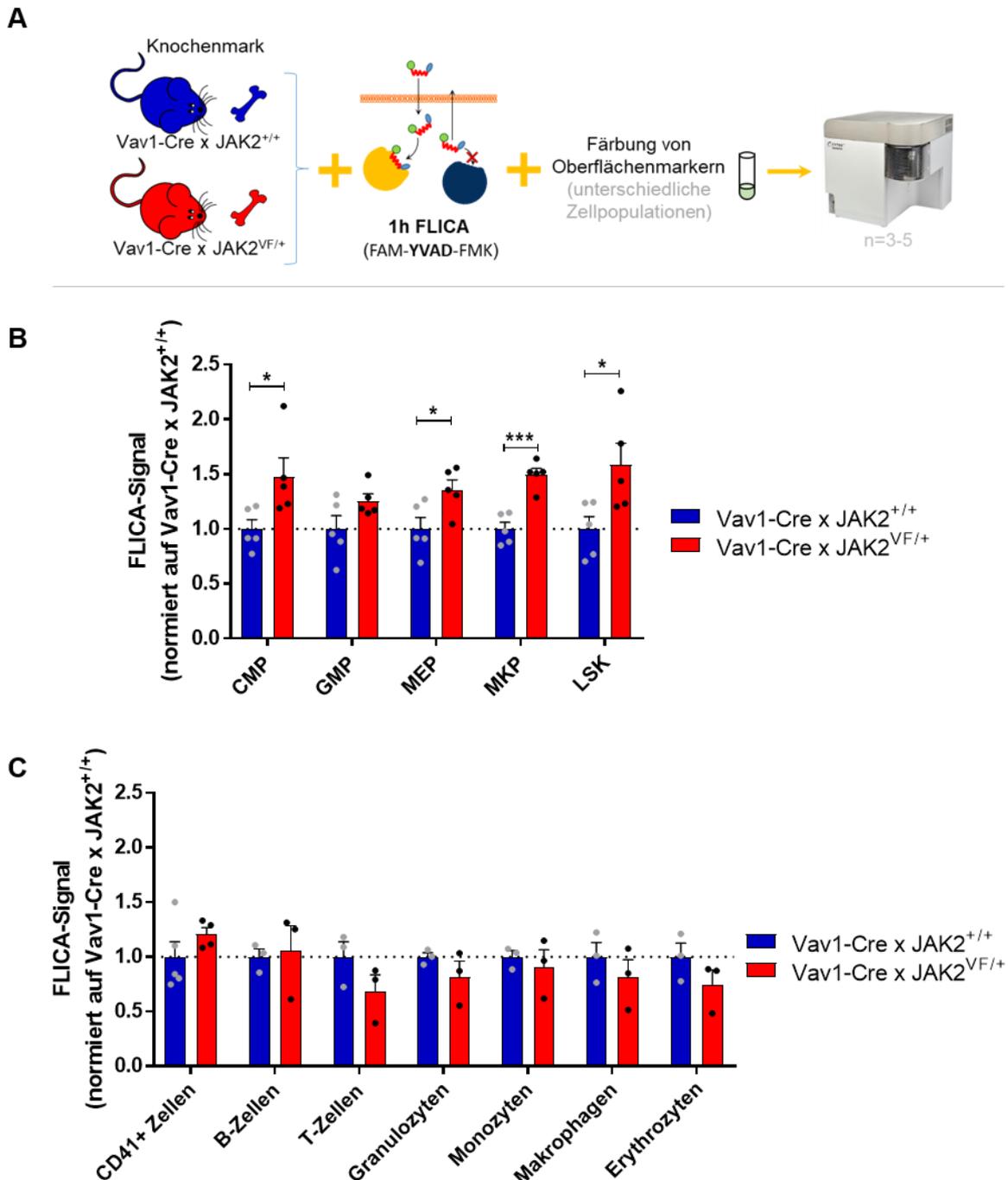


**Abbildung 18: IL-1β Expression und Prozessierung erfolgt in zwei Schritten und bedarf der Inflammasomaktivierung sowie aktiver Caspase-1.** Die Reifung von pro-IL-1β erfolgt meist durch aktive Caspase-1. Diese wird wie pro-IL-1β durch ein Induktionssignal der Inflammasomaktivierungskaskade induziert. Erst durch ein Aktivierungssignal kommt es zur Assemblierung und Oligomerisierung des Inflammasoms (hier NLRP3 gezeigt). Das so aktivierte Inflammasom kann pro-Caspase 1 aktivieren, welches dann in der Lage ist unter anderem pro-IL-1β in seine reife Form zu splaten. (erstellt mit BioRender.com)

Um die These einer verstärkten Caspase-1 Aktivität und damit Reifung des erhöhten pro-IL-1β in den untersuchten Zellpopulationen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> zu überprüfen, wurden frisch isolierten Knochenmarkzellen für 1 h mit der FLICA-Sonde (FAM-YVAD-FMK) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen entsprechend ihrer Oberflächenmarker analysiert (siehe Abbildung 19A).

Alle untersuchten Progenitorzellen zeigten eine verstärkte Caspase-1 Aktivität in den JAK2<sup>VF/+</sup>-Zellen im Vergleich zu den entsprechenden JAK2<sup>+/+</sup>-Zellen. Statistisch signifikante Unterschiede konnten dabei in den CMP (p = 0,0442), den MEP (p = 0,0341), den MKP-Zellen (p = 0,0013) und den LSK-Zellen (p = 0,0409) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19B). Die Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse verfügten über das 1,3 - 1,6-fache FLICA Signal und damit über eine stärkere Caspase-1 Aktivierung im Vergleich zu den entsprechenden Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäuse. Dies deutet darauf hin, dass die untersuchten Progenitorzellpopulationen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse bereits ohne zusätzliche *in vitro* Stimulation verstärkt über aktivierte Caspase-1 verfügen, die für IL-1 Prozessierung notwendig ist. Es wird vermutet, dass JAK2-V617F-assoziierte Mechanismen vorliegen, die zu einer

konstitutiv aktiven Caspase-1 in Progenitorzellen führen könnten. Die vorliegenden Daten könnten darauf hindeuten, dass erhöht vorliegende pro-IL-1 $\beta$  Level in den JAK2-V617F-mutierten Zellen schneller prozessiert und eine Inflammation schneller induziert werden könnte.



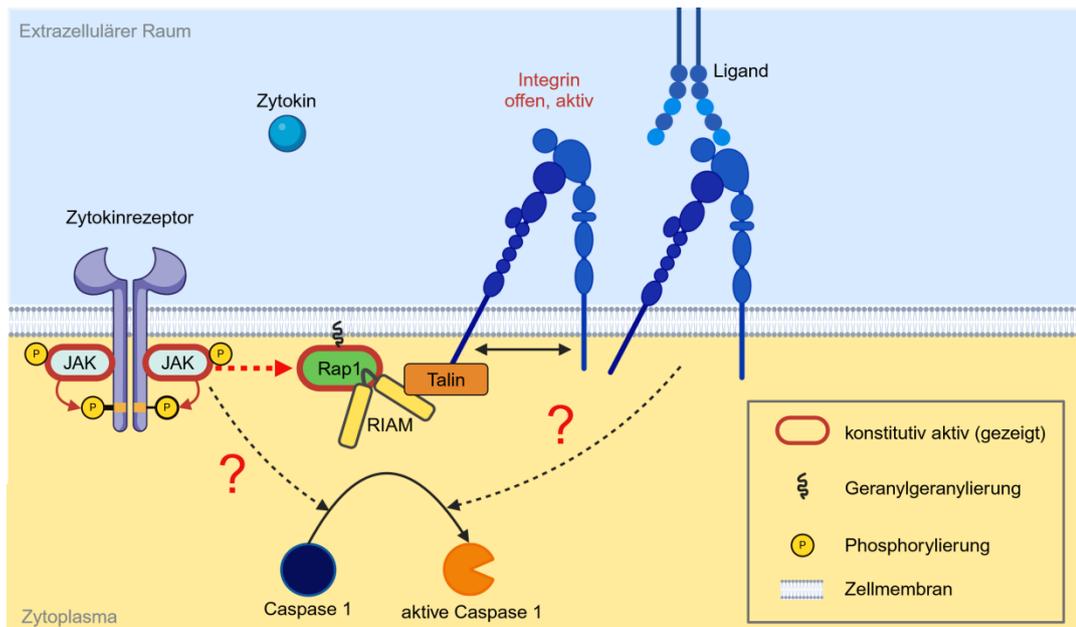
**Abbildung 19: Erhöhte konstitutive Caspase-1 Aktivität in unstimulierten Progenitorzellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse. (A)** Aktive Caspase-1 wurde in unstimulierten Knochenmarkszellen von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (blau; n = 5) und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (rot; n = 5) mittels FLICA-Assay (FAM-YVAD-FMK) und Durchflusszytometrie gemessen. Anhand spezifischer Oberflächenmarker wurden **(B)** unterschiedliche Progenitorzellen sowie **(C)** differenzierte Zellpopulationen analysiert. Die Messwerte wurden normalisiert auf die jeweilige JAK2<sup>+/+</sup> Zellpopulation. Dargestellt sind die Mittelwerte Mean + SEM (n = 3-5). Welch's T-Test mit P\* < 0,05, P\*\*\* < 0,001.

Im Gegensatz dazu konnten in den differenzierten Zellpopulationen (B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Erythrozyten) keine signifikanten Unterschiede in der basalen Caspase-1 Aktivität zwischen den JAK2<sup>VF/+</sup> und JAK2<sup>+/+</sup>-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19C). Ein geringer, jedoch nicht signifikanter Anstieg der aktiven Caspase-1 war nur in den CD41<sup>+</sup> Zellen der JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse vorhanden.

Damit konnten wir erstmals zeigen, dass neben erhöhten IL-1 Leveln ebenfalls eine erhöhte Caspase-1 Aktivität in JAK2-V617F-mutierten hämatopoetischen Progenitorzellen vorliegt. Wir vermuten, dass die hämatopoetischen Progenitorzellpopulationen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse im Gegensatz zu den JAK2<sup>+/+</sup> Zellen in einem prä-aktivierten Zustand vorliegen und ohne zusätzlichen Stimulus eine IL-1 $\beta$ -vermittelte Inflammation induzieren können. Fehlende Unterschiede in der pro-IL-1 $\beta$  Expression und Caspase-1 Aktivität in den differenzierten Zellpopulationen (B-Zellen, T-Zellen, etc.) deuten darauf hin, dass diese Zellen in dem untersuchten Mausmodell nur eine geringere Bedeutung in dem IL-1-induzierten pro-inflammatorischen Mikromilieu haben.

#### **4.1.3 Einfluss von Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 auf die Caspase-1 Aktivität in primären Zellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells**

Die Unterschiede in den intrazellulären IL-1 Konzentrationen als auch der Caspase-1 Aktivität in unstimulierten, frisch isolierten Zellen könnten durch die Mutation selbst oder aber durch Interaktionen der Zellen mit anderen Zellen bzw. der extrazellulären Matrix induziert werden. Adhäsion spielt eine entscheidende Rolle in der Induktion von Zellinteraktionen und in den verschiedensten Zellfunktionen. Ebenso wurde bereits gezeigt, dass die JAK2-V617F-Mutation zu einer konstitutiven, aktiven Konformation der  $\beta_1$ -Integrine sowie einer erhöhten  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-vermittelten Adhäsion an VCAM-1 und ICAM-1 führt.<sup>421,422</sup> Um die Hypothese eines Einflusses der Integrin-Überaktivierung auf die Caspase-1 Aktivität zu überprüfen (siehe Abbildung 20), wurde die Bedeutung der Rezeptor-Liganden-Interaktion auf die Caspase-1 Aktivität in verschiedenen Zellpopulationen analysiert. Dafür wurden Knochenmarkzellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (n = 5) und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse (n = 5) für 3 h mit immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 oder mit immobilisiertem BSA (Kontrolle) stimuliert und die zelltypspezifische Caspase-1 Aktivität mittels FLICA Signal untersucht (siehe Abbildung 21A).



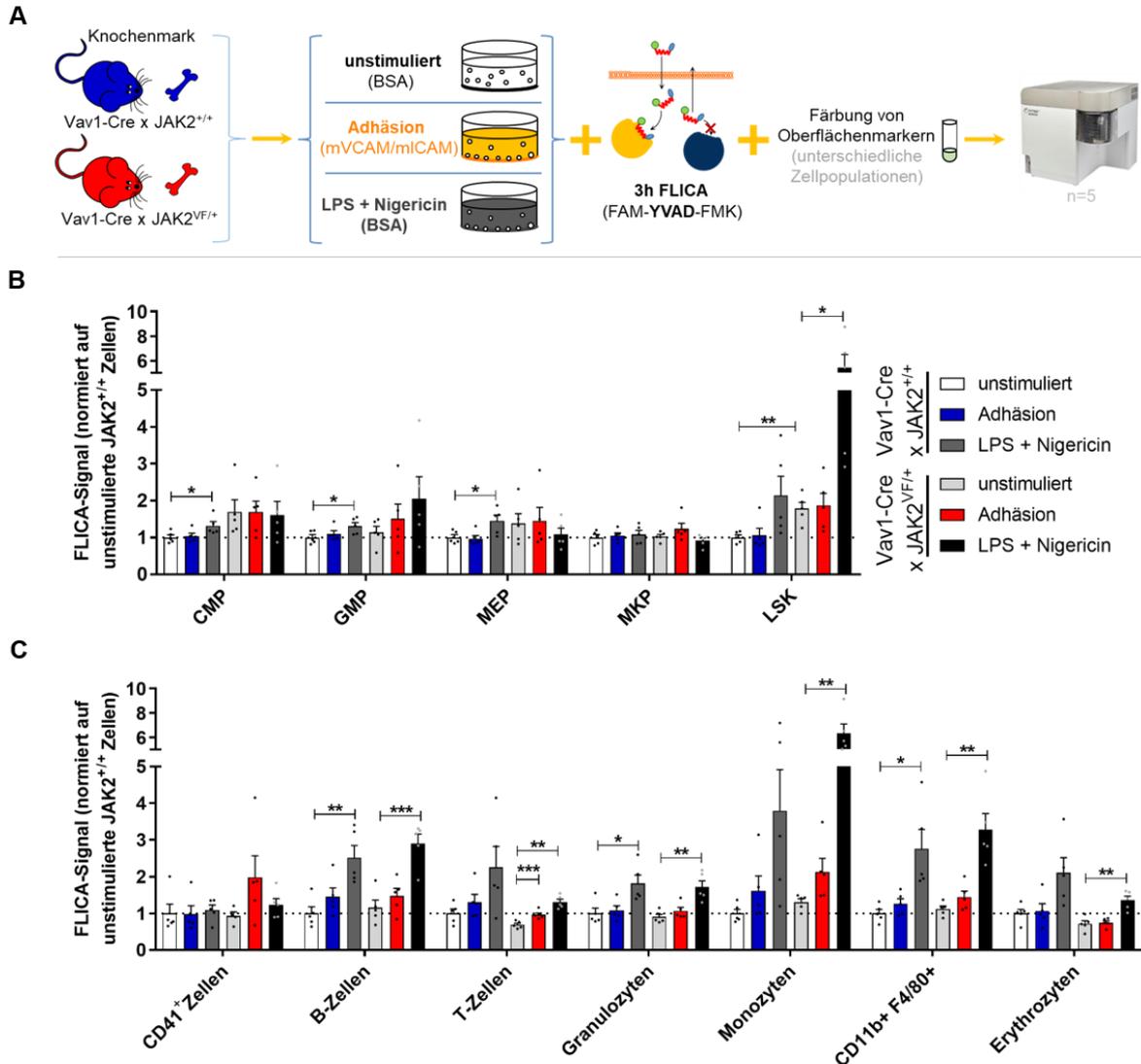
**Abbildung 20: Schematische Hypothesendarstellung – Gibt es eine Verbindung zwischen den überaktivierten Integrinen und der Caspase-1 Aktivität?** Die JAK2-V617F-Mutation führt zu einer konstitutiv aktiven  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -Integrin-Konformation (siehe Abbildung 10) und zeigt erhöhte Caspase-1 Aktivität in Progenitorzellpopulationen. Ob Adhäsion einen Einfluss auf die Caspase-1 Aktivität hat ist bislang unklar. (erstellt mit BioRender.com)

Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit 100 ng/ml LPS und 5  $\mu$ M Nigericin behandelt. LPS wirkt dabei als erstes Induktions-Signal und Nigericin als zweite Aktivierungs-Signal des NLRP3-Inflammasoms und der Caspase-1. Nahezu alle untersuchten Zellpopulationen zeigten unter Verwendung der Positivkontrolle ein Anstieg im FLICA-Signal (siehe Abbildung 21B und C) und sind demnach in der Lage LPS / Nigericin-induzierte Caspase-1 zu exprimieren und diese zu aktivieren. Ausnahmen bildeten dabei lediglich MKP-Zellen (mutations-unabhängig), sowie CMP und MEP-Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse. Möglicherweise verfügen diese Zellen nicht über das NLRP3-Inflammasom oder benötigen andere Stimuli zur Aktivierung des Inflammasoms.

In den untersuchten hämatopoetischen Progenitorzellpopulationen konnte keine verstärkte Aktivierung der Caspase-1 nach mVCAM-1/mICAM-1-Stimulation nachgewiesen werden. Lediglich in den GMP- (1,3-fach) und MKP-Zellen (1,2-fach) war ein positiver Trend zu einer JAK2<sup>VF/+</sup>-spezifischen Caspase-1 Aktivierung nach Interaktion mit immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1 sichtbar, jedoch nicht signifikant (siehe Abbildung 21B).

Die Stimulation mit immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1 führte hingegen in nahezu allen untersuchten differenzierten Zellpopulationen zu einer gering erhöhten Caspase-1 Aktivität. Ausnahmen bilden die Granulozyten und die Erythrozyten (siehe Abbildung 21C). Die Aktivierung nach VCAM-1/ICAM-1-Stimulation war jedoch in B-Zellen, T-Zellen, Monozyten und Makrophagen gleichermaßen in Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> als auch der Vav1-Cre x

JAK2<sup>+/+</sup> Mäuse nachweisbar (1,3- bis 1,6-fach; siehe Abbildung 21C). In den T-Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse war die VCAM-1/ICAM-1-induzierte Erhöhung der Caspase-1 Aktivität statistisch signifikant (p = 0,0039) (siehe Abbildung 21C).



**Abbildung 21: Unterschiedlicher Einfluss einer VCAM-1/ICAM-1-Stimulation auf die Caspase-1 Aktivität in Progenitorzellen und reifen Knochenmarkzellen von Vav1-Cre x JAK2 Mäusen. (A)** Knochenmarkzellen von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen wurden für 3 h auf 1 % BSA (unstimuliert) bzw. 3 µg/ml mVCAM-1/mICAM-1 (Adhäsion) oder mit 100 ng/ml LPS + 5 µM Nigericin inkubiert. Aktive Caspase-1 wurde mittels FLICA-Assay (FAM-YVAD-FMK) im Durchflusszytometer analysiert. Anhand spezifischer Oberflächenmarker wurden unterschiedliche **(B)** Progenitorzellen, **(C)** CD41<sup>+</sup> Zellen und weitere differenzierte Zellpopulationen analysiert. Die Messwerte wurden normalisiert auf die jeweilige unstimulierte JAK2<sup>+/+</sup> Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte Mean +SEM (n = 4-5). Welch´s T-Test mit P\* < 0,05, P\*\* < 0,01, P\*\*\* < 0,001.

In CD41<sup>+</sup> Zellen vermuteten wir eine JAK2-V617F-spezifische Caspase-1 Aktivität nach VCAM-1/ICAM-1-Stimulation (siehe Abbildung 21B). So konnte in den JAK2<sup>+/+</sup> CD41<sup>+</sup> Zellen kein Anstieg der Caspase-1 Aktivität nachgewiesen werden, wohingegen in den JAK2-V617F-

mutierten CD41<sup>+</sup> Zellen ein 2,1-facher Anstieg des FLICA-Signals beobachtet wurde. Dieser Anstieg war aufgrund einer hohen Standardabweichung nicht statistisch signifikant.

Zusammenfassend deuten unsere Ergebnisse auf zelltyp-spezifische Unterschiede in der VCAM-1/ICAM-1-induzierten Caspase-1 Aktivierung hin. Die beschriebene Integrin-Überaktivierung in JAK2-V617-positiven Zellen<sup>421,422</sup> scheint bei den Progenitorzellen nicht ursächlich für die erhöhte Caspase-1 Aktivität zu sein, da diese keine Aktivitätssteigerung nach VCAM-1/ICAM-1-Stimulation zeigten. Da in reifen Zellpopulationen dennoch ein VCAM-1/ICAM-1-induzierter Anstieg der activen Caspase-1 nachweisbar war (z.B. in JAK2-V617F-positiven T-Zellen), werden unterschiedliche Wirkmechanismen in Abhängigkeit der Zellpopulation vermutet. Nur in wenigen Zellpopulationen scheint die JAK2-V617F-Mutation und damit die Integrin-Überaktivierung eine Rolle zu spielen.

#### **4.2 VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in hämatopoetischen Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells**

Die Ergebnisse der Analyse der konstitutiven, intrazellulären IL-1 Expression, sowie der basalen und VCAM-1/ICAM-1-induzierten Caspase-1 Aktivität, deuten auf eine pro-inflammatorische Rolle unterschiedlicher Zellpopulationen hin. Um einen weiteren Einfluss der VCAM-1/ICAM-1-Stimulation (immobilisiert) auf zusätzliche pro-inflammatorische Mechanismen wie die Zytokinexpression in diesen Zellpopulationen zu analysieren, wurden weitere Untersuchungen angestellt und dazu Zellen aus Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> bzw. JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen isoliert. Basierend auf den bisherigen Ergebnissen wurden B-Zellen, Monozyten, Granulozyten und Lin<sup>-</sup> Zellen isoliert. Lin<sup>-</sup> Zellen umfassen dabei die Gesamtheit der hämatopoetischen Progenitor- und Stammzellen. Die Zellen sind negativ für die Differenzierungsmarker CD3, CD45R/B220, CD11b, Ly6C/Ly6G und Ter119.

Die isolierten Zellen wurden 1 h auf immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 oder 1 % BSA als Kontrolle inkubiert. Veränderungen in der mRNA-Expression ausgewählter Zytokine wurden mittels qPCR untersucht. Der Versuchsaufbau der unter 4.2 beschriebenen Ergebnisse war, bis auf Unterschiede in den analysierten Zellpopulation, identisch. Dies wurde jeweils in den Unterabbildungen A gekennzeichnet.

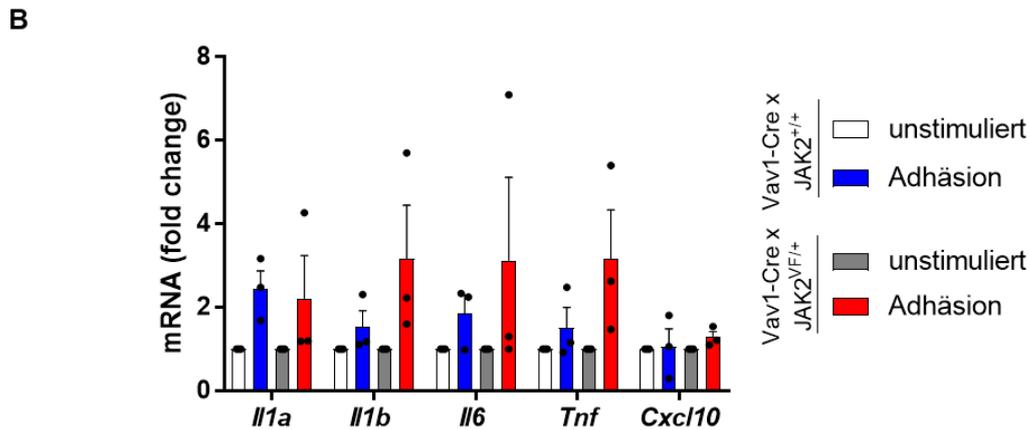
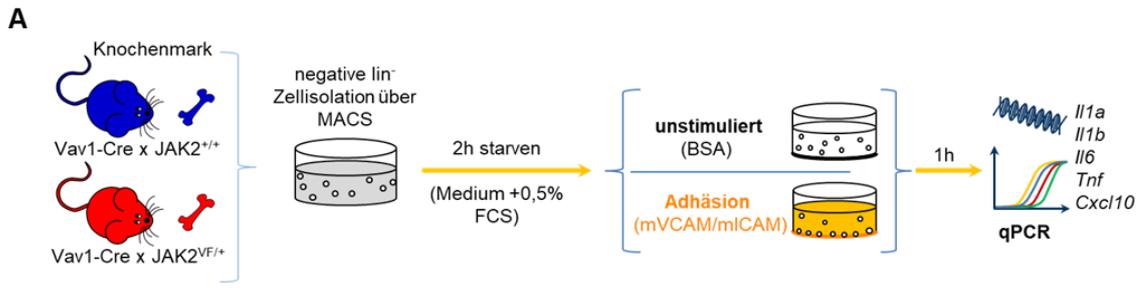
Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt einer Rezeptor-Liganden-Interaktion von unterschiedlichen Zellpopulationen und deren  $\beta_1/\beta_2$ -Integrinen mit immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1 auf unterschiedlichen Ebenen untersucht. Da in fast allen Experimenten ein Pool aus zum Zeitpunkt der Analyse tatsächlich adhären Zellen und der sich immer noch bzw. wieder in Suspension befindlichen Zellen analysiert wurden, ist die allgemeine Bezeichnung Adhäsion nicht vollständig korrekt. Aus didaktischen Gründen wird dennoch in der

vorliegenden Arbeit die Bezeichnungen „Adhäsion“, „VCAM-1/ICAM-1-Stimulation“ und „Rezeptor-Liganden-Interaktion“ gleichermaßen verwendet.

#### **4.2.1 VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in isolierten hämatopoetischen Progenitorzellen**

Die hämatopoetischen Progenitorzellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse zeigten deutliche Unterschiede sowohl in der intrazellulären IL-1 Expression als auch in der Caspase-1 Aktivität. Da technisch bedingt nur sehr geringe Zellzahlen der einzelnen Stammzell- und Progenitorzellpopulationen gewonnen werden können, wurde die Gesamtheit der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (sogenannte Lin<sup>-</sup> Zellen) stellvertretend für diese Zellpopulationen isoliert und mittels qPCR analysiert. Alle qPCRs wurden freundlicherweise von Corinna Fahldieck durchgeführt.

Interessanterweise induzierte die Rezeptor-Liganden-Interaktion isolierter Lin<sup>-</sup> Zellen an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 die mRNA-Expression eines repräsentativen Panels von inflammatorischen Zytokinen mit besonderer Bedeutung bei MPN.<sup>104,106,107,122,124,125,128,627-629</sup> *Il1a*, *Il1b*, *Il6* und *Tnf* wurde im Vergleich zur unstimulierten BSA-Kontrolle induziert (siehe Abbildung 22A+B). Dies konnte sowohl in Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (n=3) als auch der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> (n=3) Mäuse gleichermaßen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 22B). Für *Cxcl10* konnte keine Adhäsions-induzierte mRNA-Expression in den Lin<sup>-</sup> Zellen detektiert werden.



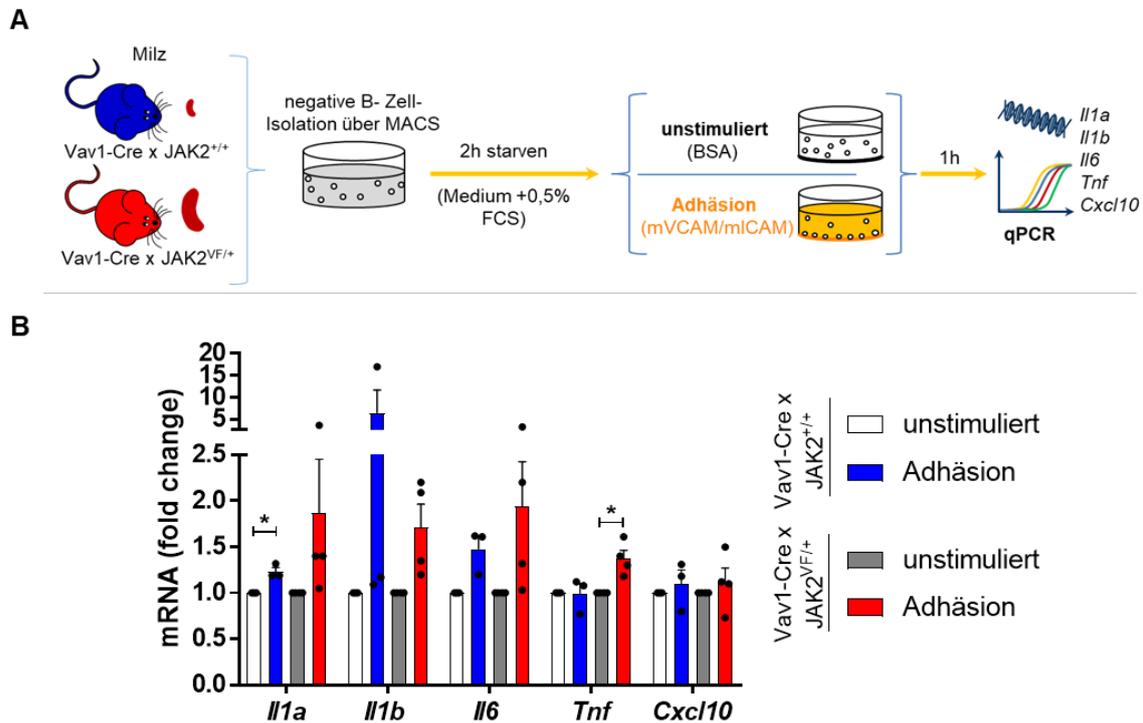
**Abbildung 22: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Interaktion induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in isolierten Lin<sup>-</sup> Zellen aus Vav1-Cre x JAK2 Mäusen.** Der Versuchsaufbau ist (A) schematisch dargestellt. Isolierte Lin<sup>-</sup> Zellen von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (blau; n = 3) und JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (rot; n = 3) wurden 1 h auf immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 inkubiert und anschließend bezüglich der mRNA-Expression von *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnf* und *Cxcl10* mittels qPCR untersucht. Die (B) Veränderungen der Genexpression sind als Mean + SEM (n=3) des „fold change“ (2<sup>-ΔΔCT</sup>-Methode) dargestellt und wurden auf die jeweilige unstimulierte Kontrolle normiert.

Die mittels 2<sup>-ΔΔCT</sup>-Methode bestimmten „fold change“ weisen hohe Standardfehler (SEM) auf. Dies ist möglicherweise auf die geringe Reinheit (durchschnittlich 65,2 %) oder auf eine geringe Zellzahl zurückzuführen. Der Anteil Lin<sup>-</sup> Zellen beträgt in den verwendeten Vav1-Cre x JAK2 Mäusen durchschnittlich 7,2 %. Jedoch konnten aufgrund der verwendeten Isolationsmethode (engl.: *Magnetic Cell Separation*; MACS) der Zellen lediglich 1-2 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Maus isoliert werden. Demnach war nicht immer die Analyse von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Probe möglich. Zudem umschließen Lin<sup>-</sup> Zellen einen Pool unterschiedlicher Zellpopulationen der Stamm- und Progenitorzellen, bei denen sich der relative Anteil zwischen den einzelnen Mäusen unterscheiden kann.

#### 4.2.2 VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in isolierten B-Zellen

Die Isolation der B-Zellen erfolgte aus der Milz von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (n = 3) und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (n = 4), während die Stimulation der Zellen in identischer Weise wie bei den anderen Zellpopulationen erfolgte (Vgl. Abbildung 22A – 25A). Die B-Zellen zeigten nach Stimulation mit immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 einen Anstieg von *Il1a*, *Il1b*, *Il6* und *Tnf*

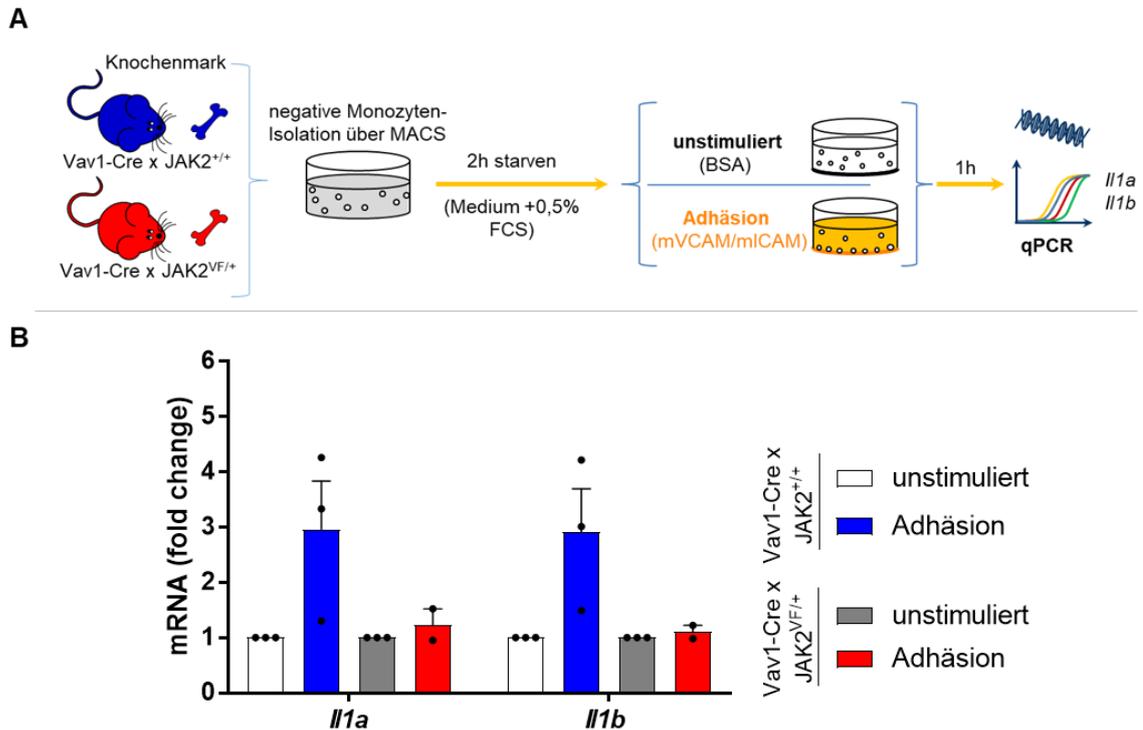
mRNA im Vergleich zur unstimulierten BSA-Kontrolle (siehe Abbildung 23B). In den Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäuse war dieser Effekt geringer als in JAK2-V617F-positiven Zellen. Eine JAK2-V617F-spezifische, signifikante, Adhäsion-induzierte mRNA-Expression konnte nur für *Tnf* (1,37-fach; p = 0,0264) nachgewiesen werden. Dennoch scheint ein Trend zu einer verstärkten Adhäsions-induzierten Zytokin mRNA-Expression in JAK2-V617F-positiven Zellen im Vergleich zu JAK2<sup>+/+</sup> Zellen zu existieren. Die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 hatte in den isolierten B-Zellen keinen Einfluss auf die *Cxcl10* mRNA Level.



**Abbildung 23: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Interaktion induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in isolierten B-Zellen aus Vav1-Cre x JAK2 Mäusen.** Der Versuchsaufbau ist (A) schematisch dargestellt. Isolierte B-Zellen von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (blau; n = 3) und JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (rot; n = 3) wurden 1 h auf immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 bzw. BSA inkubiert und anschließend bezüglich der mRNA-Expression von *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnf* und *Cxcl10* mittels qPCR untersucht. Die (B) Veränderungen der Genexpression sind als Mean + SEM (n=3-4) des „fold change“ (2<sup>-ΔΔCT</sup>-Methode) dargestellt und wurden auf die jeweilige unstimulierte Kontrolle normiert. Welch’s T-Test mit P<0,05.

#### 4.2.3 VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in isolierten Monozyten

Die Adhäsion isolierter Knochenmarks-Monozyten der Vav1-Cre xJAK2<sup>+/+</sup> Mäuse (n=3) an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 führte zu einem 2,96-fachen Anstieg von *Il1a* bzw. 2,91-fachem Anstieg von *Il1b* mRNA (siehe Abbildung 24A+B). Dies konnte jedoch nicht in den Monozyten der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse (n = 2) nachgewiesen werden. Es fand keine Adhäsions-induzierte mRNA-Expression nach 1 h (siehe Abbildung 24B) oder 3 h (unveröffentlichte Daten) in JAK2-V617F-positiven Monozyten statt.

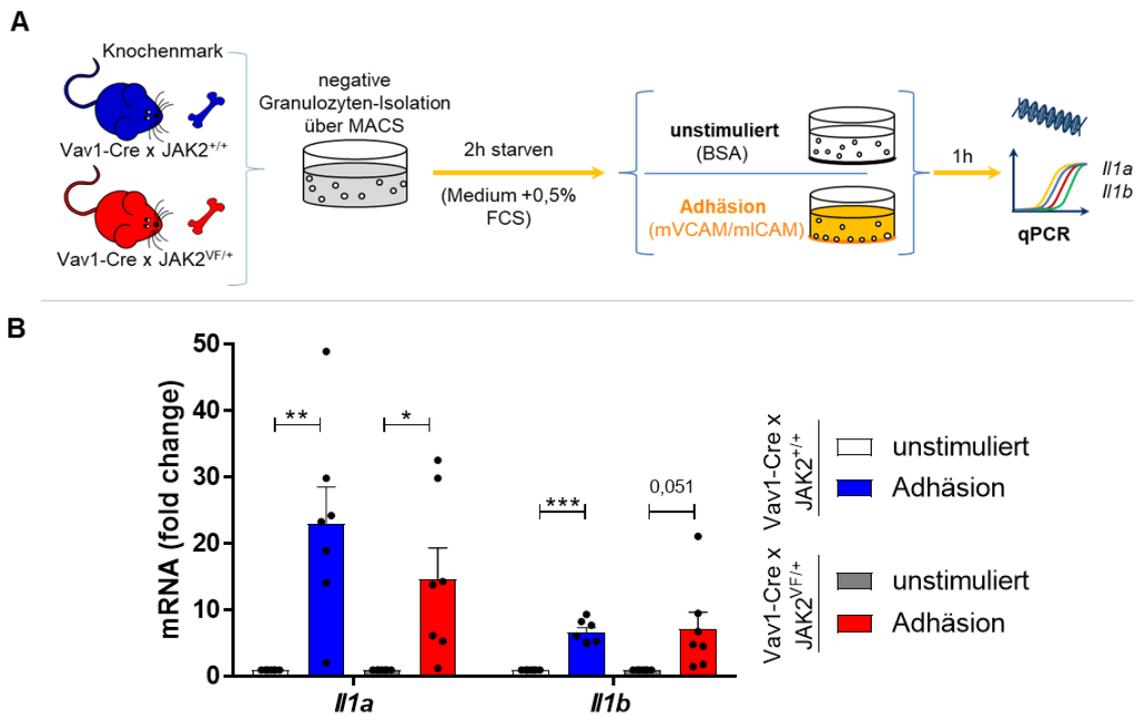


**Abbildung 24: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Interaktion induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in isolierten Monozyten aus Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen.** Der Versuchsaufbau ist (A) schematisch dargestellt. Isolierte Monozyten von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (blau; n = 3) und JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (rot; n = 2) wurden 1 h auf immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 inkubiert und anschließend bezüglich der mRNA-Expression von *Il1a* (links) und *Il1b* (rechts) mittels qPCR untersucht. Die (B) Veränderungen der Genexpression sind als Mean + SEM (n=2-3) des „fold change“ (2<sup>-ΔΔCT</sup>-Methode) dargestellt und wurden auf die jeweilige unstimulierte Kontrolle normiert.

Aufgrund des fehlenden Anstiegs der Zytokin-mRNA-Expression nach Adhäsion in den JAK2-V617F-mutierten Monozyten, wird vermutet, dass von diesen keine Adhäsions-induzierte Inflammation ausgeht. Da der Fokus in diesem Abschnitt der Arbeit jedoch auf dem Adhäsions-induzierten, pro-inflammatorischen Mechanismus in JAK2-V617F-mutierten Zellen liegt, wurden keine weiteren Analysen in Monozyten durchgeführt.

#### 4.2.4 VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert die Genexpression pro-inflammatorischer Zytokine in isolierten Granulozyten

Die VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion induziert in isolierten Knochenmarks-Granulozyten der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (n = 7) und der JAK2<sup>VF/+</sup> (n = 7) Mäuse eine *Il1a* und *Il1b* mRNA-Expression (Vergleich zur unstimulierten BSA-Kontrolle). Dabei war der Anstieg der Adhäsions-induzierten *Il1a* Expression in JAK2<sup>+/+</sup> Zellen (23,1-fach; p = 0,0068) 1,56-fach höher als in den JAK2<sup>VF/+</sup> Zellen (14,8-fach; p = 0,02243) (siehe Abbildung 25B). Die *Il1b* mRNA Level waren hingegen nach Adhäsion zwischen JAK2<sup>+/+</sup> Zellen (6,7-fach; p = 0,001) und JAK2<sup>VF/+</sup> Zellen (7,2-fach; p = 0,0521) vergleichbar.



**Abbildung 25: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Interaktion induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in isolierten Granulozyten-Zellen aus Vav1-Cre x JAK2 Mäusen.** Der Versuchsaufbau ist **(A)** schematisch dargestellt. Isolierte Granulozyten aus dem Knochenmark von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (blau; n = 7) und JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (rot; n = 7) wurden 1 h auf immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 inkubiert und anschließend bezüglich der mRNA-Expression von *Il1a* (links) und *Il1b* (rechts) mittels qPCR untersucht. Die **(B)** Veränderungen der Genexpression sind als Mean + SEM (n=7) des „fold change“ ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode) dargestellt und wurden auf die jeweilige unstimulierte Kontrolle normiert. Welch’s T-Test mit  $P^* < 0,05$ ,  $P^{**} < 0,01$ ,  $P^{***} < 0,001$ .

Neutrophile Granulozyten sind die häufigste Art von Granulozyten und machen 25-75 % der Leukozyten im Blut aus.<sup>630,631</sup> Viele Studien zeigten bereits die essentielle Rolle neutrophiler Granulozyten in der Entstehung und dem Fortschreiten von MPN (siehe Überblick von Kiem et.al.<sup>632</sup>). Um den Einfluss von VCAM-1/ICAM-1-vermittelter Adhäsion auf weitere pro-inflammatorische Marker, Zytokine und Chemokine in den JAK2<sup>+/+</sup> bzw. JAK2<sup>VF/+</sup> Granulozyten näher zu untersuchen, wurde eine Genexpressionsanalyse mittels RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) durchgeführt. Die Granulozyten aus dem Knochenmark wurden mittels „negativer“ MACS Separation in unserem Labor isoliert, mit immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 bzw. BSA stimuliert und die RNA-Seq von der Firma Genewiz® von Azenta Life Science (GENEWIZ Germany GmbH) durchgeführt (siehe Abbildung 26A).

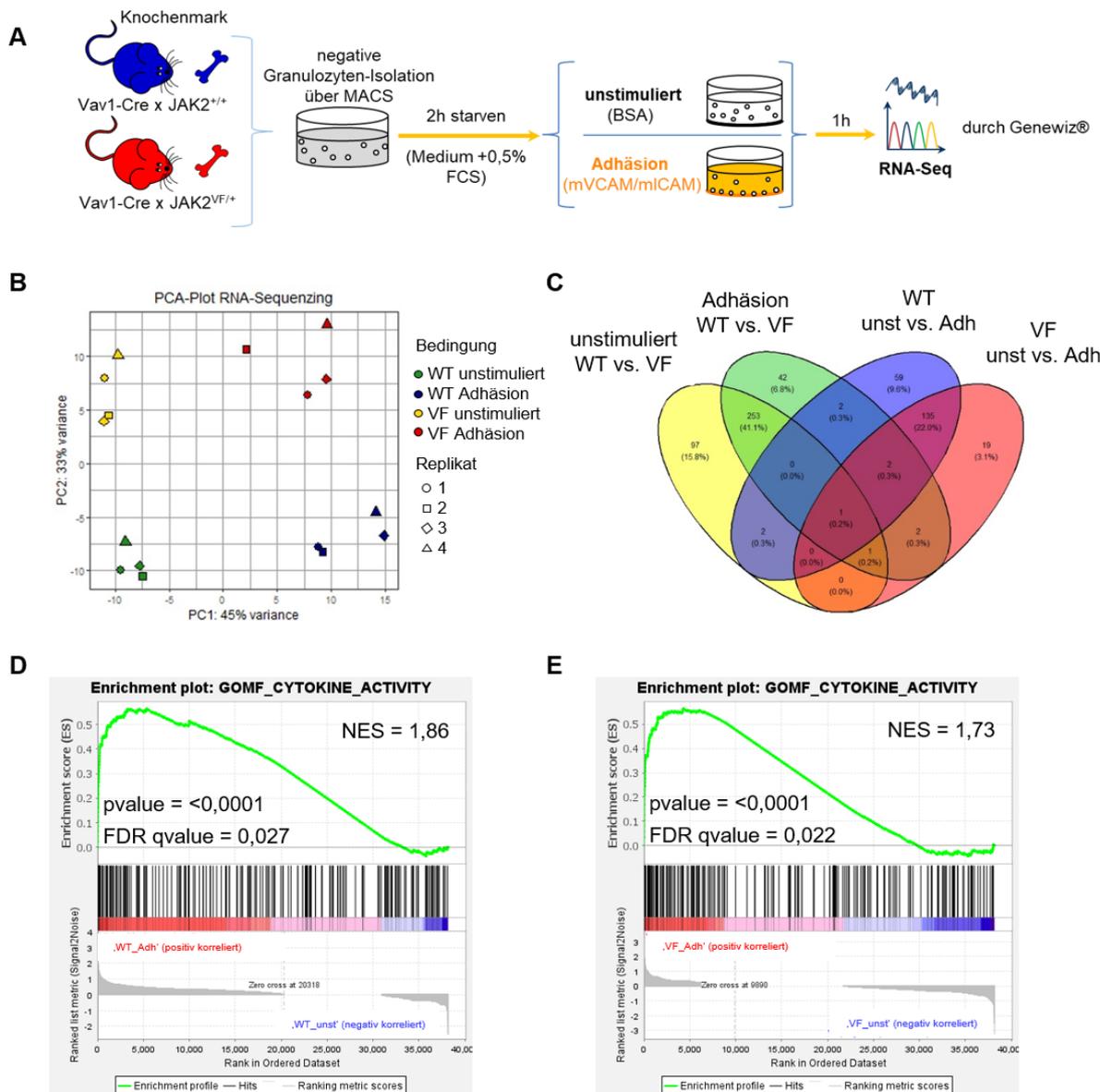
Die Hauptkomponentenanalyse (engl.: *Principal Component Analysis*; PCA) der RNA-Sequenzierung zeigte eine deutliche Trennung aller untersuchten Gruppen (siehe Abbildung 26B). Die ersten beiden Hauptkomponenten (PC) erklären 45 % und 33 % der Variation zwischen den untersuchten Gruppen. PC1 separiert unstimulierte Zellen von adhärenen Zellen und PC2 JAK2<sup>+/+</sup> von JAK2<sup>VF/+</sup> Zellen. Die DESeq2 Analyse zeigte zahlreiche differentiell regulierte Gene. Dabei wurden Gene mit einem p-Wert < 0,05 und einem

$\log_2 \text{fold} > 1$  als differentiell exprimiert definiert. Es lagen sowohl Adhäsions-induzierte als auch mutationsbedingte Veränderungen vor (siehe Abbildung 26C). Es wurden beispielsweise 255 Gene sowohl in unstimulierten als auch adhärenen JAK2<sup>VF/+</sup> Zellen im Vergleich zu JAK2<sup>+/+</sup> Zellen differentiell exprimiert. Dabei handelt es sich unter anderem um Gene der Erythrozytenentwicklung und –Differenzierung, Hämatopoese und Megakaryozyten-differenzierung. Weiterhin wurden 138 Gene unabhängig von der Mutation nach Adhäsion an mVCAM-1/mICAM-1 hochreguliert. In JAK2<sup>+/+</sup> Granulozyten wurden zusätzlich 63 Gene und in JAK2<sup>VF/+</sup> Granulozyten 22 Gene nach Adhäsion differentiell exprimiert.

Signifikant differentiell exprimierte Gene nach Adhäsion wurden gemäß ihrer Genontologie (GO) geclustert und die Anreicherung mittels Exakter Fisher-Test durch die Firma Genewiz® getestet. Der deutlichste, hochregulierte biologische Prozess war dabei die „Entzündungsreaktion“ (GO:0006954 ~ *inflammatory response*). Dieser zeigte sowohl in JAK2<sup>+/+</sup> als auch JAK2<sup>VF/+</sup> Granulozyten die signifikanteste Anreicherung nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1.

Eine genauere Genmengen Anreicherungsanalyse (engl.: *Gene Set Enrichment Analysis*; GSEA) wurde durchgeführt. Es konnte ebenfalls eine Anreicherung vieler unterschiedlicher Gensätze gefunden werden. Exemplarisch wurde der „GOMF\_CYTOKINE\_ACTIVITY“ Term (GO:0005125~ *cytokine activity*) näher untersucht. Dieser umfasst eine Vielzahl inflammatorischer Marker.

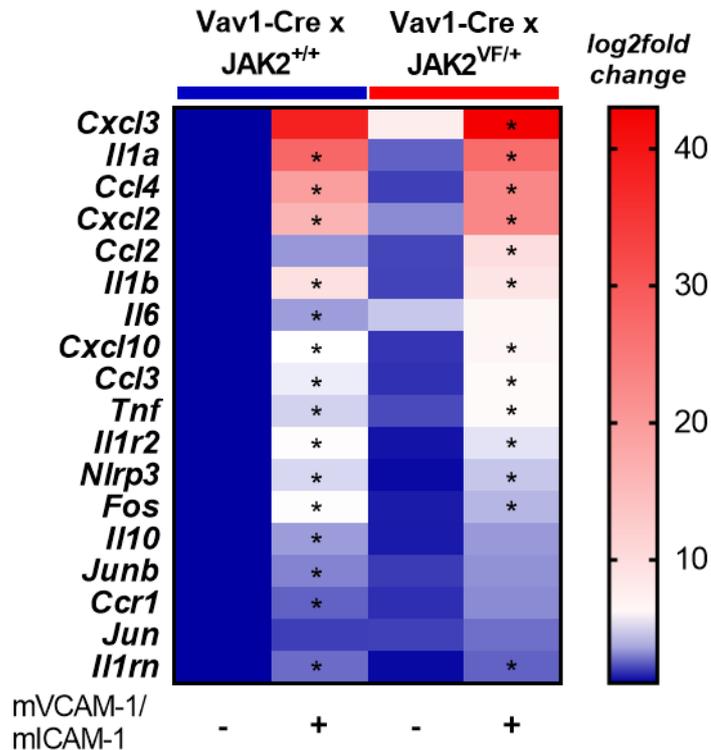
Bei der näheren Untersuchung dieses „Zytokin-Aktivitäts“-Gensatzes konnte ein normalisierter Anreicherungs-Score (engl.: *normalized enrichment score*; NES) von 1,86 bzw. 1,73 mit einer Falschentdeckungsrate (FDR q-value) von 0,027 bzw. 0,022 bestimmt werden (siehe Abbildung 26D, E). Demnach war die Anreicherung der durch Adhäsion positiv regulierten Gene dieses Gensatzes in JAK2<sup>+/+</sup> und JAK2<sup>VF/+</sup> Zellen vergleichbar.



**Abbildung 26: Analyse der RNA-Sequenzierung isolierter Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> und JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen nach Stimulation mit immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1.** (A) Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (WT; n = 4) und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (VF; n = 4) adhären für 1 h auf immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels RNA-Sequenzierung durch die Firma Genewiz®. Die (B) PCA-Analyse und das (C) Venn-Diagramm der differentiell exprimierten Gene wurde mittels R durchgeführt bzw. erstellt. Die Gengen-Anreicherungsanalyse (GSEA) zwischen den unstimulierten (unst) und adhären (Adh) (D) JAK2-WT (WT) bzw. (E) JAK2-V617F-mutierten (VF) Zellen wurde mittels GSEAv4.3.2 (Broad Institut) durchgeführt. Die normalisierte Anreicherungsscore ist als NES und die Falschentdeckungsrate als FDR *q-value* angegeben.

Der GO:0005125 Gensatz umfasst 236 Gene. In Abbildung 27 ist eine Auswahl dieser Gene in unstimulierten bzw. adhären JAK2<sup>+/+</sup> und JAK2<sup>VF/+</sup> Granulozyten mit dessen *read counts*, normalisiert auf die unstimulierten JAK2<sup>+/+</sup> Granulozyten, dargestellt. Interessanterweise induziert die Stimulation mit mVCAM-1/mICAM-1 eine Vielzahl pro-inflammatorischer Chemokine, Zytokine und weiterer Marker wie *Nlrp3* um das 1,97-43,0-fache. Neben *Cxcl2*, *Cxcl10*, *Ccl2*, *Ccl4*, *Il1a*, *Il1b*, *Il6* und *Tnf* werden auch Transkriptionsfaktoren wie *Jun* und *Fos*

nach Adhäsion differentiell exprimiert (siehe Abbildung 27). Die Veränderungen (*log2fold change*) nach Rezeptor-Liganden-Interaktion waren dabei zwischen beiden Genotypen vergleichbar bis hin zu einem leicht verstärktem Resultat in den JAK2<sup>+/+</sup> Granulozyten.



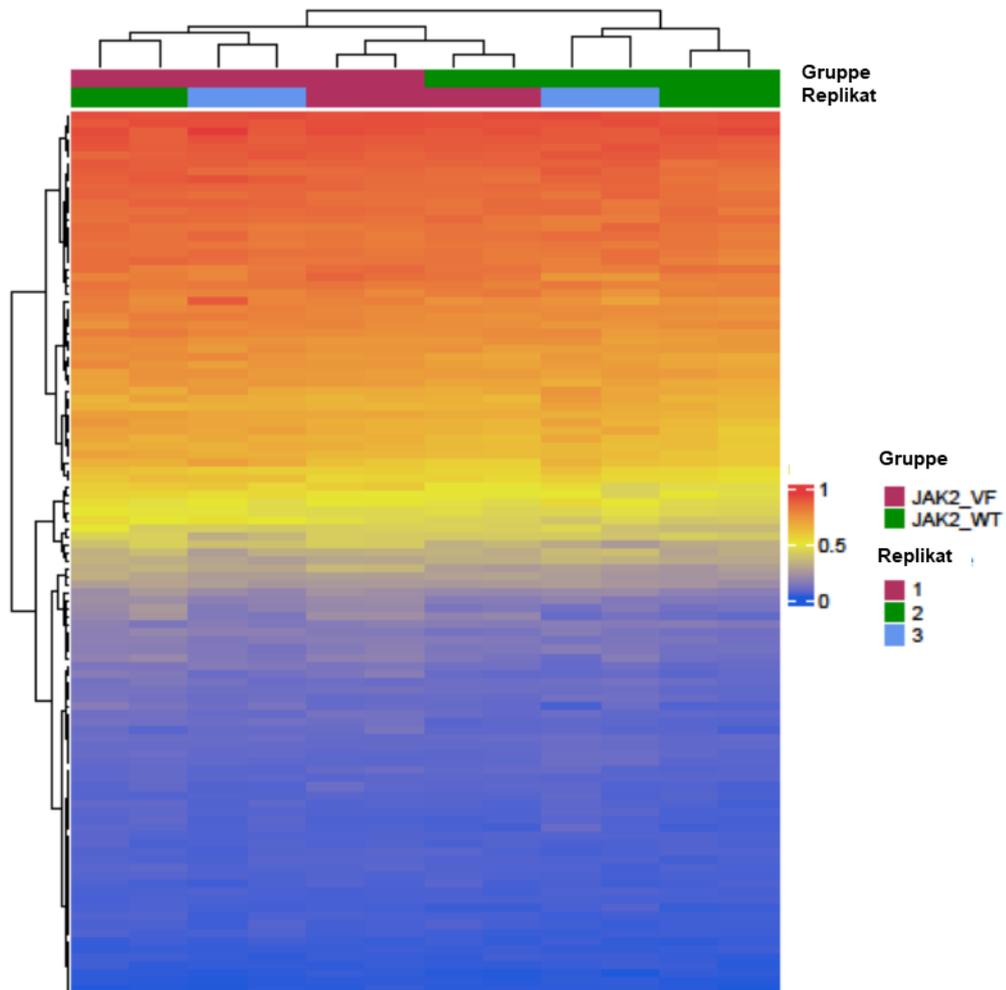
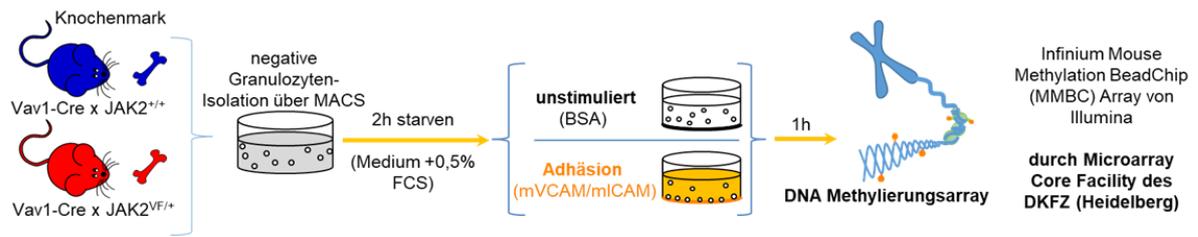
**Abbildung 27: Genexpressionsänderungen in isolierten Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2 Mäusen vor und nach Stimulation mit immobilisiertem mVCAM-1/miCAM-1.** Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (n = 4) und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (n = 4) adhärten für 1 h auf immobilisiertem mVCAM-1/miCAM-1. Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels RNA-Sequenzierung durch die Firma Genewiz®. Die Genexpressionsänderung (*log2fold change*) ausgewählter Gene sind normiert auf die unstimulierten JAK2<sup>+/+</sup> Zellen als Heatmap dargestellt. Differentiell exprimierte Gene nach Adhäsion (deseq2, padj < 0.05, *log2fold change* > 1) sind markiert (\*).

Bei Betrachtung der *read counts* der einzelnen Gene zeigten sich jedoch teilweise Unterschiede zwischen den unstimulierten Granulozyten der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> und Vav1-Cre x JAK<sup>VF/+</sup> Mäuse. So scheint beispielsweise signifikant mehr *Ccl4*, *Il1b* und *Nlrp3* in unstimulierten JAK2-V617F-mutierten Granulozyten (JAK2<sup>VF/+</sup>) exprimiert zu werden im Vergleich zu JAK2<sup>+/+</sup> Granulozyten (unveröffentlichte Daten). Dies deutet darauf hin, dass die JAK2-V617F-mutierten Zellen bereits ohne Stimulation voraktiviert vorliegen. Adhäsion induziert dabei einen weiteren Anstieg dieser Genexpression auf vergleichbare Level zwischen JAK2<sup>+/+</sup> und JAK2<sup>VF/+</sup> Zellen.

Neben den Treibermutationen<sup>6-15</sup> sind weitere Mutationen auch in der epigenetischen Regulation beschrieben<sup>45-47</sup>. Um zu untersuchen, ob eine mögliche Voraktivierung der JAK2-V617F-mutierten Zellen oder aber der Adhäsions-induzierte mRNA Anstieg durch Veränderungen in der DNA-Methylierung verursacht wurden, wurden identische Proben

generiert und die DNA-Methylierung analysiert. So wurden Granulozyten isoliert und mit immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 bzw. BSA für 1 h stimuliert. Es erfolgte eine DNA-Isolation in unserem Labor. Die Analyse der DNA-Methylierung erfolgte am DKFZ Heidelberg (NCT - *Section Translational Cancer Epigenomics*) durch Dr. rer. nat. Mariam Hakobyan und PD Dr. med. Daniel Lipka sowie der dortigen *Corefacility*.

Die globalen Methylierungsdaten zeigten im Vergleich zur normalen Maus-Hämatopoese, dass die JAK2-V617F-mutierten Granulozyten einen verstärkten Vorläufercharakter aufwiesen im Vergleich zu JAK2<sup>+/+</sup> Granulozyten (siehe Anhang 1). Es konnten jedoch keine Adhäsions-induzierten Veränderungen des Methylierungsmusters beobachtet werden. Die nähere Betrachtung der in Abbildung 27 dargestellten Gene zeigte keine deutlichen Unterschiede zwischen unstimulierten und adhärenen Zellen ebenso wie zwischen JAK2<sup>V617F/+</sup> und JAK2<sup>+/+</sup> Granulozyten (siehe Abbildung 28). Das Methylierungsprofil der adhärenen Granulozyten clusterte dabei zusammen mit der jeweiligen unstimulierten Kontrolle. Bei dem dargestellten Methylierungsmuster ist jedoch zu beachten, dass der verwendete Assay unterschiedliche viele CpGs pro Gen abdeckt (siehe Anhang 2) und somit die Gene unterschiedlich stark abgebildet werden. Die untersuchten CpGs befinden sich zusätzlich in unterschiedlichen Lokalisationen. So haben beispielsweise Methylierungen von Enhancer-Elementen eine abweichende Bedeutung als die eines Promotors. Derzeit ist die Interpretation von Methylierungsdaten auf Einzelgen-Ebene jedoch noch schwierig, da eine Hyper- oder Hypomethylierung nicht zwangsläufig mit einer veränderten Transkription assoziiert ist. Da jedoch keine starken Unterschiede aufgrund der Mutation oder der Stimulation nachweisbar waren, wird davon ausgegangen, dass kein epigenetischer Mechanismus in den JAK2-V617F-mutierten Granulozyten als auch keine Adhäsions-induzierte epigenetische Veränderung zu erhöhter mRNA-Expression der untersuchten Gene führte.



**Abbildung 28: Methylierungsänderungen in isolierten Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2 Mäusen vor und nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1.** Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (JAK2<sub>WT</sub>; n = 4) und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (JAK2<sub>VF</sub>; n = 4) adhärten für 1 h auf immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 oder BSA. Methylierungsanalysen wurden im NCT - *Section Translational Cancer Epigenomics* (Heidelberg) durchgeführt und analysiert. Dargestellt sind die CpGs der in Abbildung 27 dargestellten Gene. Da die Ergebnisse der adhären Zellen mit denen der BSA-Kontrollen eines jeden Replikates zusammen clusteren, ist die Stimulation nicht einzeln gekennzeichnet.

Zusammenfassend konnten wir in den bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die Adhäsion an immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1 die mRNA-Expression pro-inflammatorischer Marker in sowohl in hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen (Lin<sup>-</sup>) als auch differenzierten Zellpopulationen wie B-Zellen und Granulozyten induziert. Diese ist jedoch zumeist von der JAK2-V61F Mutation unabhängig und scheint auch nicht durch epigenetische Veränderungen verursacht zu sein. Dennoch waren Unterschiede in den Expressionsmustern der

unterschiedlichen Zellpopulationen vorhanden. Dies deutet auf einen meist JAK2-V617F-unabhängigen, VCAM-1/ICAM-1-vermittelten Mechanismus hin, der zu einer zelltyp-spezifischen Expression pro-inflammatorischer Zytokine führte. Dies könnte erste Hinweise darauf geben, dass der Mechanismus der Integrin-Adhäsion an den erhöhten Zytokinspiegeln in JAK2-V617F-positiven MPN beteiligt ist.

#### **4.3 VCAM-1/ICAM-1-Stimulation reguliert IL-1 $\beta$ Proteinexpression in hämatopoetischen Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells**

Zytokine werden auf mehreren Ebenen streng reguliert. So gibt es Regulationsmechanismen auf transkriptionaler<sup>633,634</sup>, translationaler und post-translationaler Ebene, sowie Mechanismen, die die Stabilität der mRNA<sup>634–638</sup> und der reifen Zytokine beeinflussen können. So ist das Vorhandensein von hoch-regulierten mRNA-Spiegeln nicht zwangsläufig mit einem Anstieg von funktionalem Protein verbunden. Um zu untersuchen, ob Adhäsion neben den erhöhten mRNA-Leveln auch die Proteinexpression von IL-1 induziert, wurde die IL-1 Expression nach Adhäsion in ausgewählten Zellpopulationen auf Proteinebene untersucht.

Die Zellpopulationen (Lin<sup>-</sup>, Lin<sup>+</sup>, B-Zellen, Granulozyten) wurden gemäß 3.2.1.3 isoliert, 6 h auf einer mit mVCAM-1/mICAM-1 beschichteten Zellkulturplatte inkubiert, die Zellen anschließend lysiert und das Volumen des Zellkulturüberstandes reduziert (siehe 3.4.1). Die Lysate und die reduzierten Überstände wurden im ELISA analysiert. Die resultierenden Konzentrationen entsprechen somit der intrazellulären IL-1 Konzentration bzw. dem sekretierten IL-1 im Überstand.

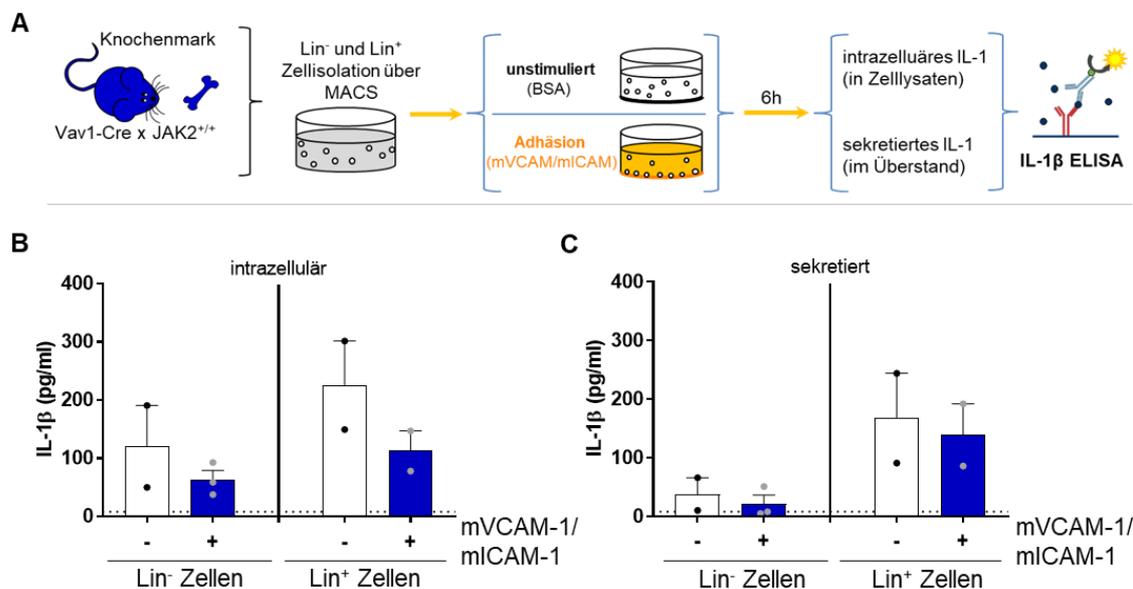
Überraschenderweise konnte kein IL-1 $\alpha$  weder in unstimulierten oder adhären Zellen noch im Überstand nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Die Positivkontrollen mit LPS bzw. LPS/ATP-stimulierten Granulozyten zeigten, dass die Zellen IL-1 $\alpha$  exprimieren als auch Inflammasom-vermittelt sekretieren können (unveröffentlichte Daten).

##### **4.3.1 Einfluss von Adhäsion auf die intrazelluläre Expression und Sekretion von IL-1 $\beta$ Protein in isolierten hämatopoetischen Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen**

Bei der Isolation der Lin<sup>-</sup> Zellen (negative Selektion) wurden die dabei positiv selektierten Lin<sup>+</sup> Zellen (umfassen alle reifen Zellpopulationen) ebenfalls gesammelt und für die Proben-gewinnung für ELISA Analysen verwendet (siehe Abbildung 29A). Um ausreichend Zellen für eine ELISA Untersuchung zu haben, mussten die Lin<sup>-</sup> Zellen von je zwei Mäusen gepoolt werden. Aufgrund des 3R-Prinzips und der Reduktion der Versuchstieranzahl wurde lediglich

ein Experiment mit einer sehr geringen Anzahl von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen (n = 4-6) als Konzeptnachweis (engl.: *Proof of Concept*) durchgeführt.

Der verwendete anti-IL-1 $\beta$ -ELISA erkennt gemäß Herstellerangaben die reife Form des IL-1 $\beta$ . In den Lin<sup>-</sup> Zellen konnten geringere intrazelluläre IL-1 $\beta$  Konzentrationen (120,5  $\pm$  70,2 pg/ml) im Vergleich zu Lin<sup>+</sup> Zellen (225,5  $\pm$  75,9 pg/ml) nachgewiesen werden. In beiden Zellgruppen führte die VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion jedoch zu einer verminderten intrazellulären IL-1 $\beta$  Konzentration (0,52-fach; 0,50-fach) im Vergleich zur unstimulierten BSA-Kontrolle (siehe Abbildung 29B).



**Abbildung 29: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion reduziert intrazelluläres IL-1 $\beta$  in isolierten Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen, aber induziert keine IL-1 $\beta$  Sekretion.** Der Versuchsaufbau ist (A) schematisch dargestellt. Der Einfluss von Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 auf (B) intrazelluläres sowie (C) in den Zellkulturüberstand sekretiertes, reifes IL-1 $\beta$  in isolierten Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen (1 x 10<sup>6</sup> Zellen) wurde mittels ELISA analysiert. Die eingezeichnete Linie (...) kennzeichnet das Detektionslimit des verwendeten anti-IL-1 $\beta$  ELISA (reifes IL-1 $\beta$ ). Alle Messwerte, die unterhalb der Detektionsgrenze (<8pg/ml) lagen, wurden anhand der Standardkurve extrapoliert. Alle Messwerte sind als Mean + SEM (n=2-3) dargestellt.

Eine intrazelluläre Konzentrationsabnahme des IL-1 $\beta$  deutet auf eine Proteinsekretion, auf Adhäsions-induzierte regulatorische Mechanismen oder eine verminderte Proteinexpression hin. Um eine mögliche Adhäsions-induzierte Proteinsekretion zu untersuchen, wurden die Zellkulturüberstände ebenfalls bezüglich der enthaltenen IL-1-Konzentration analysiert. Lin<sup>-</sup> Zellen zeigten erneut geringere Konzentrationen des sekretierten IL-1 $\beta$  (38,3  $\pm$  27,8 pg/ml) im Zellkulturüberstand verglichen mit den Zellkulturüberständen der Lin<sup>+</sup> Zellen (167,7  $\pm$  76,6 pg/ml). Der Konzentrationsunterschied des intrazellulären und sekretiertem IL-1 $\beta$  zwischen Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen ist möglicherweise auf die unterschiedlichen Zellpopulationen zurückzuführen oder auf einen Effekt der unterschiedlichen Isolationsmethode. Die Lin<sup>-</sup> Zellen

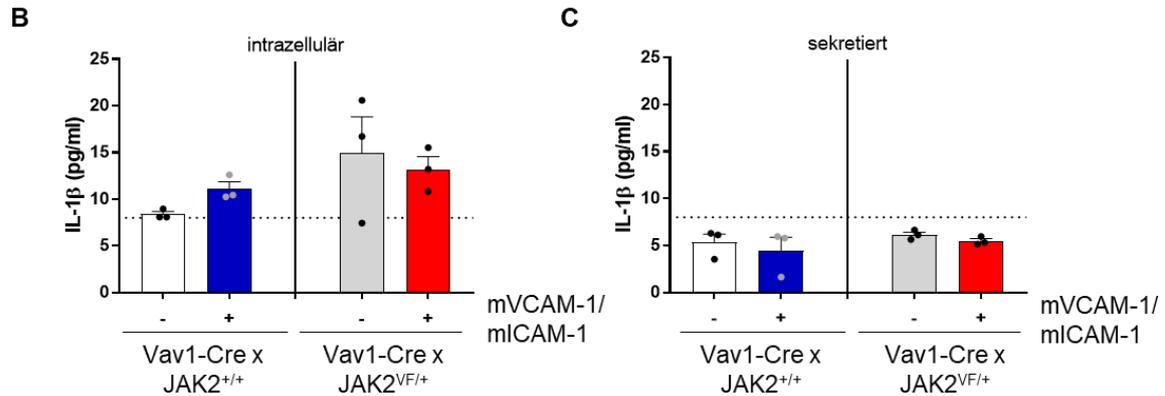
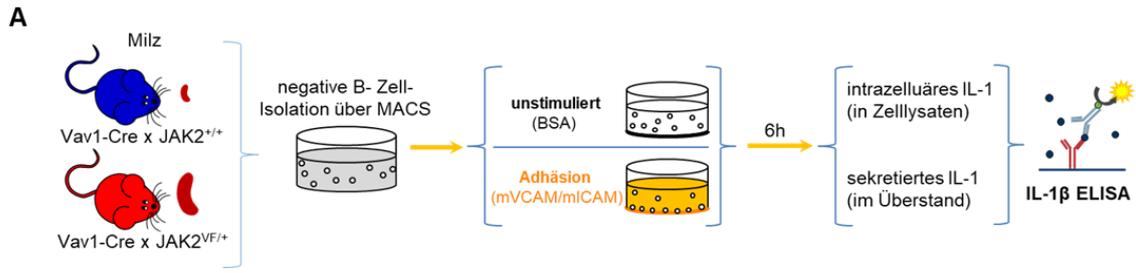
wurden mittels negativer Selektion und die Lin<sup>+</sup> Zellen mittels positiver Selektion zeitgleich isoliert. Eine positive Selektion kann aufgrund der Antikörpermarkierung und Interaktion mit den Isolationsbeads zu einer Aktivierung der Zellen führen.

Durch die Adhäsion an mVCAM-1/mICAM-1 kam es weder bei den Lin<sup>-</sup> Zellen noch bei den Lin<sup>+</sup> Zellen zu einem Anstieg des sekretierten IL-1 $\beta$  im Zellkulturüberstand verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (siehe Abbildung 29C). Demnach scheint die VCAM/ICAM-1-vermittelte Adhäsion keinen Einfluss auf die Menge des sekretierten IL-1 $\beta$  der Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen zu haben. Möglicherweise werden durch die Adhäsion dennoch regulatorische Mechanismen in den Zellen aktiviert, die in einer verminderten intrazellulären IL1 $\beta$  Konzentrationen resultieren.

#### **4.3.2 Einfluss von Adhäsion auf die intrazelluläre Expression und Sekretion von IL-1 $\beta$ Protein in isolierten B-Zellen**

Unstimulierte B-Zellen enthielten eine deutlich niedrigere IL-1 $\beta$  Konzentration verglichen mit den Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen des Knochenmarks (vgl. Abbildung 29, 30). Der verwendete ELISA erkennt dabei reifes IL-1 $\beta$ . Die IL-1 $\beta$  Konzentration war in den JAK2<sup>VF/+</sup> B-Zellen ( $14,9 \pm 3,9$  pg/ml) durchschnittlich um das 1,78-fache höher als in den JAK2<sup>+/+</sup> B-Zellen ( $8,4 \pm 0,3$  pg/ml).

In den B-Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäuse führte die Adhäsion an mVCAM-1/mICAM-1 zu einem geringen Anstieg des intrazellulären IL-1 $\beta$  ( $11,1 \pm 0,8$  pg/ml; siehe Abbildung 30B). In den B-Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse hingegen konnte kein eindeutiger Trend für den Einfluss von Adhäsion auf intrazelluläres IL-1 $\beta$  beobachtet werden. Demnach scheinen abweichende, mutationsbedingte Mechanismen vorzuliegen.

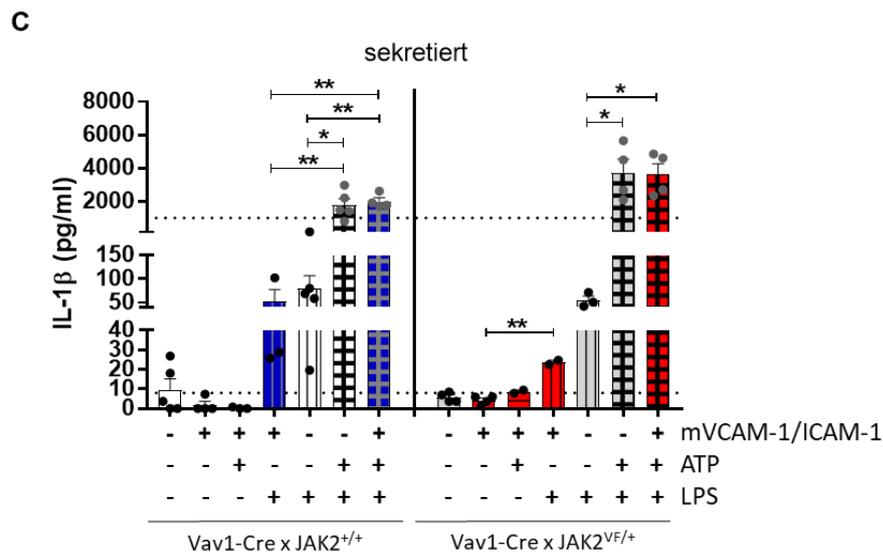
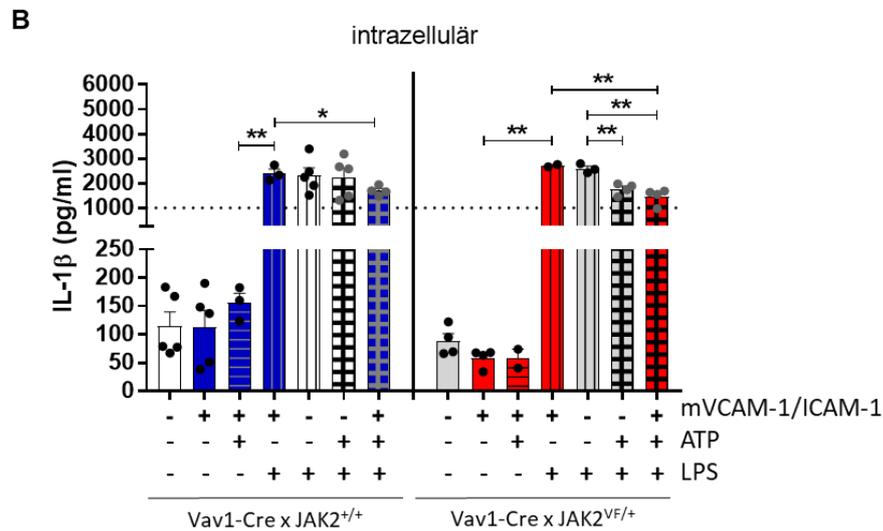
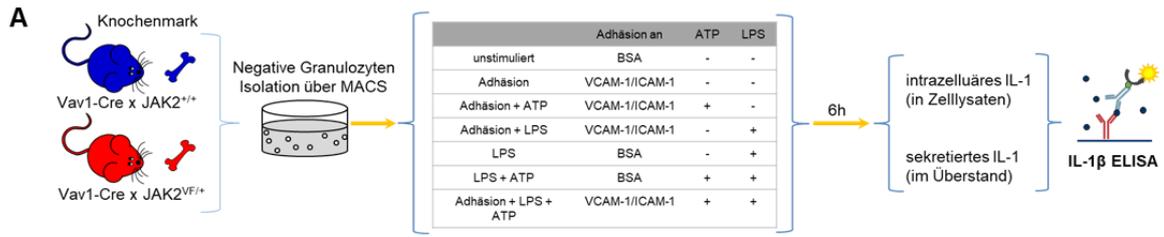


**Abbildung 30: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion erhöht intrazelluläres IL-1 $\beta$  in isolierten B-Zellen von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen, aber induziert keine IL-1 $\beta$  Sekretion.** Der Versuchsaufbau ist (A) schematisch dargestellt. Der Einfluss von Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 auf (B) intrazelluläres, sowie (C) in den Zellkulturüberstand sekretiertes, reifes IL-1 $\beta$  isolierter B-Zellen ( $1 \times 10^6$  Zellen) wurde mittels ELISA analysiert. Die B-Zellen wurden aus der Milz isoliert. Die eingezeichnete Linie (...) kennzeichnet das Detektionslimit des verwendeten anti-IL-1 $\beta$  ELISA (reifes IL-1 $\beta$ ). Alle Messwerte, die unterhalb der Detektionsgrenze ( $< 8$  pg/ml) lagen, wurden anhand der Standardkurve extrapoliert. Alle Messwerte sind als Mean + SEM ( $n=3$ ) dargestellt.

Unabhängig von der Mutation und der Stimulation konnten nur sehr geringe Mengen an sekretiertem IL-1 $\beta$  im Überstand der B-Zellen nachgewiesen werden (4,4 – 6,1 pg/ml; siehe Abbildung 30C). Die Konzentrationen lagen alle unter dem Detektionslimit ( $< 8$  pg/ml) des verwendeten ELISA und wurden extrapoliert. Genaue Aussagen sind demnach nicht möglich. Dennoch wird basierend auf den vorliegenden Daten davon ausgegangen, dass die Adhäsion auch in den B-Zellen keine IL-1 $\beta$  Sekretion induziert. Aufgrund der geringen, nachgewiesenen IL-1 $\beta$  Konzentration wird auch nur eine geringe Bedeutung der B-Zellen in der Adhäsions-induzierten Inflammation vermutet.

#### 4.3.3 Einfluss von Adhäsion auf die intrazelluläre Expression und Sekretion von IL-1 $\beta$ Protein in isolierten Granulozyten

Granulozyten zeigten die stärkste Adhäsions-induzierte Zytokin mRNA-Expression unter den untersuchten Zellpopulationen. Daher wurden isolierte Granulozyten aus Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> ( $n = 5$ ) und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> ( $n = 4$ ) Mäusen ebenfalls bezüglich ihrer Adhäsions-induzierten intrazellulären bzw. sekretierten IL-1 $\beta$  Konzentration untersucht (siehe Abbildung 31A).



**Abbildung 31: VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion reduziert intrazelluläres IL-1β in Knochenmarks-Granulozyten der JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse, aber induziert keine IL-1β Sekretion.** Der Versuchsaufbau ist (A) schematisch dargestellt. Der Einfluss von Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 auf (B) intrazelluläres sowie (C) in den Zellkulturüberstand sekretiertes, reifes IL-1β isolierter Knochenmarks-Granulozyten ( $1 \times 10^6$  Zellen) wurde mittels ELISA analysiert. Für genauere Analysen wurden die Zellen mit ATP (▨), LPS (▩) oder beiden (▧) stimuliert. Die eingezeichneten Linien (...) kennzeichnen das Detektionslimit des verwendeten anti-IL-1β ELISA (reifes IL-1β). Alle Messwerte, die außerhalb der Detektionsgrenzen ( $<8\text{pg/ml}$ ;  $>1000\text{pg/ml}$ ) lagen, wurden anhand der Standardkurve extrapoliert. Alle Messwerte sind als Mean + SEM ( $n=2-5$ ) dargestellt. Welch's T-Test mit  $P^* < 0,05$ ;  $P^{**} < 0,01$ .

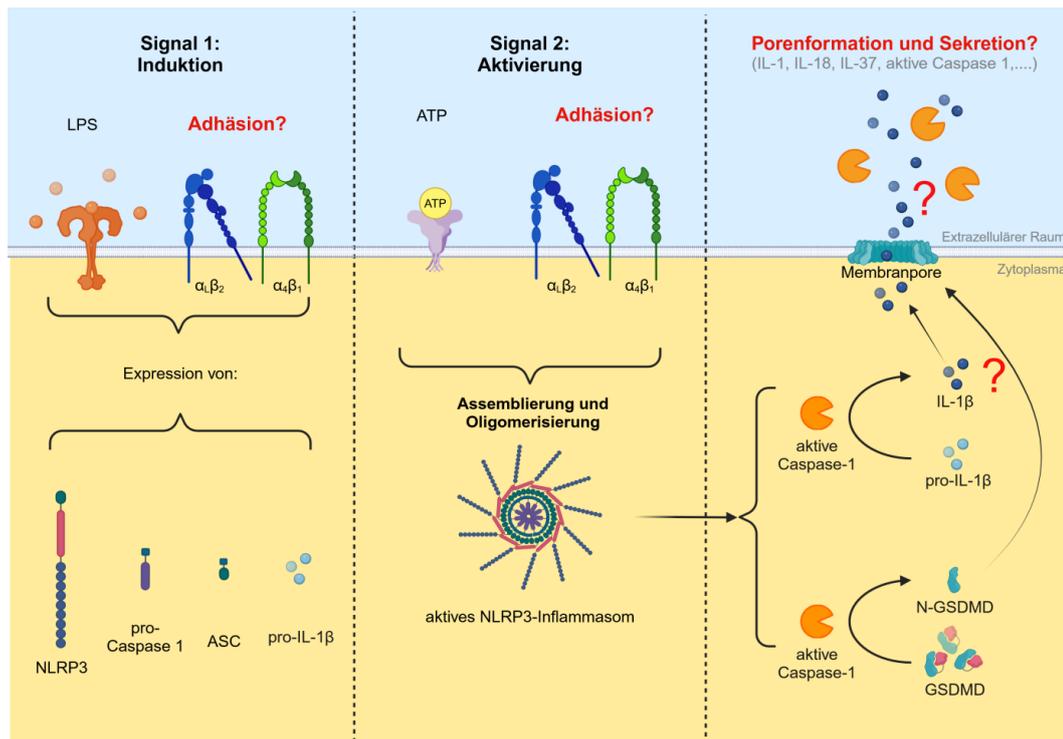
Unstimulierte Granulozyten aus dem Knochenmark von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen ( $115,0 \pm 24,9 \text{ pg/ml}$ ) enthalten durchschnittlich mehr reifes IL-1β als die Granulozyten der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse ( $88,5 \pm 13,1 \text{ pg/ml}$ ). In JAK2<sup>+/+</sup> Granulozyten war kein eindeutiger

Einfluss der Adhäsion auf die intrazelluläre IL-1 $\beta$  Konzentration nachweisbar. In JAK2-V617F-mutierten Granulozyten führt die Adhäsion an mVCAM-1/mICAM-1 hingegen zu einer Reduktion des reifen, intrazellulären IL-1 $\beta$  ( $58,3 \pm 8,0$  pg/ml; siehe Abbildung 31B).

Im Zellkulturüberstand der unstimulierten JAK2<sup>+/+</sup> Granulozyten ( $9,7 \pm 5,4$  pg/ml) war ebenfalls 2,3-fach mehr IL-1 $\beta$  nachweisbar im Vergleich zu JAK2-V617F-positiven Granulozyten ( $4,3 \pm 1,1$  pg/ml). Die Adhäsion der Granulozyten auf immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 schien unabhängig der Mutation keinen deutlichen Einfluss auf die Sekretion von IL-1 $\beta$  zu haben (siehe Abbildung 31C). Genaue Aussagen können nicht getroffen werden, da die Zytokinkonzentrationen im Überstand der unstimulierten und adhärenen Zellen zumeist unterhalb der Nachweisgrenze lagen und daher nur extrapolierte Daten dargestellt werden konnten.

Folglich induziert Adhäsion an VCAM-1/ICAM-1 keinen Anstieg von reifem, intrazellulärem IL-1 weder in Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen noch in Granulozyten, als auch keine IL-1 Sekretion in den Zellkulturüberstand aller untersuchten Zellpopulationen. In Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen sowie Granulozyten verringert sich die intrazelluläre IL-1 $\beta$  Konzentration nach Adhäsion zusätzlich. Möglicherweise werden regulatorische Mechanismen induziert. Zudem wird angenommen, dass weitere Signale und Faktoren notwendig sind, um eine erfolgreiche Sekretion zu induzieren.

Da IL-1 $\beta$  als Pro-Form exprimiert<sup>157</sup> wird und auch in seinem reifen Zustand nicht über den ER-Golgi-Apparat sekretiert werden kann,<sup>246</sup> bedarf es einer Reifung sowie einer unkonventionellen Sekretion. Es sind verschiedene, teils Zellpopulations-abhängige Signalwege bekannt (siehe 1.2.1.3). Die Reifung und Sekretion wird oft als NLRP3-Inflammasom- und Caspase-1-abhängig beschrieben.<sup>207,229,283</sup> Das NLRP3-Inflammasom kann *in vitro* über LPS (Induktions-Signal)<sup>263,278</sup> und ATP (Aktivierungs-Signal)<sup>263,278</sup> induziert sowie aktiviert werden, was ebenfalls zu einer Caspase-1-Aktivierung<sup>207</sup> führt. Adhäsion alleine kann (basierend auf den vorliegenden Daten) keine Sekretion induzieren, dennoch wurde in einigen Zellpopulationen eine erhöhte Caspase-1 Aktivität nach Adhäsion beobachtet. Daher vermuten wir, dass Adhäsion möglicherweise dennoch als Teil der Inflammasom-Aktivierungskaskade fungieren kann und in Kombination mit Induktions- bzw. Aktivierungssignalen eine Sekretion des IL-1 bewirkt (siehe Abbildung 32).



**Abbildung 32: Schematische Hypothesendarstellung – Kann die Adhäsion an VCAM-1/ICAM-1 als Induktions- bzw. Aktivierungssignal in der Inflammasom-Aktivierungskaskade wirken und die Sekretion von IL-1 induzieren?** LPS ist ein klassisches Signal zur Induktion der NLRP3-Inflammasomexpression. ATP dient dabei als Aktivierungssignal und kann sowohl die Reifung als auch Sekretion von IL-1 induzieren. Es wird postuliert, dass Adhäsion das Induktions- oder Aktivierungssignal geben und so die Sekretion von IL-1 induzieren kann. (erstellt mit BioRender.com)

Um zu überprüfen, ob die Adhäsion an immobilisierten mVCAM-1/mICAM-1 selbst das Induktions- oder Aktivierungssignal der Inflammasom-Aktivierungskaskade induzieren kann, wurden adhärenente Granulozyten zusätzlich mit LPS oder ATP bzw. beiden Faktoren gleichzeitig stimuliert (siehe Abbildung 31A). Die nachfolgenden Ergebnisse konnten sowohl in den JAK2<sup>+/+</sup> als auch JAK2<sup>VF/+</sup> Granulozyten nachgewiesen werden.

Die Co-Stimulation adhärenenter Zellen (an mVCAM-1/mICAM-1) mit ATP zeigte keine Konzentrationsänderungen des intrazellulären und sekretierten IL-1β im Vergleich zu den adhärenenten Zellen allein (siehe Abbildung 31). Demnach fand keine Adhäsions/ATP-vermittelte IL-1 Sekretion statt. Dies deutet darauf hin, dass Adhäsion nicht als Induktions-Signal des NLRP3 Inflammasoms in den analysierten Zellen wirkt.

Die Co-Stimulation adhärenenter Zellen (an mVCAM-1/mICAM-1) mit LPS resultierte in einem 21,3- bzw. 46,6- fachen Konzentrationsanstieg des intrazellulären IL-1β im Vergleich adhärenenten Zellen alleine. Die intrazelluläre Konzentration war dabei vergleichbar mit der alleinigen LPS-Stimulation (siehe Abbildung 31). Die Messwerte lagen oberhalb der Detektionsgrenze (> 1000 pg/ml), weshalb keine genaueren Aussagen getroffen werden können. Die zusätzliche LPS-Stimulation adhärenenter Granulozyten führte zudem zu einem geringen Anstieg von sekretiertem IL-1β im Vergleich zu adhärenenten Zellen allein. Dennoch

war die Konzentration im Zellkulturüberstand der Co-Stimulation deutlich niedriger als bei der LPS-Kontrolle (siehe Abbildung 31). Dies deutet auf einen inhibierenden, Adhäsions-induzierten Regulationsmechanismus der IL-1 $\beta$  Sekretion hin. Die Daten lassen zudem vermuten, dass Adhäsion ebenfalls nicht als Aktivierungssignal des NLRP3 Inflammasoms in den analysierten Zellen wirkt.

Als Positivkontrolle wurden die Granulozyten mit LPS bzw. LPS und ATP stimuliert. Durch die LPS-Stimulation kam es zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulärer IL-1 $\beta$  Konzentration und einem geringen Konzentrationsanstieg von sekretiertem IL-1 $\beta$ . Die zusätzliche ATP-Stimulation hingegen führte zu einer geringen Hemmung der intrazellulären IL-1 $\beta$  Konzentration und einem signifikanten Anstieg der sezernierten IL-1 $\beta$  Konzentrationen im Zellkulturüberstand. Die Daten bestätigen damit eine LPS-induzierte IL-1 $\beta$  Expression und eine LPS/ATP-vermittelte Sekretion (siehe Abbildung 31). Demnach sind die Zellen prinzipiell in der Lage IL-1 $\beta$  sowohl verstärkt zu exprimieren als auch zu sezernieren und es liegt kein Defekt im Pyroptose-Mechanismus vor.

Eine dreifache Stimulation mit Adhäsion, LPS und ATP resultiert in vergleichbaren IL-1 $\beta$  Konzentrationen im Zellkulturüberstand wie bei LPS und ATP stimulierten Granulozyten. Dies deutet darauf hin, dass Adhäsion an mVCAM-1/ICAM-1 zwar einen inhibitorischen Effekt auf die IL-1 $\beta$  Sekretion haben kann, aber dieser aber nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Demnach konnte kein Hinweis darauf gefunden werden, dass die VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion als induzierendes und/oder aktivierendes Signal der Inflammasom-Aktivierungskaskade in Granulozyten wirkt. Die Hypothese konnte demnach nicht bestätigt werden. Da es trotz Adhäsions-induzierter Zytokin mRNA-Expression und teilweise Adhäsions-induzierter Caspase-1 Aktivität, zu einer vermeintlichen Hemmung des intrazellulären bzw. sekretierten IL-1 $\beta$  in einigen Zellpopulationen kam, werden dennoch Adhäsions-induzierte Regulationsmechanismen vermutet.

#### **4.4 Charakterisierung Integrin-induzierter *Outside-in* Signalwege in myeloischen 32D JAK2/EPOR Progenitorzellen**

Technisch bedingt ist die Ausbeute an primären Zellpopulationen, die aus den Vav1-Cre x JAK2 Mäusen gewonnen werden kann, teilweise sehr gering und nicht ausreichend für nähere, mechanistische Untersuchungen. Aufgrund des 3R-Prinzips und der Versuchstierzahl-Reduktion<sup>639,640</sup> wurde deshalb auf das in der Literatur gut etablierte 32D JAK2-V617F/EPOR Rekonstitutionsmodell zurückgegriffen.<sup>27,421,641</sup> Hierbei werden myeloische JAK2-WT/EPOR oder JAK2-V617F/EPOR transfizierte 32D Progenitorzellen für die weiteren Analysen verwendet. Die Zelllinien verfügen über Eigenschaften der Granulozytenvorläufer und wurden bereits gut charakterisiert.<sup>642,643</sup> Unser Labor untersuchte in diesem Zellmodell beispielsweise

die Auswirkung der konstitutiv aktivierenden JAK2-V617F-Mutation auf die *inside-out* Signalgebung von Integrinen und der damit verbundenen verstärkten Adhäsion.<sup>422</sup> Die so erhaltenen Ergebnisse stimmten dabei sehr gut mit den Daten aus primären JAK2-V617F-positiven Granulozyten des Vav1-Cre JAK2-V617F Mausmodells<sup>422</sup> und den Daten aus primären Granulozyten von JAK2-V617F-positiven Patienten<sup>421</sup> überein.

#### **4.4.1 Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 induziert *outside-in* Signaling**

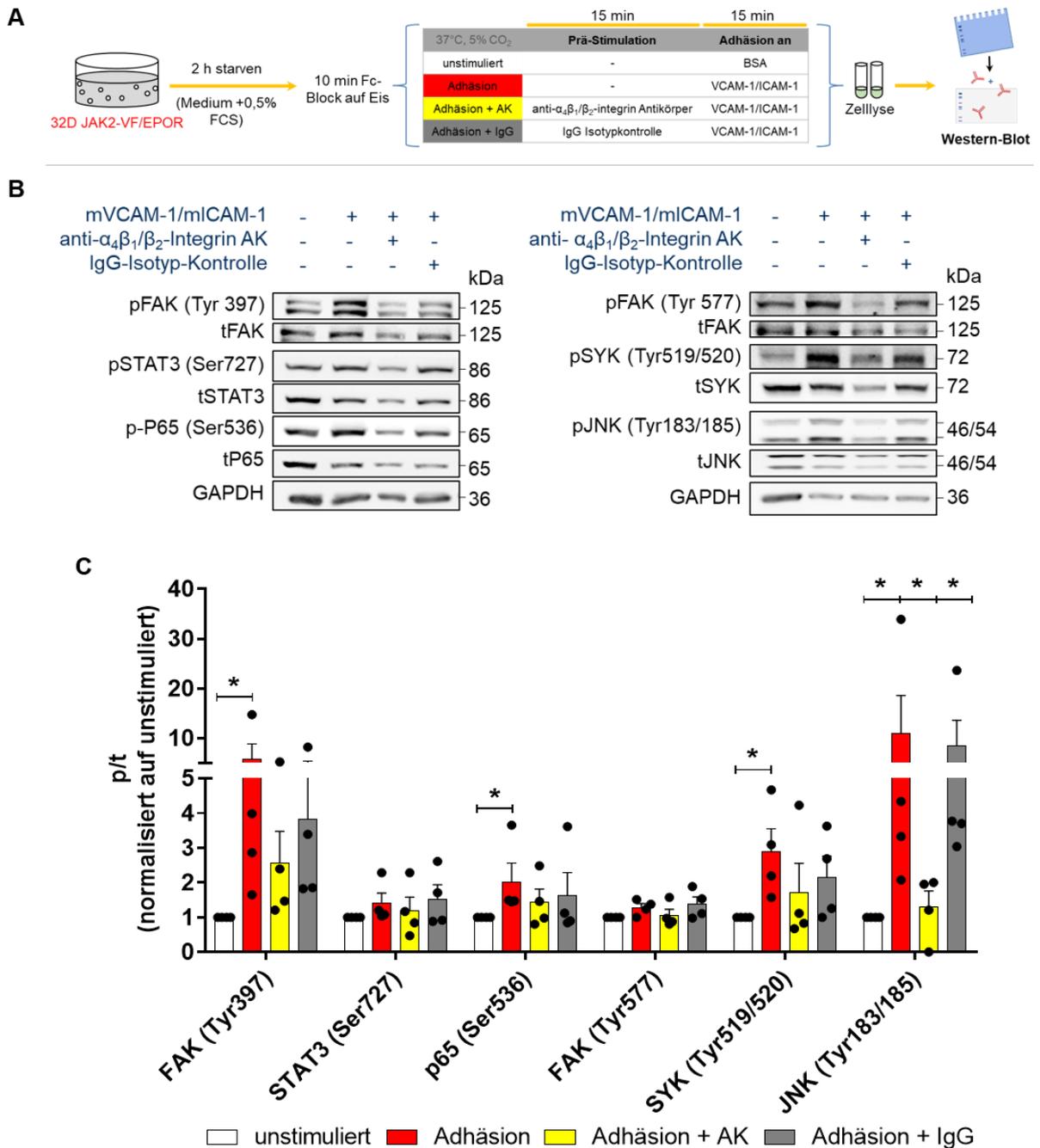
In der Literatur sind viele verschiedene *outside-in* Signalwege nach Integrin-Interaktion beschrieben (siehe 1.3.2)<sup>527,564,573–575,644</sup>. Eine Zusammenfassung dessen ist in Abbildung 11 dargestellt. Um den zugrundeliegenden, VCAM-1/ICAM-1-vermittelten Mechanismus in den 32D JAK2/EPOR Zellen zu untersuchen, wurden 32D JAK2-VF/EPOR Zellen auf immobilisiertem mVCAM-1 und mICAM-1 inkubiert, anschließend lysiert und im Western-Blot untersucht (siehe Abbildung 33A). Zunächst wurde ein kurzer Zeitverlauf (0 min, 15 min, 30 min) für einen optimalen Zeitpunkt getestet sowie die Lyse-Bedingungen optimiert. Als optimale Inkubationsdauer wurden 15 min für die folgenden Western-Blot Experimente festgelegt. Ebenso zeigte sich, dass eine direkte Lyse auf der beschichteten Zellkulturplatte erfolgen muss, um einen Signalverlust zu verhindern (unveröffentlichte Daten).

##### **4.4.1.1 $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-spezifische Adhäsion induziert *outside-in* Signaling in 32D JAK2/EPOR Zellen**

Für die Untersuchungen der Adhäsion-induzierten *outside-in* Signalgebung in dem vorliegenden Zellkulturmodell wurden Signalmoleküle ausgewählt, für die eine wichtige Rolle im *outside-in* Signaling anderer Zellmodelle in der Literatur beschrieben wurde.<sup>517,553,557,582,645–648</sup> Die für die Aktivierung bedeutsamen phosphorylierten Epitope wurden dabei der Literatur entnommen.<sup>521,645,649–659</sup> Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 induziert die Phosphorylierung kritischer Aktivierungsepitope von beispielsweise FAK, STAT3, Syk, NF $\kappa$ B (p65) und JNK in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (n = 4) (siehe Abbildung 33). Die Interaktion von 32D Zellen mit immobilisiertem Liganden führt demnach zur Induktion von *outside-in* Signalen und der Aktivierung Adhäsom-assoziiierter Proteine.

Um die Spezifität der induzierten Signalwege zu überprüfen, wurden die Zellen 15 min mit spezifischen anti- $\alpha_4\beta_1$ - und anti- $\beta_2$ -Integrin-Antikörpern bzw. den entsprechenden IgG-Isotyp-Kontrollen prä- sowie co-inkubiert. Im Anschluss an die Adhäsion wurden die Zellen lysiert und im Western-Blot untersucht. Die signifikant verstärkte Phosphorylierung von FAK, Syk, NF $\kappa$ B (p65) und JNK konnte unter Verwendung der spezifischen anti-Integrin-Antikörper (anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ ) gehemmt werden (siehe Abbildung 33B+C). Die IgG-Isotyp-Kontrollen zeigten dabei keine Unterschiede im Phosphorylierungsstatus der untersuchten Signalmoleküle. Demnach

findet ein  $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -spezifisches *outside-in Signaling* durch Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 statt, welches ebenfalls für weitere untersuchte Proteine (p38, AKT) beobachtet werden konnte (unveröffentlichte Daten).

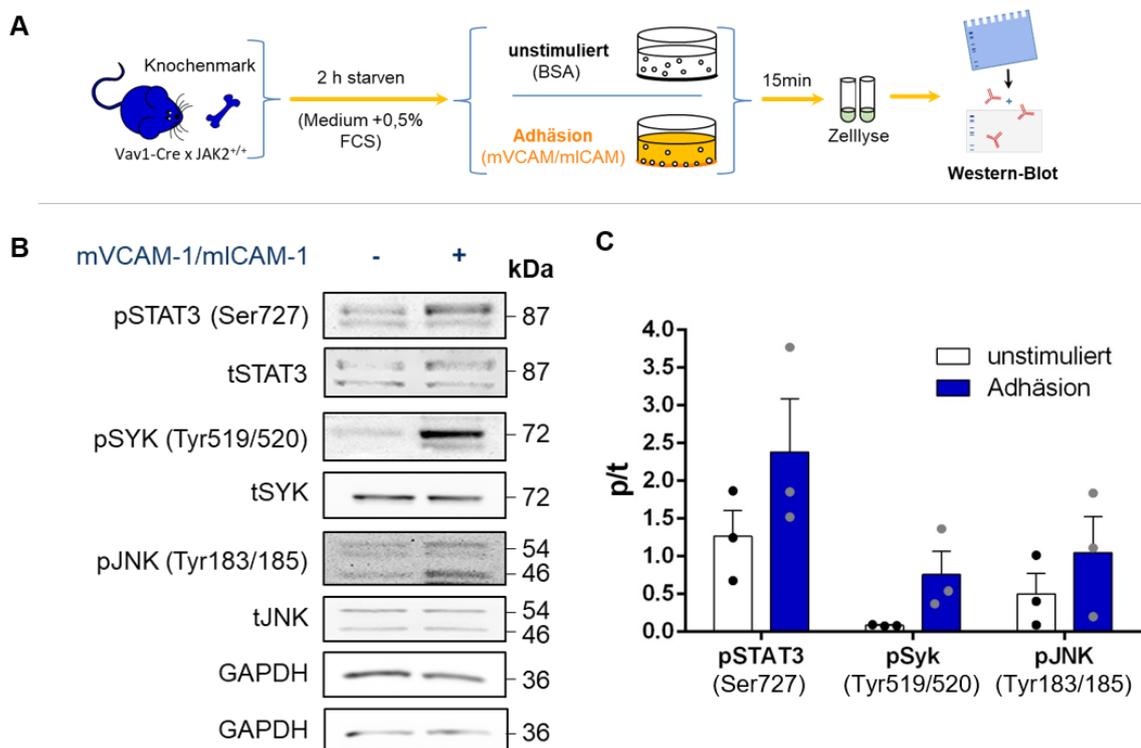


**Abbildung 33: Die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 induziert  $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin-spezifisches *outside-in Signaling* in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen.** Der Versuchsaufbau ist (A) schematisch dargestellt. Das VCAM-1/ICAM-1-Adhäsions-induzierte (rot) *outside-in Signaling* wurde mittels Western-Blot analysiert. Die Integrin-Spezifität wurde mittels anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Antikörper (gelb) oder den entsprechenden Isotyp-Kontrollen (grau) untersucht. Dargestellt sind (B) repräsentative Blots und (C) die semi-quantitative Analyse (Verhältnisse der phosphorylierten Fraktion zur Gesamt-(total)-Fraktion (p/t) normiert auf die unstimulierte Kontrolle) von 4 unabhängigen Replikaten. Mean + SEM. Mann-Whitney Test mit  $P^* < 0,05$ .

#### 4.4.1.2 Adhäsion induziert *outside-in Signaling* in Knochenmarkszellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäuse

Für eine erfolgreiche Western-Blot Analyse primärer Zellen wird eine hohe Zellzahl benötigt. Um dennoch den Nachweis der Aktivierung des Adhäsions-induzierten *outside-in Signaling* in primären Zellen zu erbringen, wurden das Knochenmark von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen (n = 3) isoliert und je 10 x 10<sup>6</sup> Zellen auf immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 oder BSA als Kontrolle für 15 min wie die Zellkulturproben inkubiert (siehe Abbildung 34). Die Proben wurden lysiert und eine Western-Blot Analyse bezüglich der im 32D Modell untersuchten Signalmoleküle durchgeführt.

Dabei zeigte sich, dass die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 ebenfalls die Phosphorylierung von STAT3, Syk und JNK in unselektierten Knochenmarkszellen induziert (Abbildung 34B). Der Nachweis von FAK und NFκB war unter den verwendeten Bedingungen nicht möglich.



**Abbildung 34: Die Adhäsion induziert *outside-in Signaling* in primären, unselektierten Knochenmarkszellen.** (A) Knochenmarkszellen von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen (n = 3) wurde isoliert, die Zellen *gestarved* (0,5 % FCS), für 15 min auf immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 bzw. BSA inkubiert, die Zellen lysiert und im Western-Blot untersucht. (B) Ein repräsentativer Blot sowie die (C) Semiquantifizierung von 3 unabhängigen Experimenten sind als Mean + SEM dargestellt.

Dennoch kann davon ausgegangen werden das Integrin-vermittelte Adhäsion *outside-in Signaling* in 32D als auch in primären Mauszellen des Knochenmarks induzieren kann.

#### 4.4.1.3 Charakterisierung der Adhäsions-induzierten *outside-in* Signalwege in 32D JAK2/EPOR Zellen

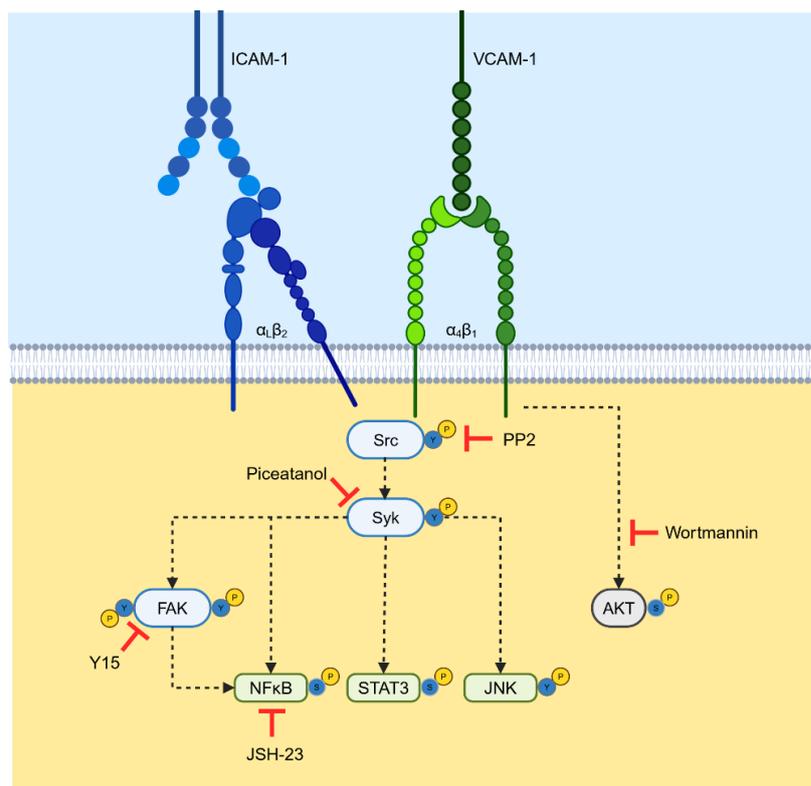
Um die Signalkaskade der beteiligten Signalmoleküle in den 32D JAK2/EPOR Zellen näher zu untersuchen, wurden unterschiedliche Inhibitoren für FAK, Syk, PI3K, NFκB und Src mittels Western-Blot getestet. Es wurden insgesamt sieben verschiedene Inhibitoren zunächst in drei verschiedenen Konzentrationen bezüglich ihrer hemmenden Wirkung auf Adhäsions-induzierte Signalgebung untersucht (siehe Tabelle 18). Es wurden dabei die folgenden Phosphorylierungsepitope analysiert: pFAK (Tyr577)<sup>651,652</sup>, pFAK (Tyr397)<sup>521,649,650</sup>, pSyk (Tyr519/520)<sup>655,656</sup>, pSTAT3 (Ser727)<sup>645,657</sup>, pAKT (Ser473)<sup>653</sup>, pNFκB (Ser536)<sup>658,659</sup>, und pJNK (Tyr183/185)<sup>654</sup>. Es wurden jeweils drei Replikate angefertigt. Anhand der phospho-zu-total-Verhältnisse (p/t) wurden geeignete Inhibitor-Konzentrationen für weitere Experimente ausgewählt (siehe Tabelle 18). Die regulatorische Wirkung ausgewählter Inhibitoren auf den Aktivierungsstatus verschiedener Signalmoleküle ist in Tabelle 27 zusammengefasst.

**Tabelle 27: Zusammenfassung der Wirkung verschiedener Signalmolekülinhibitoren auf das Adhäsions-induzierte *outside-in* Signaling in JAK2-VF/EPOR 32D Zellen.** Die Inhibitoren erhöhten (↑), verminderten (↓) oder hatten keinen Einfluss (=) auf das p/t Verhältnis der einzelnen Signalmoleküle. Die Anzahl der Pfeile kennzeichnet die Stärke der Regulation. n.d. (*not done*) gekennzeichnete Daten wurden bisher nicht untersucht.

Inhibitor (Protein)	PP2 (Src)	Piceatannol (Syk)	Y15 (FAK)	Wortmannin (PI3K)	JSH-23 (NFκB)
FAK (Tyr577)	↓(=)	↓↓	↓↓	↑	n.d.
FAK (Tyr397)	↓↓↓	↓	↓↓	↓	n.d.
STAT3 (Ser727)	↓↓	↓↓	=	=	↓↓ (im Zellkern)
Syk (Tyr519/520)	↓↓	↓↓	=	=	↓(=)
p65 (Ser536)	↓↓	↓	↑↑	=	↓ (im Zellkern)
AKT (Ser473)	n.d.	n.d.	n.d.	↓↓↓	n.d.
JNK (Tyr183/185)	↓	↓↓	=	n.d.	↓

Dabei wurde deutlich, dass PP2 (Src-Inhibitor<sup>570,660</sup>) alle untersuchten, durch Adhäsion aktivierten Signalmoleküle hemmte. Daher wird vermutet, dass Src *upstream* der untersuchten Signalmoleküle lokalisiert ist (siehe Abbildung 35). Die Phosphorylierung von FAK (Tyr397) wurde dabei durch PP2 am stärksten gehemmt. Piceatannol (Syk-Inhibitor)<sup>528,553,661</sup> konnte

ebenfalls alle aktivierten Signalmoleküle, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, hemmen. Dabei lagen leicht abweichende Regulationsstärken im Vergleich zu PP2 vor. So hatte Piceatanol einen stärkeren Einfluss auf pTyr577-FAK als auf pTyr397-FAK. Da Y15 (FAK-Inhibitor)<sup>662</sup> keine Veränderungen der Adhäsions-induzierten Syk-, STAT3- und JNK-Phosphorylierung bewirkte, scheint FAK keinen Einfluss auf dessen Phosphorylierung zu haben. Interessanterweise stieg das p/t-Verhältnis des NFκB (p65) nach zusätzlicher Y15 Stimulation weiter an. Aufgrund der verwendeten Lysemethode konnte jedoch nicht unterschieden werden, ob es sich dabei um zytosolisches oder nukleäres Protein handelte. Die PI3K, welche durch Wortmannin<sup>663</sup> gehemmt wird, scheint einen dualen und regulatorischen Effekt auf Adhäsions-aktiviertes FAK zu haben. Die Hemmung der PI3K zeigte hingegen keinen Einfluss auf den Aktivierungsstatus von Syk, STAT3 und NFκB. Das *downstream* befindliche AKT wurde stark durch Wortmannin gehemmt. JSH-23 inhibiert die Translokation von NFκB in den Zellkern.<sup>664</sup> Neben NFκB wurde auch nukleäres STAT3 durch JSH-23 reduziert. JSH-23 hemmte ebenfalls die Phosphorylierung von Syk gering und JNK mäßig.



**Abbildung 35: Postuliertes *outside-in* Signaling basierend auf den Western-Blot Analysen der Inhibitor-Untersuchungen.** Die Bindung von  $\beta_1$ -/ $\beta_2$ -Integrinen an immobilisiertem mVACM-1/mICAM-1 phosphoryliert eine Vielzahl von Signalmolekülen und Transkriptionsfaktoren. Src-Kinasen aktivieren Syk und scheinen *upstream* von allen untersuchten Signalmolekülen zu sein. Syk ist anschließend involviert in der Aktivierung von FAK, NFκB, STAT3, und JNK. Die verwendeten Inhibitoren und deren Zielmoleküle sind dargestellt. Wortmannin wurde als PI3K-Inhibitor verwendet, jedoch AKT stellvertretend untersucht. (erstellt mit BioRender.com)

Aufgrund der Datenlage in der Literatur wird eine große Bedeutung von Syk vermutet. Um unspezifische Effekte von Piceatannol auszuschließen, wurden deshalb RNA-Interferenz Experimente mittels geeigneter siRNA für Syk durchgeführt. Es wurden unterschiedliche Zellzahlen, Inkubationsdauern, Transfektionsreagenzien als auch Transfektionsvolumina untersucht. Es gelang nicht trotz vieler Optimierungsversuche einen persistenten *Knockdown* von Syk in 32D Zellen zu generieren. Es ist dabei bekannt, dass die verwendeten 32D Zellen nur sehr schwer transfizierbar sind. Hinzu kommt, dass die verwendeten Zellen bereits durch das JAK2 als auch den EPOR bereits zwei weitere transfizierte Gene enthalten, ein Umstand der das Einbringen der siRNA zusätzlich erschwert. Daher wurden für Syk zwei verschiedenen Inhibitoren (Piceatannol und R406) untersucht, um eventuelle unspezifische Hemmungen auszuschließen und deren Spezifität zu bestätigen. Die Ergebnisse des R406-Inhibitors waren mit den des Piceatannol vergleichbar (unveröffentlichte Daten).

#### **4.4.2 Integrin-vermittelte Adhäsion induziert Zytokin mRNA-Expression in 32D JAK2/EPOR Zellen**

Es gibt wenige Literaturquellen, die eine Verbindung zwischen den Integrinen und der Zytokin-expression beschreiben.<sup>362,531,606–614</sup> Die vorliegenden Daten der Adhäsions-induzierten Expression pro-inflammatorischer Zytokin mRNA in unterschiedlichen Zellpopulationen der Vav1-Cre x JAK2 Mäuse (siehe 4.2) unterstützen aber die Hypothese, dass Integrin-vermittelte Adhäsion die Genexpression von Zytokinen treibt. Für weitere Analysen bezüglich der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression wurden deshalb 32D JAK2/EPOR Zellen untersucht.

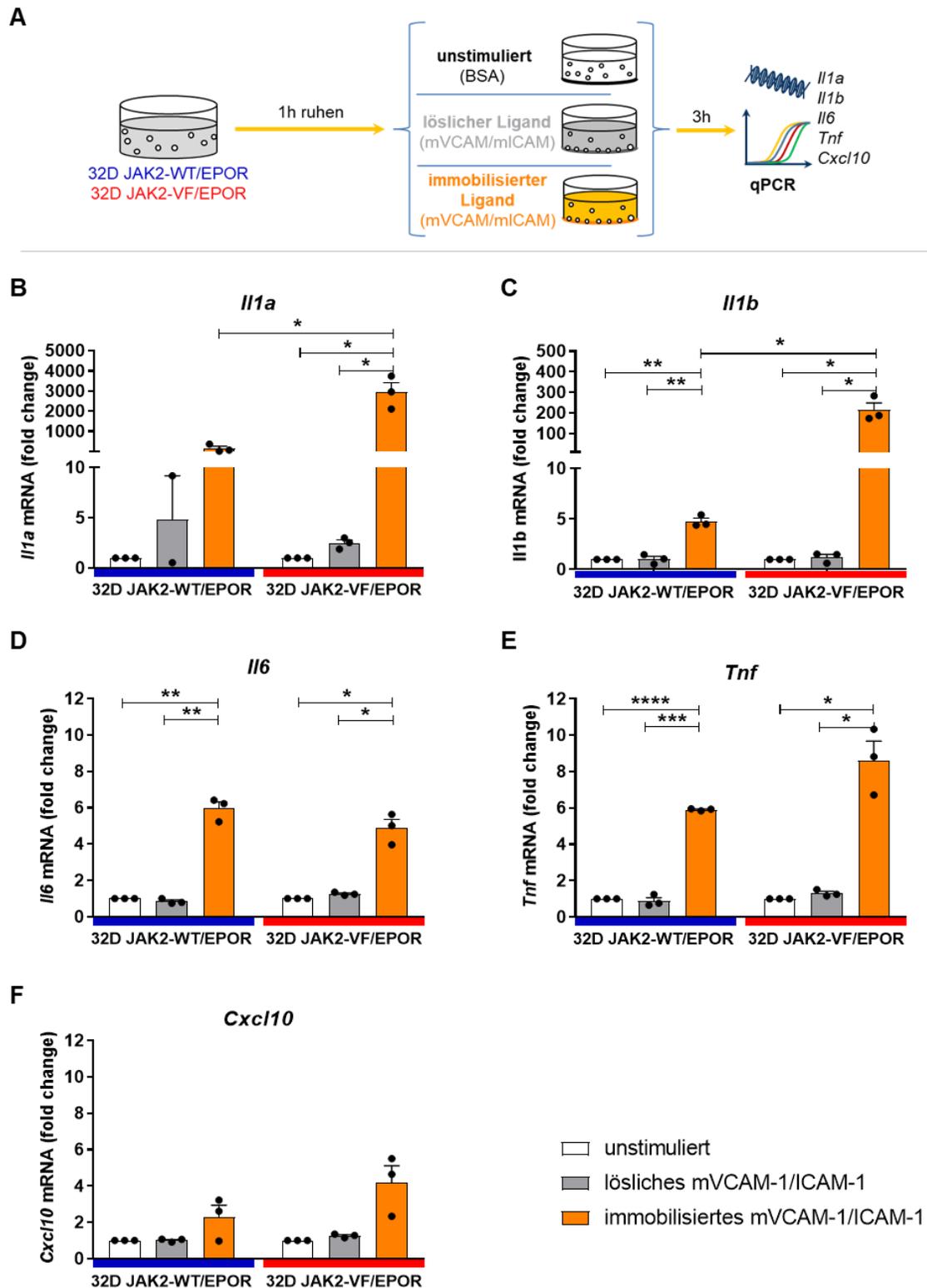
Die Zellen wurden auf immobilisiertem oder mit löslichem mVCAM-1 und mICAM-1 oder BSA als Kontrolle für 3 h inkubiert. Anschließend wurde eine qPCR-Analyse bezüglich enthaltener Zytokin-mRNA durchgeführt (siehe Abbildung 36A). Dabei haben wir uns erneut auf Zytokine fokussiert, für die eine wichtige Rolle bei JAK2-V617F-positiven MPN beschrieben wurde.<sup>104,106,107,122,124,125,128,627–629</sup>

Interessanterweise zeigte sich dabei, dass die Adhäsion auf immobilisiertem mVCAM-1 und mICAM-1 die mRNA-Expression verschiedener pro-inflammatorischer Zytokine (*Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Cxcl10*) in 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen induziert, während löslicher Ligand dazu nicht in der Lage war. In den JAK2-V617F-mutierten Zellen wurde ein signifikanter Anstieg der *Il1a* (2942,0-fach;  $p = 0,0248$ ) und *Il1b* (214,8-fach;  $p = 0,0248$ ) mRNA-Level nach Adhäsion an immobilisiertem Liganden im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nachgewiesen (siehe Abbildung 36B+C). Signifikante Unterschiede waren ebenfalls zwischen JAK2-WT Zellen und JAK2-VF Zellen nach Adhäsion an mVCAM-1/mICAM vorhanden (*Il1a*:  $p = 0,0228$ ; *Il1b*:  $p = 0,0256$ ). Zudem war eine signifikante, Adhäsions-vermittelte Induktion von *Tnf* und *Il6* mRNA in JAK2-WT und JAK2-VF Zellen nachweisbar

(siehe Abbildung 36D+E). Dabei war die *Il6* mRNA-Induktion nach Adhäsion in beiden Zelllinien vergleichbar (5,95-fach vs. 4,87-fach) und ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion induzierte nur einen geringfügigen Anstieg der *Cxcl10* mRNA-Level (siehe Abbildung 36F).

Zusammenfassend konnte in den 32D JAK2/EPOR Zellen eine Adhäsions-induzierte Zytokin mRNA-Expression gefunden werden, die die Ergebnisse in den primären hämatopoetischen Zellen des Vav1-Cre Mausmodells (siehe Abbildung 22-Abbildung 25) im Wesentlichen bestätigt. Anders als bei den primären hämatopoetischen Zellen wurde die Genexpression inflammatorischer Zytokine aber durch die JAK2-V617F-Mutation zusätzlich verstärkt.

Interessant ist die Beobachtung, dass bei der Inkubation mit löslichem Liganden (VCAM-1 und ICAM-1) im Wesentlichen keine Induktion von Zytokin mRNA nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 36). Dies deutet darauf hin, dass ein Kontakt der Zellen mit dem immobilisierten Liganden und damit die Induktion von mechanischen Rezeptor-Liganden Scherkräften<sup>485</sup> notwendig ist, um ein Integrin-Aktivierungssignal in der Zelle auszulösen. Die Daten bestätigen zudem erneut die Verbindung von Adhäsion und Induktion proinflammatorischer Zytokin mRNA. Weiterhin schien die JAK2-V617F-Mutation in den 32D JAK2/EPOR Zellen die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression zu verstärken.

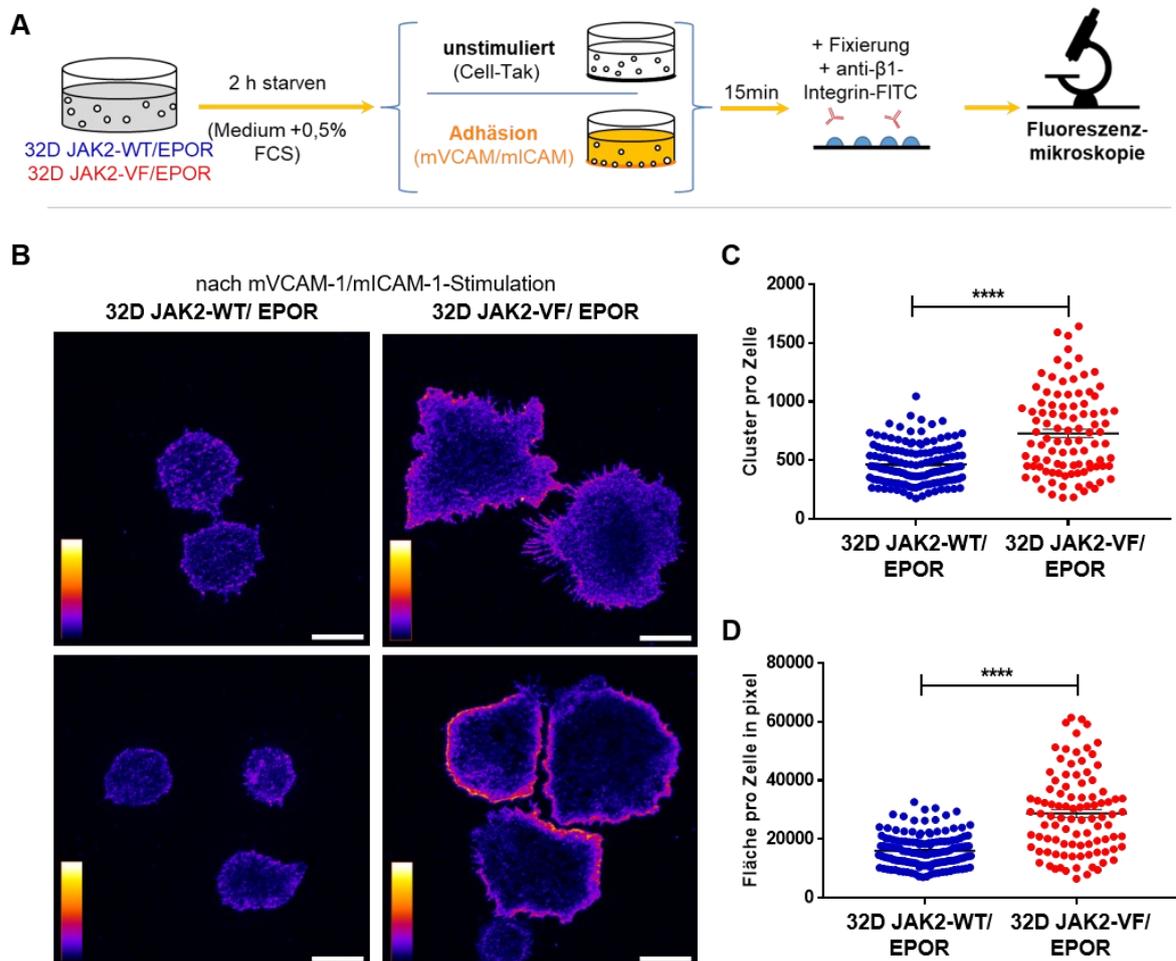


**Abbildung 36: Die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 induziert mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine in 32D JAK2/EPOR Zellen.** Der Versuchsaufbau ist (A) schematisch dargestellt. Der Einfluss von löslichem (grau) und immobilisiertem (orange) Liganden (mVCAM-1/ICAM-1) auf die mRNA-Expression von (B) *IL1a*, (C) *IL1b*, (D) *IL6*, (E) *Tnf* und (F) *Cxcl10* in 32D JAK2-WT/EPOR ( $n = 3$ ) und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen ( $n = 3$ ) wurde nach 3 h Inkubation mittels qPCR untersucht. Expressionsänderungen sind von 3 unabhängigen Experimenten als „Fold change“ dargestellt ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Ungepaarter T-Test mit Welch’s Korrektur mit  $P^* < 0,05$ ,  $P^{**} < 0,01$ ,  $P^{***} < 0,001$ ,  $P^{****} < 0,0001$ .

#### 4.4.2.1 Integrin-vermittelte Adhäsion induziert Integrin-Clusterbildung

Einige Arbeitsgruppen haben beschrieben, dass neben einer Rezeptor-Liganden-Bindung mechanische Scherkräfte für die Integrin-Signalgebung notwendig sind.<sup>485</sup> Andere beschrieben die Notwendigkeit von Clusterbildungen der aktivierten Integrine, um ein ausreichend starkes Signal für eine Signalweiterleitung zu generieren.<sup>486,497-500</sup>

Es wurde deshalb untersucht, ob die Adhäsion von 32D JAK2/EPOR Zellen an immobilisiertem mVCAM-1/miCAM-1 zu einer Integrin-Clusterbildung führt. Die  $\beta_1$ -Integrin-Clusterbildung wurde dafür exemplarisch mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (siehe Abbildung 37A).



**Abbildung 37: Die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/miCAM-1 induziert verstärkte  $\beta_1$ -Integrin Clusterbildung in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen.** (A) Es erfolgte der fluoreszenzmikroskopische Nachweis von  $\beta_1$ -Integrin-Clustern in adhären 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen. (B) Dargestellt sind repräsentative fluoreszenzmikroskopische Bilder, deren Helligkeit auf das stärkste Signal normiert wurde und als Falschfarben präsentiert ist (dunkel – niedrige Fluoreszenzintensität, hell – hohe Fluoreszenzintensität). Der im Bild angegebene Maßstab entspricht 10 $\mu$ m. (C) Die Quantifizierung der Clusteranzahl pro Zelle und (D) die Fläche (in Pixel) der Zellen nach VCAM-1/iCAM-1-Stimulation sind von 32D JAK2-WT/EPOR (blau; n = 144 Zellen) und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (rot; n = 96 Zellen) als Mean + SEM dargestellt. Mann-Whitney Test mit P\*\*\*\*<0,0001.

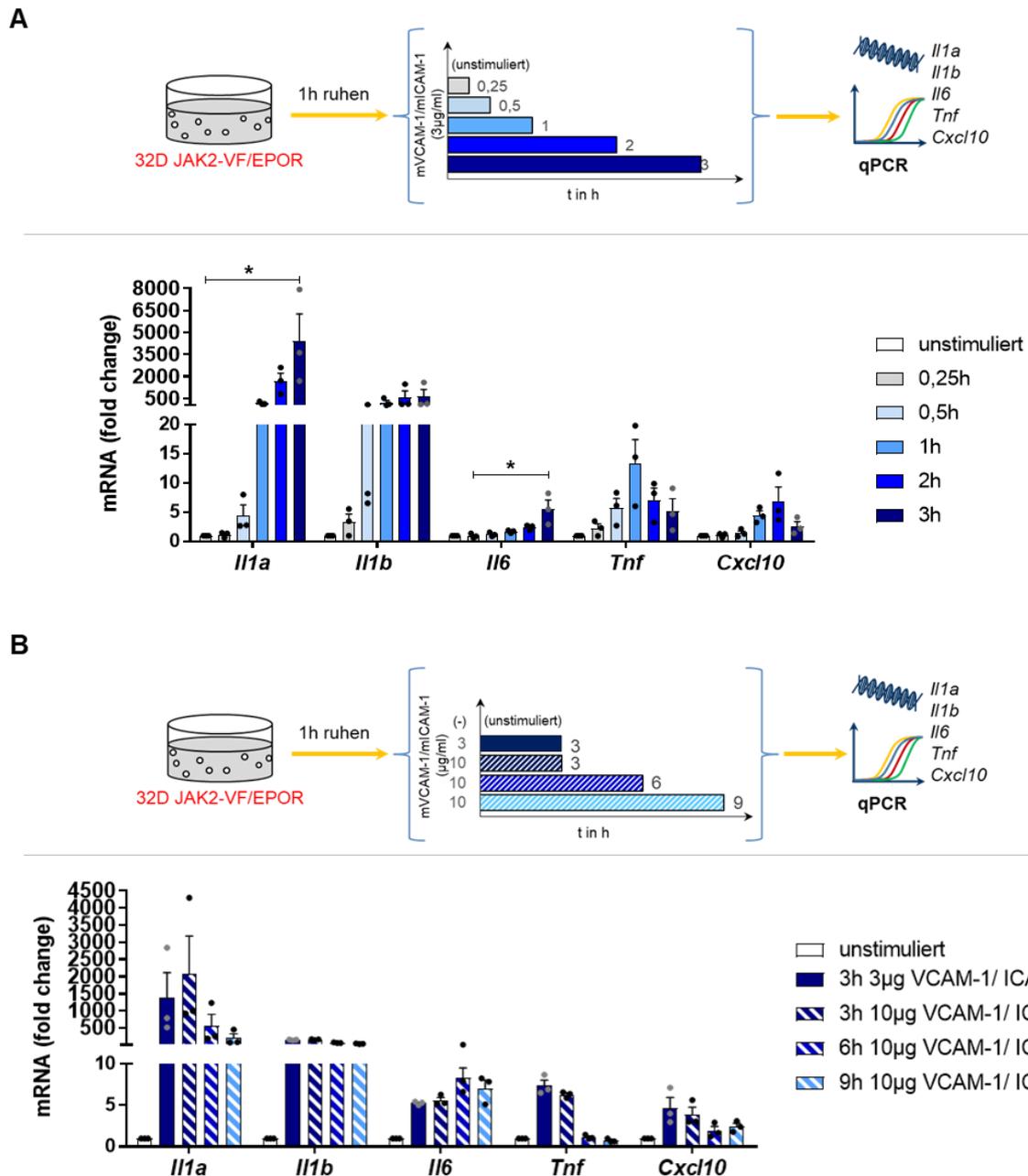
32D JAK2-VF/EPOR Zellen zeigten nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 eine signifikant höhere  $\beta_1$ -Integrin-Clusteranzahl im Vergleich zu adhärenen 32D JAK2-WT/EPOR Zellen (siehe Abbildung 37B+C). Die Adhäsion resultierte zudem in einer abweichenden Zellmorphologie. Die Fläche (in Pixel) der adhärenen 32D JAK2-VF/EPOR Zellen war dabei signifikant größer als die der 32D JAK2-WT/EPOR Zellen nach VCAM-1/ICAM-1-Stimulation (siehe Abbildung 37B + D).

#### 4.4.2.2 Optimierung der Versuchsbedingungen zur Analyse Adhäsions-induzierter Zytokin mRNA-Expression

Für die Optimierung weiterführender qPCR-basierter Experimente wurden Zeit- sowie Konzentrationsverläufe mit 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (n = 3) erstellt (siehe Abbildung 38A+B oben). Diese zeigten, dass alle 5 untersuchten Zytokine ein unterschiedliches Expressionsprofil für die Induktion von Adhäsions-induzierter mRNA-Expression über die Zeit besaßen. *Il1a* und *Il1b* wurden am stärksten durch die Interaktion mit mVCAM-1/mICAM-1 induziert und zeigten ein mRNA-Expressionsmaximum nach 3 h Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 (siehe Abbildung 38). Das Adhäsions-induzierte Expressionsmaximum der mRNA lag für *Il6* bei 6 h, für *Tnf* bei 1 h und für *Cxcl10* bei 2 h. Die Induktion dieser Zytokine war jedoch deutlich niedriger als die von *Il1a* und *Il1b*.

In den vorliegenden Daten konnte eine besonders starke Adhäsions-induzierte mRNA-Expression für *Il1a* und *Il1b* nachgewiesen werden. Daher haben wir uns im Folgenden auf diese beiden Zytokine fokussiert und eine Inkubationszeit von 3 h für weitere Experimente verwendet.

Die Erhöhung der verwendeten Liganden-Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  auf 10  $\mu\text{g/ml}$  führte zu keiner weiteren Steigerung der mRNA-Expression in den JAK2-V617F-positiven Zellen (siehe Abbildung 38B). Daher wurde eine Konzentration von 3  $\mu\text{g/ml}$  mVCAM-1 und mICAM-1 für die Beschichtung qPCR-basierter Experimente im Folgenden verwendet.



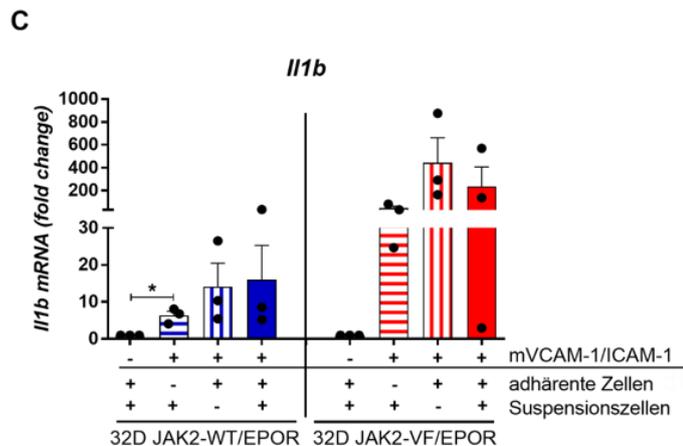
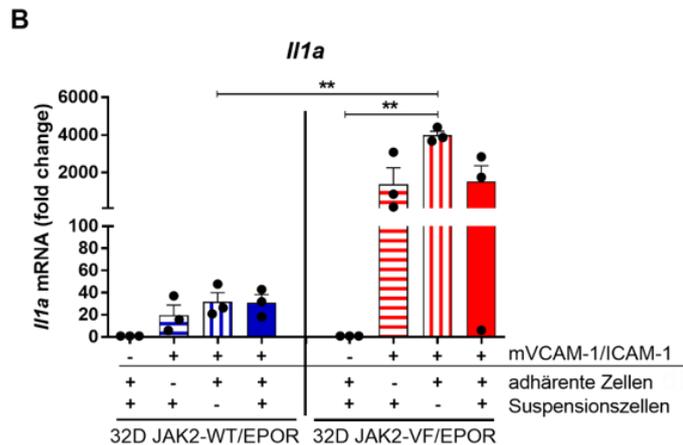
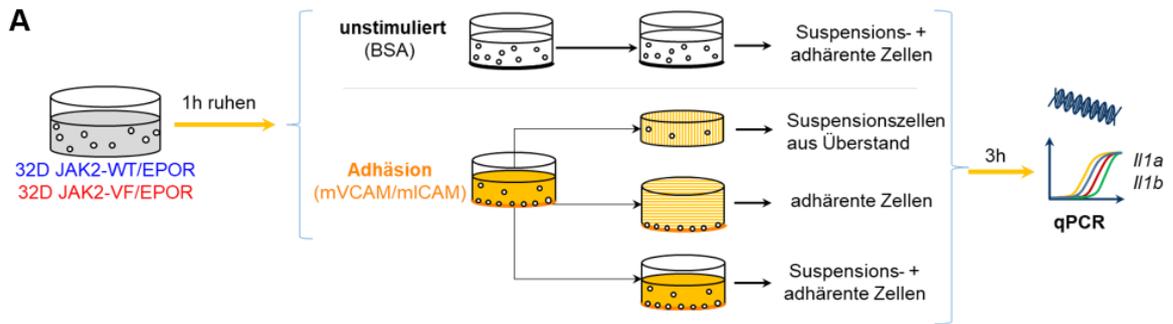
**Abbildung 38: Zytokin-spezifische Expressionskinetik von Adhäsions-induzierter mRNA-Expression in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen.** Der (A) Versuchsaufbau ist schematisch dargestellt. Zur Optimierung der durchgeführten qPCR-Analysen Adhäsions-induzierter mRNA-Expression wurde (A) eine Expressionskinetik (0,25 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 3 h) erstellt. (B) Zudem wurden 3 µg/ml und 10 µg/ml mVCAM-1/mICAM-1 als Beschichtungskonzentrationen für 3 h, 6 h und 9 h verglichen. Die Ergebnisse der qPCR sind von 3 unabhängigen Experimenten als „Fold change“ dargestellt ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Kruskal-Wallis-Test mit  $P^* < 0,05$ .

#### 4.4.2.3 Einfluss der JAK2-V617F-Mutation auf die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression

Unsere bisherigen Ergebnisse zeigen, dass JAK2-V617F-mutierte 32D Zellen über eine stärkere Adhäsions-vermittelte Zytokin mRNA Induktion als die JAK2-WT Zellen (siehe 4.4.2) verfügen. Unsere Hypothese war, dass dies allein aus der JAK2-V617F-induzierten

Überaktivierung der Integrine und damit verstärkten Adhäsion resultiert. Demnach würden mehr JAK2-VF/EPOR Zellen adhären und damit eine höhere, Adhäsions-induzierte mRNA-Menge nachweisbar sein. In den bisher gezeigten Experimenten wurden die Zellen des Überstandes mit den adhären Zellen auf der beschichteten Oberfläche vereinigt und gemeinsam analysiert. Damit wurden zwar identische Zellzahlen in der PCR-Analyse eingesetzt, jedoch setzte sich diese möglicherweise aus einem abweichenden Verhältnis von tatsächlich adhären Zellen und der sich wieder bzw. immer noch in Suspension befindlichen Zellen beider Zelllinien zusammen. Um zu untersuchen, ob die beobachteten Unterschiede auf die verstärkte Adhäsion der 32D JAK2-VF/EPOR Zellen zurückzuführen ist und damit auf eine höhere Zahl an Zellen, die adhären haben, wurden die jeweiligen Zellfraktionen (adhärente Zellen, im Überstand befindliche Zellen, Gesamtzellen) separat in der qPCR entsprechend der Induktion der Zytokin-mRNA (*Il1a*, *Il1b*) untersucht (siehe Abbildung 39). Für die qPCR wurden identische cDNA-Mengen eingesetzt, sowie die Zytokin-mRNA auf die *Hprt*-mRNA (konstitutiv exprimiertes Gen, *Housekeeping*-Gen) bezogen. Demnach war weiterhin ein direkter Vergleich beider Zelllinien möglich, als auch der Vergleich zwischen den sich in Suspension befindlichen Zellen und der adhären Zellen. Zu den Suspensionszellen gehören in diesem Fall die Zellen, die nicht adhären haben oder sich bereits wieder abgelöst haben.

Beim Vergleich der ausschließlich adhären Zellen konnte erneut ein signifikanter Unterschied in der *Il1a* ( $p = 0,0031$ ) mRNA-Expression zwischen 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 39B). Die Adhäsion induzierte in den JAK2-VF Zellen eine deutlich stärkere *Il1a* (125-fach) und *Il1b* (31-fach) mRNA-Expression im Vergleich zu den JAK2-WT Zellen (siehe Abbildung 39B+C). Wären die erhöhten Adhäsions-induzierten Zytokin-mRNA-Konzentrationen lediglich durch eine erhöhte Anzahl adhären JAK2-VF Zellen verursacht wurden, so wären in diesem Experiment übereinstimmende *Il1a* und *Il1b* mRNA-Level zwischen JAK2-WT und JAK2-VF Zellen nachweisbar gewesen. Dies war nicht der Fall. Demnach ist eine verstärkte Adhäsion der 32D JAK2-VF/EPOR Zellen nicht die Hauptursache für den Nachweis erhöhter VCAM-1/ICAM-1-induzierter mRNA-Level. Stattdessen wird vermutet, dass die Mutation eine verstärkende Rolle in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression spielt.



**Abbildung 39: Der Unterschied in der *Il1* mRNA-Expression nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/miCAM-1 zwischen 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen wird nicht durch die erhöhte Adhäsion von 32D JAK2-VF/EPOR Zellen verursacht.** Der (A) Versuchsaufbau ist schematisch dargestellt. Die adhärenente Zellen (▣) und die im Überstand befindlichen Zellen (▤) wurden separat voneinander bezüglich ihrer (B) *Il1a* und (C) *Il1b* mRNA-Expression nach 3 h Adhäsion untersucht und mit dem Gesamtzellpool (adhärenente Zellen + Überstand) verglichen. Die Ergebnisse der 32D JAK2-WT/EPOR (blau) wurden den der 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (rot) gegenübergestellt. Die qPCR-Ergebnisse sind als Mean + SEM (n = 3) des „Fold change“ ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) dargestellt. Es wurde jeweils die gleiche cDNA-Menge für die qPCR eingesetzt und die Ergebnisse auf die Expression des *Housekeeping*-Genes (*Hprt*) sowie die jeweilige unstimulierte Kontrolle bezogen. Ungepaarter T-Test mit Welch’s Korrektur mit  $P^* < 0,05$ ,  $P^{**} < 0,01$ . (ÜS - Überstand)

Um die Realität besser abbilden zu können, wurden für die folgenden Experimente weiterhin ein Pool aus adhärenente und Suspensionszellen verwendet. Somit wird keiner der beiden möglichen Einflussfaktoren der erhöhten Adhäsion und Verstärkung der Adhäsions-induzierten

mRNA-Expression durch die JAK2-V617F-Mutation ausgeschlossen. Es wurden die gleichen Zellzahlen sowie cDNA-Mengen eingesetzt und die Ergebnisse auf die Expression des Housekeeping-Genes *Hprt* bezogen.

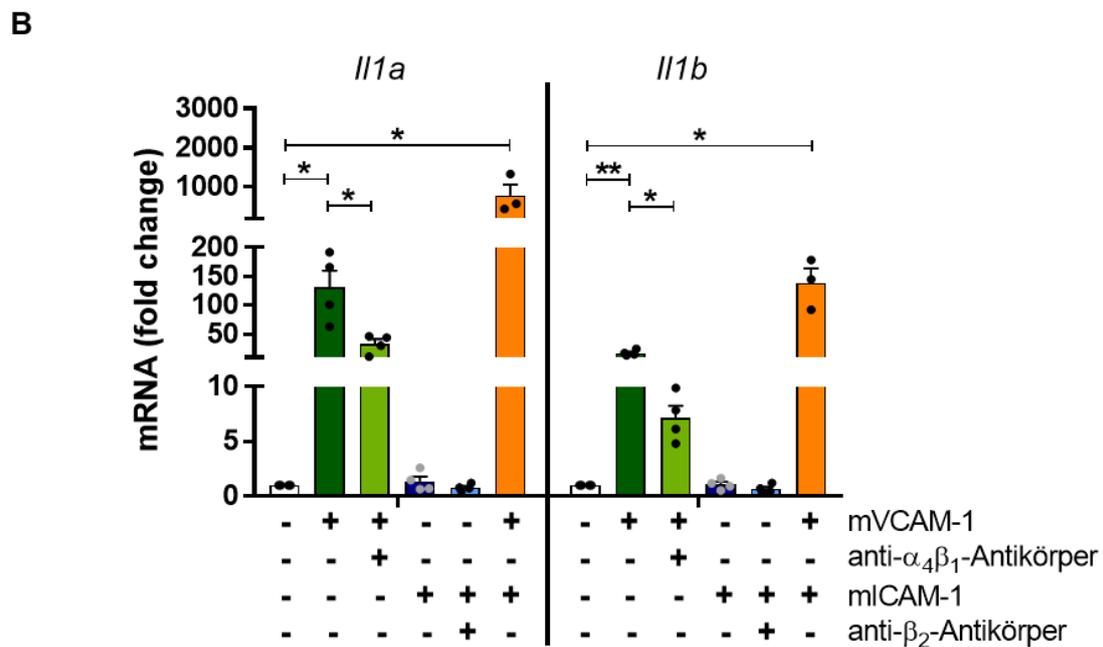
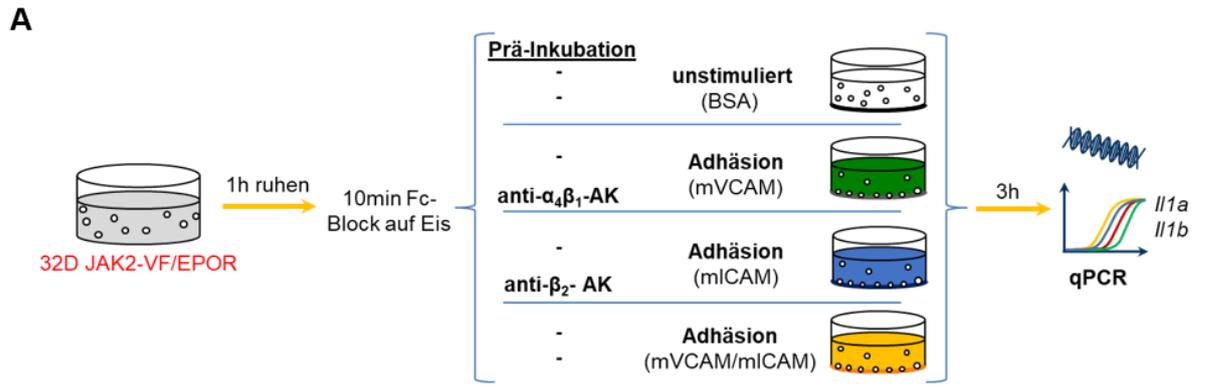
#### 4.4.2.4 Liganden-Spezifität der Zytokin-mRNA-Expression

In allen bisherigen Experimenten wurden mVCAM-1 sowie mICAM-1 gleichzeitig als lösliche bzw. immobilisierte Liganden verwendet. Um die Spezifität der einzelnen Liganden zu überprüfen, wurden mVCAM-1 und mICAM-1 separat immobilisiert. Die Inkubation der 32D JAK2-VF/EPOR Zellen erfolgte anschließend für 3 h. Zusätzlich wurde eine Prä- sowie Co-Inkubation von anti- $\alpha_4\beta_1$  bzw. anti- $\beta_2$ -spezifischer Antikörper untersucht (siehe Abbildung 40A). Es erfolgte abschließend die Analyse der *Il1a* und *Il1b* mRNA-Expression.

Die Adhäsion an mVCAM-1 allein induzierte eine signifikant erhöhte *Il1a* ( $p = 0,0286$ ) und *Il1b* ( $p = 0,0286$ ) mRNA-Expression in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (siehe Abbildung 40B). Hingegen war nach Adhäsion an immobilisiertem mICAM-1 keine gesteigerte mRNA-Expression beider Zytokine im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nachweisbar. Demnach scheint nur die VCAM-1-vermittelte Interaktion (nicht aber die ICAM-1-vermittelte-Interaktion) entscheidend für die Induktion von Zytokin-mRNA-Expression im vorliegenden 32D Zellkulturmodell zu sein.

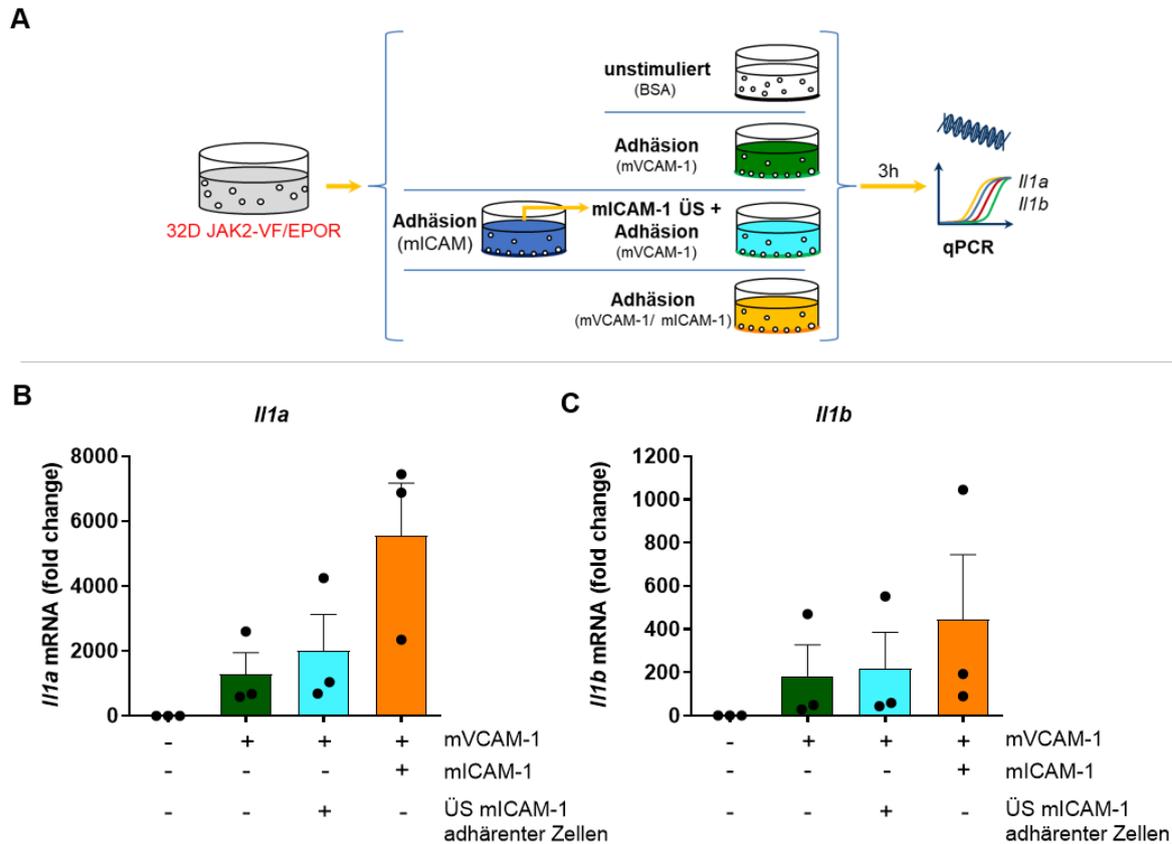
VCAM-1 kann mit  $\beta_1$ -Integrinen interagieren, während  $\beta_2$ -Integrine ICAM-1 binden. Die anti- $\alpha_4\beta_1$ -Antikörper Inkubation führte zu einer signifikant reduzierten mRNA-Expression von *Il1a* ( $p = 0,0286$ ) und *Il1b* ( $p = 0,0286$ ) nach Adhäsion an VCAM-1 (siehe Abbildung 40B). Unter Verwendung Integrin-spezifischer Antikörper (anti- $\alpha_4\beta_1$ -Antikörper) konnte so die Spezifität und Bedeutung der VCAM-1- $\beta_1$ -Interaktion bestätigt werden.

Die Kombination beider Liganden ( $n = 3$ ) führte zu einer weiteren (6,0-fachen bzw. 7,8-fachen) Erhöhung der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen im Vergleich zur Adhäsion an mVCAM-1 alleine. Dies deutet auf einen additiven Effekt der ICAM-1-vermittelten Signaltransduktion hin.



**Abbildung 40: Die  $\beta_1$ -Integrin-VCAM-1-Interaktion ist ursächlich für eine Adhäsion-induziert *Il1a* und *Il1b* mRNA-Expression in JAK2-VF/EPOR 32D Zellen. (A)** 32D JAK2-VF/EPOR Zellen wurden mit Fc-Block vor-inkubiert und mittels anti- $\alpha_4\beta_1$  bzw. anti- $\beta_2$ -Integrin Antikörper behandelt oder blieben unbehandelt. Die Adhäsion erfolgte auf immobilisiertem mVCAM-1 oder mICAM-1 für 3 h (n = 4). Es erfolgte eine qPCR bezüglich (B) *Il1a* (links) und *Il1b* (rechts) mRNA-Expression. Vergleichend wurden adhärenente Zellen (n = 3) analysiert, die sowohl mit immobilisiertem mVCAM-1 als auch mICAM-1 stimuliert wurden. Die Expressionsänderungen sind als Mean + SEM (n =3-4) des „Fold change“ ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) dargestellt. Mann-Whitney Test mit  $P^* < 0,05$ .

Ob es sich bei dem additiven Effekt um eine zell-intrinsische oder -extrinsische Ursache handelt, wurde im Folgenden näher charakterisiert. Die folgenden Bedingungen wurden dafür verglichen: 1) unstimulierte 32D JAK2-VF/EPOR Zellen, 2) 32D JAK2-VF/EPOR Zellen, die auf immobilisiertem mVCAM-1 adhärten und 3) die zusätzlich mit dem Überstand von mICAM-1 adhärenente Zellen co-inkubiert wurden, sowie 4) 32D JAK2-VF/EPOR Zellen, die auf immobilisiertem mVCAM-1 und mICAM-1 in Kombination adhärten (siehe Abbildung 41A).



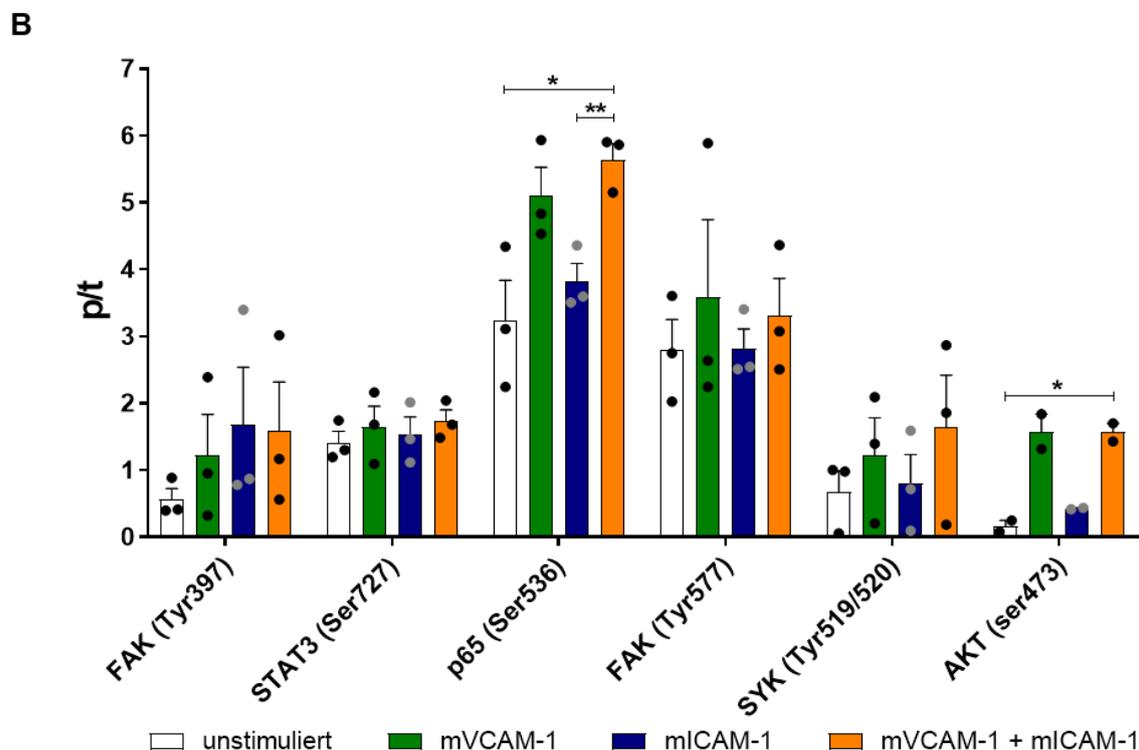
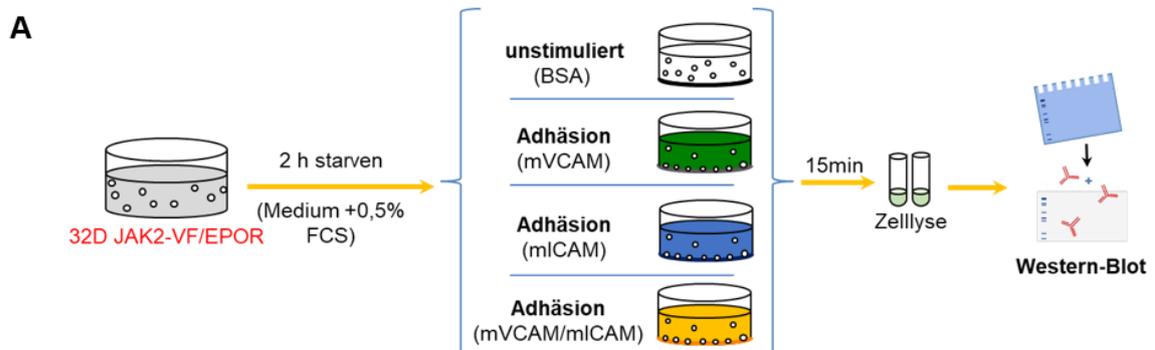
**Abbildung 41: Die  $\beta_2$ -Integrin-vermittelten Signale fördern die  $\beta_1$ -Integrin-induzierte mRNA-Expression zell-intrinsisch.** Der (A) Versuchsaufbau ist schematisch dargestellt. Adhäsions-induzierte (B) *Il1a* und (C) *Il1b* mRNA-Expression in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen wurde mittels qPCR nach mVCAM-1 Adhäsion (grün; n = 3), der zusätzlichen Inkubation mit ICAM-1 ÜS (türkis; n = 3) oder der Adhäsion an mVCAM-1 und mICAM-1 (orange; n = 3) untersucht. Die Expressionsänderungen sind als Mean + SEM (n = 3) des „Fold change“ ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) im Vergleich zur BSA-Kontrolle (n = 3) dargestellt. (ÜS - Überstand)

Die Co-Stimulation VCAM-1-adhärenter Zellen mit dem Zellkulturüberstand von ICAM-1 adhärenter Zellen führte zu keiner stärkeren mRNA-Expression. Demnach können ICAM-1-vermittelte lösliche Faktoren als Ursache für eine verstärkte mRNA-Expression ausgeschlossen werden. Jedoch führte die Adhäsion an beiden Liganden, wie auch in Abbildung 40 gezeigt, zu einem weiteren Anstieg der Adhäsions-induzierten Zytokin mRNA-Level (siehe Abbildung 41B+C). Dies bestätigt unsere vorherige Interpretation, dass bei simultaner Stimulation durch VCAM-1 und ICAM-1 ein intrazellulärer Wirkmechanismus aktiviert wird, der in einem additiven Effekt resultiert. Da beide Liganden meist zusammen auf aktivierten **Endothelzellen** exprimiert werden<sup>665</sup>, wurden für alle weiteren Experimente dennoch immer beide Liganden immobilisiert.

#### 4.4.2.5 Aktivierung Liganden-spezifischer *outside-in* Signalwege

Um den additiven, intrazellulären Effekt beider Liganden-Rezeptor-Interaktionen näher zu untersuchen, wurden die Liganden (mVCAM-1, mICAM-1) separat und in Kombination

immobilisiert (siehe Abbildung 42A) und die Phosphorylierung repräsentativer Signalmoleküle untersucht. Dafür wurden Western-Blot Proben von 32D JAK2-VF/EPOR Zellen nach Adhäsion generiert und repräsentative Phosphorylierungsepitope analysiert.



**Abbildung 42: Untersuchung Liganden-spezifischer Signalwege nach VCAM-1 und ICAM-1 Stimulation in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen.** (A) Die Liganden-spezifische Signalgebung nach VCAM-1-vermittelter (grün; n = 2-3) oder mICAM-1-vermittelte (blau; n = 2-3) Adhäsion wurden mittels Western-Blot untersucht. Das *outside-in* Signaling repräsentativer Signalwege wurde nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1 und mICAM-1 (orange; n = 2-3) bzw. BSA (weiß; n = 2-3) vergleichend analysiert. (B) Dargestellt ist die Semiquantifizierung der Western-Blot-Analysen repräsentativer Phosphorylierungsepitope (p/t) aus 2-3 unabhängigen Experimenten. Ungepaarter T-Test mit Welch's Korrektur mit  $P^* < 0,05$ ,  $P^{**} < 0,01$ .

Es konnten Unterschiede in der Signalgebung zwischen den beiden Liganden nachgewiesen werden. So wurde beispielsweise Syk, p65 und AKT durch die Adhäsion an mICAM-1 kaum phosphoryliert, während ein deutlicher Anstieg im p/t-Verhältnis nach Adhäsion an mVCAM-1

nachweisbar war (siehe Abbildung 42B). Ein Trend zu einer stärkeren ICAM-1-vermittelten Aktivierung von pTyr397-FAK im Vergleich zu VCAM-1 konnte ebenfalls beobachtet werden. Dies deutet auf die Aktivierung verschiedener Liganden-spezifischer Signalwege hin. Dennoch konnten keine klaren, additiven Effekte nach Stimulation mit beiden Liganden in den untersuchten Signalmolekülen beobachtet werden. Da dieses Thema aber jenseits der Zielstellung der Arbeit lag, wurde zum jetzigen Zeitpunkt auf weitere Analysen verzichtet.

Da lediglich nach VCAM-1-Stimulation eine mRNA-Expression des *Il1a* und *Il1b* erfolgte (nicht aber nach ICAM-1-Stimulation) und die Phosphorylierung von Syk, p65 und AKT ebenfalls nur nach VCAM-1-Stimulation vorlag, wird eine große Relevanz dieser Signalmoleküle bei der Adhäsions-induzierten Zytokin-mRNA-Expression vermutet.

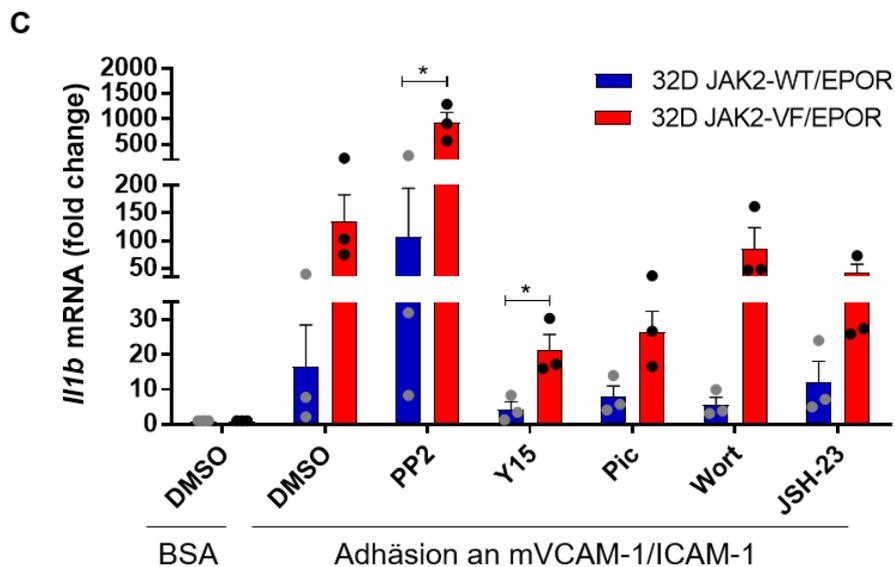
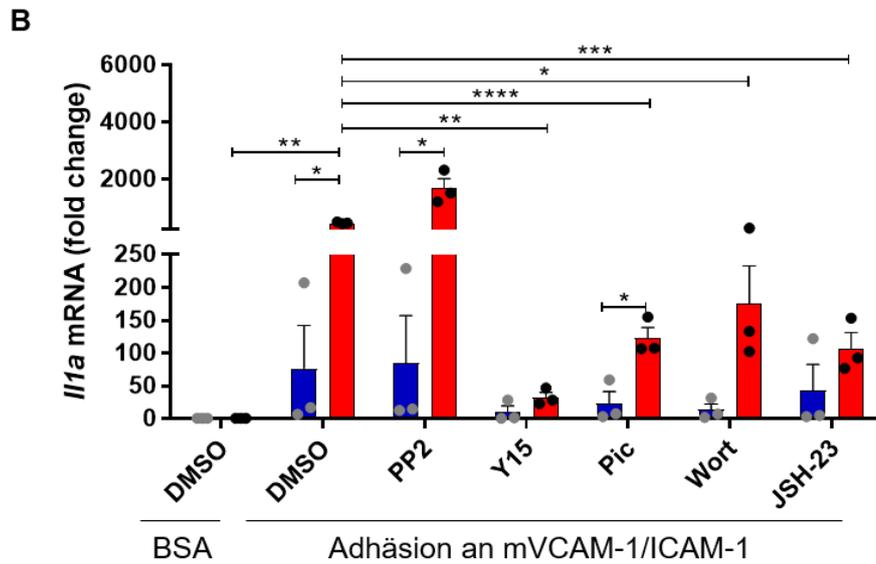
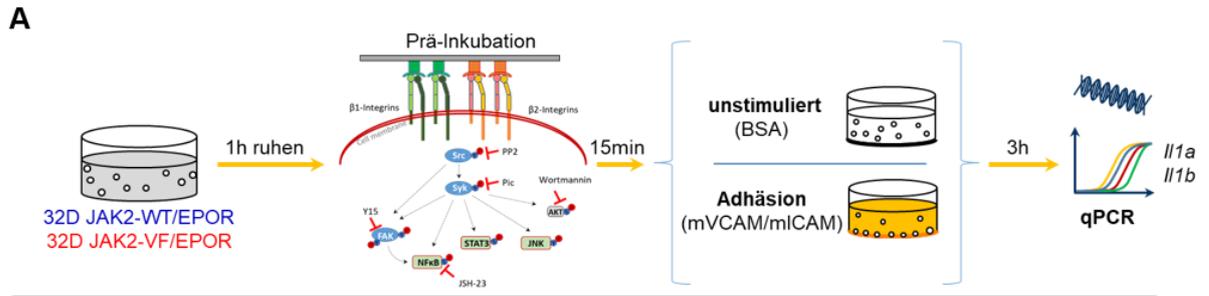
#### 4.4.2.6 Einfluss ausgewählter Inhibitoren auf Adhäsions-induzierte mRNA-Expression

Aufgrund dieser Ergebnisse wird vermutet, dass sich die Bedeutung einzelner Signalmoleküle des *outside-in Signaling* auf die mRNA-Expression von Zytokinen unterscheiden könnte. Um die Beteiligung unterschiedlicher Signalmoleküle auf die Adhäsions-induzierte Zytokin mRNA-Expression zu untersuchen, wurden ausgewählte Inhibitoren (siehe Tabelle 18) bezüglich ihres Einflusses in der VCAM-1/ICAM-1-vermittelte mRNA-Expression analysiert. Dafür wurden 32D JAK2/EPOR Zellen mit den Inhibitoren prä-inkubiert und anschließend in Anwesenheit der Inhibitoren für weitere 3 h auf immobilisiertem mVCAM-1 und mICAM-1 inkubiert (siehe Abbildung 43A). Die adhären Zellen wurden mit den Suspensionszellen vereinigt und die exprimierte Zytokin mRNA mittels qPCR analysiert. Dabei lag der Fokus auf der *Il1a* und *Il1b* mRNA-Expression.

Y15, Piceatannol, Wortmannin sowie JSH-24 hemmten die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression von *Il1a* und *Il1b* in 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen um 37 - 93 % (siehe Abbildung 43B+C). Keines der untersuchten Signalmoleküle konnte als Ursache für die beobachtete Induktion der mRNA-Expression ausgeschlossen werden. Dies deutet auf die Beteiligung multipler Signalwege hin.

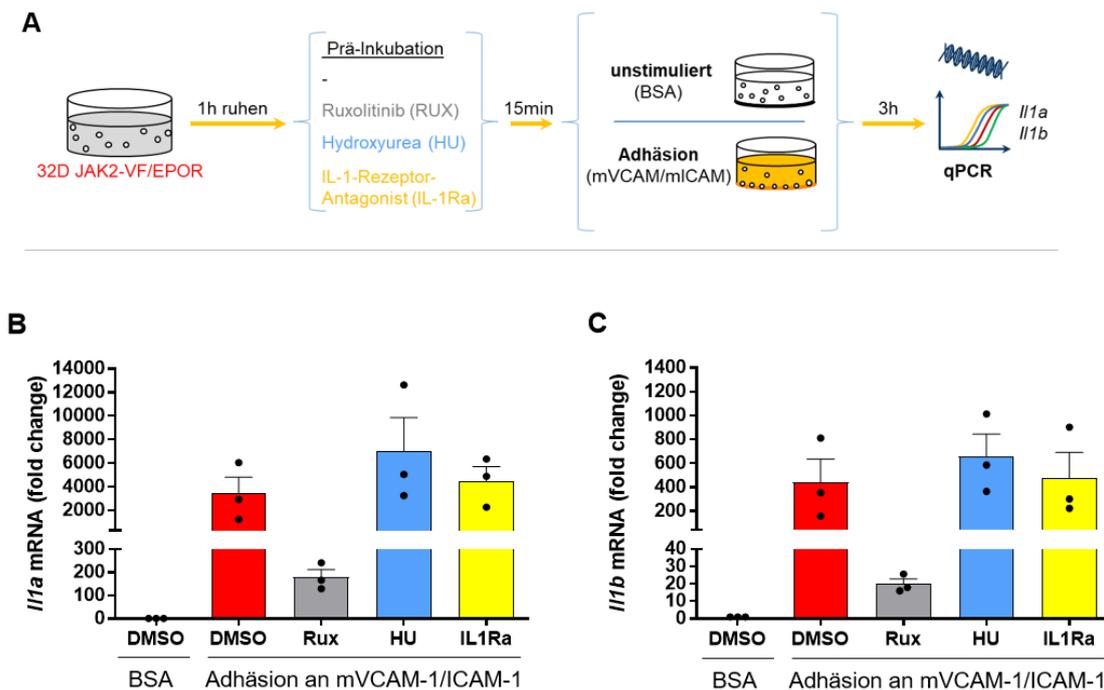
Interessanterweise führte Y15 zu einer fast vollständigen Hemmung der Adhäsion-induzierten *Il1a* mRNA-Induktion (JAK2-WT: -86 %, JAK2-VF: -93 %). *Il1b* wurde dabei um 75 % bzw. 85 % gehemmt. Damit ist Y15 der potenteste der untersuchten Inhibitoren, was auf eine dominante Rolle von FAK in der *outside-in* vermittelten Zytokin-mRNA-Expression in den 32D JAK2/EPOR Zellen unabhängig von der JAK2-V617F-Mutation hindeutet.

Unerwarteter Weise verstärkte PP2 die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression weiter. Weiterführende Analysen deuteten aber auf einen zelltyp-spezifischen, Konzentrations-, Zytokin- und mutations-abhängigen Mechanismus hin (unveröffentlichte Daten).



**Abbildung 43: Die Beteiligung unterschiedlicher Signalwege in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression.** Der (A) Versuchsaufbau ist schematisch dargestellt. Die Inhibierung unterschiedlicher Signalmoleküle führte zur Hemmung von Adhäsions-induzierter (B) *Il1a* und (C) *Il1b* mRNA-Expression in 32D JAK2-WT/EPOR (blau; n = 3) und 32D JAK2-VF/EPOR (rot; n = 3) Zellen nach 3 h Adhäsion an mVCAM-1/ICAM-1. DMSO wurde als Kontrolle verwendet. Die qPCR-Ergebnisse sind als Mean + SEM (n=3) des „Fold change“ ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) dargestellt. Ungepaarter T-Test mit Welch’s Korrektur mit  $P^* < 0,05$ ,  $P^{**} < 0,01$ ,  $P^{****} < 0,0001$ . (Pic - Piceatannol, Wort – Wortmannin)

Neben Signalmolekül-spezifischen Inhibitoren wurden auch Klinik-relevante Medikamente wie Ruxolitinib (RUX) und Hydroxyurea (HU) bezüglich ihrer Wirkung auf die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen untersucht (siehe Abbildung 44A). Wie erwartet, hemmt Ruxolitinib (JAK1/2-Inhibitor) die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression von *Il1a* (-94,8 %) und *Il1b* (-95,5 %) sehr stark (siehe Abbildung 44B+C). Ruxolitinib hemmt die konstitutiv aktivierte JAK2-V617F Kinase und damit die JAK2-V617F-induzierte Aktivierung der Adhäsion. Dies ist unseres Erachtens die Ursache für die reduzierten mRNA-Level nach Adhäsion.

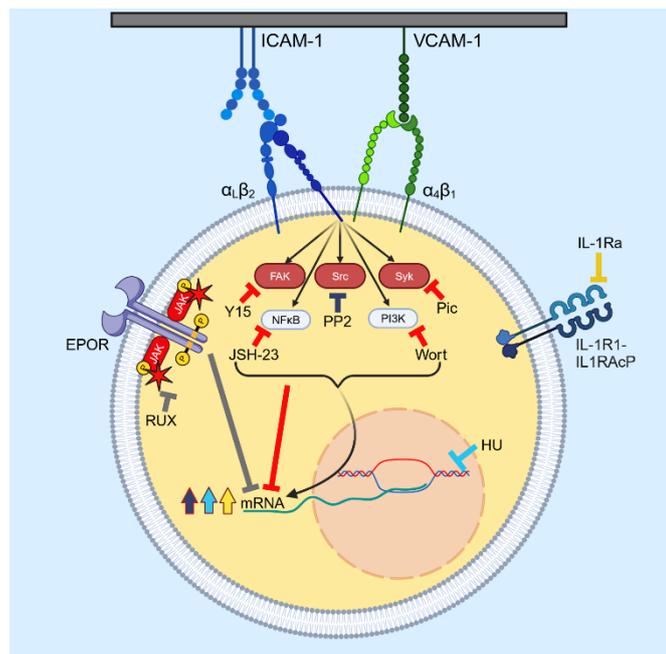


**Abbildung 44: Der Einfluss von in der Klinik verwendeten Medikamenten auf die Adhäsions-induzierte Zytokin-mRNA-Expression.** (A) Die Auswirkung von Ruxolitinib (Rux, grau; n = 3), Hydroxyurea (HU, blau; n = 3) und IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL1Ra, gelb; n = 3) auf die Adhäsions-induzierte (B) *Il1a* und (C) *Il1b* mRNA-Expression nach 3 h an mVCAM-1/ICAM-1 wurde in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen mittels qPCR untersucht. DMSO wurde als Kontrolle vergleichend analysiert. Die Stimulation mit immobilisiertem BSA wurde als unstimulierte Kontrolle verwendet (n = 3). Die Expressionsänderungen sind als Mean + SEM (n=3) des „Fold change“ ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) dargestellt.

Hydroxyurea (HU; Zytostatikum) wird ebenfalls in der Klinik eingesetzt und hemmt die DNA-Synthese.<sup>666</sup> Es führt jedoch unter den verwendeten Experimentierbedingungen zu einem weiteren 1,5-2,0-fachen Anstieg der mRNA-Expression, der am ehesten unspezifisch bedingt ist.

Um mögliche autokrine oder parakrine Wirkungen des neu induzierten IL-1 auszuschließen, wurde ein IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL1Ra) untersucht. Es konnten dabei keine Veränderungen in den Adhäsions-induzierten *Il1a* bzw. *Il1b* mRNA-Leveln nachgewiesen werden (siehe Abbildung 44B+C). Dies schließt eine autokrine oder parakrine Wirkung des IL-1 selbst in den vorliegenden Experimenten aus.

Alle verwendeten Inhibitoren induzieren unter den verwendeten Bedingungen keinen Zelltod und zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Integrinexpression (unveröffentlichte Daten). Zusammengefasst deuten die Ergebnisse auf die Beteiligung unterschiedlicher Signalwege in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine *Il1a* und *Il1b* hin. Eine additive Wirkung von neu synthetisiertem IL-1 auf die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression konnte jedoch ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 45).



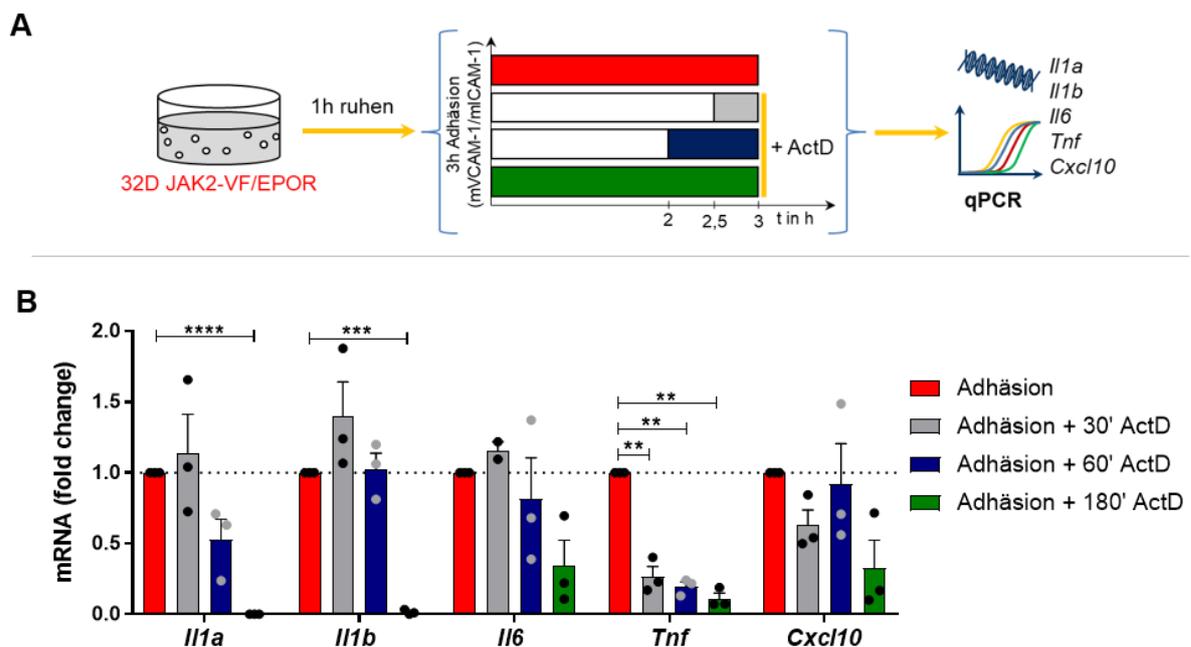
**Abbildung 45: Schematische Darstellung der Beteiligung unterschiedlicher Signalwege in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression von *Il1*.** Die mögliche Beteiligung des JAK2-Signalweges, von FAK, Src, Syk, NFκB und PI3K, des IL-1RI-Signalweges oder DNA-Synthese wurde mit entsprechenden Inhibitoren untersucht. Im Gegensatz zur Hemmung von Src-Kinasen durch PP2, hemmt Y15 (FAK), Piceatannol (Pic; Syk), JSH-23 (NFκB) und Wortmannin (Wort; PI3K) die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression von *Il1a* und *Il1b*. Ruxolitinib (RUX; JAK1/2-Inhibitor) hemmt ebenfalls die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression. Das IL-1RI-Signaling (inhibiert durch IL-1Ra) und die DNA-Synthese (inhibiert durch Hydroxyurea (HU)) haben keinen Einfluss auf die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression. (erstellt mit Biorender.com)

#### 4.4.2.7 Integrin-vermittelte Adhäsion induziert *de novo* mRNA-Synthese und eine gesteigerte mRNA-Stabilität pro-inflammatorischer Zytokine

mRNA-Level können auf transkriptioneller und post-transkriptioneller Ebenen reguliert werden.<sup>634–638</sup> So kann beispielsweise eine erhöhte mRNA-Stabilität zu einer verminderten Degradierung und so zu einem Anstieg von mRNA führen. Es ist bekannt, dass einige Zytokine verstärkt über die mRNA-Stabilität reguliert werden.<sup>633,635–638</sup> Daher wurde überprüft, ob die Adhäsion eine verstärkte mRNA-Stabilität oder eine neue mRNA-Synthese induziert. Dafür wurde ein mRNA-Stabilitätsassay angepasst nach Ratnadiwakara et al.<sup>667</sup> durchgeführt. 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (n = 3) wurden auf immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 inkubiert und

zu unterschiedlichen Zeitpunkten Actinomycin D (ActD), ein Transkriptioninhibitor<sup>667</sup>, hinzugefügt (siehe Abbildung 46A). Actinomycin D ist ein zytotoxisches Antibiotikum, das durch die Interkalation mit DNA ein Entwinden der DNA-Doppelhelix verhindert und so die DNA-abhängige RNA-Neusynthese hemmt. Abschließend wurden die enthaltenen Zytokin mRNA Level analysiert.

Eine zeitabhängige Hemmung der Adhäsions-induzierten *Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnf* und *Cxcl10* mRNA-Level durch Actinomycin D wurde nachgewiesen (siehe Abbildung 46B). Es konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Zytokinen beobachtet werden. So führte bereits die Zugabe von Actinomycin nach 2 h Adhäsion zu einer Hemmung der *Il1a*, nicht aber der *Il1b* mRNA-Level. Wurde jedoch Actinomycin D 3 h co-inkubiert, kam es zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Adhäsions-induzierten *Il1a* (-99,96%) und *Il1b* (-98,5%) mRNA-Expression. Die Induktion der *Il6* (-65,8 %), *Tnf* (-88,9 %) und *Cxcl10* (-67,2 %) mRNA-Level wurde durch Actinomycin D hingegen nicht vollständig gehemmt (siehe Abbildung 46B).



**Abbildung 46: Die VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion induziert überwiegend mRNA Neusynthese. (A)** 32D JAK2-VF/EPOR Zellen adhärten für 3 h auf immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1. Actinomycin D (ActD) wurde 30min (grau; n = 3) bzw. 60min (blau; n = 3) vor Ablauf der 3 h Inkubation hinzugefügt und die exprimierte mRNA nach 3 h Adhäsion mit (grün; n = 3) bzw. ohne (rot; n = 3) Actinomycin D Stimulation verglichen. **(B)** Die dargestellten mRNA-Level (Mean + SEM; n = 3) wurden normiert auf den Ausgangswert adhärenter Zellen ohne Zugabe von Actinomycin D ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ). Ungepaarter T-Test mit Welch's Korrektur mit  $P^{**} < 0,01$ ,  $P^{***} < 0,001$ ,  $P^{****} < 0,0001$ .

Eine vollständige Hemmung deutet auf neu synthetisierte mRNA und auf keine Beteiligung RNA-stabilisierenden Mechanismen im Falle von *Il1a* und *Il1b* hin. Demnach scheint mRNA-Synthese die Hauptursache für die nach Adhäsion gestiegenen *Il1a* und *Il1b* mRNA-Level zu

sein. Die Daten deuten zudem darauf hin, dass Adhäsion die Transkription induziert, dass aber auch RNA-stabilisierende Mechanismen für *Il6*, *Tnf* und *Cxcl10* existieren.

#### **4.4.3 Integrin-vermittelte Adhäsion erhöht die Proteinkonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine in 32D JAK2/EPOR Zellen**

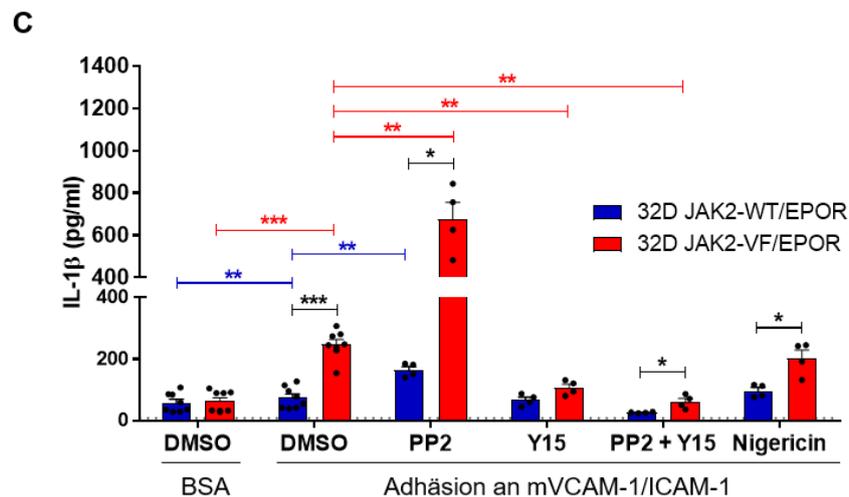
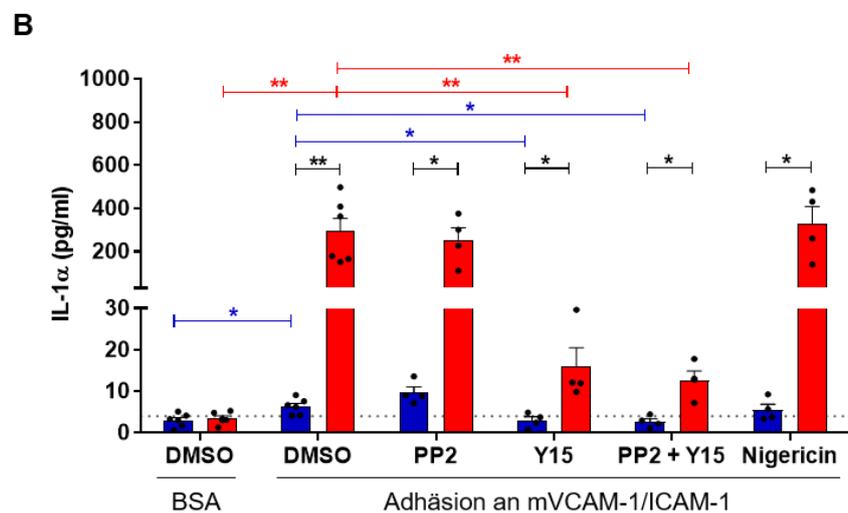
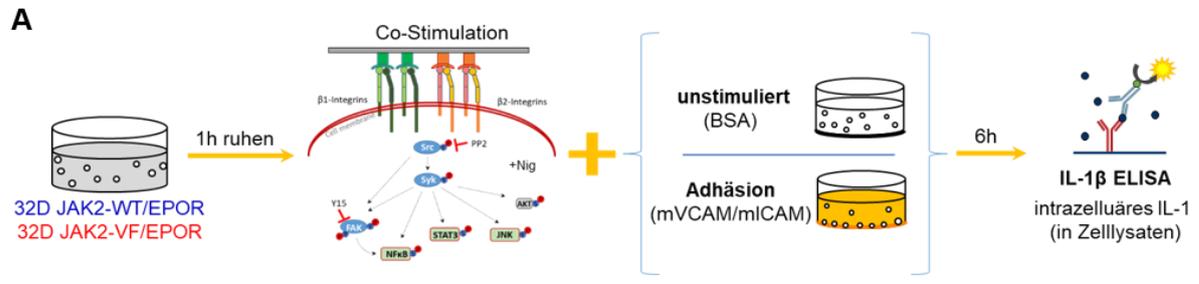
##### **4.4.3.1 Integrin-vermittelte Adhäsion induziert einen Anstieg der intrazellulären IL-1 $\alpha$ und IL-1 $\beta$ Proteinkonzentration in 32D JAK2/EPOR Zellen**

Wie bereits beschrieben, ist ein Anstieg von mRNA-Leveln nicht zwangsläufig mit einem Anstieg des entsprechenden Proteins übereinstimmend. In den meisten untersuchten primären Zellpopulationen konnte keine Adhäsions-induzierte Erhöhung der Proteinmengen inflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden (siehe 4.3). Um zu überprüfen, ob neben der Transkription von Zytokin mRNA auch eine Steigerung der Proteinmenge in den 32D Zellen induziert wird, wurden die intrazellulären Proteinkonzentrationen von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach Adhäsion in den 32D JAK2/EPOR Zelllysaten mittels ELISA analysiert (siehe Abbildung 47A). Gemäß persönlicher Kommunikation mit dem Hersteller erkennen die verwendeten ELISA Tests die jeweilige reife Form des IL-1 $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$ .

In unstimulierten Zellen beider Zelllinien (n = 8) wurden vergleichbare IL-1 $\alpha$  Level (JAK2-WT: 3,01  $\pm$  0,6 pg/ml; JAK2-VF: 3,49  $\pm$  0,6 pg/ml) nachgewiesen. Die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 hingegen führte zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären IL-1 $\alpha$  Konzentrationen in den JAK2-WT- (6,33  $\pm$  0,8 pg/ml, p=0,0152) sowie JAK2-V617F-mutierten Zellen (293,85  $\pm$  60,3 pg/ml, p=0,0022). Dies deutet darauf hin, dass neben der erhöhten Zytokin-mRNA-Expression ebenfalls ein Anstieg der IL-1 $\alpha$  Proteinkonzentration durch das *outside-in Signaling* der Integrine induziert wird. Der Adhäsions-induzierte Anstieg des intrazellulären IL-1 $\alpha$  war dabei in JAK2-V617F-mutierten Zellen signifikant stärker als in den JAK2-WT Zellen (siehe Abbildung 47B). Dies war übereinstimmend mit den qPCR-Ergebnissen, da in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen ebenfalls eine deutlich stärkere Adhäsions-induzierte *Il1a* mRNA-Expression als in den 32D JAK2-WT/EPOR Zellen beobachtet wurde.

PP2 zeigte eine Verstärkung der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression von IL-1 $\alpha$  in beiden Zelllinien. Für die 32D JAK2-WT/EPOR Zellen konnte ein Anstieg ebenfalls auf Proteinebene im ELISA bestätigt werden (WT: 9,66  $\pm$  1,4 pg/ml). In den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen konnte dagegen keine weitere Steigerung nachgewiesen werden. Y15 war in den vorangegangenen Analysen der potenteste Inhibitor, der im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde. Auf Proteinebene konnte ebenfalls eine signifikante Hemmung der Adhäsions-induzierten IL-1 $\alpha$  Expression in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen nachgewiesen werden (15,9  $\pm$  4,6 pg/ml; p=0,0095). Die IL-1 $\alpha$  Konzentration in den Y15 co-inkubierten 32D JAK2-WT/EPOR Zellen

( $2,98 \pm 0,9$  pg/ml,  $p = 0,0381$ ) entsprach dabei der unstimulierten Kontrolle. Eine kombinierte Stimulation beider Inhibitoren führte zu einer vergleichbaren Hemmung wie unter Verwendung von Y15 allein (JAK2-WT:  $2,68 \pm 0,7$ pg/ml; JAK2-VF:  $12,71 \pm 2,2$ pg/ml) (siehe Abbildung 47B).



**Abbildung 47: Die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 induziert einen Anstieg von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  auf Proteinebene. (A)** 32D JAK2-WT/EPOR (blau;  $n = 4-8$ ) und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (rot;  $n = 4-8$ ) adhärten an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 oder BSA für 6 h, bevor die Zellen lysiert und intrazelluläre Konzentrationen von reifem **(B)** IL-1 $\alpha$  und **(C)** IL-1 $\beta$  im ELISA gemessen wurden. Es wurden ausgewählte Inhibitoren der Integrin-Signaltransduktion sowie Nigericin (Nig) untersucht. DMSO wurde als Kontrolle verwendet. Die IL-1 Konzentrationen sind als Mean + SEM ( $n = 4-8$ ) dargestellt. Mann-Whitney Test mit  $P^* < 0,05$ ,  $P^{**} < 0,01$ ,  $P^{***} < 0,001$ .

Vergleichbare Expressionsmuster konnten für reifes IL-1 $\beta$  im ELISA nachgewiesen werden (siehe Abbildung 47C). Die IL-1 $\beta$  Konzentration betrug  $58,48 \pm 10,8$  pg/ml in den unstimulierten (DMSO-Kontrolle) 32D JAK2-WT/EPOR Zellen und  $62,93 \pm 11,9$  pg/ml in den unstimulierten 32D JAK2-VF/EPOR Zellen. Adhäsion an immobilisiertem mVAM-1/ICAM-1 erhöhte die nachgewiesene IL-1 $\beta$  Konzentration in den Zelllysaten auf  $74,24 \pm 12,4$  pg/ml sowie  $247,16 \pm 16,1$  pg/ml. Der Adhäsions-bedingte Anstieg war dabei signifikant höher in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen im Vergleich zu den 32D JAK2-WT/EPOR Zellen ( $p = 0,0002$ ).

Im Einklang mit den qPCR-Ergebnissen führte die Co-Stimulation mit PP2 zu einem weiteren Anstieg der Adhäsions-induzierten IL-1 $\beta$  Konzentration in beiden Zelllinien (JAK2-WT:  $164,81 \pm 10,9$  pg/ml,  $p = 0,0004$ ; JAK2-VF:  $676,55 \pm 78,8$  pg/ml,  $p = 0,0004$ ). Die Co-Stimulation mit Y15 führte ebenfalls zu einer starken Hemmung der IL-1 $\beta$  Expression auf Proteinebene in den 32D JAK2-VF/EPOR ( $106,95 \pm 11,7$  pg/ml,  $p = 0,004$ ). Unter Verwendung beider Inhibitoren (PP2, Y15) wurde die Adhäsion-induzierte IL-1 $\beta$  Konzentration in den 32D JAK2-WT/EPOR Zellen unterhalb des Ausgangswertes der unstimulierten Zellen gehemmt ( $26,56 \pm 1,1$  pg/ml), während die der 32D JAK2-VF/EPOR ihren unstimulierten Ausgangswert erreichte ( $61,66 \pm 11,0$  pg/ml).

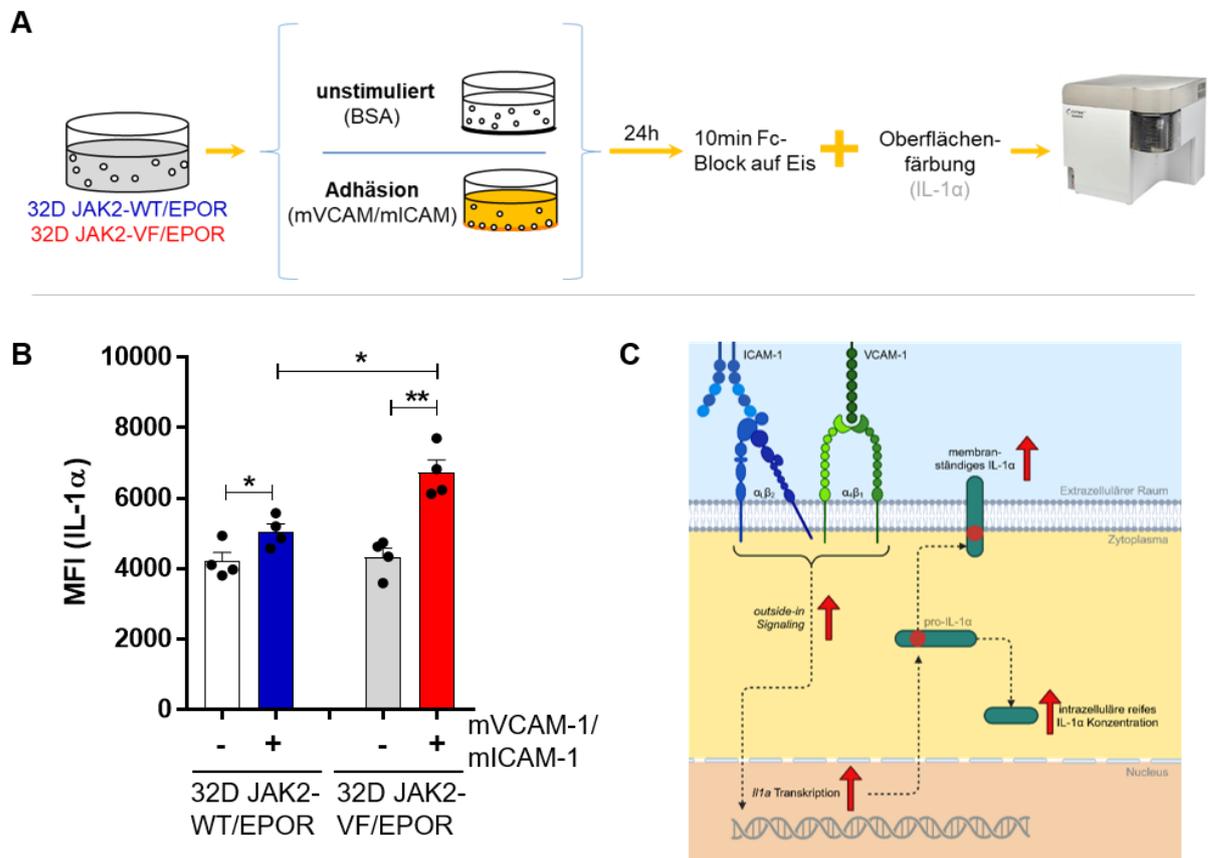
Demnach sind die erhobenen Proteindaten konsistent mit den mRNA-Ergebnissen der Adhäsions-induzierten Zytokinexpression in 32D JAK2/EPOR Zellen. Neben dem Anstieg von Zytokin-mRNA induziert das aktivierte *outside-in Signaling* ebenfalls einen Anstieg der IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Proteinkonzentrationen. Auch hier scheint die JAK2-V617F-Mutation einen fördernden Einfluss zu haben und der Signalknoten FAK eine bedeutsame Rolle zu spielen. Die Co-Stimulation der adhärenen Zellen mit Nigericin (NLRP3-Inflammasome-Aktivator) resultierte in unveränderten intrazellulären IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Konzentrationen.

#### 4.4.3.2 Integrin-vermittelte Adhäsion steigert die IL-1 $\alpha$ Oberflächenexpression

Gemäß der Literatur ist IL-1 $\alpha$  unabhängig des Reifestatus biologisch funktional.<sup>161</sup> In Abhängigkeit der Lokalisation verfügt IL-1 $\alpha$  jedoch über unterschiedliche Wirkmechanismen (Vergleich Review Chiu et al.<sup>315</sup> siehe 1.2.2.2). Wir vermuten, dass die Adhäsion eine lokale Immunantwort durch membranständiges IL-1 $\alpha$  induzieren und so ein pro-inflammatorisches Milieu in bspw. der Knochenmarknische fördern könnte. Daher wurde die IL-1 $\alpha$  Expression auf der Zelloberfläche von 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen ( $n = 4$ ) nach Adhäsion mittels FACS-Analyse untersucht (siehe Abbildung 48A).

In 32D JAK2-WT/EPOR Zellen kam es durch Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 nur zu einem geringen Anstieg des IL-1 $\alpha$  auf der Zelloberfläche ( $p = 0,0429$ ). Nach 24 h Adhäsion konnte jedoch ein deutlicher Anstieg des membranständigen IL-1 $\alpha$  in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen ( $p = 0,0023$ ) nachgewiesen werden

(siehe Abbildung 48B). Dieser war ebenfalls signifikant im Vergleich zu adhärenen 32D JAK2-WT/EPOR Zellen ( $p = 0,0111$ ). Um fehlerhafte Färbungen (z.B. intrazelluläre Färbung) zu verhindern, wurden die Zellen nicht fixiert.<sup>226</sup> Zudem wurde ein Fc-Block zur Blockierung von Fc-Rezeptoren verwendet.



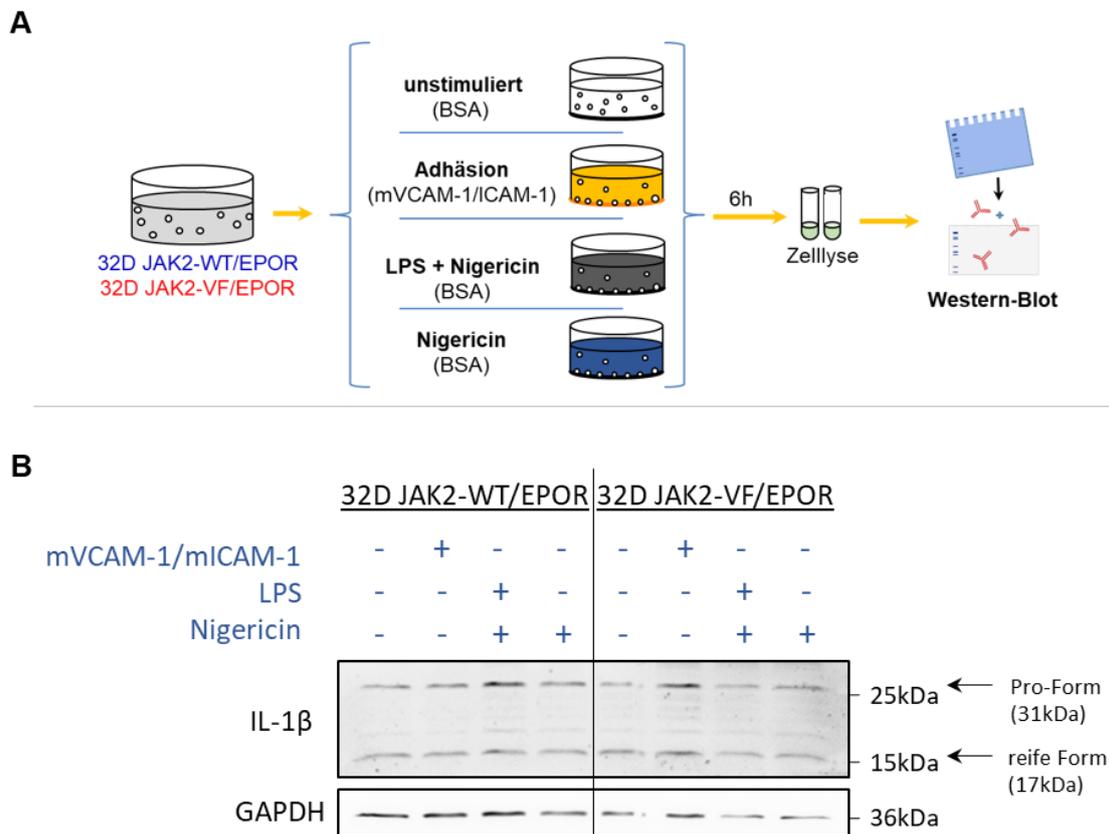
**Abbildung 48: Anstieg des membranständigen IL-1α auf 32D JAK2-VF/EPOR Zellen nach 24 h Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1. (A)** IL-1α wurde an der Zelloberfläche von 32D JAK2-WT/EPOR (blau;  $n = 4$ ) und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (rot  $n = 4$ ) nach 24 h Adhäsion (immobilisiertes mVCAM-1/mICAM-1) mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen. **(B)** Die MFI-Werte sind als Mean + SEM ( $n=3$ ) dargestellt. **(C)** Schematische Darstellung der Adhäsions-vermittelten IL-1α Oberflächenexpression. Ungepaarter T-Test mit Welch's Korrektur mit  $P < 0,05$ ,  $P^{**} < 0,01$ .

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass lediglich die 32D JAK2-VF/EPOR Zellen nach Adhäsion zusätzlich eine lokale Immunantwort über das an der Oberfläche exprimierte IL-1α induzieren könnten.

#### 4.4.3.3 Integrin-vermittelte Adhäsion induziert die IL-1β Prozessierung in 32D JAK2/EPOR Zellen

Pro-IL-1β ist im Gegensatz zu pro-IL-1α nicht biologisch aktiv und bedarf weiterer Prozessierung.<sup>161</sup> Nach einer Spaltung des pro-IL-1β durch beispielsweise die aktive Caspase-1<sup>204-206</sup> ist das reife IL-1β ebenfalls biologisch aktiv und kann eine Signalgebung induzieren.<sup>161</sup>

Um eine mögliche Integrin-vermittelte Prozessierung von IL-1 $\beta$  zu überprüfen, wurden Zelllysate für Western-Blot Analysen angefertigt (siehe Abbildung 49A). Für den IL-1 $\beta$  Nachweis wurde ein Antikörper verwendet, der sowohl die Pro-Form (31 kDa) als auch die reife, prozessierte Form des Proteins (17 kDa) detektieren.



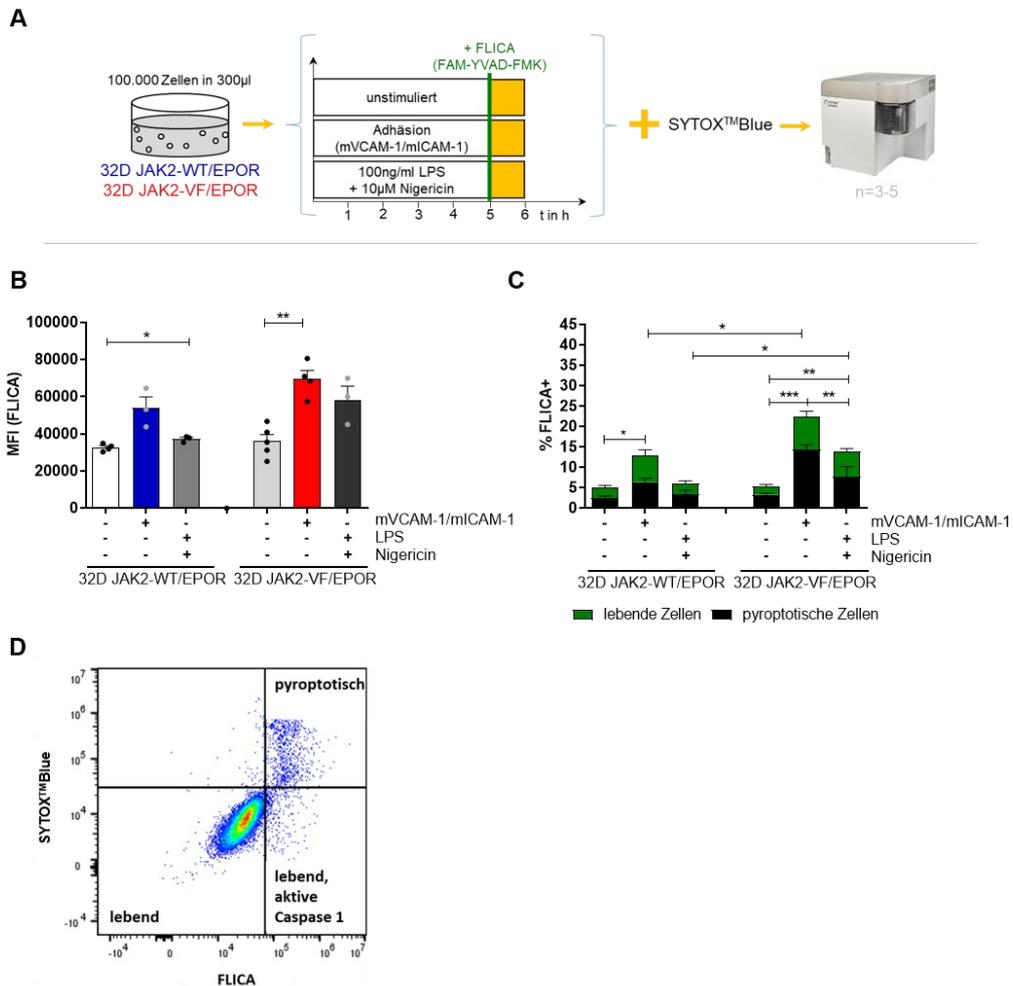
**Abbildung 49: Bestätigung des Vorhandenseins von IL-1 $\beta$  in reifer (17 kDa) und Pro-Form (31 kDa).** (A) Aus 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen wurden nach 6 h Adhäsion (mVCAM-1/miCAM-1) oder nach Stimulation mit LPS und Nigericin Lysate erstellt. (B) Der Nachweis des Reifestadiums des IL-1 $\beta$  erfolgte anhand des Molekulargewichtes im Western-Blot und einem spezifischen anti-IL-1 $\beta$  Antikörper, der sowohl die Pro-Form als auch das reife IL-1 $\beta$  erkennt. Als Ladekontrolle wurde GAPDH verwendet. Dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot (n=2).

Es konnte sowohl die Pro-Form des IL-1 $\beta$  als auch reifes IL-1 $\beta$  im Western-Blot anhand des Molekulargewichtes detektiert werden (siehe Abbildung 49B). In den unstimulierten Zellen konnten auch vergleichbare Mengen von IL-1 $\beta$  in beiden Zelllinien nachgewiesen werden. Dies ist übereinstimmend mit den ELISA Ergebnissen. Nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/miCAM-1 war ein deutlicher Anstieg des pro-IL-1 $\beta$  in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen nicht aber in den 32D JAK2-WT/EPOR nachweisbar. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit LPS und Nigericin behandelt. Jedoch war keine deutlichen Signalveränderungen im Western-Blot nachweisbar. Lediglich ein geringer Anstieg des pro-IL-1 $\beta$  in den 32D JAK2-WT/EPOR Zellen konnte gezeigt werden.

Für die Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  ist beispielsweise das Vorhandensein eines Inflammasoms sowie aktiver Caspase-1 notwendig.<sup>207</sup> Für das NLRP3-Inflammasom konnten alle notwendigen Komponenten wie das NLRP3-Protein, das Adapterprotein ASC und Caspase-1 mittels Western-Blot nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten).

Der Nachweis Adhäsions-induzierter, aktiver Caspase-1 in 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (n = 3-5) erfolgte erneut unter Verwendung des FAM-YVAD-FMK FLICA-Assay (siehe Abbildung 50A). Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 führte, anders als in den primären Zellen, zu einem deutlichen Anstieg des FLICA-Signals in 32D JAK2-WT/EPOR (3,4-fach; p = 0,0682) und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (4,8-fach; p = 0,0014) (siehe Abbildung 50B). Dabei war der Anteil FLICA-positiver Zellen nach Adhäsion bei den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (20,55  $\pm$  1,4 %) signifikant höher als in den 32D JAK2-WT/EPOR Zellen (12,5  $\pm$  2,2 %, p = 0,0443) (siehe Abbildung 50C). Demzufolge induziert Adhäsion die Aktivierung von Caspase-1 in 32D JAK2/EPOR Zellen und bekräftigt die Annahme, das reife, prozessierte IL-1 $\beta$  vorliegt.

Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit LPS und Nigericin stimuliert. Dabei liefert LPS das Induktionssignal und Nigericin das Aktivierungssignal des NLRP3-Inflammasoms und kann Caspase-1 aktivieren. Die Positivkontrolle induzierte in beiden Zelllinien Caspase-1 Aktivität. Jedoch war sowohl das FLICA-Signal als auch der Anteil FLICA-positiver Zellen nach LPS / Nigericin-Stimulation niedriger als nach Adhäsion (siehe Abbildung 50B+C). Dies deutet darauf hin, dass VCAM-1/ICAM-1-vermittelte Adhäsion eine stärkere Caspase-1 Aktivität induziert als die verwendete Positivkontrolle. Einschränkend wurde aber auch gezeigt, dass der FLICA Assay nicht zu 100% spezifisch ist und demnach unspezifische Bindungen eine Rolle spielen könnten.<sup>668</sup>



**Abbildung 50: Die Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 aktiviert Caspase-1 und induziert Pyroptose in 32D JAK2/EPOR Zellen. (A)** Aktive Caspase-1 wurde nach Adhäsion in 32D JAK2-WT/EPOR Zellen (blau) bzw. 32D JAK2-VF/EPOR Zellen (rot) mittels FLICA (FAM-YVAD-FMK) gefärbt und analysiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit LPS und Nigericin stimuliert. **(B)** Die MFI-Werte der gesamten Zellen, sowie **(C)** die Verteilung von lebenden und pyroptotischen Zellen ist als Mean + SEM (n = 3 - 5) dargestellt. **(D)** Das *Gating* ist in einem repräsentativen Blot dargestellt. Die zusätzliche Färbung mit SYTOX™ Blue erlaubt die Unterscheidung zwischen lebenden (FLICA+, SYTOX™ Blue-; grün) und pyroptotischen Zellen (FLICA+, SYTOX™ Blue+; schwarz). Ungepaarter T-Test mit Welch's Korrektur mit  $P^* < 0,05$ .

#### 4.4.4 Integrin-vermittelte Adhäsion induziert Pyroptose in 32D JAK2/EPOR Zellen

Neben der Spaltung von pro-IL-1 $\beta$  spielt aktive Caspase-1 ebenfalls eine entscheidende Rolle in der Spaltung von Gasdermin D und der Pyroptose.<sup>283</sup> Gespaltenes Gasdermin D kann Poren in der Zellmembran bilden, was zur Pyroptose führt.<sup>283–285</sup> Zum Nachweis von Pyroptose wird zumeist aktive Caspase-1 sowie LDH-Freisetzung bzw. verschiedene Lebend-tot-Farbstoffe verwendet.<sup>603,604,669</sup>

SYTOX™ Blue wurde als Lebend-tot-Farbstoff verwendet und während der FLICA-Färbung eingesetzt. Durchflusszytometrische Analysen zeigten, dass 6,5 % der JAK2-WT und 8,1 %

der JAK2-VF Zellen FLICA positiv waren, jedoch als lebend identifiziert werden konnten. Demnach enthielten diese Zellen aktive Caspase-1, waren jedoch noch nicht pyroptotisch, da sie kein SYTOX™ Blue aufnahmen (siehe Abbildung 50C+D). Zudem waren 6,3 % der adhärenen JAK2-WT und 14,4 % der JAK2-VF Zellen sowohl FLICA als auch SYTOX™ Blue positiv. Dies entspricht pyroptotischen Zellen. Demnach kann Adhäsion Pyroptose induzieren. Dies wurde erneut verstärkt durch die JAK2-V617F-Mutation. Die Daten deuten darauf hin, dass Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 sowohl Caspase-1 aktivieren als auch Pyroptose induzieren kann, dies jedoch nicht in allen Zellen stattfindet. Der Adhäsion-induzierte Effekt wurde dennoch durch die JAK2-V617F-Mutation verstärkt.

#### 4.4.5 Fehlende Sezernierung von reifem IL-1 $\alpha$ und IL-1 $\beta$ nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 von 32D JAK2/EPOR Zellen

Bei der Pyroptose handelt es sich um einen stark inflammatorischen, programmierten Zelltod.<sup>275</sup> Da Pyroptose nachgewiesen werden konnte, wird davon ausgegangen, dass ebenfalls eine Sekretion des intrazellulären IL-1 erfolgte. Um dies zu überprüfen, wurden die Zellkulturüberstände adhärenen 32D JAK2/EPOR Zellen im ELISA untersucht. Nach 6 h sowie 24 h konnte kein IL-1 im Überstand unstimulierter und adhärenen Zellen nachgewiesen werden (unveröffentlichte Daten). Zu geringe Proteinkonzentrationen wurden vermutet, daher wurden die Überstände zusätzlich mittels Amicon Ultrazentrifugeneinheit (Molekular-*cutoff* 3 kDa) um den Faktor 10 aufkonzentriert und erneut im ELISA analysiert. Ein Nachweis von sezerniertem IL-1 war dennoch nicht möglich.

Das IL-1 könnte zudem in extrazellulären Vesikeln (EV) verpackt vorliegen oder durch Proteasen im Überstand bereits abgebaut worden sein. Um dies auszuschließen wurden die Zellkulturüberstände nach Zellernte mit 1 % Triton X-100 und Protease-Inhibitoren versetzt. Der Nachweis von sezerniertem IL-1 war dennoch nicht möglich. Die direkte Bindung von sezerniertem IL-1 an den Zell-eigenen IL-1R könnte eine weitere mögliche Erklärung sein, konnte jedoch mittels Co-Stimulation mit anti-IL-1R-Antikörper (blockierende Wirkung) und einem weiterhin ausbleibenden Nachweis von sezerniertem IL-1 ausgeschlossen werden (unveröffentlichte Daten).

Trotz nachgewiesener Pyroptose war also keine Sekretion des IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  detektierbar. Das IL-1 wurde zudem weder über EV sezerniert, noch durch Proteasen abgebaut oder hatte an den Zell-eigenen IL-1R gebunden. Es wird vermutet, dass weiterhin zu geringe IL-1 Konzentrationen sezerniert wurden, ein weiteres Signal zur Freisetzung der beiden Zytokine notwendig ist oder die untersuchten 32D JAK2-WT/EPOR und 32D JAK2-VF/EPOR Zellen eventuell nicht in der Lage sind IL-1 zu sekretieren. Die letzte These wird gestützt durch

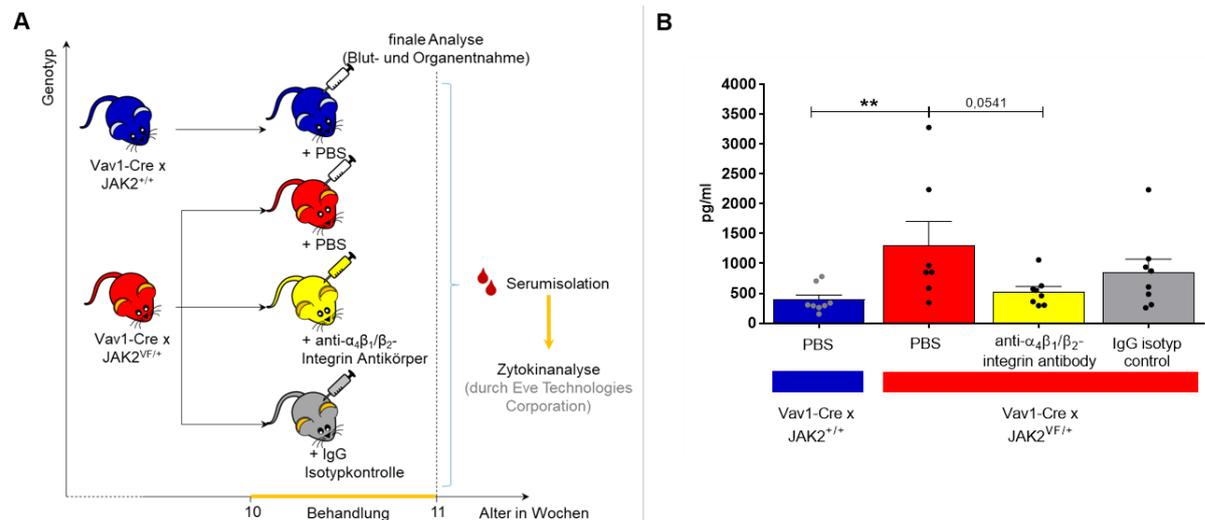
fehlende IL-1 Sekretion unter Verwendung der Adhäsion – Nigericin-Kontrolle (siehe Abbildung 47) oder der LPS - Nigericin Positivkontrolle (unveröffentlichte Daten).

Zusammenfassend war weder in hämatopoetischen Zellen der Vav1-Cre x JAK2 Mäuse noch in 32D JAK2/EPOR Zellen eine Adhäsions-induzierte Sekretion des IL-1 nachweisbar. Die übereinstimmenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Adhäsion an VCAM-1 und ICAM-1 nicht die Freisetzung von IL-1 induziert und dass dafür weitere Signale und Faktoren notwendig sind, die im Zellkultursystem (*in vitro*) von primären Zellen und in Zelllinien nicht enthalten sind.

#### **4.5 *In vivo* Hemmung der Aktivierung von $\beta_1/\beta_2$ -Integrinen und deren Auswirkungen auf die Serum IL-1 $\alpha$ Konzentration im MPN-Mausmodell**

In den vorausgegangenen Kapiteln konnten erhöhte intrazelluläre IL-1 $\alpha$  und pro-IL-1 $\beta$  Konzentrationen, eine verstärkt aktivierte Caspase-1 und Adhäsions-induziertes *outside-in Signaling* sowie die Induktion pro-inflammatorischer Zytokin mRNA in JAK2-V617F-mutierten Zellen nachgewiesen werden. Daher wurde eine pro-inflammatorische Rolle der Aktivierung von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrinen postuliert. Dennoch konnte kein sekretiertes IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. Da sich dennoch erhöht Zytokinlevel im Serum der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse befanden, werden weitere *in vivo* Signale für eine erfolgreiche Sekretion von IL-1 vermutet. Um die Rolle der Integrinaktivierung *in vivo* zu untersuchen, wurden Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse im Alter von 10 Wochen einmalig mit 200  $\mu$ g anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin Antikörper (n = 8) bzw. der zugehörigen IgG-Isotyp-Kontrolle (n = 8) i.p. behandelt (siehe Abbildung 51A). Nach einer Woche erfolgte die finale Analyse der Mäuse. Serum-Zytokin-Analysen zeigten signifikant erhöhtes IL-1 $\alpha$  in PBS behandelten Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen (1302,0  $\pm$  400,0 pg/ml; p = 0,0037) im Vergleich zu PBS behandelten Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (392,3  $\pm$  79,6 pg/ml) Mäusen (siehe Abbildung 51B). Die PBS-Kontrollen wurde verwendet, um mögliche injektionsbedingte Veränderungen im Zytokinprofil ausschließen zu können.

Im Serum anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Antikörper behandelter Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse wurden reduzierte IL-1 $\alpha$  Konzentrationen (528,7  $\pm$  87,8 pg/ml) im Vergleich zu PBS und IgG Isotyp-behandelten Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Kontrollen nachgewiesen (siehe Abbildung 51B). IL-1 $\beta$  lag in allen Gruppen des verwendeten Mausmodells unter der Nachweisgrenze, sodass mögliche Veränderungen nicht untersucht werden konnten.



**Abbildung 51: Die anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Behandlung hemmt die erhöhte IL-1 $\alpha$  Serumkonzentrationen in Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen. (A)** Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse (rot) wurden im Alter von 10 Wochen einmalig mit 200 $\mu$ g (  ; n = 8) anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin Antikörpern bzw. (  ; n = 8) den zugehörigen IgG-Isotyp-Kontrollen behandelt (i.p.). Als Kontrolle wurden Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (blau; n = 8) und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse (rot; n = 7) mit PBS behandelt, um Einflüsse der i.p. Injektion auszuschließen. **(B)** Nach einer Woche erfolgte die Serumisolierung und Zytokinanalyse durch Eve Technologies Corporation. Die Konzentrationen sind als Mean + SEM (n = 7-8) dargestellt. Mann-Whitney Test mit P\*\*<0,01.

Eine anti-Integrin-Antikörper-Behandlung wurde nicht in gesunden Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen untersucht. Da jedoch mehrere verschiedene Zellpopulationen eine Adhäsions-induzierte mRNA-Expression unabhängig der Mutation *in vitro* zeigten, wird dennoch vermutet, dass die Adhäsion ein pro-inflammatorisches Mikromilieu unabhängig der Mutation induzieren kann. Möglicherweise wird dieses jedoch im Zusammenspiel mehrerer Zellpopulationen im JAK2-V617F-mutierten Organismus verstärkt, gibt das notwendig Signal zur Sekretion und führt zu erhöhten pro-inflammatorischen Zytokinleveln.

Dieses Experiment deutet darauf hin, dass eine Blockade der  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Aktivierung durch VCAM-1/ICAM-1 ausreichend ist, um die erhöhte IL-1 $\alpha$  Spiegel im Serum JAK2-V617F-mutierter Mäuse zu reduzieren.

## 5 Diskussion

MPN-Erkrankungen sind vorwiegend mit der somatischen JAK2-V617F Treibermutation<sup>6-15</sup>, einer klonalen Hämatopoese<sup>670,671</sup>, einem erhöhten Risiko eines thromboembolischen Ereignisses<sup>52-54</sup>, einer Splenomegalie<sup>55-57</sup> und erhöhten pro-inflammatorischen Zytokin-Spiegeln im Serum der Patienten<sup>62-64</sup> assoziiert. Mehrere Forschungsgruppen haben eine bedeutende Rolle des IL-1 $\beta$  in der Induktion<sup>107</sup> und dem Fortschreiten<sup>106,107,109,128</sup> einer JAK2-V617F-mutierten MPN beschrieben. Die JAK2-V617F-Mutation aktiviert unterschiedliche Signalwege *downstream* der mutierten JAK2-Kinase.<sup>6,7,9,32</sup> Dabei wird das *inside-out Signaling* von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrinen aktiviert und resultiert in der Induktion der hoch-affinen Konformation der  $\beta_1$ -Integrine sowie einer erhöhten Adhäsion der  $\beta_1$ - (VLA-4) und  $\beta_2$ -Integrine (LFA-1) JAK2-V617F-mutierter hämatopoetischer Zellen auf VCAM-1 und ICAM-1.<sup>421,422</sup>

### 5.1 Charakterisierung hämatopoetischer Zellpopulationen im Vav1-Cre x JAK2 Mausmodell bezüglich ihrer IL-1 Expression und ihrer Caspase-1 Aktivität

Erhöhte pro-inflammatorische Zytokin-Spiegel im Serum wurden in unterschiedlichen MPN-Studien<sup>62-64</sup> und in Mausmodellen<sup>106-108,118,122,124</sup> nachgewiesen. Einige Mausstudien deuten auf eine Sekretion durch hämatopoetische Zellen<sup>106</sup>, insbesondere Stammzellen, Megakaryozyten und Monozyten hin.<sup>107</sup> In dem von uns untersuchten Vav1-Cre x JAK2 Mausmodell enthielten unstimulierte, frisch isolierte Progenitorzellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse deutlich mehr intrazelluläres IL-1 $\alpha$  und pro-IL-1 $\beta$  im Vergleich zu Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen (siehe 4.1.1). Übereinstimmend mit Watari et al.<sup>672</sup> konnten wir ebenfalls eine IL-1 $\beta$  Expression in hämatopoetischen Progenitorzellen nachweisen. Im Vergleich zu JAK2<sup>+/+</sup> Zellen war diese in allen untersuchten JAK2-V617F-mutierten Progenitorzellen erhöht. In den meisten Studien werden jedoch reife Zellpopulationen wie T-Zellen<sup>292</sup>, Granulozyten<sup>208,251,292</sup>, Monozyten<sup>191</sup>, Makrophagen<sup>340,673</sup> und dendritische Zellen<sup>190</sup> als Hauptproduzenten von IL-1 beschrieben. Im Gegensatz zu unseren Analysen wurden dabei jedoch keine hämatopoetischen Progenitorzellen charakterisiert. In der Analyse der differenzierten Zellpopulationen zeigten die Granulozyten die höchste IL-1 $\alpha$  und pro-IL-1 $\beta$  Expression. Ein direkter Vergleich zwischen Progenitorzellen und reifen Zellpopulationen war in unseren Analysen aufgrund der Verwendung unterschiedlicher Durchflusszytometer (DFZ; Progenitorzellen - Cytex® Northern Lights™ versus reife Zellpopulationen - BD FACS Canto II) jedoch nicht möglich.

Die Expression des IL-1 $\alpha$  und pro-IL-1 $\beta$  war in den reifen Zellpopulationen der beiden Genotypen vergleichbar. Ausnahmen bildeten dabei CD41<sup>+</sup> Zellen (entsprechen megakaryozytären Zellen<sup>625,626</sup>) und B-Zellen der JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse mit signifikant erhöhten IL-

1 $\alpha$  Leveln bzw. mit signifikant erhöhtem pro-IL-1 $\beta$ . MK sind in der Lage *Il1a* mRNA zu exprimieren.<sup>295</sup> Übereinstimmend zeigten unsere FACS-Daten eine IL-1 $\alpha$  Expression auf Proteinebene. Die signifikant erhöhten IL-1 $\alpha$  Level in den CD41<sup>+</sup> Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse bestätigen die Megakaryozyten ebenfalls als relevante IL-1 $\alpha$  Produzenten in JAK2-V617F-mutierten MPN. Bisher wurden die MK in JAK2-V617F-mutierten Mausmodellen lediglich als IL-1 $\beta$ -Produzenten beschrieben.<sup>107</sup>

Pro-IL-1 $\beta$  hingegen konnte in unserem Modell weder in den CD41<sup>+</sup> Zellen der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse noch in den JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen nachgewiesen werden. Dies könnte auf unterschiedliche Ursachen zurückgeführt werden: es ist bekannt, dass die IL-1 $\beta$  Expression ein Induktions-Signal benötigt<sup>190,191</sup> und dieses könnte hier fehlen. Da die pro-IL-1 $\beta$  Expression in anderen Zellpopulationen des von uns untersuchten Mausmodells nachgewiesen wurde, wird es als unwahrscheinlich angesehen, dass ein fehlendes Induktions-Signal ursächlich ist. Weiterhin erkennt der verwendete anti-pro-IL-1 $\beta$ -Antikörper gemäß Herstellerangaben nur die Pro-Form des IL-1, aber nicht die reife Form. Demnach besteht die Möglichkeit, dass das exprimierte pro-IL-1 $\beta$  in den CD41<sup>+</sup> Zellen bereits in seine reife Form gespalten wurde und/oder bereits sekretiert wurde. Damit wäre eine Detektion mit dem verwendeten Antikörper nicht möglich.

CD41 charakterisiert hauptsächlich ruhende Thrombozyten (PLT) als auch Megakaryozyten aus denen PTL entstehen.<sup>625,626</sup> Da keine weiteren spezifizierenden Antikörper für die Charakterisierung verwendet wurden, erfolgte eine Plausibilitätskontrolle im FSC-SSC der DFZ-Analyse. Diese ergab, dass es sich bei den in dieser Arbeit untersuchten CD41<sup>+</sup> Zellen höchstwahrscheinlich tatsächlich um MK und nicht um PLT handelt. In der Literatur wird kritisch diskutiert, ob MK und PLT fähig sind, IL-1 zu exprimieren und zu sezernieren. Dies würde eine weitere Erklärung für den fehlenden Nachweis von pro-IL-1 $\beta$  in den CD41<sup>+</sup> Zellen liefern. Li et al.<sup>293</sup> zeigten jedoch eine Panx1-p38-abhängige IL-1 $\beta$  Expression in aktivierten PLT, nicht aber in ruhenden PLT. Auch andere Arbeitsgruppen beschrieben eine IL-1 Expression in PLT<sup>674,675</sup>, während Rolfes et al. zeigten, dass auf mRNA- und Proteinebene weder IL-1 noch die Inflammasom-Komponenten in PLT und in MK exprimiert werden.<sup>291</sup> Dennoch wurde eine Korrelation von der Thrombozytenzahl und der IL-1 $\beta$  Plasmakonzentration, sowie ein fördernder Effekt von PLT auf die IL-1 $\beta$  Expression und Sekretion in myeloischen Zellen beschrieben.<sup>291</sup>

B-Zellen werden nur sehr selten und unter bestimmten Bedingungen als IL-1 $\beta$ -Produzenten beschrieben. Dennoch gibt es Studien, die B-Zellen als IL-1 $\beta$  Hauptproduzenten identifizieren.<sup>676</sup> Zudem ist bekannt, dass die JAK2-V617F-Mutation als auch die CALR-Mutationen zu einer B-Zellaktivierung führen.<sup>677</sup> Dies geht ebenfalls mit einem erhöhten Anteil IL-1 $\beta$ - und IL-6-positiver B-Zellen einher.<sup>677</sup> Diese Beobachtung konnten wir in unseren Daten

bestätigen: die JAK2-V617F-mutierten B-Zellen enthielten signifikant mehr pro-IL-1 $\beta$  als die JAK2<sup>+/+</sup> B-Zellen.

Pro-IL-1 $\beta$  ist nicht biologisch aktiv und bedarf einer proteolytischen Spaltung, um biologische Reaktionen hervorzurufen zu können.<sup>161</sup> Zumeist erfolgt diese durch aktive Caspase-1.<sup>204–206</sup> Erhöhte Mengen an pro-IL-1 $\beta$  als auch an aktiver Caspase-1 wurden von uns in den Progenitorzellen der JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse nachgewiesen. Diese Zellen könnten somit zur pro-inflammatorischen Situation in JAK2-V617F-mutierten MPN beitragen. Dies ist übereinstimmend mit der Beobachtung von Rai et al., dass die hämatopoetischen, JAK2-V617F-mutierten Zellen die Quelle der erhöhten IL-1 Konzentrationen in JAK2-V617F-mutierten MPN darstellen und insbesondere HSC eine bedeutende Rolle spielen.<sup>106</sup> Unsere Daten legen nahe, dass ergänzend zu den LT-HSC, Monozyten und Megakaryozyten<sup>107</sup>, verschiedene Progenitorzellen als auch B-Zellen zu den erhöhten IL-1 Spiegeln bei JAK2-V617F-positiven MPN beitragen.

Im Gegensatz dazu war in den reifen, unstimulierten Zellpopulationen der JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse keine erhöhte Caspase-1 Aktivität im Vergleich zu den JAK2<sup>+/+</sup> Zellen nachweisbar. Dies deutet erneut auf eine stärkere Bedeutung der Progenitorzellen im Vergleich zu den reifen Zellpopulationen in dem IL-1 $\beta$ -vermittelten pro-inflammatorischen *Microenvironment* bei JAK2-V617F-positiven MPN hin. Unter den differenzierten Zellen zeigten lediglich CD41<sup>+</sup> Zellen der JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse eine leicht erhöhte Caspase-1 Aktivität. Dies unterstützt die Annahme, dass in den *ex vivo* untersuchten CD41<sup>+</sup> Zellen bereits eine Prozessierung und Sekretion von IL-1 $\beta$  stattgefunden hat und dies der Grund für den fehlenden Nachweis von pro-IL-1 $\beta$  ist.

## **5.2 Einfluss von Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 auf die Caspase-1 Aktivität in primären Zellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells**

Gemäß der Literatur wird IL-1 $\alpha$  konstitutiv exprimiert<sup>296–298</sup>, wohingegen die IL-1 $\beta$  Expression und Caspase-1 Aktivierung zusätzliche Signale benötigt<sup>190,210,211,258</sup>. In dem hier verwendeten Vav1-Cre x JAK2 Mausmodell konnte jedoch vermehrt pro-IL-1 $\beta$  und aktive Caspase-1 in nahezu allen, unstimulierten Progenitorzellpopulationen der JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse nachgewiesen werden. Aufgrund dessen gehen wir davon aus, dass die Mutation selbst oder die Interaktion mit anderen Zellen der Stammzellnische oder mit der extrazellulären Matrix die verstärkte Expression von IL-1 $\beta$  und die Aktivierung von Caspase-1 induziert. Daher wurde der Einfluss der Stimulation mit Integrin-Liganden VCAM-1 und ICAM-1 auf die Caspase-1 Aktivität untersucht. VCAM-1 und ICAM-1 wird eine bedeutende Rolle in der Stammzellnische des Knochenmarks zugeschrieben.<sup>678,679</sup> Zudem wird ihre Expression durch inflammatorisches Mikromilieu hochreguliert.<sup>680–683</sup> Interessanterweise induzierte die *in vitro* Stimulation mit

immobilisiertem mVAM-1/mICAM-1 keinen weiteren Anstieg der aktiven Caspase-1 in den Progenitorzellen. Es wird deshalb vermutet, dass andere Interaktionen oder die Mutation selbst für die erhöhten Caspase-1 Aktivität in den unstimulierten JAK2<sup>VF/+</sup> Zellen ursächlich sind. AIM2, ein weiteres Inflammasom, wurde beispielsweise gemeinsam mit CASP1 und IL1 $\beta$  ebenfalls *downstream* von der JAK2-V617F-Mutation in D9 Zelllinien<sup>684</sup>, in JAK2-V617F Mausmodellen<sup>685</sup> sowie bei MPN-Patienten<sup>686</sup> nachgewiesen. Daher wird ein mutations-induzierter und zelltyp-spezifischer Mechanismus als Ursache der verstärkten pro-IL-1 $\beta$  Expression und der aktiven Caspase-1 in den untersuchten Progenitorzellen vermutet.

Dennoch konnte eine Caspase-1 Aktivierung nach mVCAM-1/mICAM-1-Stimulation von JAK2-V617F-positiven T-Zellen auf statistisch signifikantem Niveau nachgewiesen werden (siehe 4.1.3). Eine diskrete, statistisch nicht-signifikante Erhöhung zeigte sich ebenfalls in B-Zellen, Monozyten und Makrophagen. Diese war sowohl in den JAK2<sup>+/+</sup> als auch in den JAK2<sup>VF/+</sup> Populationen erkennbar. In den CD41<sup>+</sup> Zellen lag eine geringe Erhöhung in der JAK2<sup>VF/+</sup> Fraktion vor. Damit konnten wir erstmals die Induktion von Caspase-1 Aktivität durch Adhäsion an mVCAM-1 und mICAM-1 in unterschiedlichen Zellpopulationen zeigen. Lediglich Watanabe et al.<sup>687</sup> zeigten bereits, dass Adhäsion von Fibroblasten an Collagen oder poly-L-Lysin zu einer Caspase-3, nicht aber Caspase-1 Aktivierung führte. Demnach wird sowohl ein zelltyp-spezifischer als auch Liganden-abhängiger Mechanismus der Adhäsions-vermittelten Caspase-1 Aktivierung vermutet. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig. Möglicherweise spielen dabei NF $\kappa$ B, Syk, JNK und FAK eine Rolle, da diese sowohl im *outside-in Signaling* als auch in der Inflammasom-Signalgebung beteiligt sind. NF $\kappa$ B kann die Expression aller Inflammasom-Komponenten, sowie von pro-IL-1 $\beta$  induzieren.<sup>197,210,213</sup> Syk hingegen kann ASC, ein Adapterprotein des Inflammasoms, phosphorylieren.<sup>688</sup> Diese Phosphorylierung an Tyrosinrest 146 und 187 ist notwendig für die ASC-Oligomerisierung und Assemblierung des Inflammasoms.<sup>688</sup> Jedoch kann Syk auch die Expression von NLRP3 und pro-IL-1 $\beta$  negativ beeinflussen.<sup>688</sup> JNK hingegen ist in der Lage das NLRP3-Inflammasom zu phosphorylieren.<sup>222</sup> Diese ist für die Deubiquitinierung und Aktivierung des Inflammasoms notwendig.<sup>222</sup> Weiterhin wurde FAK in *Yersinia enterocolitica* infizierten Epithelzellen beschrieben, eine  $\beta_1$ -Integrin-vermittelte Caspase-1 Spaltung zu induzieren.<sup>689</sup> Demnach könnten die ebenfalls durch *outside-in Signaling* aktivierten Signalmoleküle (NF $\kappa$ B, Syk, JNK und FAK) die Expression und anschließende Aktivierung des Inflammasomes und damit auch der Caspase-1 induzieren.

Lediglich in CD41<sup>+</sup> Zellen schien eine JAK2-V617F-Mutations-spezifische Caspase-1 Aktivierung nach VCAM-1/ICAM-1-Stimulation stattzufinden. Dies deutet abermals auf eine besondere Rolle von CD41<sup>+</sup> Zellen in JAK2-V617F-mutierten MPN hin. Diese These wird gestützt durch eine erhöhte Anzahl der Megakaryozyten (CD41<sup>+</sup>) im Knochenmark und in der

Milz JAK2-V617F-mutierter Mäuse.<sup>108</sup> Übereinstimmend mit unseren Daten legen viele Studien zudem eine wichtige Verbindung zwischen IL-1 und CD41<sup>+</sup> Zellen nahe (siehe 1.2.1.4).

PF4-Cre spezifische JAK2-V617F Mausmodelle tragen die JAK2-V617F-Mutation lediglich in MK und PLT.<sup>122,244</sup> Diese Modelle zeigten einen PV-ähnlichen Phenotyp.<sup>122,244</sup> Demnach ist die JAK2-V617F-Mutation in den MK und PLT ausreichend um eine MPN zu induzieren.<sup>122,244</sup> Die Serummarker CCL11, CXCL1, CXCL2 und IL-6 wurden in diesem Mausmodell als signifikant erhöht nachgewiesen.<sup>122</sup> Überraschenderweise waren die IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Zytokin-Spiegel jedoch in diesem Mausmodell unverändert.<sup>122</sup> Dies deutet auf eine entscheidende Rolle der MK, aber auch auf die Notwendigkeit weiterer JAK2-V617F-mutierter Zellpopulationen hin, um das vollständige pro-inflammatorische Mikromilieu in JAK2-V617F-mutierten MPN abbilden zu können. Demnach ist die JAK2-V617F-Mutation in MK nicht allein ausschlaggebend für die stark erhöhten IL-1 Serumlevel bei MPN-Patienten. Im PF4-Cre JAK2-VF Mausmodell scheint die erhöhte IL-6 Konzentration einen starken Einfluss auf mehrere Krankheits-assoziierte Parameter zu haben.<sup>122</sup> Im Gegensatz zu dem PF4-Cre JAK2-V617F Modell zeigten unsere Daten<sup>123</sup>, dass eine IL-6 Inhibition im Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mausmodell zu keiner signifikanten Verbesserung Krankheits-assoziierte Parameter führt. Dies deutet auf kompensatorische Mechanismen und die Beteiligung multipler Zellpopulationen und/oder Zytokine hin.

Einschränkend muss erwähnt werden, dass in den vorliegenden Untersuchungen keine weiteren zusätzlichen Oberflächenmarker zur näheren Charakterisierung der CD41<sup>+</sup> Zellen verwendet wurden, um Mastzellen<sup>690</sup>, Thrombozyten-Granulozyten-Aggregate<sup>691,692</sup> oder Emperipolese<sup>693</sup> auszuschließen. Diese gelten ebenfalls als pro-inflammatorisch.<sup>691,694–696</sup> Bei der Emperipolese handelt es sich um ein Phänomen der Megakaryozyten, bei dem diese beispielsweise Granulozyten umschließen und in sich aufnehmen, ohne die Granulozyten zu beschädigen.<sup>693,697</sup> Emperipolese wurde vermehrt sowohl in inflammatorischen Mausmodellen<sup>695</sup> mit einer PLT-Überproduktion als auch bei MPN-Patienten<sup>698–700</sup> nachgewiesen. Eine Untersuchung der Emperipolese erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht. Dennoch deuten unsere Daten, insbesondere wegen der stark erhöhten intrazellulären IL-1 $\alpha$  Expression, übereinstimmend mit der Literatur auf eine besondere Rolle der CD41<sup>+</sup> Zellen in JAK2-V617F-positiven MPN hin.

### **5.3 VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert *outside-in Signaling* in 32D JAK2/EPOR Zellen und in Knochenmarkzellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells**

Die Stimulation mit immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 induzierte *outside-in Signaling* sowohl in 32D JAK2/EPOR Zellen als auch in Knochenmarkzellen von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> Mäusen (siehe 4.4.1). Dabei wurden ausgewählte Signalmoleküle untersucht, die im *outside-*

*in* Signaling als bedeutsam beschrieben wurden und einen möglichen Einfluss auf eine Adhäsions-induzierte Genexpression haben könnten. Nach Stimulation der Zellen mit immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 wurden STAT3, Syk und JNK in beiden MPN-Modellen aktiviert. Beispielsweise ist das Integrin-FAK-STAT3-Signaling bedeutend für die Mitochondrien-Funktionalität.<sup>645</sup> Zudem ist phosphoryliertes STAT3 als Transkriptionsfaktor in der Lage eine Vielzahl von Genen zu induzieren.<sup>657</sup> Da STAT3 in den 32D JAK2/EPOR Zellen lediglich geringfügig durch die mVCAM-1/mICAM-1 Stimulation phosphoryliert wurde, wurde STAT3 nicht näher untersucht. Syk wird eine große Bedeutung in der Integrin-vermittelten Adhäsion zugeschrieben.<sup>528,553,578,584,606</sup> Übereinstimmend damit konnten wir ebenfalls eine deutliche Syk-Phosphorylierung nach Stimulation mit immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1 in beiden MPN-Modellen nachweisen. Ebenfalls zeigten die Western-Blot Analysen nach Co-Stimulation von adhären 32D JAK2-VF/EPOR Zellen mit Piceatannol eine Hemmung aller untersuchten Signalmoleküle, was ebenfalls eine große Relevanz der Syk Kinase im  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-vermitteltem *outside-in* Signaling bestätigt. JNK ist eine Proteinkinase, die Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und damit Genexpression induzieren kann.<sup>701</sup> Eine Src-abhängige sowie FAK-unabhängige JNK-Aktivierung nach  $\beta_1$ -Stimulation wurde ebenfalls beschrieben.<sup>647</sup> Dies ist übereinstimmend mit den von uns durchgeführten Inhibitor-Untersuchungen (siehe Tabelle 27) sowie einer  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-spezifischen JNK-Aktivierung nach mVCAM-1/mICAM-1 Stimulation von 32D JAK2-VF/EPOR Zellen.

In den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen konnte zudem die Phosphorylierung von FAK und NF $\kappa$ B nach mVCAM-1/mICAM-1 Stimulation nachgewiesen werden. FAK wird als wichtige Komponente des Adhäsoms, und gemeinsam mit Src, als Ausgangspunkt vieler Adhäsions-induzierten Signalwege beschrieben.<sup>527,573–575,580,702</sup> Die mVCAM-1/mICAM-1 Stimulation induzierte dabei eine starke Autophosphorylierung der FAK Kinase (Tyr397)<sup>649</sup> sowie eine Phosphorylierung des aktiven Zentrums der FAK Kinase (Tyr577)<sup>651</sup> in den hier untersuchten 32D JAK2-VF/EPOR Zellen. Beide Phosphorylierungen konnten durch die Prä-Inkubation mit anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Antikörper gehemmt werden, was auf eine  $\beta_1/\beta_2$ -spezifische Aktivierung hindeutet. Im Gegensatz zur Inhibierung von Src durch PP2 hatte die Inhibierung von FAK durch Y15 dennoch keinen Einfluss auf die meisten der untersuchten Signalmoleküle (siehe Tabelle 27). Demnach handelt es sich um FAK-unabhängige Signalwege, oder das untersuchte Signalmolekül befindet sich *upstream* von der FAK Kinase. Unerwartet war der Nachweis einer verstärkten NF $\kappa$ B (Ser536) Phosphorylierung nach Y15 Stimulation adhären 32D JAK2-VF/EPOR Zellen. Gemäß der Literatur resultiert eine FAK-Inhibierung in einer reduzierten NF $\kappa$ B Aktivierung.<sup>703,704</sup> Ebenso wurde eine Hemmung der STAT3 Aktivierung durch die zusätzliche Y15 Stimulation erwartet<sup>645</sup>, die jedoch nicht nachweisbar war. Mögliche Ursachen für die abweichenden Ergebnisse sind nicht bekannt. Wir konnten ebenfalls eine mVCAM-1/mICAM-1 induzierte NF $\kappa$ B-Aktivierung in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen zeigen. NF $\kappa$ B ist

ein Transkriptionsfaktor, welcher ebenfalls durch *outside-in* Signalgebung der Integrine aktiviert wird.<sup>646</sup>

Ein Nachweis von FAK und NFκB konnte in den Knochenmarkzellen nicht erbracht werden. Technisch bedingt konnten nur Lysate mit geringer Proteinkonzentration generiert werden, sodass eine zu geringe Proteinkonzentration als Ursache des fehlenden Nachweises vermutet wird. Dennoch wurde erstmals eine VCAM-1/ICAM-1-induzierte STAT3-, Syk- und JNK-Aktivierung im Gesamtknochenmark von Mäusen gezeigt. Diese Daten sind übereinstimmend mit den Ergebnissen der 32D JAK2/EPOR Zellen sowie den von anderen Arbeitsgruppen untersuchten isolierten Zellpopulationen.<sup>528,553,645,647</sup> Aufgrund der vorliegenden Daten wird angenommen, dass gemeinsame *outside-in* Signalwege in beiden MPN-Modellen nach VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert werden.

#### **5.4 VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert pro-inflammatorische mRNA-Expression in hämatopoetischen Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells**

Nach Adhäsion an immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 konnte neben dem *outside-in Signaling* ebenfalls ein Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine mRNA-Level nachgewiesen werden. Entgegen der Annahme übereinstimmender Signalwege, konnten Unterschiede in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression zwischen 32D JAK2/EPOR Zellen und hämatopoetischen Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells gezeigt werden. In den 32D JAK2/EPOR Zellen wurde eine zusätzliche Verstärkung der mRNA-Expression inflammatorischer Zytokine (*Il1a*, *Il1b*, *Tnf*, *Cxcl10*) durch die JAK2-V617F-Mutation gezeigt (siehe 4.4.2). Die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression inflammatorischer Zytokine (*Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnf*) in den hämatopoetischen Zellpopulationen des Mausmodells hingegen erfolgte überwiegend unabhängig von der JAK2-V617F-Mutation (siehe 4.2).

Eine Ausnahme bildete *Cxcl10*, dessen Expression den hämatopoetischen Zellpopulationen durch die Stimulation mit mVCAM-1/mICAM-1 nicht verstärkt wurde, jedoch in JAK2-V617F-positiven MPN<sup>629</sup> als bedeutend beschrieben wurde. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass CXCL10 verstärkt von IFNγ-stimulierten Keratinozyten und deutlich geringer von Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten exprimiert wird.<sup>705</sup> Dies stützt die Vermutung eines zelltyp-spezifischen Mechanismus der Adhäsions-induzierten Zytokin mRNA-Expression. Übereinstimmend wurden unterschiedliche Expressionsmuster in isolierten Lin<sup>-</sup> Stamm- und Progenitorzellen, B-Zellen, Granulozyten und Monozyten beobachtet.

So konnte beispielsweise die VCAM-1/ICAM-1-Stimulation eine JAK2-V617F-Mutation-spezifische *Tnf* mRNA-Expression in B-Zellen induzieren, aber nicht in Lin<sup>-</sup> Zellen. Weiterhin führte die Adhäsion in Monozyten der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup>, nicht aber der Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup>

Mäuse zu einem Anstieg von *Il1a* und *Il1b* mRNA-Leveln. Demnach scheinen sowohl zelltypspezifische und als auch Mutations-spezifische Mechanismen bei der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression zu existieren.

In Granulozyten wurde zudem gezeigt, dass eine VCAM-1/ICAM-1-Stimulation die Expression einer Vielzahl von pro-inflammatorischen Mediatoren induziert (siehe Abbildung 27). Dies erfolgt jedoch vornehmlich mutations-unabhängig. Demnach könnten auch nicht-mutierte Zellen zum Adhäsions-induzierten, pro-inflammatorischen Milieu der JAK2-V617F-positiven MPN beitragen. Dies ist zwar gegenläufig zu der Annahme von Rai et al.<sup>106</sup>, dass lediglich JAK2-V617F-mutierte Zellen die Quelle der erhöhten IL-1 Level sind, jedoch auch übereinstimmend mit Kleppe et al.<sup>118</sup>, die ebenfalls die Zytokinexpression von malignen und nicht-malignen hämatopoetischen Zellen in einem MPL-mutierten MPN-Mausmodell beschrieben.

Die JAK2-V617F-Mutation, sowie die Stimulation mit immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1, induzierte keine deutlichen Veränderungen des Methylierungsmusters in den isolierten Granulozyten (siehe Abbildung 28). Möglicherweise ist eine Nachweismethode mit einer besseren Auflösung (bspw. Sequenzierung nach Bisulfit-Konvertierung) oder eine genomische Methylierungsanalyse notwendig, um geringe Unterschiede sichtbar zu machen. Ebenfalls zu berücksichtigen ist, dass es sich um eine Bulkanalyse handelte und die Reinheit und die damit verbundene Heterogenität zu beachten ist. Dennoch wird auf Grund der vorliegenden Daten davon ausgegangen, dass die Adhäsion nicht die Genexpression pro-inflammatorischer Gene durch veränderte Methylierungsmuster begünstigt. Dennoch wurden die Methylierungsmusters der isolierten Granulozyten der Vav1-Cre JAK2<sup>+/+</sup> und JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse ebenfalls auf globaler Ebene untersucht und geringe Unterschiede beobachtet. Basierend auf Schönung et al.<sup>706</sup> deuten diese geringen Unterschiede jedoch lediglich auf einen stärkeren Vorläufercharakter der JAK2-V617F-mutierten Granulozyten im Vergleich zu den JAK2-Wildtyp Zellen hin. Welche Relevanz dies hat und ob dies lediglich in JAK2-V617F-mutierten Mauszellen zu beobachten ist, konnte bisher nicht ermittelt werden.

In verschiedenen Studien wurde eine epigenetische Dysregulation bei MPN-Patienten gezeigt.<sup>707–710</sup> Diese wird zudem durch die Krankheits-Phase, das Alter des Patienten und durch die Therapie-Modalität beeinflusst.<sup>711</sup> Alle drei klassischen MPN-Entitäten (PV, ET, PMF) zeigten ein, von gesunden Spendern abweichendes, Methylierungsmuster, welches jedoch keine grundlegende Unterscheidung der Entitäten ermöglicht.<sup>710</sup> Es liegt zumeist eine Hypermethylierung von vorwiegend CpG-Inseln (beispielsweise in Tumorsuppressorgenen) vor.<sup>710</sup> Dennoch wurden keine klaren Verbindungen zwischen dem JAK2-V617F-Mutationsstatus und des Methylierungsmusters beobachtet.<sup>710</sup> Dies ist übereinstimmend mit den von uns erhaltenen Methylierungsmustern der Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> und Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup>

Granulozyten. Dennoch könnten die geringen Unterschiede in der globalen Methylierungsanalyse mit den Unterschieden zwischen MPN-Patienten und gesunden Spendern oder dem Fortschreiten der Erkrankung einhergehen. So beschrieb Perez et al. eine AML-ähnliche Hypermethylierung in transformierten MPN-Patienten.<sup>710</sup>

## 5.5 Einflussfaktoren der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine in 32D JAK2/EPOR Zellen

Da der stärkste Anstieg von Adhäsions-induzierter mRNA in Granulozyten stattfand, wurden die zugrundeliegenden Mechanismen in einem myeloischen Zellmodell (32D JAK2/EPOR Zellen) näher charakterisiert. Im Gegensatz zu den primären Zellpopulationen aus dem Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mausmodell konnte in den 32D Zellen eine Verstärkung der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression durch die JAK2-V617F-Mutation nachgewiesen werden. Diese Unterschiede können dabei durch die abweichende Zelldifferenzierung der primären und 32D Zellen oder die Überexpression der mutierten JAK2 Kinase im 32D JAK2/EPOR Zellmodell entstehen. Da nicht alle untersuchten Signalmoleküle in den primären Zellen nachweisbar waren, besteht auch die Möglichkeit, dass abweichende *outside-in* Signalwege zu einer mutations-spezifischen Regulation führen.

Eine Adhäsions-induzierte Steigerung der mRNA-Expression wurde für *Il1a*, *Il1b*, *Il6* sowie *Tnf* gezeigt. In der Literatur wird beschrieben, dass Integrine über *outside-in Signaling* Transkriptionsfaktor wie NFκB<sup>646</sup> und AP-1<sup>712</sup> induzieren können. Diese sind neben SP-1<sup>303</sup> in der Lage IL-1 zu induzieren.<sup>197–199,306–308</sup> Eine mögliche Erklärung wäre demnach die Adhäsions-induzierte Aktivierung von NFκB und AP-1, die anschließend die Transkription von IL-1 induziert.

Wenige Studien zeigten eine Verbindung zwischen Adhäsion und der Induktion pro-inflammatorischer Zytokine.<sup>362,531,606–614</sup> Ebenso ist bisher wenig über die genauen Mechanismen der Adhäsions-induzierten Zytokin-Expression bekannt.<sup>606</sup> Entsprechend wurden teilweise gegenläufige Erkenntnisse publiziert. Die meisten Studien zeigten jedoch eine Adhäsions-induzierte mRNA-Expression als auch ein Anstieg der Proteinkonzentration im Überstand Integrin-aktivierter Zellen (Adhäsion an immobilisiertem Liganden, Co-Kultivierung mit Endothelzellen oder Integrin-aktivierende Antikörper).<sup>362,531,610</sup> Dabei schienen Unterschiede in den Zellpopulationen und in den untersuchten Integrinen und Stimuli vorzuliegen. Beispielsweise kann die Adhäsion von Monozyten an aktivierten Endothelzellen MIP1α in Abhängigkeit von ICAM-1 induzieren<sup>608</sup>, während die Adhäsions-induzierte IL-8 bzw. MCP-1 Expression unabhängig von VCAM-1 und ICAM-1 erfolgt.<sup>607</sup> In Granulozyten erfolgt die IL-8 Expression beispielsweise ebenfalls über β<sub>2</sub>-Integrin-Stimulation.<sup>531</sup> Zudem wurde eine β<sub>1</sub>-Integrin-induzierte IL-1β Expression in Monozyten nachgewiesen und die Beteiligung

von  $\beta_2$ -Integrinen ausgeschlossen<sup>362,530</sup>, während in Granulozyten eine  $\beta_2$ -Integrin spezifische IL-1 $\beta$  Induktion, nicht aber eine IL-6 und TNF- $\alpha$  Expression, beschrieben wurde.<sup>531</sup>

### **5.5.1 Immobilisierung von Liganden ist notwendig für die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine**

In den 32D JAK2/EPOR Zellen konnte gezeigt werden, dass die Adhäsion an immobilisierten VCAM-1/ICAM-1 Liganden essentiell für die mRNA-Induktion war. Erste Experimente deuteten auch darauf hin, dass die Stimulation mit immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 zu einer Clusterbildung führte, die durch die räumliche Nähe der immobilisierten Liganden ermöglicht wurde. Das Vorhandensein von aktiven Integrinen, immobilisiertem Liganden, PIP2 und Talin wurde als essential für eine Clusterbildung beschrieben.<sup>502</sup> Die Ausbildung von Integrin-Clustern erhöht die Avidität<sup>505</sup> und induziert eine *outside-in* Signalgebung.<sup>497,517,713</sup> So aktiviert die Clusterbildung beispielsweise die Aktivierung von Signalmolekülen wie FAK<sup>517</sup> und Syk<sup>497</sup>.

Bereits die 32D JAK2-WT/EPOR Zellen zeigten eine Clusterbildung. Passend dazu wurde bereits beschrieben, dass ebenfalls eine Adhäsion an immobilisiertem Liganden auch unabhängig von der Integrin-Aktivität eine Clusterbildung induzieren kann.<sup>505,714</sup> Dabei wurde die hohe Ligandendichte und die damit verbundene Konformationsänderung von Fibrinogen bei einer Immobilisierung als eine mögliche Ursache beschrieben.<sup>505,715</sup> Möglicherweise liegen ähnliche Mechanismen für das hier untersuchte VCAM-1 und ICAM-1 vor. Es war eine deutlich stärkere Clusterbildung in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen nachweisbar. Die Clusterbildung in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen wurde vermutlich durch die konstitutiv aktive Integrin-Konformation verstärkt und könnte demnach zu einer verstärkten Adhäsions-induzierten mRNA-Expression von 32D JAK2-VF/EPOR Zellen beitragen.

Interessanterweise wurde gezeigt, dass IL-1 $\beta$  ebenfalls in der Lage ist Integrin-Cluster zu induzieren und somit die Adhäsion von MSC zu verstärken.<sup>716</sup> Dies könnte auf einen sich aufrechterhaltenden Kreislauf hindeuten.

### **5.5.2 Beteiligung verschiedener Signalwege in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression pro-inflammatorischer Zytokine**

Es konnten zudem in den vorliegenden Daten erstmals gezeigt werden, dass für die VCAM-1/ICAM-1-induzierte mRNA-Expression spezifische Signalmoleküle notwendig sind. Die Inhibierung von FAK, Syk, NF $\kappa$ B und PI3K hemmte die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression von *Il1a* und *Il1b* in den 32D JAK2/EPOR Zellen deutlich (siehe 4.4.2). Diese Proteine wurden somit als wesentliche Signalmoleküle des *inside-out Signaling* charakterisiert, die für die Induktion pro-inflammatorischer Zytokin mRNA nach Stimulation mit VCAM-1/ICAM-1 notwendig sind. FAK<sup>517,569,572</sup>, Src<sup>553-557</sup> und Syk<sup>528,553,578,582</sup> wird eine besondere Rolle in der

*outside-in* Signalgebung der Integrin-vermittelten Adhäsion zugeschrieben. Unsere Daten deuten ebenfalls auf eine besondere Rolle der FAK-Kinase in der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression von *I1a* und *I1b* hin. Diese Kinase ist in der Literatur als essentiell für den Adhäsionskomplex beschrieben.<sup>572,575,580,717</sup> FAK bildet zudem mit Src-Kinasen den Ausgangspunkt vieler Integrin-induzierter *outside-in* Signalwege<sup>527,573–575,702</sup> und stellt eine Verbindung zur Wachstumsfaktor-Signalgebung dar<sup>576,577</sup>. Dieses wirkt verstärkend auf das *outside-in* Signaling.<sup>577</sup> Möglicherweise hemmte die FAK-Inhibierung mehrere Signalwege, die für die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression relevant sind und ermöglichte somit eine nahezu vollständige Hemmung der VCAM-1/ICAM-1-Stimulation-induzierten *I1a* und *I1b* mRNA-Expression. Interessanterweise zeigten Untersuchungen von He et al.<sup>718</sup> einen zeitabhängigen Effekt einer FAK-Inhibierung auf die mRNA-Expression in Makrophagen. Zunächst führt die FAK-Inhibitoren zu einer Hemmung der mRNA-Expression, steigert diese jedoch nach 24-48 h signifikant.<sup>718</sup>

Piceatannol, ein potenter Syk Inhibitor<sup>528,553,661</sup>, hemmte die Adhäsions-induzierte mRNA-Expression ebenfalls stark. Syk ist in Granulozyten als unerlässlich für viele Integrin-induzierte Mechanismen wie beispielsweise Adhäsion, Zell-Spreading, Phagozytose, NETose<sup>578</sup>, Degranulierung sowie ROS-Produktion beschrieben.<sup>553</sup> Die Beteiligung an der Integrin-induzierten Migration ist jedoch umstritten.<sup>473,506</sup> Die Hemmung der Adhäsions-induzierten *I1b* mRNA-Expression durch Piceatannol ist im Einklang mit früheren Beobachtungen von Lin et al.<sup>674</sup> und Bakthavatsalam et al.<sup>675</sup>. Diese zeigten ebenfalls eine Beteiligung der Syk-Kinase in der  $\beta_1$ -Integrin-vermittelten IL-1 $\beta$  mRNA-Expression.<sup>528,553</sup>

Um weitere Aussagen über die beteiligten Signalkaskaden und die Interaktionen der einzelnen Signalmoleküle in den 32D Zellen treffen zu können, bedarf es weiterer Analysen (z.B. über Immunpräzipitationen). Eine autokrine Wirkung des IL-1 auf die Zellen selbst konnte jedoch über IL-1Ra Experimente ausgeschlossen werden. Da keine Sekretion nachgewiesen werden konnte, war dies zu erwarten. Ruxolitinib (JAK1/2-Inhibitor) hemmte ebenfalls die mRNA-Expression der inflammatorischen Zytokine. Da die mutierte JAK2-Kinase eine wichtige Rolle im *inside-out* Signaling von  $\beta_1$ - (VLA4) und  $\beta_2$ - (LFA-1) Integrinen von Leukozyten spielt<sup>421,422</sup>, liegt hier der wahrscheinlichste Angriffspunkt von Ruxolitinib. Zudem konnte von Zhu et al.<sup>719</sup> gezeigt werden, dass Ruxolitinib in einem Schlaganfallmodell die Expression des NLRP3-Inflammasoms sowie der Caspase-1 und des ASC über eine verminderte STAT3-Phosphorylierung hemmen kann. Dies könnte auf einen zusätzlichen Mechanismus hindeuten.

### 5.5.3 $\beta_1$ -Integrin-VCAM-1-Interaktion induziert mRNA-Expression

Zudem konnte in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen gezeigt werden, dass die beobachtete Adhäsions-induzierte mRNA-Expression vornehmlich durch die  $\beta_1$ -Integrin-VCAM-1-

Interaktion induziert wird. Dies ist übereinstimmend mit Untersuchungen von Yurochko et al.<sup>610</sup> und Zohlnhöfer et al.<sup>362</sup>. Diese zeigten eine *Il1b* mRNA-Expression in Monozyten in Abhängigkeit einer Aktivierung bzw. Liganden-induzierten Quervernetzung von  $\beta_1$ -Integrinen, nicht aber  $\beta_2$ -Integrinen. Die entsprechenden  $\alpha$ -Ketten scheinen dabei ebenfalls von Bedeutung zu sein.<sup>362,610</sup> Es wurde beschrieben, dass die ICAM-1-Inhibierung von Monozyten-Endothelzell-Co-Kulturen keinen Einfluss auf die VCAM- $\beta_1$ -Integrin-induzierte Zytokin-Expression hat.<sup>362</sup> Anders als bei der Co-Kultivierung zeigten wir erstmals einen additiven Effekt einer zusätzlichen  $\beta_2$ -Integrin-ICAM-1-Interaktion. Die vorliegenden Daten deuteten dabei auf einen intrazellulären und keinen extrazellulären Mechanismus hin. Untersuchungen bezüglich der Aktivierung unterschiedlicher  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-vermittelter Signalwege in den 32D JAK2-VF/EPOR Zellen ergab eine verstärkte Aktivierung von Syk, NF $\kappa$ B (p65) und AKT nach  $\beta_1$ -Integrin-VCAM-1 Interaktion, die nicht nach  $\beta_2$ -Integrin-ICAM-1-Interaktion beobachtet wurde. Reyes-Reyes et al. untersuchten ebenfalls separat aktivierte Signalwege über  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -Integrine in Monozyten.<sup>606</sup> Die Aktivierung von  $\beta_1$ - bzw.  $\beta_2$ -Integrinen über aktivierende Antikörper und natürliche Liganden führte zu einer Phosphorylierung von Syk und NF $\kappa$ B.<sup>606</sup> Deutliche Unterschiede zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrin-induzierten Signalwegen wurden in der Beteiligung der PI3K-Kinase beobachtet.<sup>606</sup> Während die  $\beta_1$ -Integrin vermittelte Signalgebung zu einer PI3K-abhängigen Aktivierung von NF $\kappa$ B führte, erfolgte die  $\beta_2$ -vermittelte Aktivierung unabhängig der PI3K.<sup>606</sup> Die PI3K befindet sich *upstream* des von uns untersuchten AKT. Demnach konnte eine Bestätigung der differenziellen Beteiligung des PI3K-AKT Signalweges in der Integrin-vermittelten Signalgebung erfolgen. In allen Experimenten von Reyes-Reyes et al. wurde zudem eine ERK-unabhängige NF $\kappa$ B Aktivierung nachgewiesen<sup>606</sup>, weshalb ERK von uns nicht näher betrachtet wurde.

Syk wurde bereits in mehreren Studien als  $\beta_2$ -Integrin-assoziiert und bedeutend in der  $\beta_2$ -Integrin-Signalgebung beschrieben.<sup>528,578,606</sup> Dies ist gegenläufig zu den von uns erhobenen Daten. Dies könnte möglicherweise auf die Analyse abweichender Zellpopulationen<sup>606</sup>, die Verwendung von rekombinantem ICAM-1 in den vorliegenden Untersuchungen anstatt Fibrinogen in anderen Studien<sup>528</sup> oder auf ein grundlegend abweichendes System (Bakterien-induzierte Inflammation)<sup>578</sup> zurückgeführt werden. Andere Arbeitsgruppen beschrieben ebenfalls eine Bedeutung von Syk in der  $\beta_1$ - und  $\beta_3$ -Integrinen-Signalgebung.<sup>553,584</sup> Dies ist übereinstimmend mit der von uns beobachteten Syk-Phosphorylierung nach  $\beta_1$ -Integrin-VCAM-1-Interaktion.

Trotz teilweise abweichender Signalaktivierung zwischen  $\beta_1$ - oder  $\beta_2$ -Integrin-vermittelter Adhäsion konnten keine additiven Signalwege in dem verwendeten Zellsystem identifiziert werden. Möglicherweise sind weitere Signalwege und Signalmoleküle wie p38, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden, beteiligt. P38 ist sehr vielseitig und kann unter anderem

Transkriptionsfaktoren aktivieren.<sup>720</sup> Es wurde ebenfalls ein regulatorischer Effekt auf Zytokine wie IL-6<sup>721,722</sup> und TNF- $\alpha$  nachgewiesen.<sup>723</sup> Weiterhin wurde die Beteiligung mehrerer Integrin-Subtypen bei der Stabilisierung der Adhäsion beschrieben.<sup>724</sup> Der *Crosstalk* der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine kann außerdem dazu führen, dass die  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Integrine sich gegenseitig sowohl aktivierend als auch inhibierend beeinflussen können.<sup>515,725</sup> Somit könnten sich die von uns untersuchten  $\beta_1$ -Integrin-VCAM-1-Interaktion und die  $\beta_2$ -Integrine-ICAM-1-Interaktion gegenseitig verstärken und so möglicherweise zu veränderten Signalwegen sowie zu einer erhöhten mRNA-Expression nach VCAM-1/ICAM-1-Stimulation führen. Diese Hypothese wäre ein Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

## **5.6 VCAM-1/ICAM-1-Stimulation induziert die IL-1 Proteinexpression in 32D JAK2/EPOR Zellen**

Neben der Adhäsions-induzierten mRNA-Expression wurde auch der Anstieg der Zytokin-konzentration auf Proteinebene untersucht. In den 32D JAK2/EPOR Zellen war ein signifikanter Anstieg des intrazellulären IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach VCAM-1/ICAM-1-Stimulation nachweisbar. Dies wurde durch die JAK2-V617F-Mutation zusätzlich verstärkt (siehe 4.4.3). Ebenfalls übereinstimmend mit den qPCR-Ergebnissen supprimierte Y15 (FAK-Inhibitor) die VCAM-1/ICAM-1-induzierte IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Proteinexpression fast vollständig auf das Niveau unstimulierter Zellen. In *Yersinia enterocolitica* infizierten Epithelzellen wurde FAK bereits beschrieben,  $\beta_1$ -Integrin-vermittelt eine IL-18 Expression sowie Inflammasomaktivierung zu induzieren<sup>689</sup> und ist somit möglicherweise auch an der hier untersuchten Zytokinexpression von IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  beteiligt.

## **5.7 Integrin-Stimulation induziert IL-1 $\alpha$ Oberflächenexpression in 32D JAK2/EPOR Zellen**

Wir konnten in dieser Arbeit zum ersten Mal zeigen, dass die Integrin-Stimulation mit immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 zu einer Steigerung der membranständigen IL-1 $\alpha$  Oberflächenexpression führen kann (siehe 4.4.3.2). Diese war statistisch signifikant stärker in den JAK2-V617F-mutierten Zellen. Der Lokalisation von IL-1 $\alpha$  an der Oberfläche der Zellmembran wird eine pro-inflammatorische Wirkung zugeschrieben.<sup>317,319</sup> Es kann eine lokale Immunantwort<sup>352,353,726</sup> über in der Nachbarschaft vorhandene Immunzellen auslösen, sowie diese rekrutieren<sup>190,251,348</sup>. Unser Daten lassen daher vermuten, dass im Gegensatz zu JAK2-WT Zellen die JAK2-V617F Zellen eine zusätzlich lokale Immunantwort über Adhäsions-induzierte IL-1 $\alpha$  Oberflächenexpression auslösen und somit zur pro-inflammatorischen Komponente des JAK2-V617F-induzierten MPN beitragen könnten. Diese These wird unterstützt, durch eine erhöhte Anzahl myeloischer Zellen im Knochenmark von JAK2-V617F-

positiven Mäusen<sup>128</sup> (sowie Baldauf et al. - unveröffentlichte Daten des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells).

## **5.8 VCAM-1/ICAM-1-Stimulation hat keinen Einfluss auf die IL-1 Proteinexpression in hämatopoetischen Zellpopulationen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells**

In unstimulierten sowie adhärenen Lin<sup>-</sup> Stamm- und Progenitorzellen, B-Zellen und Granulozyten war kein IL-1 $\alpha$  detektierbar. In den hier untersuchten Zellpopulationen wurde zudem eine reduzierte Konzentration von reifem IL-1 $\beta$  nach Stimulation mit VCAM-1/ICAM-1 nachgewiesen. Diese ging jedoch nicht mit einem Anstieg von sezerniertem IL-1 $\beta$  einher (siehe 4.3). Das Anreichern der Proteinkonzentration in der Probe unter Verwendung von Amicon-Röhrchen, die Lyse möglicher EV als auch das Inhibieren von Proteasen (ab Zellernte) war nicht erfolgreich, um eine verstärkte IL-1 $\beta$  Sekretion nachweisen zu können. Demnach wurden folgende Möglichkeiten vermutet: 1) es findet keine Adhäsions-induzierte Steigerung der Proteinexpression statt, 2) es findet eine gegenläufige Regulation auf Proteinebene statt, 3) das IL-1 befindet sich in seiner Pro-Form und ist daher nicht mit dem verwendeten ELISA nachweisbar, 4) es erfolgt ein proteolytischer Abbau während der Inkubationszeit, 5) Autophagie führte zu einem Abbau anstatt einer Freisetzung, 6) es liegt eine zu geringe Halbwertszeit vor oder 7) die enthaltenen Proteinkonzentrationen sind zu niedrig für einen Nachweis mit herkömmlichen Methoden.

### **5.8.1 Integrin-vermittelte Adhäsion kann Translation begünstigen**

Chicurel et al. zeigten bereits, dass die Bindung von Endothelzellen an EZM-gekoppelte Beads zu einer Akkumulation von mRNA im Allgemeinen (Poly(A)<sup>+</sup>) und Ribosomen an dem fokalen Adhäsionskomplex führt.<sup>727</sup> Dabei scheint die Lokation beider Bestandteile Integrin-spezifische zu sein und erreicht bereits nach 20 min ihr Maximum.<sup>727</sup> Diese Akkumulation konnte durch mechanische Scherkräfte verstärkt werden.<sup>727</sup> Erfolgt die Bindung der Zellen über  $\beta_1$ -Integrine ist dieser Effekt im Vergleich zu einer  $\beta_3$ -Integrine-vermittelten Interaktion stärker nachweisbar.<sup>727</sup> In Suspension befindliche Fibroblasten zeigten zudem eine translationale Hemmung, die durch unspezifische Adhäsion aufgehoben wurde und zu einer Translation präformierter mRNA führte.<sup>728,729</sup> Weiterhin bestätigten Adhäsions-Studien von PLT, dass die Adhäsion an Fibrinogen und Collagen in der Translation präformierter mRNA resultiert.<sup>730</sup> Die Adhäsion von PLT an Fibronectin, Laminin und Vitronectin führt zudem zu einer Aktivierung von ribosomaler p70 S6 Kinase (p70<sup>S6K</sup>).<sup>731</sup> Demnach könnte Adhäsion neben Transkription ebenfalls Translation induzieren. Bei der Aktivierung von p70<sup>S6K</sup> wird die Beteiligung von FAK beschrieben.<sup>731</sup> Dies deutet auf eine weitere, mögliche Rolle von FAK in der Adhäsions-induzierten Zytokin-Expression hin. FAK wird ebenfalls durch *outside-in Signaling* in den von

uns untersuchten 32D JAK2/EPOR Zellen aktiviert und könnte somit die Translation induzieren. Ein Nachweis der FAK-Kinase in den Knochenmarkzellen der Vav1-Cre JAK2<sup>+/+</sup> Mäuse nach Adhäsion an mVCAM-1/mICAM-1 konnte aufgrund zu geringer Proteinausbeute nicht erfolgen. Dennoch deuten die Daten generell auf die Möglichkeit einer Adhäsions-induzierten Translation hin.

### 5.8.2 Mögliche Regulationsmechanismen der mRNA-Stabilität und Translation durch ARE-bindende Proteine

Es gibt eine Vielzahl von Regulationsmechanismen, die eine Translation hemmen oder mRNA degradieren können. So wurden beispielsweise unterschiedliche mRNA-bindende Proteine in AU-reichen Elementen (ARE) in der 3'UTR (untranslatierter Bereich; engl.: *untranslated region*) mit einer stabilisierenden bzw. destabilisierenden Wirkung auf mRNA beschrieben.<sup>635,732</sup> Einige dieser ARE-bindenden Proteine können die Translation der gebundenen mRNA unterbinden. So wurde beispielsweise CUGBP2,<sup>733</sup> Tia-1<sup>734</sup> und Zfp361l<sup>735</sup> translations-hemmend beschrieben.<sup>736</sup> So kann Tia-1 die Translation von pro- sowie anti-inflammatorischen mRNA inhibieren.<sup>736</sup> Dieser Effekt scheint jedoch mRNA spezifisch zu sein und hat beispielsweise keinen Einfluss auf *Il1b*.<sup>734</sup> Dennoch wurden *Tia1* und *Zfp361l* RNA-Level in der von uns durchgeführten RNA-Sequenzierung der isolierten Granulozyten mit geringen *read counts* nachgewiesen. Interessanterweise hemmte dabei die Adhäsion der Granulozyten an VCAM-1/ICAM-1 die *Tia1* Genexpression geringfügig, während die *Zfp361l* Genexpression in den JAK2-V617F-mutierten Granulozyten nach VCAM-1/ICAM-1-Stimulation anstieg. In Verbindung mit der Literatur wäre demnach eine Adhäsions-induzierte Hemmung der Translation prinzipiell ein möglicher Wirkmechanismus, um die reduzierten intrazellulären IL-1 Level nach Stimulation mit VCAM-1/ICAM-1 zu erklären.

Die ARE-bindenden Proteine sind abhängig von post-translationalen Modifikationen. Beispielsweise dissoziiert phosphoryliertes Tristetraprolin (Ttp) von der mRNA<sup>737</sup>, während phosphoryliertes „*human antigen-related protein*“ (HuR) mit der mRNA assoziiert<sup>738</sup>. mRNA gebundenes Ttp wirkt destabilisierend<sup>737</sup> und HuR stabilisierend auf die mRNA.<sup>738</sup> Die Phosphorylierung von ARE-bindenden Proteinen wurde hauptsächlich durch p38-MK2-<sup>723,739,740</sup> aber auch PI3K-AKT-Signaling<sup>741</sup> beschrieben. Der PI3K/AKT Signalweg wurde ebenfalls nach Adhäsion von 32D JAK2/EPOR Zellen aktiviert und könnte ARE-bindende Proteine regulieren. Die ARE-bindenden Proteine können ebenfalls mit miRNA interagieren und sowohl miteinander agieren als auch konkurrieren.<sup>635</sup>

Auf-1, Ttp und HuR sind an der post-transkriptionellen Regulation von *Il1a*, *Il1b* und *Tnf* beteiligt.<sup>739,740,742</sup> *Zfp36* (entspricht Ttp) und *Elav1* (entspricht HuR) RNA-Level wurden ebenfalls in der RNA-Sequenzierung der von uns untersuchten Granulozyten detektiert. Dabei

war ein Anstieg der *Zfp36* RNA-Level nach Adhäsion, aber keine Veränderung der *Elavl1* Genexpression nachweisbar. Die Literatur und die RNA-Sequenzierungsdaten würden demnach auf eine Adhäsions-induzierten Degradierung der mRNA hindeuten, jedoch waren dennoch erhöhte Zytokin mRNA-Level nach Adhäsion nachweisbar. Interessanterweise wurde für IL-1, insbesondere für IL-1 $\alpha$ , beschrieben, die Stabilität verschiedener instabiler mRNAs wie *Il1b*, *Il6*, *Csf2*, *Capn1*, *Vcam1* und *Icam1* zu erhöhen.<sup>743,744</sup> Dabei wird eine Regulation über p38 und ARE bindende Proteine vermutet.<sup>743</sup> Möglicherweise kann IL-1 $\alpha$  so die pro-inflammatorische Situation in JAK2-V617F-induzierten MPN weiter verstärken. Die vorliegenden Daten zeigten keine veränderte mRNA-Stabilität von *Il1a* und *Il1b* nach Adhäsion in 32D JAK2-VF/EPOR Zellen. Dennoch scheint die Adhäsion auf immobilisierten Integrin-Liganden eine stabilisierende Wirkung auf die *Il6*, *Tnf* und *Cxcl10* RNA-Expression in diesen Zellen zu haben (siehe 4.4.2.7). Es wäre zu überprüfen, ob dies durch die Integrin-vermittelte Adhäsion oder durch das induzierte IL-1 $\alpha$  verursacht wird.

### **5.8.3 Mögliche Regulationsmechanismen der mRNA-Stabilität und Translation durch microRNAs**

Schätzungen zu Folge können 30 % der Gene des menschlichen Genoms über microRNAs (miRNA)<sup>745-747</sup> reguliert werden. Dabei sind verschiedene Mechanismen in Abhängigkeit der Zellpopulation, des Genes und den vorhandenen Bedingungen bekannt.<sup>748</sup> Mehrere miRNAs können dabei eine mRNA, sowie eine bestimmte miRNA mehrere mRNAs regulieren.<sup>749</sup> Die RNA-Regulatoren können dabei die 3'UTR direkt oder über ARE-bindende Proteine binden und die Translation in unterschiedlichen Phasen inhibieren und/oder die mRNA degradieren.<sup>747,749-751</sup> Beispielsweise wurde für miR-181a beschrieben LPS-induziertes IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in Makrophagen sowie Monozyten zu hemmen und an eine hochkonservierte Bindungsstelle der 3'-UTR von murinem und humanem *IL1a* zu binden.<sup>752</sup>

### **5.8.4 Mögliche Regulationsmechanismen der Translation durch lncRNAs**

Als lange nicht-kodierende RNAs (lncRNA; engl.: *long non-coding RNA*) werden nicht codierende RNA-Segmente mit einer Länge von > 200 Nukleotiden bezeichnet.<sup>753,754</sup> Diese können DNA, mRNA, miRNA und Proteine binden und in Abhängigkeit ihrer Lokalisation die Genexpression auf transkriptioneller, post-transkriptioneller, translationaler und post-translationaler Ebene beeinflussen.<sup>754</sup> lncRNAs können beispielsweise an der Transkriptionsaktivierung, Transkriptionsinterferenz, Chromatinmodifikation, Gerüstbildung und Regulierung der Translationsmaschinerie beteiligt sein.<sup>754</sup> Sie können Translationsfaktoren und damit die Translation in allen Phasen regulieren.<sup>754</sup> Dies kann in Abhängigkeit der lncRNA positiv oder negativ erfolgen.<sup>754</sup> AS-IL-1a (lncRNA) wurde beispielsweise in Monozyten nachgewiesen, die IL-1 Expression zu regulieren.<sup>309</sup>

In JAK2-V617F-positiven Zelllinien wurden eine Vielzahl von lncRNAs nachgewiesen,<sup>755</sup> ob diese an der Adhäsions-induzierten Regulation beteiligt sind, wurde bisher jedoch nicht untersucht. Zudem könnten auch neben den Zytokin mRNAs auch weitere Gene über miRNA oder lncRNA negativ reguliert werden, die wichtig für die Translation sind.

Möglicherweise werden weitere Signale benötigt, um die Hemmung der Translation über beispielsweise miRNA oder lncRNA zu überwinden. Ein spezifischer Nachweis gehemmter Translation in den untersuchten Zellpopulationen erfolgte bisher nicht. Die Adhäsion 32D JAK2-VF/EPOR Zellen an immobilisiertes mVCAM-1/mICAM-1 scheint die Stabilität der *Il1a* und *Il1b* mRNA jedoch nicht zu verändern.

### **5.8.5 Mögliche Regulationsmechanismen der IL-1 Verfügbarkeit durch Ubiquitinierung**

Im Rahmen einer ablaufenden Protein-Translation, gilt die Ubiquitinierung als regulierender Faktor von intrazellulärem IL-1.<sup>188,189,223</sup> In dendritischen Zellen und Makrophagen wurde eine Polyubiquitinierung von IL-1 $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$  nachgewiesen.<sup>188,189</sup> Diese erfolgt an unterschiedlichen Positionen während des Induktions-Signals (z.B. LPS).<sup>188,189</sup> Die Ubiquitinierung führt zu einer schnellen proteasomalen Degradierung des IL-1.<sup>188,189</sup> Die zusätzliche Stimulation mit dem Aktivierungssignal (z.B. ATP, Nigericin) führt zu proteasomaler Degradation<sup>193</sup> oder Freisetzung des IL-1.<sup>188</sup> Die Deubiquitinierung von ASC durch Deubiquitinasen (DUBs) ist für die ASC-Speck-Bildung wichtig.<sup>224</sup> Die ASC-Speck-Bildung wird dabei oft als Nachweis eines aktiven Inflammasoms verwendet.<sup>756</sup> Für das NLRP3-Inflammasom ist die Deubiquitinierung ebenfalls für die Aktivierung des Inflammasoms notwendig und wird infolge beider Signale (Induktion, Aktivierung) induziert.<sup>223</sup> Die Ubiquitinierung dient demnach der Regulation von vorhandenem, intrazellulärem IL-1 (reifem und Pro-Form). Zusätzlich ermöglicht Ubiquitinierung die Verpackung von Proteinen in Autophagosome über p62<sup>757</sup>, was eine Sekretion des IL-1 über Autophagie ermöglichen würde. Autophagie ist in Granulozyten als möglicher Sekretionsmechanismus des IL-1 $\beta$  beschrieben.<sup>257–259</sup> Autophagie kann jedoch auch zu einer Degradierung des IL-1 $\beta$  führen.<sup>256</sup> Was genau diese beiden Mechanismen unterscheidet, wurde bisher nicht beschrieben.

Zusammenfassend könnte eine Vielzahl regulatorischer Mechanismen für die Unterschiede zwischen IL-1 Genexpression und Proteinkonzentration in den hämatopoetischen Zellen des Vav1-Cre JAK2 Mausmodells ursächlich sein. Für weitere Untersuchungen könnte auch ein sensitiveres, aber aufwändigeres Nachweisverfahren hilfreich sein, um geringe Konzentrationsunterschiede zuverlässig detektieren zu können (Übersicht in Liu et al.<sup>758</sup>). Die Verwendung von Testsystemen zum Nachweis von pro-IL-1 $\alpha$  bzw. pro-IL-1 $\beta$  könnte ebenfalls nützlich sein. Da Autophagie als möglicher Sekretionsmechanismus des IL-1 beschrieben

wurde<sup>257–259</sup>, jedoch auch ein Abbau des enthaltenen IL-1 im Autophagosom möglich ist<sup>256</sup>, sollte dieser potentielle Mechanismus in zukünftigen Untersuchungen ebenfalls adressiert werden.

## **5.9 Fehlende Sezernierung von reifem IL-1 $\alpha$ und IL-1 $\beta$ nach Stimulation von 32D JAK2/EPOR Zellen mit immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1**

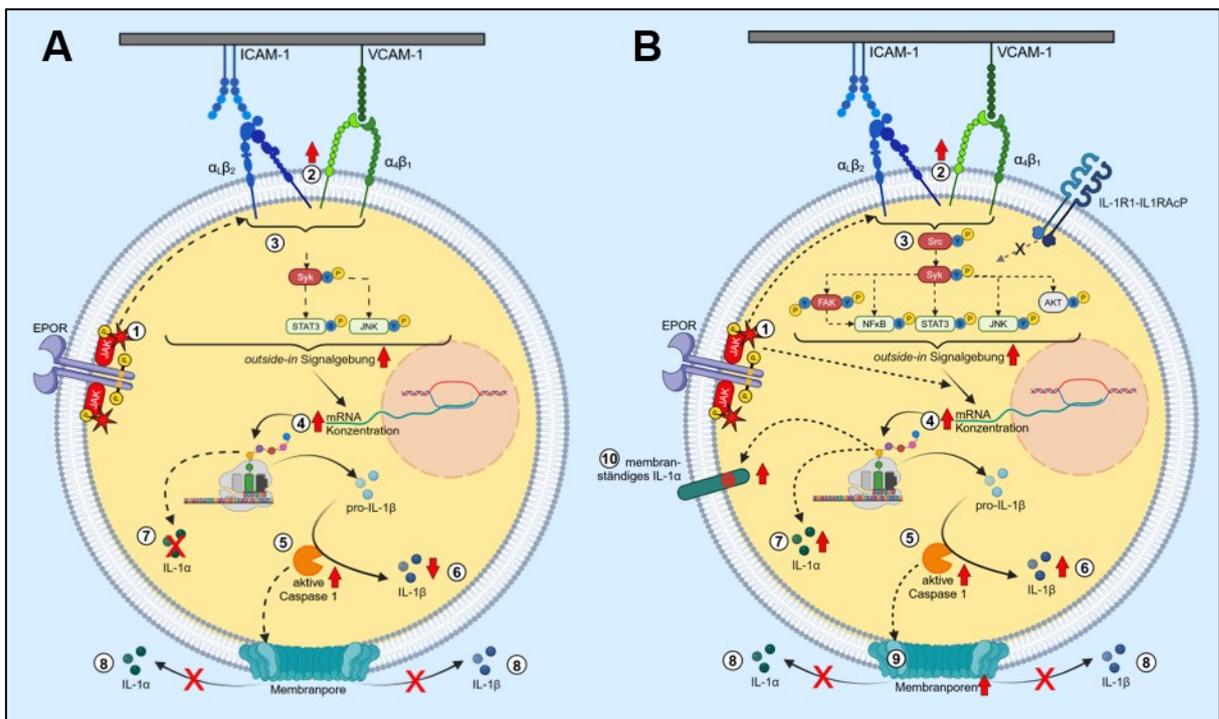
Der Nachweis von aktiver Caspase-1 deutet auf eine pro-IL-1 $\beta$  Reifung<sup>190,263,759</sup> und in Kombination mit einem Lebend-Tot-Farbstoff wie SYTOX™ Blue auf Pyroptose<sup>603,604</sup> hin. Wir fanden einen Anstieg aktiver Caspase-1 und Pyroptose in adhären 32D JAK2/EPOR Zellen. Diese wurde zudem durch die JAK2-V617F-Mutation verstärkt. Im Gegensatz dazu wurde Adhäsion bisher beschriebene Autophagie und apoptotischen Zelltod zu hemmen. Erst das Ablösen adhärenter Zellen induziert Autophagie bzw. einen apoptotischen Zelltod (Anoikis).<sup>760</sup> Gemäß den vorliegenden Daten wären die JAK2-V617F-mutierten Zellen sensitiver für den Adhäsions-induzierten Zelltod. Möglicherweise wurden jedoch lediglich Poren induziert, die groß genug waren, um SYTOX™ Blue aufzunehmen, jedoch klein genug, um keinen Zelltod per se auszulösen. Der Nachweis von aktiver Caspase-1 mit Porenbildung deutet auch darauf hin, dass eine Sekretion von reifem IL-1 möglich sein sollte. Gemäß der Literatur kann dabei die Co-Sekretion von IL-1 $\alpha$  mit dem IL-1 $\beta$  erfolgen.<sup>190,301,315,343</sup>

Es konnte aber weder in den 32D JAK2/EPOR Zellen noch in den primären Zellpopulationen eine Adhäsions-induzierte IL-1 Sekretion nachgewiesen werden. Trotz Nachweis einer Adhäsions-induzierten Caspase-1 Aktivität konnte keine Sekretion detektiert werden, auch nicht nach Zugabe Inflammasom-aktivierender Substanzen wie Nigericin bzw. ATP.

In der Literatur wurde die IL-1 Sekretion von Granulozyten unter anderem als unabhängig von Pyroptose und Porenbildung in der Zellmembran über Autophagie beschrieben.<sup>259</sup> In den meisten Studien zur IL-1 Sekretion über Autophagie oder extrazelluläre Vesikel war IL-1 ohne weitere Lyse möglicher Zellkompartimente im Zellkulturüberstand detektierbar.<sup>190,251,257,259,340</sup> In unserem untersuchten Zellsystem ist dies auch nach Lysebehandlung extrazellulärer Vesikel nicht der Fall gewesen.

Rubartelli et al. zeigten eine Sekretion von reifem bzw. pro-IL-1 $\beta$  in Abhängigkeit des pH-Wertes und der Temperatur.<sup>247</sup> Die Zellkulturbedingungen mit der verwendeten Inkubationstemperatur und dem pH-Wert des verwendeten Mediums, sollten die Sekretion von reifem IL-1 begünstigen. Das verwendete Nachweissystem erkennt jedoch gemäß Herstellerangaben nur reifes IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ . Falls dennoch die Sekretion von pro-IL-1 erfolgt, war diese nicht detektierbar. Aufgrund Adhäsions-induzierter Caspase-1 Aktivität, wird dies jedoch als unwahrscheinlich betrachtet. Die bisher beschriebenen Erkenntnisse bezüglich Adhäsions-

induzierter Mechanismen in hämatopoetischen Zellen des Vav1-Cre x JAK2 Mausmodells sowie der 32D JAK2/EPOR Zellen sind in Abbildung 52 schematisch zusammengefasst.



**Abbildung 52: Schematische Zusammenfassung VCAM-1/ICAM-1-Stimulation-induzierter Signalwege in hämatopoetischen Zellen des Vav1-Cre x JAK2-VF Mausmodells und den 32D JAK2/EPOR Zellen.** (1) Die JAK2-V617F-Mutation in der Januskinase 2 resultiert in einer (2) konstitutiv aktiven Integrinkonformation von  $\beta_1/\beta_2$ -Integrinen, was sich in einer gesteigerten Adhäsion an VCAM-1 und ICAM-1 resultiert. **(A)** In hämatopoetischen Zellen induziert die Stimulation mit immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 eine (3) *outside-in* Signalgebung und einen (4) überwiegenden mutationsunabhängigen Anstieg pro-inflammatorischer Zytokin mRNA (*Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnf*). In einigen Zellpopulationen führte die Stimulation mit mVCAM-1/ICAM-1 zu einem (5) Anstieg der aktiven Caspase-1. Dennoch war eine (6) gehemmte bzw. gleichbleibende IL-1 $\beta$  Konzentration und (7) kein Nachweis von IL-1 $\alpha$  auf Proteinebene möglich. Ebenso konnte (8) kein sekretiertes IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. **(B)** In 32D JAK2/EPOR Zellen induziert die Stimulation mit immobilisiertem mVCAM-1/ICAM-1 ebenfalls eine (3) *outside-in* Signalgebung. FAK, Syk, und PI3K/AKT sind dabei an dem (4) Anstieg pro-inflammatorischer Zytokin mRNA (*Il1a*, *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, *Cxcl10*) nach VCAM-1/ICAM-1 Stimulation beteiligt. Der Anstieg wurde durch die JAK2-V617F-Mutation verstärkt. Die Stimulation mit mVCAM-1/ICAM-1 führte zu einem (5) Anstieg der Caspase-1 Aktivität, welche erneut durch die JAK2-V617F-Mutation verstärkt wurde. Eine (6) signifikant erhöhte IL-1 $\beta$  und (7) IL-1 $\alpha$  Konzentration war nachweisbar. Jedoch konnte ebenso (8) kein sekretiertes IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. Dennoch war eine (9) verstärkte Porenbildung (Pyroptose) und eine (10) IL-1 $\alpha$  Oberflächenexpression in den JAK2-V617F-mutierten 32D JAK2/EPOR Zellen nach Stimulation mit immobilisiertem VCAM-1/ICAM-1 möglich. (erstellt mit BioRender.com)

Unsere Daten legen nahe, dass ein weiteres Signal zur erfolgreichen Sekretion des Adhäsions-induzierten IL-1 in 32D JAK2/EPOR Zellen sowie einer erfolgreichen Translation in primären hämatopoetischen Zellen notwendig ist. Dieses war jedoch *in vitro* nicht existent, aber ist möglicherweise *in vivo* vorhanden.

## 5.10 Die Applikation von anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin Antikörpern reduzierte die erhöhte IL-1 $\alpha$ Serumkonzentration im Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mausmodell

Sowohl JAK2-V617F-mutierte MPN-Patienten<sup>62-65</sup> als auch Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse<sup>124</sup> verfügen über stark erhöhte pro-inflammatorische Zytokinlevel. Jedoch zeigten unsere bisherigen *in vitro* Untersuchungen, trotz Adhäsions-induzierter mRNA-Expression, keine erfolgreiche Sekretion des IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nach VCAM-1/ICAM-1 Stimulation. Daher sollte überprüft werden, ob die *in vitro* analysierten, VCAM-1/ICAM-1-induzierten Mechanismen *in vivo* durch zusätzlich vorhandene Signale zu den erhöhten Zytokinkonzentrationen im Serum beitragen könnten.

Um zu testen, ob die Hemmung von  $\beta_1/\beta_2$ -Integrinen in einer Suppression inflammatorischer Zytokine im Serum resultiert, wurden Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäuse mit einer einmaligen intraperitonealen (i.p.) Injektion mit anti- $\alpha_4\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Antikörpern oder mit der entsprechenden Isotyp-Kontrolle behandelt. Die anti-Integrin-Behandlung von Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen führte zu einer reduzierten IL-1 $\alpha$  Serumkonzentration im Vergleich zu PBS oder IgG behandelten Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Kontrollmäusen (siehe Abbildung 51). Somit konnte *in vivo* eine kausale Verbindung zwischen der  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Aktivierung und den erhöhten pro-inflammatorischen Zytokinleveln im JAK2-V617F-positiven MPN-Mausmodell gezeigt werden. Dies deutet erneut auf eine essentielle Rolle überaktivierter Integrine in der Ausgestaltung der pro-inflammatorischen Situation bei JAK2-V617F-mutierten MPN hin.

Da die Applikation von anti-IL-1RI Antikörpern zur Hemmung der IL-1-Signalwege im MPN-Mausmodell zu einer Verbesserung der Knochenmarkfibrose, der Splenomegalie und der erhöhten Leukozytenzahl führte<sup>108</sup>, könnten die vorliegenden Daten auch auf eine anti-inflammatorische Therapiemöglichkeit mittels anti-Integrin-Behandlung hindeuten. Für eine erste Einschätzung dieser Hypothese untersucht unsere Arbeitsgruppe zurzeit den Einfluss der anti-Integrin-Therapie auf weitere Zytokine sowie auf krankheitsrelevante Parameter im Blut, Knochenmark und in der Milz im Vav1-Cre x JAK2-V617F Mausmodell. Die Analysen zu diesen Parametern sind derzeit in Bearbeitung, zeigen aber erste interessante Ergebnisse.

Die IL-1 $\beta$  Konzentration war in allen Gruppen des verwendeten Mausmodells unterhalb der Nachweisgrenze. In anderen JAK2-V617F Mausmodellen wie beispielsweise dem Scf;Cre;V617F Mausmodell ist IL-1 $\beta$  nach 16 Wochen Tamoxifen-Induktion deutlich erhöht, IL-1 $\alpha$  jedoch nicht im Plasma nachweisbar.<sup>106</sup> Dies deutet auf eine wichtige Rolle der verwendeten Cre-Rekombinase und der JAK2-V617F-Mutation tragenden Zellpopulationen hin. Möglicherweise liegen zudem lokale Akkumulationen des IL-1 $\beta$  in beispielsweise dem Knochenmark von Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> Mäusen vor. Aufgrund zu geringer IL-1 $\beta$

Konzentrationen im Serum konnten keine Aussagen bezüglich des Einflusses einer anti-Integrin-Behandlung auf die IL-1 $\beta$  Serumkonzentration gemacht werden.

Für IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde bereits gezeigt, dass sie sich selbst in einem positiven Feedback-Loop<sup>761–763</sup>, andere pro-inflammatorische Marker wie IL-6<sup>764</sup>, aber auch Adhäsionsmoleküle wie VCAM-1<sup>680,681</sup> und ICAM-1<sup>681,765</sup> induzieren können. Dies könnte wie in einem *circulus vitiosus* zu einer sich selbst induzierenden Verstärkung der Integrin-induzierten Inflammation führen.

### 5.11 Die Bedeutung von IL-1 $\alpha$ bei JAK2-V617F-mutierten MPN

Bisher wurde die Rolle von IL-6<sup>122,123</sup>, TNF- $\alpha$ <sup>114,124,125,766</sup>, TGF- $\beta$ <sup>121</sup> und IL-1 $\beta$ <sup>106–109</sup> im Kontext von JAK2-V617F-positiven MPN näher untersucht. Dabei zeigte unsere Arbeitsgruppe, dass eine anti-IL-6 Antikörper-Gabe im MPN-Mausmodell keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die JAK2-V617F induzierten Krankheitsparameter hat.<sup>123</sup> Eine anti-TNFR1-Therapie bzw. anti-TNFR2 Antikörper Applikation führte zu einer Reduktion des erhöhten Hämatokrit der erhöhten Leukozytenzahl bzw. einer Reduktion der Leukozytenzahl.<sup>124</sup> Andere krankheitsrelevante MPN-Parameter wurden allerdings nicht oder kaum verbessert.<sup>124</sup> Im Gegensatz dazu führte eine anti-IL-1 $\beta$ -<sup>106,107</sup> und anti-IL-1R-Therapie<sup>108</sup> zu einer signifikanten Verbesserung MPN-assoziiierter Parameter. Bisher lag dabei das Augenmerk auf IL- $\beta$ . Dennoch wurde in JAK2-VF-IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> <sup>106,107</sup> als auch JAK2-VF-IL-1RI<sup>-/-</sup> <sup>108</sup> Transplantationsmodellen zusätzlich reduzierte IL-1 $\alpha$  Plasmalevel nachgewiesen. Aufgrund dieser Beobachtung und den hier vorgelegten Daten, postulieren wir ebenfalls eine bedeutende Rolle von IL-1 $\alpha$  bei JAK2-V617F-induzierten MPN. Dies wird auch gestützt von der Hypothese von Rai et al.<sup>106,107</sup>, dass ein erhöhtes IL-1Ra-zu-IL-1 $\alpha$ -Verhältnis in JAK2-VF-IL-1 $\beta$ <sup>-/-</sup> Transplantationsmodellen mit einer geringeren MPN-Phänotyp-Ausprägung korreliert.

Rahman et al. zeigten neben erhöhten IL-1 $\beta$  Konzentrationen auch eine erhöhte IL-1 $\alpha$  Konzentration auf RNA- sowie Proteinebene bei JAK2-V617F-positiven MPN-Patienten.<sup>108</sup> Die mRNA-Expression des *IL1A* (und *IL1B*) korrelierte dabei mit der JAK2-V617F-Allellast in den Granulozyten. In deren MX1Cre; JAK2<sup>VF/VF</sup> Transplantationsmodell ist neben IL- $\beta$  auch IL-1 $\alpha$  im Serum erhöht.<sup>108</sup> Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-1 $\alpha$  vergleichbar mit IL-1 $\beta$  signifikant CFU-GM und CFU-MK Kolonien nach *ex vivo* Stimulation von Knochenmarkzellen induziert.<sup>108</sup> Die MK-Proliferation wird gleichermaßen positiv beeinflusst und die induzierte Signalgebung sowie die *Col3a1* mRNA Induktion war ebenfalls übereinstimmend.<sup>108</sup> IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  binden denselben Rezeptor.<sup>161</sup> Daher kann auch vermutet werden, dass die positiven Effekte eines IL-1RI-*Knockout* Modells oder einer IL-1RI-Inhibition nicht nur auf die Signalunterdrückung von IL-1 $\beta$ , sondern auch von IL-1 $\alpha$  zurückgeführt werden können.

Zudem ist IL-1 $\alpha$  sowohl in seiner Pro- und reifen Form biologisch aktiv,<sup>161</sup> als auch durch seine verschiedensten Lokalisationen im Zellkern<sup>322,323</sup> und an der Zellmembran<sup>301,317–320</sup> besonders. Es kann sowohl lokale<sup>352,353,726</sup> als auch systemische<sup>351–353</sup> Immunantworten induzieren. In Peritonitis-Mausmodellen wurde beispielweise gezeigt, dass IL-1 $\alpha$  deutlich effizienter Neutrophile rekrutieren kann als IL-1 $\beta$ .<sup>251</sup> Es wurde für IL-1 $\alpha$  beschrieben, sowohl die Myelopoese<sup>350</sup> als auch die Thrombopoese<sup>327</sup> zu fördern. Aufgrund IL-1 $\alpha$  induzierter MK-Ruptur und Freisetzung vieler PLT in kürzester Zeit<sup>294</sup>, könnten erhöhte IL-1 $\alpha$  Konzentrationen möglicherweise eine mechanistische Brücke zu den erhöhten PLT-Zahlen bei MPN-Patienten<sup>54</sup> bilden. IL-1RI sowie IL-1Ra Untersuchungen haben gezeigt, dass IL-1 einen Einfluss auf Symptome wie Fieber<sup>135,136</sup>, Hypertension<sup>767,768</sup>, Vasodilatation<sup>769</sup> und ein erhöhtes Schmerzempfinden<sup>770,771</sup> in den unterschiedlichsten Krankheitsmodellen haben kann. Diese Symptome werden auch bei MPN-Patienten beobachtet und könnten neben IL-1 $\beta$  ebenfalls durch IL-1 $\alpha$  induziert werden. Die Rolle des IL-1 $\alpha$  sollte daher in zukünftigen Untersuchungen ebenfalls adressiert werden.

## 6 Ausblick

Im Mittelpunkt der hier vorgelegten Arbeit stehen die neuen Erkenntnisse zur Induktion inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF in hämatopoetischen Zellen durch die Aktivierung des *outside-in Signaling* von  $\beta_1/\beta_2$ -Integrinen nach Bindung an die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1. In der Pathogenese und Progression der MPN spielen diese Zytokine, insbesondere IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , eine zentrale Rolle. Kürzlich konnten andere MPN-Forschungsgruppen zeigen, dass die Suppression der IL-1 Signaltransduktion durch neutralisierende Antikörper gegen IL-1 oder den IL-1 Rezeptor ein interessantes therapeutisches Potential bei MPN besitzt. In diesem Kontext haben unsere Ergebnisse eine besondere Bedeutung für das Verstehen der Pathogenese von JAK2-V617F-mutierten MPN. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben bereits eine konstitutive aktive Konformation von  $\beta_1/\beta_2$ -Integrinen durch die JAK2-V617F-Mutation und eine verstärkte Adhäsion an VCAM-1/ICAM-1 beschrieben. Zusammengefasst deuten die hier vorgelegten Daten darauf hin, dass die JAK2-V617F-getriggerte Überaktivierung von  $\beta_1/\beta_2$ -Integrinen nach Bindung an die bei MPN hochregulierten Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 ein wesentlicher molekularer Mechanismus für die Hochregulation von inflammatorischen Zytokinen bei MPN ist. So konnten wir darstellen, dass die *in vivo* Hemmung der  $\beta_1/\beta_2$ -Integrine durch neutralisierende Antikörper zu einer Suppression der erhöhten IL-1 $\alpha$  Serumspiegel führt. Damit könnte die Inhibition der  $\beta_1/\beta_2$ -Integrin-Signaltransduktion ein therapeutisches Potential bei MPN besitzen. Die hier vorgelegten Daten legen die Grundlage, um diese Hypothese in zukünftigen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen weiter zu verfolgen.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Gianelli U, Thiele J, Orazi A, Gangat N, Vannucchi AM, Tefferi A et al. International Consensus Classification of myeloid and lymphoid neoplasms: myeloproliferative neoplasms. *Virchows Archiv* 2023; 482: 53–68.
- 2 Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Borowitz MJ, Beau MML, Bloomfield CD et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. 2019; 127: 2391–2406.
- 3 Titmarsh GJ, Duncombe AS, McMullin MF, O’Rorke M, Mesa R, De Vocht F et al. How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. *American Journal of Hematology* 2014; 89: 581–587.
- 4 Kraywinkel K. Epidemiologie der myeloproliferativen Neoplasien und myelodysplastischen Syndrome in Deutschland. *Der Onkologe* 2019; 25: 948–956.
- 5 Caponetti GC, Bagg A. Genetic studies in the evaluation of myeloproliferative neoplasms. *Seminars in Hematology* 2019; 56: 7–14.
- 6 James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005; 434: 1144–1148.
- 7 Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell* 2005; 7: 387–397.
- 8 Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *The Lancet* 2005; 365: 1054–1061.
- 9 Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S, Tiedt R, Passweg JR et al. A Gain-of-Function Mutation of JAK2 in Myeloproliferative Disorders. *New England Journal of Medicine* 2005; 352: 1779–1790.
- 10 Tefferi A, Guglielmelli P, Larson DR, Finke C, Wassie EA, Pieri L et al. Long-term survival and blast transformation in molecularly annotated essential thrombocythemia, polycythemia vera, and myelofibrosis. *Blood* 2014; 124: 2507–2513.
- 11 Jones AV. Widespread occurrence of the JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative disorders. *Blood* 2005; 106: 2162–2168.
- 12 Rumi E, Pietra D, Ferretti V, Klampfl T, Harutyunyan AS, Milosevic JD et al. JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes. *Blood* 2014; 123: 1544–1551.
- 13 Grinfeld J, Nangalia J, Baxter EJ, Wedge DC, Angelopoulos N, Cantrill R et al. Classification and Personalized Prognosis in Myeloproliferative Neoplasms. *New England Journal of Medicine* 2018; 379: 1416–1430.
- 14 Schmidt A, Bernhardt C, Bürkle D, Fries S, Hannig CV, Jentsch-Ullrich K et al. Diagnosis and treatment of MPN in real life: exploratory and retrospective chart review including 960 MPN patients diagnosed with ET or MF in Germany. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2023; 149: 7197–7206.
- 15 Payzin KB, Savasoglu K, Alacacioglu I, Ozdemirkiran F, Mutlu BB, Bener S et al. JAK2 V617F Mutation Status of 232 Patients Diagnosed With Chronic Myeloproliferative Neoplasms. *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia* 2014; 14: 525–533.

- 16 Rampal R, Al-Shahrour F, Abdel-Wahab O, Patel JP, Brunel J-P, Mermel CH et al. Integrated genomic analysis illustrates the central role of JAK-STAT pathway activation in myeloproliferative neoplasm pathogenesis. *Blood* 2014; 123: e123–e133.
- 17 Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2017; 129: 667–679.
- 18 Grinfeld J, Nangalia J, Green AR. Molecular determinants of pathogenesis and clinical phenotype in myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2017; 102: 7–17.
- 19 Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O. Signaling Through the Hematopoietic Cytokine Receptors. *Annual Review of Immunology* 1995; 13: 369–398.
- 20 Barber DL, D'Andrea AD. Erythropoietin and Interleukin-2 Activate Distinct JAK Kinase Family Members. *Molecular and Cellular Biology* 1994; 14: 6506–6514.
- 21 Sattler M, Durstin MA, Frank DA, Okuda K, Kaushansky K, Salgia R et al. The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases. *Experimental hematology* 1995; 23: 1040–8.
- 22 Heberlein C, Fischer K-D, Stoffel M, Nowock J, Ford A, Tessmer U et al. The Gene for Erythropoietin Receptor Is Expressed in Multipotential Hematopoietic and Embryonal Stem Cells: Evidence for Differentiation Stage-Specific Regulation. *Molecular and Cellular Biology* 1992; 12: 1815–1826.
- 23 Longmore GD, Pharr P, Lodish HF. Mutation in murine erythropoietin receptor induces erythropoietin-independent erythroid proliferation in vitro, polycythemia in vivo. *Leukemia* 1992; 6 Suppl 3: 130S-134S.
- 24 de Sauvage FJ, Hass PE, Spencer SD, Malloy BE, Gurney AL, Spencer SA et al. Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 1994; 369: 533–538.
- 25 Van Zant G, Goldwasser E. Simultaneous Effects of Erythropoietin and Colony-Stimulating Factor on Bone Marrow Cells. *Science* 1977; 198: 733–735.
- 26 Lang DF, Rosenfeld CS, Diamond HS, Shadduck RK, Zeigler ZR. Successful treatment of T-γ lymphoproliferative disease with human-recombinant granulocyte colony stimulating factor. *American Journal of Hematology* 1992; 40: 66–68.
- 27 Lu X, Levine R, Tong W, Wernig G, Pikman Y, Zarnegar S et al. Expression of a homodimeric type I cytokine receptor is required for JAK2V617F-mediated transformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2005; 102: 18962–18967.
- 28 Cordua S, Kjaer L, Skov V, Pallisgaard N, Hasselbalch HC, Ellervik C. Prevalence and phenotypes of JAK2 V617F and calreticulin mutations in a Danish general population. *Blood* 2019; 134: 469–479.
- 29 Steensma DP. Clinical consequences of clonal hematopoiesis of indeterminate potential. *Blood advances* 2018; 2: 3404–3410.
- 30 Chen E, Mullally A. How does JAK2V617F contribute to the pathogenesis of myeloproliferative neoplasms? *Hematology* 2014; 2014: 268–276.
- 31 Saharinen P, Takaluoma K, Silvennoinen O. Regulation of the Jak2 Tyrosine Kinase by Its Pseudokinase Domain. *Molecular and Cellular Biology* 2000; 20: 3387–3395.
- 32 Dusa A, Mouton C, Pecquet C, Herman M, Constantinescu SN. JAK2 V617F Constitutive Activation Requires JH2 Residue F595: A Pseudokinase Domain Target for Specific Inhibitors. *PLoS ONE* 2010; 5: e11157.

- 33 Araki M, Yang Y, Masubuchi N, Hironaka Y, Takei H, Morishita S et al. Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2016; 127: 1307–16.
- 34 Chaligné R, Tonetti C, Besancenot R, Roy L, Marty C, Mossuz P et al. New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia* 2008; 22: 1557–1566.
- 35 Ding J, Komatsu H, Iida S, Yano H, Kusumoto S, Inagaki A et al. The Asn505 mutation of the c-MPL gene, which causes familial essential thrombocythemia, induces autonomous homodimerization of the c-Mpl protein due to strong amino acid polarity. *Blood* 2009; 114: 3325–8.
- 36 Defour J-P, Itaya M, Gryshkova V, Brett IC, Pecquet C, Sato T et al. Tryptophan at the transmembrane-cytosolic junction modulates thrombopoietin receptor dimerization and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013; 110: 2540–5.
- 37 Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS medicine* 2006; 3: e270.
- 38 Staerk J, Lacout C, Sato T, Smith SO, Vainchenker W, Constantinescu SN. An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood* 2006; 107: 1864–71.
- 39 Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood* 2016; 127: 1317–24.
- 40 Elf S, Abdelfattah NS, Baral AJ, Beeson D, Rivera JF, Ko A et al. Defining the requirements for the pathogenic interaction between mutant calreticulin and MPL in MPN. *Blood* 2018; 131: 782–786.
- 41 Jang M-A, Choi CW. Recent insights regarding the molecular basis of myeloproliferative neoplasms. *The Korean Journal of Internal Medicine* 2020; 35: 1–11.
- 42 Lim K-H, Chang Y-CY-F, Gon-Shen Chen C, Lin H-C, Wang W-T, Chiang Y-H et al. Frequent CALR exon 9 alterations in JAK2 V617F-mutated essential thrombocythemia detected by high-resolution melting analysis. *Blood cancer journal* 2015; 5: e295.
- 43 Mullally A, Lane SW, Ball B, Megerdichian C, Okabe R, Al-Shahrour F et al. Physiological Jak2V617F Expression Causes a Lethal Myeloproliferative Neoplasm with Differential Effects on Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Cancer Cell* 2010; 17: 584–596.
- 44 Foßelteder J, Pabst G, Sconocchia T, Schlacher A, Auinger L, Kashofer K et al. Human gene-engineered calreticulin mutant stem cells recapitulate MPN hallmarks and identify targetable vulnerabilities. *Leukemia* 2023; 37: 843–853.
- 45 Segura-Díaz A, Stuckey R, Florido Y, González-Martín JM, López-Rodríguez JF, Sánchez-Sosa S et al. Thrombotic Risk Detection in Patients with Polycythemia Vera: The Predictive Role of DNMT3A/TET2/ASXL1 Mutations. *Cancers* 2020; 12. doi:10.3390/cancers12040934.
- 46 Brecqueville M, Rey J, Bertucci F, Coppin E, Finetti P, Carbuccion N et al. Mutation analysis of ASXL1, CBL, DNMT3A, IDH1, IDH2, JAK2, MPL, NF1, SF3B1, SUZ12, and TET2 in myeloproliferative neoplasms. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2012; 51: 743–755.
- 47 Shimizu T, Kubovcakova L, Nienhold R, Zmajkovic J, Meyer SC, Hao-Shen H et al. Loss of Ezh2 synergizes with JAK2 -V617F in initiating myeloproliferative neoplasms and promoting myelofibrosis. *Journal of Experimental Medicine* 2016; 213: 1479–1496.

- 48 Barbui T, Thiele J, Gisslinger H, Kvasnicka HM, Vannucchi AM, Guglielmelli P et al. The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and in-depth discussion. *Blood Cancer Journal* 2018; 8: 15.
- 49 Lengfelder E, Baerlocher GM, Döhner K, Gisslinger H, Grieshammer M, Koschmieder S et al. Polycythaemia Vera (PV) Leitlinie ICD10:D45. *Oncopedia*. 2019.<https://www.onkopedia-guidelines.info/de/onkopedia/guidelines/polycythaemia-vera-pv/@@guideline/html/index.html#ID0EOWAE>.
- 50 Petrides PE, Grieshammer M, Lengfelder E, Baerlocher GM, Döhner K, Gisslinger H et al. Essentielle (oder primäre) Thrombozythämie (ET) - Leitlinie. *Oncopedia*. 2023.<https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/essentielle-oder-primare-thrombozythaemie-et/@@guideline/html/index.html>.
- 51 Grieshammer M, Lengfelder E, Baerlocher GM, Döhner K, Gisslinger H, Koschmieder S et al. Primäre Myelofibrose (PMF) - Leitlinie. *Oncopedia*. 2023.
- 52 Rungjirajitranon T, Owattanapanich W, Ungprasert P, Siritanaratkul N, Ruchutrakool T. A systematic review and meta-analysis of the prevalence of thrombosis and bleeding at diagnosis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *BMC Cancer* 2019; 19: 184.
- 53 Hultcrantz M, Björkholm M, Dickman PW, Landgren O, Derolf ÅR, Kristinsson SY et al. Risk for Arterial and Venous Thrombosis in Patients With Myeloproliferative Neoplasms. *Annals of Internal Medicine* 2018; 168: 317.
- 54 Guy A, Helzy K, Mansier O, Bordet J-C, Rivière E, Fiore M et al. Platelet function studies in myeloproliferative neoplasms patients with Calreticulin or JAK2V617F mutation. *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis* 2023; 7: 100060.
- 55 Lee M-W, Yeon S-H, Ryu H, Song I-C, Lee H-J, Yun H-J et al. Volumetric Splenomegaly in Patients With Polycythemia Vera. *Journal of Korean Medical Science* 2022; 37. doi:10.3346/jkms.2022.37.e87.
- 56 Accurso V, Santoro M, Raso S, Contrino AD, Casimiro P, Di Piazza F et al. Splenomegaly impacts prognosis in essential thrombocythemia and polycythemia vera: A single center study. *Hematology Reports* 2019; 11. doi:10.4081/hr.2019.8281.
- 57 Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood* 2009; 113: 2895–2901.
- 58 Finazzi G, Carobbio A, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Ruggeri M et al. Incidence and risk factors for bleeding in 1104 patients with essential thrombocythemia or prefibrotic myelofibrosis diagnosed according to the 2008 WHO criteria. *Leukemia* 2012; 26: 716–719.
- 59 Yesilova AM, Yavuzer S, Yavuzer H, Cengiz M, Toprak ID, Hanedar E et al. Analysis of thrombosis and bleeding complications in patients with polycythemia vera: a Turkish retrospective study. *International Journal of Hematology* 2017; 105: 70–78.
- 60 Kim J, Byun JM, Hong J, Koh Y, Shin D-Y, Kim I et al. Incidence, characteristics and risk factors of thromboembolic events in East Asian patients with BCR-ABL1 negative myeloproliferative neoplasms. *Scientific Reports* 2021; 11: 17819.
- 61 Leiva O, How C-J, Brunner AM, Hobbs GS. Trends in All-Cause and Cardiovascular Mortality Among Patients with Myeloproliferative Neoplasms: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Database Analysis. *Blood* 2022; 140: 6808–6809.
- 62 Tefferi A, Vaidya R, Caramazza D, Finke C, Lasho T, Pardanani A. Circulating Interleukin (IL)-8, IL-2R, IL-12, and IL-15 Levels Are Independently Prognostic in Primary Myelofibrosis: A Comprehensive Cytokine Profiling Study. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29: 1356–1363.

- 63 Vaidya R, Gangat N, Jimma T, Finke CM, Lasho TL, Pardanani A et al. Plasma cytokines in polycythemia vera: Phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. *American Journal of Hematology* 2012; 87: 1003–1005.
- 64 Pourcelot E, Trocme C, Mondet J, Bailly S, Toussaint B, Mossuz P. Cytokine profiles in polycythemia vera and essential thrombocythemia patients: Clinical implications. *Experimental Hematology* 2014; 42: 360–368.
- 65 Cacemiro M da C, Cominal JG, Tognon R, Nunes N de S, Simões BP, Figueiredo-Pontes LL de et al. Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms as disorders marked by cytokine modulation. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy* 2018; 40: 120–131.
- 66 O'Sullivan J, Mead AJ. Heterogeneity in myeloproliferative neoplasms: Causes and consequences. *Advances in Biological Regulation* 2019; 71: 55–68.
- 67 Scherber R, Dueck AC, Johansson P, Barbui T, Barosi G, Vannucchi AM et al. The Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form (MPN-SAF): International Prospective Validation and Reliability Trial in 402 patients. *Blood* 2011; 118: 401–408.
- 68 Mitra D, Kaye JA, Piecoro LT, Brown J, Reith K, Mughal TI et al. Symptom burden and splenomegaly in patients with myelofibrosis in the United States: a retrospective medical record review. *Cancer Medicine* 2013; 2: 889–898.
- 69 Benton CB, Boddu PC, DiNardo CD, Bose P, Wang F, Assi R et al. Janus kinase 2 variants associated with the transformation of myeloproliferative neoplasms into acute myeloid leukemia. *Cancer* 2019. doi:10.1002/cncr.31986.
- 70 Barbui T, Barosi G, Birgegard G, Cervantes F, Finazzi G, Griesshammer M et al. Philadelphia-Negative Classical Myeloproliferative Neoplasms: Critical Concepts and Management Recommendations From European LeukemiaNet. *Journal of Clinical Oncology* 2011; 29: 761–770.
- 71 Barbui T, Tefferi A, Vannucchi AM, Passamonti F, Silver RT, Hoffman R et al. Philadelphia chromosome-negative classical myeloproliferative neoplasms: revised management recommendations from European LeukemiaNet. *Leukemia* 2018; 32: 1057–1069.
- 72 Gremmel T, Gisslinger B, Gisslinger H, Panzer S. Response to aspirin therapy in patients with myeloproliferative neoplasms depends on the platelet count. *Translational Research* 2018; 200: 35–42.
- 73 Donovan PB, Kaplan ME, Goldberg JD, Tatarsky I, Najean Y, Silberstein EB et al. Treatment of polycythemia vera with hydroxyurea. *American Journal of Hematology* 1984; 17: 329–334.
- 74 Lengfelder E, Berger U, Hehlmann R. Interferon alpha in the treatment of polycythemia vera. *Annals of hematology* 2000; 79: 103–9.
- 75 Huang B-T, Zeng Q-C, Zhao W-H, Li B-S, Chen R-L. Interferon-2b gains high sustained response therapy for advanced essential thrombocythemia and polycythemia vera with JAK2V617F positive mutation. *Leukemia Research* 2014; 38: 1177–1183.
- 76 Kiladjian JJ, Chomienne C, Fenaux P. Interferon- $\alpha$  therapy in bcr-abl-negative myeloproliferative neoplasms. *Leukemia* 2008; 22: 1990–1998.
- 77 Bjørn ME, de Stricker K, Kjær L, Ellemann K, Hasselbalch HC. Combination therapy with interferon and JAK1-2 inhibitor is feasible: Proof of concept with rapid reduction in JAK2V617F-allele burden in polycythemia vera. *Leukemia Research Reports* 2014; 3: 73–75.
- 78 Austin RJ, Straube J, Bruedigam C, Pali G, Jacquelin S, Vu T et al. Distinct effects of ruxolitinib and interferon-alpha on murine JAK2V617F myeloproliferative neoplasm hematopoietic stem cell populations. *Leukemia* 2020; 34: 1075–1089.

- 79 Yacoub A, Mascarenhas J, Kosiorek H, Prchal JT, Berenson D, Baer MR et al. Pegylated interferon alfa-2a for polycythemia vera or essential thrombocythemia resistant or intolerant to hydroxyurea. In: *Blood*. 2019, pp 1498–1509.
- 80 Masarova L, Patel KP, Newberry KJ, Cortes J, Borthakur G, Konopleva M et al. Pegylated interferon alfa-2a in patients with essential thrombocythemia or polycythemia vera: a post-hoc, median 83 month follow-up of an open-label, phase 2 trial. *The Lancet Haematology* 2017; 4: e165–e175.
- 81 Masciulli A, Ferrari A, Carobbio A, Ghirardi A, Barbui T. Ruxolitinib for the prevention of thrombosis in polycythemia vera: A systematic review and meta-analysis. *Blood Advances* 2020; 4: 380–386.
- 82 Passamonti F, Griesshammer M, Palandri F, Egyed M, Benevolo G, Devos T et al. Ruxolitinib for the treatment of inadequately controlled polycythemia vera without splenomegaly (RESPONSE-2): a randomised, open-label, phase 3b study. *The Lancet Oncology* 2017; 18: 88–99.
- 83 Samuelson BT, Vesely SK, Chai-Adisaksopha C, Scott BL, Crowther M, Garcia D. The impact of ruxolitinib on thrombosis in patients with polycythemia vera and myelofibrosis: A meta-analysis. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2016; 27: 648–652.
- 84 Vannucchi AM, Kiladjian JJ, Griesshammer M, Masszi T, Durrant S, Passamonti F et al. Ruxolitinib versus Standard Therapy for the Treatment of Polycythemia Vera. *New England Journal of Medicine* 2015; 372: 426–435.
- 85 Ostojic A, Vrhovac R, Verstovsek S. Ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis: Its clinical potential. *Therapeutics and Clinical Risk Management* 2012; 8: 95–103.
- 86 Mullally A, Hood J, Harrison C, Mesa R. Fedratinib in myelofibrosis. *Blood Advances* 2020; 4: 1792–1800.
- 87 Santos FPS, Tam CS, Kantarjian H, Cortes J, Thomas D, Pollock R et al. Splenectomy in patients with myeloproliferative neoplasms: efficacy, complications and impact on survival and transformation. *Leukemia & lymphoma* 2014; 55: 121–7.
- 88 Cervantes F. How I treat splenomegaly in myelofibrosis. *Blood Cancer Journal* 2011; 1: e37–e37.
- 89 Mesa RA. How I treat symptomatic splenomegaly in patients with myelofibrosis. *Blood* 2009; 113: 5394–5400.
- 90 Kröger NM, Deeg JH, Olavarria E, Niederwieser D, Bacigalupo A, Barbui T et al. Indication and management of allogeneic stem cell transplantation in primary myelofibrosis: a consensus process by an EBMT/ELN international working group. *Leukemia* 2015; 29: 2126–33.
- 91 Deeg HJ, Gooley TA, Flowers MED, Sale GE, Slattery JT, Anasetti C et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for myelofibrosis. *Blood* 2003; 102: 3912–3918.
- 92 Ostojic A, Vrhovac R, Verstovsek S. Ruxolitinib: A New JAK1/2 Inhibitor That Offers Promising Options for Treatment of Myelofibrosis. *Future Oncol* 2011; 7: 1035–1043.
- 93 Verstovsek S, Kantarjian H, Mesa RA, Pardanani AD, Cortes-Franco J, Thomas DA et al. Safety and Efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 Inhibitor, in Myelofibrosis. *New England Journal of Medicine* 2010; 363: 1117–1127.
- 94 Chrysohoou C, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Das UN, Stefanadis C. Adherence to the Mediterranean diet attenuates inflammation and coagulation process in healthy adults. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 44: 152–158.
- 95 Fung TT, McCullough ML, Newby P, Manson JE, Meigs JB, Rifai N et al. Diet-quality scores and plasma concentrations of markers of inflammation and endothelial dysfunction. *The American Journal of Clinical Nutrition* 2005; 82: 163–173.

- 96 Côté A, Daneault S. Effect of yoga on patients with cancer: our current understanding. *Canadian family physician Medecin de famille canadien* 2012; 58: e475-9.
- 97 Harder H, Parlour L, Jenkins V. Randomised controlled trials of yoga interventions for women with breast cancer: a systematic literature review. *Supportive Care in Cancer* 2012; 20: 3055–3064.
- 98 Buffart LM, van Uffelen JGZ, Riphagen II, Brug J, van Mechelen W, Brown WJ et al. Physical and psychosocial benefits of yoga in cancer patients and survivors, a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *BMC Cancer* 2012; 12: 559.
- 99 Sadjja J, Mills PJ. Effects of Yoga Interventions on Fatigue in Cancer Patients and Survivors: A Systematic Review of Randomized Controlled Trials. *EXPLORE* 2013; 9: 232–243.
- 100 Mendez Luque LF, Blackmon AL, Ramanathan G, Fleischman AG. Key Role of Inflammation in Myeloproliferative Neoplasms: Instigator of Disease Initiation, Progression. and Symptoms. *Current Hematologic Malignancy Reports* 2019; 14: 145–153.
- 101 Lundberg P, Takizawa H, Kubovcakova L, Guo G, Hao-Shen H, Dirnhofer S et al. Myeloproliferative neoplasms can be initiated from a single hematopoietic stem cell expressing JAK2 -V617F. *The Journal of Experimental Medicine* 2014; 211: 2213–2230.
- 102 Fowles JS, How J, Allen MJ, Oh ST. Young versus old age at diagnosis confers distinct genomic profiles in patients with polycythemia vera. *Leukemia* 2019; 33: 1522–1526.
- 103 Karantanos T, Chaturvedi S, Braunstein EM, Spivak J, Resar L, Karanika S et al. Sex determines the presentation and outcomes in MPN and is related to sex-specific differences in the mutational burden. *Blood Advances* 2020; 4: 2567–2576.
- 104 Čokić VP, Mitrović-Ajtić O, Beleslin-Čokić BB, Marković D, Buač M, Diklić M et al. Proinflammatory Cytokine IL-6 and JAK-STAT Signaling Pathway in Myeloproliferative Neoplasms. *Mediators of Inflammation* 2015; 2015: 1–13.
- 105 Fisher DAC, Miner CA, Engle EK, Hu H, Collins TB, Zhou A et al. Cytokine production in myelofibrosis exhibits differential responsiveness to JAK-STAT, MAP kinase, and NFκB signaling. *Leukemia* 2019; 33: 1978–1995.
- 106 Rai S, Grockowiak E, Hansen N, Luque Paz D, Stoll CB, Hao-Shen H et al. Inhibition of interleukin-1β reduces myelofibrosis and osteosclerosis in mice with JAK2-V617F driven myeloproliferative neoplasm. *Nature Communications* 2022; 13: 5346.
- 107 Rai S, Zhang Y, Grockowiak E, Kimmerlin Q, Hansen N, Stoll CB et al. IL-1β promotes MPN disease initiation by favoring early clonal expansion of JAK2 -mutant hematopoietic stem cells. *Blood Advances* 2024; 8: 1234–1249.
- 108 Rahman MFU, Yang Y, Le BT, Dutta A, Posyniak J, Faughnan P et al. Interleukin-1 contributes to clonal expansion and progression of bone marrow fibrosis in JAK2V617F-induced myeloproliferative neoplasm. *Nature Communications* 2022; 13. doi:10.1038/s41467-022-32928-3.
- 109 Arranz L, Sánchez-Aguilera A, Martín-Pérez D, Isern J, Langa X, Tzankov A et al. Neuropathy of haematopoietic stem cell niche is essential for myeloproliferative neoplasms. *Nature* 2014; 512: 78–81.
- 110 Rodriguez-Meira A, Norfo R, Wen S, Chédeville AL, Rahman H, O'Sullivan J et al. Single-cell multi-omics identifies chronic inflammation as a driver of TP53-mutant leukemic evolution. *Nature Genetics* 2023; 55: 1531–1541.
- 111 Kurzrock R. The role of cytokines in cancer-related fatigue. *Cancer* 2001; 92: 1684–8.

- 112 Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, Bumm TG, Petersen CL, Doratotaj S et al. TNF $\alpha$  facilitates clonal expansion of JAK2 V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011; 118: 6392–6398.
- 113 Fleischman AG. Inflammation as a Driver of Clonal Evolution in Myeloproliferative Neoplasm. *Mediators of Inflammation* 2015; 2015: 1–6.
- 114 Fleischman AG, Aichberger KJ, Luty SB, Bumm TG, Petersen CL, Doratotaj S et al. TNF $\alpha$  facilitates clonal expansion of JAK2V617F positive cells in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2011; 118: 6392–6398.
- 115 Mullally A, Bruedigam C, Poveromo L, Heidel FH, Purdon A, Vu T et al. Depletion of Jak2V617F myeloproliferative neoplasm-propagating stem cells by interferon- $\alpha$  in a murine model of polycythemia vera. *Blood* 2013; 121: 3692–3702.
- 116 Hasan S, Lacout C, Marty C, Cuingnet M, Solary E, Vainchenker W et al. JAK2V617F expression in mice amplifies early hematopoietic cells and gives them a competitive advantage that is hampered by IFN $\alpha$ . *Blood* 2013; 122: 1464–1477.
- 117 Hasselbalch HC. Chronic inflammation as a promotor of mutagenesis in essential thrombocythemia, polycythemia vera and myelofibrosis. A human inflammation model for cancer development? *Leukemia Research* 2013; 37: 214–220.
- 118 Kleppe M, Kwak M, Koppikar P, Riester M, Keller M, Bastian L et al. JAK–STAT Pathway Activation in Malignant and Nonmalignant Cells Contributes to MPN Pathogenesis and Therapeutic Response. *Cancer Discovery* 2015; 5: 316–331.
- 119 Allain-Maillet S, Bosseboeuf A, Mennesson N, Bostoën M, Dufeu L, Choi EH et al. Anti-Glucosylsphingosine Autoimmunity, JAK2V617F-Dependent Interleukin-1 $\beta$  and JAK2V617F-Independent Cytokines in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancers* 2020; 12: 2446.
- 120 Hermouet S. Mutations, inflammation and phenotype of myeloproliferative neoplasms. *Frontiers in oncology* 2023; 13: 1196817.
- 121 Yao JC, Oetjen KA, Wang T, Xu H, Abou-Ezzi G, Krambs JR et al. TGF- $\beta$  signaling in myeloproliferative neoplasms contributes to myelofibrosis without disrupting the hematopoietic niche. *Journal of Clinical Investigation* 2022; 132. doi:10.1172/JCI1154092.
- 122 Woods B, Chen W, Chiu S, Marinaccio C, Fu C, Gu L et al. Activation of JAK/STAT Signaling in Megakaryocytes Sustains Myeloproliferation In Vivo. *Clinical Cancer Research* 2019; 25: 5901–5912.
- 123 Baldauf CK, Muller P, Haage TR, Adam-Frey S, Lokau J, Garbers C et al. Anti-IL-6 cytokine treatment has no impact on elevated hematocrit or splenomegaly in a polycythemia vera mouse model. *Blood Advances* 2022; 6: 399–404.
- 124 Müller P, Baldauf CK, Haage TR, Waldleben AM, Richter F, Pfizenmaier K et al. Anti-inflammatory treatment in MPN: targeting TNFR1 and TNFR2 in JAK2-V617F–induced disease. *Blood Advances* 2021; 5: 5349–5359.
- 125 Müller P, Baldauf CK, Haage TR, Charakopoulos E, Böttcher M, Bhuria V et al. Genetic Knock-out of TNFR1 and TNFR2 in a JAK2-V617F Polycythemia Vera Mouse Model. *HemaSphere* 2022; 6: E717.
- 126 Sollazzo D, Forte D, Polverelli N, Romano M, Perricone M, Rossi L et al. Crucial factors of the inflammatory microenvironment (IL-1 $\beta$ / TNF- $\alpha$ /TIMP-1) promote the maintenance of the malignant hemopoietic clone of myelofibrosis: an in vitro study. *Oncotarget* 2016; 7: 43974–43988.
- 127 Brikos C, Wait R, Begum S, O’Neill LAJ, Saklatvala J. Mass Spectrometric Analysis of the Endogenous Type I Interleukin-1 (IL-1) Receptor Signaling Complex Formed after IL-1 Binding

- Identifies IL-1RAcP, MyD88, and IRAK-4 as the Stable Components. *Molecular & Cellular Proteomics* 2007; 6: 1551–1559.
- 128 Rahman MFU, Yang Y, Le BT, Dutta A, Faughnan P, Mohi G. IL-1 Signaling Promotes Clonal Expansion and Progression of Bone Marrow Fibrosis in JAK2V617F-Induced Myeloproliferative Neoplasm. *Blood* 2021; 138: 2540–2540.
  - 129 Zhang Y, Cui J, Zhang G, Wu C, Abdel-Latif A, Smyth SS et al. Inflammasome activation promotes venous thrombosis through pyroptosis. *Blood Advances* 2021; 5: 2619–2623.
  - 130 Liberale L, Holy EW, Akhmedov A, Bonetti NR, Nietlispach F, Matter CM et al. Interleukin-1 $\beta$  Mediates Arterial Thrombus Formation via NET-Associated Tissue Factor. *Journal of Clinical Medicine* 2019; 8: 2072.
  - 131 Mantovani A, Dinarello CA, Molgora M, Garlanda C. Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity* 2019; 50: 778–795.
  - 132 Dinarello C, Arend W, Sims J, Smith D, Blumberg H, O'Neill L et al. IL-1 family nomenclature. *Nature Immunology* 2010; 11: 973–973.
  - 133 Dinarello C. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87: 2095–2147.
  - 134 Duff GW, Durum SK. The pyrogenic and mitogenic actions of interleukin-1 are related. *Nature* 1983; 304: 449–451.
  - 135 Alheim K, Chai Z, Fantuzzi G, Hasanvan H, Malinowsky D, Di Santo E et al. Hyperresponsive febrile reactions to interleukin (IL) 1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and altered brain cytokine mRNA and serum cytokine levels, in IL-1 $\beta$ -deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1997; 94: 2681–2686.
  - 136 Salmeron KE, Maniskas ME, Edwards DN, Wong R, Rajkovic I, Trout A et al. Interleukin 1 alpha administration is neuroprotective and neuro-restorative following experimental ischemic stroke. *Journal of Neuroinflammation* 2019; 16: 222.
  - 137 Miller AJ, Hopkins SJ, Luheshi GN. Sites of action of IL-1 in the development of fever and cytokine responses to tissue inflammation in the rat. *British Journal of Pharmacology* 1997; 120: 1274–1279.
  - 138 Arranz L, Arriero M del M, Villatoro A. Interleukin-1 $\beta$  as emerging therapeutic target in hematological malignancies and potentially in their complications. *Blood Reviews* 2017; 31: 306–317.
  - 139 Nozaki S, Sledge GW, Nakshatri H. Cancer Cell-Derived Interleukin 1 $\alpha$  Contributes to Autocrine and Paracrine Induction of Pro-metastatic Genes in Breast Cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 275: 60–62.
  - 140 Beaupre DM, Talpaz M, Marini FC, Cristiano RJ, Roth JA, Estrov Z et al. Autocrine interleukin-1beta production in leukemia: evidence for the involvement of mutated RAS. *Cancer research* 1999; 59: 2971–80.
  - 141 Chew ZH, Cui J, Sachaphibulkij K, Tan I, Kar S, Koh KK et al. Macrophage IL-1 $\beta$  contributes to tumorigenesis through paracrine AIM2 inflammasome activation in the tumor microenvironment. *Frontiers in Immunology* 2023; 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1211730.
  - 142 Sasu S, Cooper AL, Beasley D. Juxtacrine effects of IL-1 $\alpha$  precursor promote iNOS expression in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2001; 280: H1615–H1623.
  - 143 Massey WA, Randall TC, Kagey-Sobotka A, Warner JA, MacDonald SM, Gillis S et al. Recombinant human IL-1 alpha and -1 beta potentiate IgE-mediated histamine release from human basophils. *The Journal of Immunology* 1989; 143: 1875–1880.

- 144 van der Meer JW, Barza M, Wolff SM, Dinarello CA. A low dose of recombinant interleukin 1 protects granulocytopenic mice from lethal gram-negative infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988; 85: 1620–1623.
- 145 Wesa AK, Galy A. IL-1 $\beta$  induces dendritic cells to produce IL-12. *International Immunology* 2001; 13: 1053–1061.
- 146 Hültner L, Kölsch S, Stassen M, Kaspers U, Kremer J-P, Mailhammer R et al. In Activated Mast Cells, IL-1 Up-Regulates the Production of Several Th2-Related Cytokines Including IL-9. *The Journal of Immunology* 2000; 164: 5556–5563.
- 147 Lichtman AH, Chin J, Schmidt JA, Abbas AK. Role of interleukin 1 in the activation of T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1988; 85: 9699–9703.
- 148 Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS et al. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity* 2009; 30: 576–587.
- 149 Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 $\beta$  and 6 but not transforming growth factor- $\beta$  are essential for the differentiation of interleukin 17–producing human T helper cells. *Nature Immunology* 2007; 8: 942–949.
- 150 Rousset F, Garcia E, Banchereau J. Cytokine-induced proliferation and immunoglobulin production of human B lymphocytes triggered through their CD40 antigen. *The Journal of experimental medicine* 1991; 173: 705–710.
- 151 Nakae S, Asano M, Horai R, Iwakura Y. Interleukin-1 $\beta$ , but not interleukin-1 $\alpha$ , is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology* 2001; 104: 402–409.
- 152 Rooney M, Symons JA, Duff GW. Interleukin 1 beta in synovial fluid is related to local disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 1990; 10: 217–219.
- 153 Dujmovic I, Mangano K, Pekmezovic T, Quattrocchi C, Mesaros S, Stojkovic N et al. The analysis of IL-1 beta and its naturally occurring inhibitors in multiple sclerosis: The elevation of IL-1 receptor antagonist and IL-1 receptor type II after steroid therapy. *Journal of Neuroimmunology* 2009; 207: 101–106.
- 154 Ricote M, García-Tuñón I, Bethencourt FR, Fraile B, Paniagua R, Royuela M. Interleukin-1 (IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ ) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma. *Cancer* 2004; 100: 1388–1396.
- 155 Chen M-F, Lu M-S, Chen P-T, Chen W-C, Lin P-Y, Lee K-D. Role of interleukin 1 beta in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Molecular Medicine* 2012; 90: 89–100.
- 156 Dinarello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood* 2011; 117: 3720–3732.
- 157 March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V et al. Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs. *Nature* 1985; 315: 641–7.
- 158 Priestle JP, Schär HP, Grütter MG. Crystallographic refinement of interleukin 1 beta at 2.0 Å resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989; 86: 9667–9671.
- 159 Graves BJ, Hatada MH, Hendrickson WA, Miller JK, Madison VS, Satow Y. Structure of interleukin 1 alpha at 2.7-Å resolution. *Biochemistry* 1990; 29: 2679–84.
- 160 Veerapandian B. Structure and function of interleukin-1, based on crystallographic and modeling studies. *Biophysical Journal* 1992; 62: 112–115.

- 161 Mosley B, Urdal DL, Prickett KS, Larsen A, Cosman D, Conlon PJ et al. The interleukin-1 receptor binds the human interleukin-1 alpha precursor but not the interleukin-1 beta precursor. *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262: 2941–2944.
- 162 Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. *Immunity* 1997; 7: 837–847.
- 163 Radons J, Falk W, Dove S. Identification of critical regions within the TIR domain of IL-1 receptor type I. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2015; 68: 15–20.
- 164 Deliz-Aguirre R, Cao F, Gerpott FHU, Auevechanichkul N, Chupanova M, Mun Y et al. MyD88 oligomer size functions as a physical threshold to trigger IL1R Myddosome signaling. *Journal of Cell Biology* 2021; 220. doi:10.1083/jcb.202012071.
- 165 Vollmer S, Strickson S, Zhang T, Gray N, Lee KL, Rao VR et al. The mechanism of activation of IRAK1 and IRAK4 by interleukin-1 and Toll-like receptor agonists. *Biochemical Journal* 2017; 474: 2027–2038.
- 166 Qian Y, Commane M, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Li X. IRAK-mediated Translocation of TRAF6 and TAB2 in the Interleukin-1-induced Activation of NFκB. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 41661–41667.
- 167 Windheim M, Stafford M, Peggie M, Cohen P. Interleukin-1 (IL-1) Induces the Lys63-Linked Polyubiquitination of IL-1 Receptor-Associated Kinase 1 To Facilitate NEMO Binding and the Activation of IκBα Kinase. *Molecular and Cellular Biology* 2008; 28: 1783–1791.
- 168 Muroi M, Tanamoto K. IRAK-1-mediated negative regulation of Toll-like receptor signaling through proteasome-dependent downregulation of TRAF6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2012; 1823: 255–263.
- 169 Zhang J, Macartney T, Peggie M, Cohen P. Interleukin-1 and TRAF6-dependent activation of TAK1 in the absence of TAB2 and TAB3. *Biochemical Journal* 2017; 474: 2235–2248.
- 170 Kishida S, Sanjo H, Akira S, Matsumoto K, Ninomiya-Tsuji J. TAK1-binding protein 2 facilitates ubiquitination of TRAF6 and assembly of TRAF6 with IKK in the IL-1 signaling pathway. *Genes to Cells* 2005; 10: 447–454.
- 171 Zhang J, Clark K, Lawrence T, Peggie MW, Cohen P. An unexpected twist to the activation of IKKβ: TAK1 primes IKKβ for activation by autophosphorylation. *Biochemical Journal* 2014; 461: 531–537.
- 172 Takaesu G, Surabhi RM, Park K-J, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Gaynor RB. TAK1 is Critical for IκB Kinase-mediated Activation of the NF-κB Pathway. *Journal of Molecular Biology* 2003; 326: 105–115.
- 173 Lee J, Mira-Arbibe L, Ulevitch RJ. TAK1 regulates multiple protein kinase cascades activated by bacterial lipopolysaccharide. *Journal of leukocyte biology* 2000; 68: 909–15.
- 174 Shim J-H, Xiao C, Paschal AE, Bailey ST, Rao P, Hayden MS et al. TAK1, but not TAB1 or TAB2, plays an essential role in multiple signaling pathways in vivo. *Genes & Development* 2005; 19: 2668–2681.
- 175 Srinivasan D, Yen J-H, Joseph DJ, Friedman W. Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2004; 24: 6482–8.
- 176 Lee JG, Heur M. Interleukin-1β enhances cell migration through AP-1 and NF-κB pathway-dependent FGF2 expression in human corneal endothelial cells. *Biology of the Cell* 2013; 105: 175–189.

- 177 Brooks JW, Yoza BK, Mizel SB. Interleukin 1 activation of the AP-1 transcription complex in murine T cells is regulated at the level of Jun B protein accumulation. *Molecular Immunology* 1995; 32: 779–788.
- 178 Turner NA, Das A, Warburton P, O'Regan DJ, Ball SG, Porter KE. Interleukin-1 $\alpha$  stimulates proinflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 2009; 297: H1117–H1127.
- 179 Manning CN, Martel C, Sakiyama-Elbert SE, Silva MJ, Shah S, Gelberman RH et al. Adipose-derived mesenchymal stromal cells modulate tendon fibroblast responses to macrophage-induced inflammation in vitro. *Stem Cell Research & Therapy* 2015; 6: 74.
- 180 Thomas-Jardin SE, Kanchwala MS, Jacob J, Merchant S, Meade RK, Gahnim NM et al. Identification of an IL-1-induced gene expression pattern in AR + PCa cells that mimics the molecular phenotype of AR – PCa cells. *The Prostate* 2018; 78: 595–606.
- 181 Murphy JM, Jeong K, Rodriguez YAR, Kim JH, Ahn EYE, Lim STS. FAK and Pyk2 activity promote TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ -mediated pro-inflammatory gene expression and vascular inflammation. *Scientific Reports* 2019; 9: 1–14.
- 182 Colotta F, Re F, Muzio M, Bertini R, Polentarutti N, Sironi M et al. Interleukin-1 Type II Receptor: A Decoy Target for IL-1 That Is Regulated by IL-4. *Science* 1993; 261: 472–475.
- 183 Neumann D, Kollwe C, Martin MU, Boraschi D. The Membrane Form of the Type II IL-1 Receptor Accounts for Inhibitory Function. *The Journal of Immunology* 2000; 165: 3350–3357.
- 184 Dripps DJ, Brandhuber BJ, Thompson RC, Eisenberg SP. Interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist binds to the 80-kDa IL-1 receptor but does not initiate IL-1 signal transduction. *Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 10331–10336.
- 185 Carter DB, Deibel MR, Dunn CJ, Tomich C-SC, Laborde AL, Slightom JL et al. Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature* 1990; 344: 633–638.
- 186 Schreuder H, Tardif C, Trump-Kallmeyer S, Soffientini A, Sarubbi E, Akeson A et al. A new cytokine-receptor binding mode revealed by the crystal structure of the IL-1 receptor with an antagonist. *Nature* 1997; 386: 194–200.
- 187 Sneezum L, Eislmayr K, Dworak H, Sedlyarov V, Le Heron A, Ebner F et al. Context-Dependent IL-1 mRNA-Destabilization by TTP Prevents Dysregulation of Immune Homeostasis Under Steady State Conditions. *Frontiers in Immunology* 2020; 11: 1–16.
- 188 Ainscough JS, Gerberick GF, Zahedi-Nejad M, Lopez-Castejon G, Brough D, Kimber I et al. Dendritic cell IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are polyubiquitinated and degraded by the proteasome. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289: 35582–35592.
- 189 Vijayaraj SL, Feltham R, Rashidi M, Frank D, Liu Z, Simpson DS et al. The ubiquitylation of IL-1 $\beta$  limits its cleavage by caspase-1 and targets it for proteasomal degradation. *Nature Communications* 2021; 12: 2713.
- 190 Groß O, Yazdi AS, Thomas CJ, Masin M, Heinz LX, Guarda G et al. Inflammasome Activators Induce Interleukin-1 $\alpha$  Secretion via Distinct Pathways with Differential Requirement for the Protease Function of Caspase-1. *Immunity* 2012; 36: 388–400.
- 191 Netea MG, Nold-Petry CA, Nold MF, Joosten LAB, Opitz B, Van Der Meer JHM et al. Differential requirement for the activation of the inflammasome for processing and release of IL-1 $\beta$  in monocytes and macrophages. *Blood* 2009; 113: 2324–2335.
- 192 Andersson J, Björk L, Dinarello CA, Towbin H, Andersson U. Lipopolysaccharide induces human interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 production in the same cell. *European Journal of Immunology* 1992; 22: 2617–2623.

- 193 Gabellec M-M, Griffais R, Fillion G, Haour F. Expression of interleukin 1 $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  and interleukin 1 receptor antagonist mRNA in mouse brain: regulation by bacterial lipopolysaccharide (LPS) treatment. *Molecular Brain Research* 1995; 31: 122–130.
- 194 Chhikara M, Wang S, Kern SJ, Ferreyra GA, Barb JJ, Munson PJ et al. Carbon Monoxide Blocks Lipopolysaccharide-Induced Gene Expression by Interfering with Proximal TLR4 to NF- $\kappa$ B Signal Transduction in Human Monocytes. *PLoS ONE* 2009; 4: e8139.
- 195 Álvarez S, Muñoz-Fernández MÁ. TNF-A May Mediate Inflammasome Activation in the Absence of Bacterial Infection in More than One Way. *PLoS ONE* 2013; 8: e71477.
- 196 Marucha PT, Zeff RA, Kreutzer DL. Cytokine regulation of IL-1 beta gene expression in the human polymorphonuclear leukocyte. *The Journal of Immunology* 1990; 145: 2932–2937.
- 197 Cogswell JP, Godlevski MM, Wisely GB, Clay WC, Leesnitzer LM, Ways JP et al. NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1994; 153: 712–23.
- 198 Hull RP, Srivastava PK, D'Souza Z, Atanur SS, Mechta-Grigoriou F, Game L et al. Combined ChIP-Seq and transcriptome analysis identifies AP-1/JunD as a primary regulator of oxidative stress and IL-1 $\beta$  synthesis in macrophages. *BMC Genomics* 2013; 14: 92.
- 199 Adamik J, Wang KZQ, Unlu S, Su A-JA, Tannahill GM, Galson DL et al. Distinct Mechanisms for Induction and Tolerance Regulate the Immediate Early Genes Encoding Interleukin 1 $\beta$  and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ . *PLoS ONE* 2013; 8: e70622.
- 200 Pulugulla SH, Workman R, Rutter NW, Yang Z, Adamik J, Lupish B et al. A combined computational and experimental approach reveals the structure of a C/EBP $\beta$ -Spi1 interaction required for IL1B gene transcription. *The Journal of biological chemistry* 2018; 293: 19942–19956.
- 201 Yang Z, Wara-aswapati N, Chen C, Tsukada J, Auron PE. NF-IL6 (C/EBP $\beta$ ) Vigorously Activates il1b Gene Expression via a Spi-1 (PU.1) Protein-Protein Tether. *Journal of Biological Chemistry* 2000; 275: 21272–21277.
- 202 Ha S-D, Cho W, DeKoter RP, Kim SO. The transcription factor PU.1 mediates enhancer-promoter looping that is required for IL-1 $\beta$  eRNA and mRNA transcription in mouse melanoma and macrophage cell lines. *Journal of Biological Chemistry* 2019; 294: 17487–17500.
- 203 Hailey KL, Li S, Andersen MD, Roy M, Woods VL, Jennings PA. Pro-interleukin (IL)-1 $\beta$  Shares a Core Region of Stability as Compared with Mature IL-1 $\beta$  While Maintaining a Distinctly Different Configurational Landscape. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 26137–26148.
- 204 Black RA, Kronheim SR, Sleath PR. Activation of interleukin- 1 $\beta$  by a co-induced protease. *FEBS Letters* 1989; 247: 386–390.
- 205 Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA et al. Molecular Cloning of the Interleukin-1 $\beta$  Converting Enzyme. *Science* 1992; 256: 97–100.
- 206 Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ et al. A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 $\beta$  processing in monocytes. *Nature* 1992; 356: 768–774.
- 207 Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome. *Molecular Cell* 2002; 10: 417–426.
- 208 Mankan AK, Dau T, Jenne D, Hornung V. The NLRP3/ASC/Caspase-1 axis regulates IL-1 $\beta$  processing in neutrophils. *European Journal of Immunology* 2012; 42: 710–715.
- 209 Srinivasula SM, Poyet J-L, Razmara M, Datta P, Zhang Z, Alnemri ES. The PYRIN-CARD Protein ASC Is an Activating Adaptor for Caspase-1. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 21119–21122.

- 210 Zhang A, Wang P, Ma X, Yin X, Li J, Wang H et al. Mechanisms that lead to the regulation of NLRP3 inflammasome expression and activation in human dental pulp fibroblasts. *Molecular Immunology* 2015; 66: 253–262.
- 211 Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D et al. Cutting Edge: NF- $\kappa$ B Activating Pattern Recognition and Cytokine Receptors License NLRP3 Inflammasome Activation by Regulating NLRP3 Expression. *The Journal of Immunology* 2009; 183: 787–791.
- 212 Gao H, Liu P, Dong N. Methods to Activate the NLRP1 Inflammasome. 2023, pp 211–222.
- 213 Qiao Y, Wang P, Qi J, Zhang L, Gao C. TLR-induced NF- $\kappa$ B activation regulates NLRP3 expression in murine macrophages. *FEBS Letters* 2012; 586: 1022–1026.
- 214 Shen C, Lu A, Xie WJ, Ruan J, Negro R, Egelman EH et al. Molecular mechanism for NLRP6 inflammasome assembly and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2019; 116: 2052–2057.
- 215 Khare S, Dorfleutner A, Bryan NB, Yun C, Radian AD, de Almeida L et al. An NLRP7-Containing Inflammasome Mediates Recognition of Microbial Lipopeptides in Human Macrophages. *Immunity* 2012; 36: 464–476.
- 216 Sundaram B, Pandian N, Mall R, Wang Y, Sarkar R, Kim HJ et al. NLRP12-PANoptosome activates PANoptosis and pathology in response to heme and PAMPs. *Cell* 2023; 186: 2783-2801.e20.
- 217 Matusiak M, Van Opdenbosch N, Vande Walle L, Sirard J-C, Kanneganti T-D, Lamkanfi M. Flagellin-induced NLRC4 phosphorylation primes the inflammasome for activation by NAIP5. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2015; 112: 1541–1546.
- 218 Hornung V, Ablasser A, Charrel-Dennis M, Bauernfeind F, Horvath G, Caffrey Daniel R et al. AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC. *Nature* 2009; 458: 514–518.
- 219 Kerur N, Veetil MV, Sharma-Walia N, Bottero V, Sadagopan S, Otageri P et al. IFI16 Acts as a Nuclear Pathogen Sensor to Induce the Inflammasome in Response to Kaposi Sarcoma-Associated Herpesvirus Infection. *Cell Host & Microbe* 2011; 9: 363–375.
- 220 Poeck H, Bscheider M, Gross O, Finger K, Roth S, Rebsamen M et al. Recognition of RNA virus by RIG-I results in activation of CARD9 and inflammasome signaling for interleukin 1 $\beta$  production. *Nature Immunology* 2010; 11: 63–69.
- 221 Shao B-Z, Xu Z-Q, Han B-Z, Su D-F, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Frontiers in Pharmacology* 2015; 6. doi:10.3389/fphar.2015.00262.
- 222 Song N, Liu Z-S, Xue W, Bai Z-F, Wang Q-Y, Dai J et al. NLRP3 Phosphorylation Is an Essential Priming Event for Inflammasome Activation. *Molecular Cell* 2017; 68: 185-197.e6.
- 223 Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *The Journal of biological chemistry* 2012; 287: 36617–22.
- 224 Lopez-Castejon G, Luheshi NM, Compan V, High S, Whitehead RC, Flitsch S et al. Deubiquitinases regulate the activity of caspase-1 and interleukin-1 $\beta$  secretion via assembly of the inflammasome. *The Journal of biological chemistry* 2013; 288: 2721–33.
- 225 Katsnelson MA, Rucker LG, Russo HM, Dubyak GR. K<sup>+</sup> Efflux Agonists Induce NLRP3 Inflammasome Activation Independently of Ca<sup>2+</sup> Signaling. *The Journal of Immunology* 2015; 194: 3937–3952.

- 226 Heid ME, Keyel PA, Kamga C, Shiva S, Watkins SC, Salter RD. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Induces NLRP3-Dependent Lysosomal Damage and Inflammasome Activation. *The Journal of Immunology* 2013; 191: 5230–5238.
- 227 Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K<sup>+</sup> Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity* 2013; 38: 1142–1153.
- 228 Groß CJ, Mishra R, Schneider KS, Médard G, Wettmarshausen J, Dittlein DC et al. K<sup>+</sup> Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* 2016; 45: 761–773.
- 229 Swaan PW, Knoell DL, Hesper F, Wewers MD. Sequential Processing of Human ProIL-1 $\beta$  by Caspase-1 and Subsequent Folding Determined by a Combined In Vitro and In Silico Approach. *Pharmaceutical Research* 2001; 18: 1083–1090.
- 230 Hazuda DJ, Strickler J, Kueppers F, Simon PL, Young PR. Processing of precursor interleukin 1 $\beta$  and inflammatory disease. *Journal of Biological Chemistry* 1990; 265: 6318–6322.
- 231 Mizutani H, Schechter N, Lazarus G, Black RA, Kupper TS. Rapid and specific conversion of precursor interleukin 1 beta (IL-1 beta) to an active IL-1 species by human mast cell chymase. *The Journal of experimental medicine* 1991; 174: 821–825.
- 232 Irmeler M, Hertig S, MacDonald HR, Sadoul R, Becherer JD, Proudfoot A et al. Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *The Journal of experimental medicine* 1995; 181: 1917–1922.
- 233 Hildebrand D, Bode KA, Rieß D, Cerny D, Waldhuber A, Römmler F et al. Granzyme A Produces Bioactive IL-1 $\beta$  through a Nonapoptotic Inflammasome-Independent Pathway. *Cell Reports* 2014; 9: 910–917.
- 234 Coeshott C, Ohnemus C, Pilyavskaya A, Ross S, Wieczorek M, Kroona H et al. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor  $\alpha$  and IL-1 $\beta$  from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96: 6261–6266.
- 235 Joosten LAB, Netea MG, Fantuzzi G, Koenders MI, Helsen MMA, Sparrer H et al. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: Contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1 $\beta$ . *Arthritis & Rheumatism* 2009; 60: 3651–3662.
- 236 O'Donoghue AJ, Jin Y, Knudsen GM, Perera NC, Jenne DE, Murphy JE et al. Global Substrate Profiling of Proteases in Human Neutrophil Extracellular Traps Reveals Consensus Motif Predominantly Contributed by Elastase. *PLoS ONE* 2013; 8: e75141.
- 237 Clancy DM, Henry CM, Sullivan GP, Martin SJ. Neutrophil extracellular traps can serve as platforms for processing and activation of <sc>IL</sc> -1 family cytokines. *The FEBS Journal* 2017; 284: 1712–1725.
- 238 Meher AK, Spinosa M, Davis JP, Pope N, Laubach VE, Su G et al. Novel Role of IL (Interleukin)-1 $\beta$  in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Abdominal Aortic Aneurysms. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2018; 38: 843–853.
- 239 Keshari RS, Jyoti A, Dubey M, Kothari N, Kohli M, Bogra J et al. Cytokines Induced Neutrophil Extracellular Traps Formation: Implication for the Inflammatory Disease Condition. *PLoS ONE* 2012; 7: e48111.
- 240 Shi C-S, Kehrl JH. TRAF6 and A20 Regulate Lysine 63-Linked Ubiquitination of Beclin-1 to Control TLR4-Induced Autophagy. *Science Signaling* 2010; 3. doi:10.1126/scisignal.2000751.

- 241 Peral de Castro C, Jones SA, Ni Cheallaigh C, Hearnden CA, Williams L, Winter J et al. Autophagy Regulates IL-23 Secretion and Innate T Cell Responses through Effects on IL-1 Secretion. *The Journal of Immunology* 2012; 189: 4144–4153.
- 242 Shen J, Xu S, Zhou H, Liu H, Jiang W, Hao J et al. IL-1 $\beta$  induces apoptosis and autophagy via mitochondria pathway in human degenerative nucleus pulposus cells. *Scientific Reports* 2017; 7: 41067.
- 243 Wolach O, Sellar RS, Martinod K, Cherpokova D, McConkey M, Chappell RJ et al. Increased neutrophil extracellular trap formation promotes thrombosis in myeloproliferative neoplasms. *Science Translational Medicine* 2018; 10: eaan8292.
- 244 Guy A, Garcia G, Gourdou-Latyszenok V, Wolff-Trombini L, Josserand L, Kimmerlin Q et al. Platelets and neutrophils cooperate to induce increased neutrophil extracellular trap formation in JAK2V617F myeloproliferative neoplasms. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 2024; 22: 172–187.
- 245 Wang J-C, Shi G, Josan K, Ramachandran P, Gotlieb V, Joseph G et al. Defective Autophagy in MPN Were Predominantly Detected in Megakaryocytes in Philadelphia Negative (Ph<sup>-</sup>) Myeloproliferative Neoplasm. *Blood* 2019; 134: 5386–5386.
- 246 Rubartelli A, Cozzolino F, Talio M, Sitia R. A novel secretory pathway for interleukin-1 beta, a protein lacking a signal sequence. *The EMBO journal* 1990; 9: 1503–10.
- 247 Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Cozzolino F, Sitia R. Post-translational regulation of interleukin 1 $\beta$  secretion. *Cytokine* 1993; 5: 117–124.
- 248 Carta S, Tassi S, Pettinati I, Delfino L, Dinarello CA, Rubartelli A. The Rate of Interleukin-1 $\beta$  Secretion in Different Myeloid Cells Varies with the Extent of Redox Response to Toll-like Receptor Triggering. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 27069–27080.
- 249 Tassi S, Carta S, Delfino L, Caorsi R, Martini A, Gattorno M et al. Altered redox state of monocytes from cryopyrin-associated periodic syndromes causes accelerated IL-1 $\beta$  secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010; 107: 9789–9794.
- 250 Perregaux DG, Laliberte RE, Gabel CA. Human Monocyte Interleukin-1 $\beta$  Posttranslational Processing. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 29830–29838.
- 251 Ratitong B, Marshall M, Pearlman E.  $\beta$ -Glucan-stimulated neutrophil secretion of IL-1 $\alpha$  is independent of GSDMD and mediated through extracellular vesicles. *Cell Reports* 2021; 35. doi:10.1016/j.celrep.2021.109139.
- 252 Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1 $\beta$  secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2011; 22: 189–195.
- 253 Matsushima K, Taguchi M, Kovacs EJ, Young HA, Oppenheim JJ. Intracellular localization of human monocyte associated interleukin 1 (IL 1) activity and release of biologically active IL 1 from monocytes by trypsin and plasmin. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1986; 136: 2883–91.
- 254 Paudel RR, Lu D, Roy Chowdhury S, Monroy EY, Wang J. Targeted Protein Degradation via Lysosomes. *Biochemistry* 2023; 62: 564–579.
- 255 Bandyopadhyay D, Cyphersmith A, Zapata JA, Kim YJ, Payne CK. Lysosome Transport as a Function of Lysosome Diameter. *PLoS ONE* 2014; 9: e86847.
- 256 Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O'Shea A, Sharp FA et al. Autophagy controls IL-1 $\beta$  secretion by targeting Pro-IL-1 $\beta$  for degradation. *Journal of Biological Chemistry* 2011; 286: 9587–9597.

- 257 Iula L, Keitelman IA, Sabbione F, Fuentes F, Guzman M, Galletti JG et al. Autophagy mediates interleukin-1 $\beta$  secretion in human neutrophils. *Frontiers in Immunology* 2018; 9: 1–14.
- 258 Keitelman IA, Shiromizu CM, Zgajnar NR, Danielián S, Jancic CC, Martí MA et al. The interplay between serine proteases and caspase-1 regulates the autophagy-mediated secretion of Interleukin-1 beta in human neutrophils. *Frontiers in Immunology* 2022; 13: 1–19.
- 259 Karmakar M, Minns M, Greenberg EN, Diaz-Aponte J, Pestonjamas K, Johnson JL et al. N-GSDMD trafficking to neutrophil organelles facilitates IL-1 $\beta$  release independently of plasma membrane pores and pyroptosis. *Nature Communications* 2020; 11: 1–14.
- 260 Cocucci E, Meldolesi J. Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in cell biology* 2015; 25: 364–72.
- 261 Ståhl A, Johansson K, Mossberg M, Kahn R, Karpman D. Exosomes and microvesicles in normal physiology, pathophysiology, and renal diseases. *Pediatr Nephrol* 2019; 34: 11–30.
- 262 MacKenzie A, Wilson HL, Kiss-Toth E, Dower SK, North RA, Surprenant A. Rapid Secretion of Interleukin-1 $\beta$  by Microvesicle Shedding. *Immunity* 2001; 15: 825–835.
- 263 Qu Y, Franchi L, Nunez G, Dubyak GR. Nonclassical IL-1 $\beta$  Secretion Stimulated by P2X7 Receptors Is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages. *The Journal of Immunology* 2007; 179: 1913–1925.
- 264 Andrei C, Dazzi C, Lotti L, Torrisi MR, Chimini G, Rubartelli A. The secretory route of the leaderless protein interleukin 1beta involves exocytosis of endolysosome-related vesicles. *Molecular biology of the cell* 1999; 10: 1463–75.
- 265 Liao Y, Chen X, Miller-Little W, Wang H, Willard B, Bulek K et al. The Ras GTPase-activating-like protein IQGAP1 bridges Gasdermin D to the ESCRT system to promote IL-1 $\beta$  release via exosomes. *The EMBO Journal* 2023; 42: 1–17.
- 266 Kalluri R, LeBleu VS. The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science* 2020; 367. doi:10.1126/science.aau6977.
- 267 Deng F, Miller J. A review on protein markers of exosome from different bio-resources and the antibodies used for characterization. *Journal of Histotechnology* 2019; 42: 226–239.
- 268 Greening DW, Xu R, Ji H, Tauro BJ, Simpson RJ. A Protocol for Exosome Isolation and Characterization: Evaluation of Ultracentrifugation, Density-Gradient Separation, and Immunoaffinity Capture Methods. 2015, pp 179–209.
- 269 van Niel G, Charrin S, Simoes S, Romao M, Rochin L, Saftig P et al. The Tetraspanin CD63 Regulates ESCRT-Independent and -Dependent Endosomal Sorting during Melanogenesis. *Developmental Cell* 2011; 21: 708–721.
- 270 Cypryk W, Nyman TA, Matikainen S. From Inflammasome to Exosome—Does Extracellular Vesicle Secretion Constitute an Inflammasome-Dependent Immune Response? *Frontiers in Immunology* 2018; 9: 1–8.
- 271 Bulek K, Zhao J, Liao Y, Rana N, Corridoni D, Antanaviciute A et al. Epithelial-derived gasdermin D mediates nonlytic IL-1 $\beta$  release during experimental colitis. *Journal of Clinical Investigation* 2020; 140: 4218–4234.
- 272 Luyet P, Falguières T, Pons V, Pattnaik AK, Gruenberg J. The ESCRT-I Subunit TSG101 Controls Endosome-to-Cytosol Release of Viral RNA. *Traffic* 2008; 9: 2279–2290.
- 273 Colombo M, Moita C, van Niel G, Kowal J, Vigneron J, Benaroch P et al. Analysis of ESCRT functions in exosome biogenesis, composition and secretion highlights the heterogeneity of extracellular vesicles. *Journal of Cell Science* 2013. doi:10.1242/jcs.128868.

- 274 Scheffer LL, Sreetama SC, Sharma N, Medikayala S, Brown KJ, Defour A et al. Mechanism of Ca<sup>2+</sup>-triggered ESCRT assembly and regulation of cell membrane repair. *Nature Communications* 2014; 5: 5646.
- 275 Fink SL, Cookson BT. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular Microbiology* 2006; 8: 1812–1825.
- 276 Yamin T-T, Ayala JM, Miller DK. Activation of the Native 45-kDa Precursor Form of Interleukin-1-converting Enzyme. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 13273–13282.
- 277 Karmakar M, Katsnelson M, Malak HA, Greene NG, Howell SJ, Hise AG et al. Neutrophil IL-1 $\beta$  Processing Induced by Pneumolysin Is Mediated by the NLRP3/ASC Inflammasome and Caspase-1 Activation and Is Dependent on K<sup>+</sup> Efflux. *The Journal of Immunology* 2015; 194: 1763–1775.
- 278 Stoffels M, Zaal R, Kok N, van der Meer JWM, Dinarello CA, Simon A. ATP-induced IL-1 $\beta$  specific secretion: True under stringent conditions. *Frontiers in Immunology* 2015; 6: 1–6.
- 279 Lage SL, Dominical VM, Wong CS, Sereti I. Evaluation of canonical inflammasome activation in human monocytes by imaging flow cytometry. *Frontiers in Immunology* 2019; 10: 1–13.
- 280 Ainscough JS, Gerberick GF, Kimber I, Dearman RJ. Interleukin-1 $\beta$  Processing Is Dependent on a Calcium-mediated Interaction with Calmodulin. *Journal of Biological Chemistry* 2015; 290: 31151–31161.
- 281 Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* 2010; 464: 1357–1361.
- 282 Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nature Immunology* 2008; 9: 847–856.
- 283 Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature* 2015; 526: 660–665.
- 284 Sborgi L, Rühl S, Mulvihill E, Pipercevic J, Heilig R, Stahlberg H et al. GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death. *The EMBO Journal* 2016; 35: 1766–1778.
- 285 Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. *Nature* 2016; 535: 111–116.
- 286 DiPeso L, Ji DX, Vance RE, Price JV. Cell death and cell lysis are separable events during pyroptosis. *Cell Death Discovery* 2017; 3: 17070.
- 287 Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. *Nature* 2016; 535: 153–158.
- 288 Beaulieu LM, Lin E, Mick E, Koupenova M, Weinberg EO, Kramer CD et al. Interleukin 1 Receptor 1 and Interleukin 1 $\beta$  Regulate Megakaryocyte Maturation, Platelet Activation, and Transcript Profile During Inflammation in Mice and Humans. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2014; 34: 552–564.
- 289 Haas S, Hansson J, Klimmeck D, Loeffler D, Velten L, Uckelmann H et al. Inflammation-Induced Emergency Megakaryopoiesis Driven by Hematopoietic Stem Cell-like Megakaryocyte Progenitors. *Cell stem cell* 2015; 17: 422–34.
- 290 Chavez JS, Rabe JL, Hernandez G, Mills TS, Niño KE, Davizon-Castillo P et al. PU.1 Expression Defines Distinct Functional Activities in the Phenotypic HSC Compartment of a Murine Inflammatory Stress Model. *Cells* 2022; 11. doi:10.3390/cells11040680.

- 291 Rolfes V, Ribeiro LS, Hawwari I, Böttcher L, Rosero N, Maasewerd S et al. Platelets Fuel the Inflammasome Activation of Innate Immune Cells. *Cell Reports* 2020; 31: 107615.
- 292 Pietras EM, Mirantes-Barbeito C, Fong S, Loeffler D, Kovtonyuk LV, Zhang S et al. Chronic interleukin-1 exposure drives haematopoietic stem cells towards precocious myeloid differentiation at the expense of self-renewal. *Nature Cell Biology* 2016; 18: 607–618.
- 293 Li H, Jiang W, Zhang S-R, Li P-C, Li T-J, Jin W et al. The platelet pannexin 1-IL-1 $\beta$  axis orchestrates pancreatic ductal adenocarcinoma invasion and metastasis. *Oncogene* 2023; 42: 1453–1465.
- 294 Nishimura S, Nagasaki M, Kunishima S, Sawaguchi A, Sakata A, Sakaguchi H et al. IL-1 $\alpha$  induces thrombopoiesis through megakaryocyte rupture in response to acute platelet needs. *Journal of Cell Biology* 2015; 209: 453–466.
- 295 Luis TC, Barkas N, Carrelha J, Giustacchini A, Mazzi S, Norfo R et al. Perivascular niche cells sense thrombocytopenia and activate hematopoietic stem cells in an IL-1 dependent manner. *Nature communications* 2023; 14: 6062.
- 296 Kupper TS, Ballard DW, Chua AO, McGuire JS, Flood PM, Horowitz MC et al. Human keratinocytes contain mRNA indistinguishable from monocyte interleukin 1 alpha and beta mRNA. Keratinocyte epidermal cell-derived thymocyte-activating factor is identical to interleukin 1. *The Journal of experimental medicine* 1986; 164: 2095–2100.
- 297 Marcatili A, de l'Ero GC, Galdiero M, Folgore A, Petrillo G. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 and ICAM-1 Expression in Human Keratinocytes Stimulated in Vitro with Escherichia Coli Heat-Shock Proteins. *Microbiology* 1997; 143: 45–53.
- 298 Madrigal-Estebas L, Doherty DG, O'Donoghue DP, Feighery C, O'Farrelly C. Differential expression and upregulation of interleukin-1 $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 by freshly isolated human small intestinal epithelial cells. *Mediators of Inflammation* 2002; 11: 313–319.
- 299 Goldminz D, Kupper TS, McGuire J. Keratinocyte Membrane-Associated Epidermal Cell-Derived Thymocyte-Activating Factor (ETAF). *Journal of Investigative Dermatology* 1987; 88: 97–100.
- 300 Luger TA, Stadler BM, Luger BM, Sztejn MB, Schmidt JA, Hawley-Nelson P et al. Characteristics of an Epidermal Cell Thymocyte-Activating Factor (ETAF) Produced by Human Epidermal Cells and a Human Squamous Cell Carcinoma Cell Line. *Journal of Investigative Dermatology* 1983; 81: 187–193.
- 301 Fettelschoss A, Kistowska M, LeibundGut-Landmann S, Beer H-D, Johansen P, Senti G et al. Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  target IL-1 $\alpha$  for secretion as opposed to surface expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011; 108: 18055–18060.
- 302 van Rietschoten JGI, Verzijlbergen KF, Gringhuis SI, van der Pouw Kraan TCTM, Bayley J-P, Wierenga EA et al. Differentially methylated alleles in a distinct region of the human interleukin-1 $\alpha$  promoter are associated with allele-specific expression of IL-1 $\alpha$  in CD4 $^{+}$  T cells. *Blood* 2006; 108: 2143–9.
- 303 McDowell T, Symons J, Duff G. Human interleukin-1 $\alpha$  gene expression is regulated by Sp1 and a transcriptional repressor. *Cytokine* 2005; 30: 141–153.
- 304 Enya K, Hayashi H, Takii T, Ohoka N, Kanata S, Okamoto T et al. The interaction with Sp1 and reduction in the activity of histone deacetylase 1 are critical for the constitutive gene expression of IL-1 $\alpha$  in human melanoma cells. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 83: 190–199.
- 305 Wierstra I. Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochemical and biophysical research communications* 2008; 372: 1–13.
- 306 Bailly S, Fay M, Israël N, Gougerot-Pocidallo MA. The transcription factor AP-1 binds to the human interleukin 1 alpha promoter. *European cytokine network* 1996; 7: 125–8.

- 307 Zhou D, Yu T, Chen G, Brown SA, Yu Z, Mattson MP et al. Effects of NF- $\kappa$ B1 (p50) targeted gene disruption on ionizing radiation-induced NF- $\kappa$ B activation and TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6 mRNA expression in vivo. *International Journal of Radiation Biology* 2001; 77: 763–772.
- 308 Kimura H, Inukai Y, Takii T, Furutani Y, Shibata Y, Hayashi H et al. MOLECULAR ANALYSIS OF CONSTITUTIVE IL-1 $\alpha$  GENE EXPRESSION IN HUMAN MELANOMA CELLS: AUTHOCRINE STIMULATION THROUGH NF- $\kappa$ B ACTIVATION BY ENDOGENOUS IL-1 $\alpha$ . *Cytokine* 1998; 10: 872–879.
- 309 Chan J, Atianand M, Jiang Z, Carpenter S, Aiello D, Elling R et al. Cutting Edge: A Natural Antisense Transcript, AS-IL1 $\alpha$ , Controls Inducible Transcription of the Proinflammatory Cytokine IL-1 $\alpha$ . *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2015; 195: 1359–63.
- 310 Brody DT, Durum SK. Membrane IL-1: IL-1 alpha precursor binds to the plasma membrane via a lectin-like interaction. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1989; 143: 1183–7.
- 311 Beuscher HU, Nickells MW, Colten HR. The precursor of interleukin-1 alpha is phosphorylated at residue serine 90. *The Journal of biological chemistry* 1988; 263: 4023–8.
- 312 Kobayashi Y, Appella E, Yamada M, Copeland TD, Oppenheim JJ, Matsushima K. Phosphorylation of intracellular precursors of human IL-1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1988; 140: 2279–87.
- 313 Stevenson FT, Bursten SL, Fanton C, Locksley RM, Lovett DH. The 31-kDa precursor of interleukin 1 alpha is myristoylated on specific lysines within the 16-kDa N-terminal propiece. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1993; 90: 7245–9.
- 314 Cohen I, Rider P, Vornov E, Tomas M, Tudor C, Wegner M et al. IL-1 $\alpha$  is a DNA damage sensor linking genotoxic stress signaling to sterile inflammation and innate immunity. *Scientific reports* 2015; 5: 14756.
- 315 Chiu JW, Hanafi ZB, Chew LCY, Mei Y, Liu H. IL-1 $\alpha$  processing, signaling and its role in cancer progression. *Cells* 2021; 10: 1–19.
- 316 Malik A, Kanneganti T. Function and regulation of IL-1 $\alpha$  in inflammatory diseases and cancer. *Immunological Reviews* 2018; 281: 124–137.
- 317 Maeder C, Speer T, Wirth A, Boeckel J-N, Fatima S, Shahzad K et al. Membrane-bound Interleukin-1 $\alpha$  mediates leukocyte adhesion during atherogenesis. *Frontiers in Immunology* 2023; 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1252384.
- 318 Kurt-Jones EA, Beller DI, Mizel SB, Unanue ER. Identification of a membrane-associated interleukin 1 in macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1985; 82: 1204–1208.
- 319 Chan JNE, Humphry M, Kitt L, Krzyzanska D, Filbey KJ, Bennett MR et al. Cell surface IL-1 $\alpha$  trafficking is specifically inhibited by interferon- $\gamma$ , and associates with the membrane via IL-1R2 and GPI anchors. *European Journal of Immunology* 2020; 50: 1663–1675.
- 320 Sedlmayr P, Blaschitz A, Wilders-Truschnig M, Tiran A, Dohr G. Platelets Contain Interleukin-1 Alpha and Beta which are Detectable on the Cell Surface After Activation. *Scandinavian Journal of Immunology* 1995; 42: 209–214.
- 321 Zheng Y, Humphry M, Maguire JJ, Bennett MR, Clarke MCH. Intracellular interleukin-1 receptor 2 binding prevents cleavage and activity of interleukin-1 $\alpha$ , controlling necrosis-induced sterile inflammation. *Immunity* 2013; 38: 285–95.
- 322 Wessendorf JHM, Garfinkel S, Zhan X, Brown S, Maciag T. Identification of a nuclear localization sequence within the structure of the human interleukin-1 alpha precursor. *The Journal of biological chemistry* 1993; 268: 22100–4.

- 323 Luheshi NM, Rothwell NJ, Brough D. The Dynamics and Mechanisms of Interleukin-1 $\alpha$  and  $\beta$  Nuclear Import. *Traffic* 2009; 10: 16–25.
- 324 Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1 $\alpha$  and the inflammatory process. *Nature Immunology* 2016; 17: 906–913.
- 325 Bakouche O, Brown DC, Lachman LB. Subcellular localization of human monocyte interleukin 1: evidence for an inactive precursor molecule and a possible mechanism for IL 1 release. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1987; 138: 4249–55.
- 326 Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Lüthi AU et al. Granzyme B-Dependent Proteolysis Acts as a Switch to Enhance the Proinflammatory Activity of IL-1 $\alpha$ . *Molecular Cell* 2011; 44: 265–278.
- 327 Burzynski LC, Humphry M, Pyriou K, Wiggins KA, Chan JNE, Figg N et al. The Coagulation and Immune Systems Are Directly Linked through the Activation of Interleukin-1 $\alpha$  by Thrombin. *Immunity* 2019; 50: 1033-1042.e6.
- 328 Carruth LM, Demczuk S, Mizel SB. Involvement of a calpain-like protease in the processing of the murine interleukin 1 alpha precursor. *The Journal of biological chemistry* 1991; 266: 12162–7.
- 329 Kobayashi Y, Yamamoto K, Saido T, Kawasaki H, Oppenheim JJ, Matsushima K. Identification of calcium-activated neutral protease as a processing enzyme of human interleukin 1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1990; 87: 5548–5552.
- 330 Clancy DM, Sullivan GP, Moran HBT, Henry CM, Reeves EP, McElvaney NG et al. Extracellular Neutrophil Proteases Are Efficient Regulators of IL-1, IL-33, and IL-36 Cytokine Activity but Poor Effectors of Microbial Killing. *Cell Reports* 2018; 22: 2937–2950.
- 331 Wiggins KA, Parry AJ, Cassidy LD, Humphry M, Webster SJ, Goodall JC et al. IL-1 $\alpha$  cleavage by inflammatory caspases of the noncanonical inflammasome controls the senescence-associated secretory phenotype. *Aging Cell* 2019; 18. doi:10.1111/ace1.12946.
- 332 Kim B, Lee Y, Kim E, Kwak A, Ryoo S, Bae SH et al. The Interleukin-1 $\alpha$  Precursor is Biologically Active and is Likely a Key Alarmin in the IL-1 Family of Cytokines. *Frontiers in Immunology* 2013; 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00391.
- 333 Kawaguchi Y, Nishimagi E, Tochimoto A, Kawamoto M, Katsumata Y, Soejima M et al. Intracellular IL-1 $\alpha$ -binding proteins contribute to biological functions of endogenous IL-1 $\alpha$  in systemic sclerosis fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 103: 14501–14506.
- 334 Yin H, Morioka H, Towle CA, Vidal M, Watanabe T, Weissbach L. Evidence that HAX-1 is an interleukin-1 alpha N-terminal binding protein. *Cytokine* 2001; 15: 122–37.
- 335 Buryškova M, Pospisek M, Grothey A, Simmet T, Buryšek L. Intracellular Interleukin-1 $\alpha$  Functionally Interacts with Histone Acetyltransferase Complexes. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 4017–4026.
- 336 Zamostna B, Novak J, Vopalensky V, Masek T, Buryšek L, Pospisek M. N-Terminal Domain of Nuclear IL-1 $\alpha$  Shows Structural Similarity to the C-Terminal Domain of Snf1 and Binds to the HAT/Core Module of the SAGA Complex. *PLoS ONE* 2012; 7: e41801.
- 337 Werman A, Werman-Venkert R, White R, Lee J-K, Werman B, Krelin Y et al. The precursor form of IL-1 $\alpha$  is an intracrine proinflammatory activator of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101: 2434–9.
- 338 Zhang Y, Yu X, Lin D, Lei L, Hu B, Cao F et al. Propiece IL-1 $\alpha$  facilitates the growth of acute T-lymphocytic leukemia cells through the activation of NF- $\kappa$ B and SP1. *Oncotarget* 2017; 8: 15677–15688.

- 339 Lamacchia C, Rodriguez E, Palmer G, Gabay C. Endogenous IL-1 $\alpha$  is a chromatin-associated protein in mouse macrophages. *Cytokine* 2013; 63: 135–144.
- 340 Tsuchiya K, Hosojima S, Hara H, Kushiyama H, Mahib MR, Kinoshita T et al. Gasdermin D mediates the maturation and release of IL-1 $\alpha$  downstream of inflammasomes. *Cell Reports* 2021; 34: 108887.
- 341 England H, Summersgill HR, Edey ME, Rothwell NJ, Brough D. Release of Interleukin-1 $\alpha$  or Interleukin-1 $\beta$  Depends on Mechanism of Cell Death. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289: 15942–15950.
- 342 Mandinova A, Soldi R, Graziani I, Bagalá C, Bellum S, Landriscina M et al. S100A13 mediates the copper-dependent stress-induced release of IL-1 $\alpha$  from both human U937 and murine NIH 3T3 cells. *Journal of Cell Science* 2003; 116: 2687–2696.
- 343 Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M et al. Production of Mice Deficient in Genes for Interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , and IL-1 Receptor Antagonist Shows that IL-1 $\beta$  Is Crucial in Turpentine-induced Fever Development and Glucocorticoid Secretion. *The Journal of Experimental Medicine* 1998; 187: 1463–1475.
- 344 Brough D, Le Feuvre RA, Wheeler RD, Solovyova N, Hilfiker S, Rothwell NJ et al. Ca<sup>2+</sup> Stores and Ca<sup>2+</sup> Entry Differentially Contribute to the Release of IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  from Murine Macrophages. *The Journal of Immunology* 2003; 170: 3029–3036.
- 345 Pörn-Ares MI, Samali A, Orrenius S. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death & Differentiation* 1998; 5: 1028–1033.
- 346 Watanabe N, Kobayashi Y. Selective release of a processed form of interleukin 1 $\alpha$ . *Cytokine* 1994; 6: 597–601.
- 347 Pedrera L, Espiritu RA, Ros U, Weber J, Schmitt A, Stroh J et al. Ferroptotic pores induce Ca<sup>2+</sup> fluxes and ESCRT-III activation to modulate cell death kinetics. *Cell Death & Differentiation* 2021; 28: 1644–1657.
- 348 Sauder DN, Monick MM, Hunninghake GW. Epidermal Cell-Derived Thymocyte Activating Factor (ETAf) is a Potent T-Cell Chemoattractant. *Journal of Investigative Dermatology* 1985; 85: 431–433.
- 349 Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E et al. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  Recruit Different Myeloid Cells and Promote Different Stages of Sterile Inflammation. *The Journal of Immunology* 2011; 187: 4835–4843.
- 350 Benjamin WR, Tare NS, Hayes TJ, Becker JM, Anderson TD. Regulation of hemopoiesis in myelosuppressed mice by human recombinant IL-1 alpha. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1989; 142: 792–9.
- 351** Benjamin JT, Moore DJ, Bennett C, van der Meer R, Royce A, Loveland R et al. Cutting Edge: IL-1 $\alpha$  and Not IL-1 $\beta$  Drives IL-1R1–Dependent Neonatal Murine Sepsis Lethality. *The Journal of Immunology* 2018; 201: 2873–2878.
- 352 Gahring L, Baltzt M, Pepyst MB, Daynes R. Effect of ultraviolet radiation on production of epidermal cell thymocyte-activating factor/interleukin 1 in vivo and in vitro (acute-phase reactant/desensitization). 1984.
- 353 Ansel JC, Luger TA, Green I. The Effect of In Vitro and In Vivo UV Irradiation on the Production of ETAf Activity by Human and Murine Keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology* 1983; 81: 519–523.
- 354 León X, Bothe C, García J, Parreño M, Alcolea S, Quer M et al. Expression of IL-1 $\alpha$  correlates with distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2015; 6: 37398–37409.

- 355 Xu D, Matsuo Y, Ma J, Koide S, Ochi N, Yasuda A et al. Cancer cell-derived IL-1 $\alpha$  promotes HGF secretion by stromal cells and enhances metastatic potential in pancreatic cancer cells. *Journal of Surgical Oncology* 2010; 102: 469–477.
- 356 Tomimatsu S, Ichikura T, Mochizuki H. Significant correlation between expression of interleukin-1 $\alpha$  and liver metastasis in gastric carcinoma. *Cancer* 2001; 91: 1272–6.
- 357 Coleman KM, Gudjonsson JE, Stecher M. Open-Label Trial of MABp1, a True Human Monoclonal Antibody Targeting Interleukin 1 $\alpha$ , for the Treatment of Psoriasis. *JAMA dermatology* 2015; 151: 555–6.
- 358 Hong DS, Hui D, Bruera E, Janku F, Naing A, Falchook GS et al. MABp1, a first-in-class true human antibody targeting interleukin-1 $\alpha$  in refractory cancers: an open-label, phase 1 dose-escalation and expansion study. *The Lancet Oncology* 2014; 15: 656–66.
- 359 Solomonidi N, Vlachoyiannopoulos PG, Pappa M, Liantinioti G, Ktena S, Theotikos E et al. A randomized clinical trial of bermekimab treatment for clinical improvement of systemic sclerosis. *iScience* 2023; 26: 107670.
- 360 Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 2002; 110: 673–687.
- 361 Larjava H, Peltonen J, Akiyama SK, Yamada SS, Gralnick HR, Uitto J et al. Novel function for beta 1 integrins in keratinocyte cell-cell interactions. *The Journal of cell biology* 1990; 110: 803–815.
- 362 Zohlhöfer D, Brand K, Schipek K, Pogatsa-Murray G, Schömig A, Neumann FJ. Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1 $\beta$ -dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 2000; 20: 353–359.
- 363 Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001; 2: 793–805.
- 364 Kechagia JZ, Ivaska J, Roca-Cusachs P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2019; 20: 457–473.
- 365 Strell C, Entschladen F. Extravasation of leukocytes in comparison to tumor cells. *Cell Communication and Signaling* 2008; 6: 10.
- 366 Chen MB, Lamar JM, Li R, Hynes RO, Kamm RD. Elucidation of the Roles of Tumor Integrin  $\beta$ 1 in the Extravasation Stage of the Metastasis Cascade. *Cancer Research* 2016; 76: 2513–2524.
- 367 Argraves WS, Pytela R, Suzuki S, Millán JL, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. cDNA sequences from the alpha subunit of the fibronectin receptor predict a transmembrane domain and a short cytoplasmic peptide. *Journal of Biological Chemistry* 1986; 261: 12922–12924.
- 368 Luo B-H, Carman CV, Springer TA. Structural Basis of Integrin Regulation and Signaling. *Annual Review of Immunology* 2007; 25: 619–647.
- 369 Whittaker CA, Hynes RO. Distribution and evolution of von Willebrand/integrin A domains: widely dispersed domains with roles in cell adhesion and elsewhere. *Molecular biology of the cell* 2002; 13: 3369–87.
- 370 Wang S, Wu C, Zhang Y, Zhong Q, Sun H, Cao W et al. Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 switches its ligand specificity via distinct conformer-specific activation. *Journal of Cell Biology* 2018; 217: 2799–2812.
- 371 Humphries JD, Byron A, Humphries MJ. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science* 2006; 119: 3901–3903.

- 372 Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *Journal of Cell Biology* 1993; 120: 1031–1043.
- 373 Podolnikova NP, Podolnikov AV, Haas TA, Lishko VK, Ugarova TP. Ligand Recognition Specificity of Leukocyte Integrin  $\alpha$  M  $\beta$  2 (Mac-1, CD11b/CD18) and Its Functional Consequences. *Biochemistry* 2015; 54: 1408–1420.
- 374 Calderwood DA, Fujioka Y, de Pereda JM, García-Alvarez B, Nakamoto T, Margolis B et al. Integrin  $\beta$  cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: A structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100: 2272–2277.
- 375 Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Embryonic mesodermal defects in  $\alpha$ 5 integrin-deficient mice. *Development* 1993; 119: 1093–1105.
- 376 Yang JT, Rayburn H, Hynes RO. Cell adhesion events mediated by  $\alpha$ 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* 1995; 121: 549–560.
- 377 Kreidberg JA, Donovan MJ, Goldstein SL, Rennke H, Shepherd K, Jones RC et al. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 1996; 122: 3537–3547.
- 378 Georges-Labouesse E, Messaddeq N, Yehia G, Cadalbert L, Dierich A, Le Meur M. Absence of integrin  $\alpha$ 6 leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nature Genetics* 1996; 13: 370–373.
- 379 Molè MA, Weberling A, Fässler R, Campbell A, Fishel S, Zernicka-Goetz M. Integrin  $\beta$ 1 coordinates survival and morphogenesis of the embryonic lineage upon implantation and pluripotency transition. *Cell Reports* 2021; 34: 108834.
- 380 De Arcangelis A. Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends in Genetics* 2000; 16: 389–395.
- 381 Petzold T, Ruppert R, Pandey D, Barocke V, Meyer H, Lorenz M et al.  $\beta$ 1 integrin-mediated signals are required for platelet granule secretion and hemostasis in mouse. *Blood* 2013; 122: 2723–2731.
- 382 Tanjore H, Zeisberg EM, Gerami-Naini B, Kalluri R.  $\beta$ 1 integrin expression on endothelial cells is required for angiogenesis but not for vasculogenesis. *Developmental Dynamics* 2008; 237: 75–82.
- 383 Soloviev DA, Hazen SL, Szpak D, Bledzka KM, Ballantyne CM, Plow EF et al. Dual Role of the Leukocyte Integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 in Angiogenesis. *The Journal of Immunology* 2014; 193: 4712–4721.
- 384 Wolf D, Anto-Michel N, Blankenbach H, Wiedemann A, Buscher K, Hohmann JD et al. A ligand-specific blockade of the integrin Mac-1 selectively targets pathologic inflammation while maintaining protective host-defense. *Nature Communications* 2018; 9: 525.
- 385 Altorki T, Muller W, Brass A, Cruickshank S. The role of  $\beta$ 2 integrin in dendritic cell migration during infection. *BMC Immunology* 2021; 22: 2.
- 386 Nourshargh S, Alon R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* 2014; 41: 694–707.
- 387 Herter J, Zarbock A. Integrin Regulation during Leukocyte Recruitment. *The Journal of Immunology* 2013; 190: 4451–4457.
- 388 Blandin A-F, Renner G, Lehmann M, Lelong-Rebel I, Martin S, Dontenwill M.  $\beta$ 1 Integrins as Therapeutic Targets to Disrupt Hallmarks of Cancer. *Frontiers in Pharmacology* 2015; 6. doi:10.3389/fphar.2015.00279.

- 389 Hamidi H, Ivaska J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. *Nature Reviews Cancer* 2018; 18: 533–548.
- 390 Yao ES, Zhang H, Chen Y-Y, Lee B, Chew K, Moore D et al. Increased  $\beta 1$  Integrin Is Associated with Decreased Survival in Invasive Breast Cancer. *Cancer Research* 2007; 67: 659–664.
- 391 Benedicto A, Marquez J, Herrero A, Olaso E, Kolaczowska E, Arteta B. Decreased expression of the  $\beta 2$  integrin on tumor cells is associated with a reduction in liver metastasis of colorectal cancer in mice. *BMC Cancer* 2017; 17: 827.
- 392 Bui T, Gu Y, Ancot F, Sanguin-Gendreau V, Zuo D, Muller WJ. Emergence of  $\beta 1$  integrin-deficient breast tumours from dormancy involves both inactivation of p53 and generation of a permissive tumour microenvironment. *Oncogene* 2022; 41: 527–537.
- 393 von Andrian UH, Engelhardt B.  $\alpha 4$  Integrins as Therapeutic Targets in Autoimmune Disease. *New England Journal of Medicine* 2003; 348: 68–72.
- 394 Wilder RL. Integrin alpha V beta 3 as a target for treatment of rheumatoid arthritis and related rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2002; 61: 96ii–9699.
- 395 Asano T, Iwasaki N, Kon S, Kanayama M, Morimoto J, Minami A et al.  $\alpha 1$  integrin acts as a critical intrinsic regulator of human rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 2014; 53: 415–424.
- 396 Takeuchi T, Amano K, Sekine H, Koide J, Abe T. Upregulated expression and function of integrin adhesive receptors in systemic lupus erythematosus patients with vasculitis. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 92: 3008–3016.
- 397 Keir ME, Fuh F, Ichikawa R, Acres M, Hackney JA, Hulme G et al. Regulation and Role of  $\alpha E$  Integrin and Gut Homing Integrins in Migration and Retention of Intestinal Lymphocytes during Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Immunology* 2021; 207: 2245–2254.
- 398 Elovaara I, Ukkonen M, Leppäkynnäs M, Lehtimäki T, Luomala M, Peltola J et al. Adhesion Molecules in Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology* 2000; 57: 546.
- 399 Tubridy N, Behan PO, Capildeo R, Chaudhuri A, Forbes R, Hawkins CP et al. The effect of anti- $\alpha 4$  integrin antibody on brain lesion activity in MS. *Neurology* 1999; 53: 466–466.
- 400 Kim C, Ye F, Ginsberg MH. Regulation of integrin activation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 2011; 27: 321–345.
- 401 Takagi J, Petre BM, Walz T, Springer TA. Global conformational arrangements in integrin extracellular domains in outside-in and inside-out signaling. *Cell* 2002; 110: 599–611.
- 402 Nishida N, Xie C, Shimaoka M, Cheng Y, Walz T, Springer TA. Activation of Leukocyte  $\beta 2$  Integrins by Conversion from Bent to Extended Conformations. *Immunity* 2006; 25: 583–594.
- 403 Su Y, Xia W, Li J, Walz T, Humphries MJ, Vestweber D et al. Relating conformation to function in integrin  $\alpha 5 \beta 1$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016; 113: E3872–E3881.
- 404 Müller MA, Brunie L, Bächer A-S, Kessler H, Gottschalk K-E, Reuning U. Cytoplasmic salt bridge formation in integrin  $\alpha v \beta 3$  stabilizes its inactive state affecting integrin-mediated cell biological effects. *Cellular Signalling* 2014; 26: 2493–2503.
- 405 Pagani G, Gohlke H. On the contributing role of the transmembrane domain for subunit-specific sensitivity of integrin activation. *Scientific Reports* 2018; 8: 5733.
- 406 Salmela M, Jokinen J, Tiitta S, Rappu P, Cheng RH, Heino J. Integrin  $\alpha 2 \beta 1$  in nonactivated conformation can induce focal adhesion kinase signaling. *Scientific Reports* 2017; 7: 3414.

- 407 Kliche S, Breitling D, Togni M, Pusch R, Heuer K, Wang X et al. The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. *Molecular and cellular biology* 2006; 26: 7130–44.
- 408 van Kooyk Y, van de Wiel-van Kemenade P, Weder P, Kuijpers TW, Figdor CG. Enhancement of LFA-1-mediated cell adhesion by triggering through CD2 or CD3 on T lymphocytes. *Nature* 1989; 342: 811–813.
- 409 Spaargaren M, Beuling EA, Rurup ML, Meijer HP, Klok MD, Middendorp S et al. The B Cell Antigen Receptor Controls Integrin Activity through Btk and PLC $\gamma$ 2. *The Journal of Experimental Medicine* 2003; 198: 1539–1550.
- 410 Montresor A, Toffali L, Rigo A, Ferrarini I, Vinante F, Laudanna C. CXCR4- and BCR-triggered integrin activation in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells depends on JAK2-activated Bruton's tyrosine kinase. *Oncotarget* 2018; 9: 35123–35140.
- 411 Lévesque JP, Leavesley DI, Niutta S, Vadas M, Simmons PJ. Cytokines increase human hemopoietic cell adhesiveness by activation of very late antigen (VLA)-4 and VLA-5 integrins. *The Journal of experimental medicine* 1995; 181: 1805–1815.
- 412 Xiao T, Takagi J, Collier BS, Wang J-H, Springer TA. Structural basis for allostery in integrins and binding to fibrinogen-mimetic therapeutics. *Nature* 2004; 432: 59–67.
- 413 Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biology* 2007; 8: 215.
- 414 Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Influence of stereochemistry of the sequence Arg-Gly-Asp-Xaa on binding specificity in cell adhesion. *Journal of Biological Chemistry* 1987; 262: 17294–17298.
- 415 Viney JL, Jones S, Chiu HH, Lagrimas B, Renz ME, Presta LG et al. Mucosal addressin cell adhesion molecule-1: a structural and functional analysis demarcates the integrin binding motif. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1996; 157: 2488–97.
- 416 Clements JM, Newham P, Shepherd M, Gilbert R, Dudgeon TJ, Needham LA et al. Identification of a key integrin-binding sequence in VCAM-1 homologous to the LDV active site in fibronectin. *Journal of Cell Science* 1994; 107: 2127–2135.
- 417 Springer TA, Dustin ML. Integrin inside-out signaling and the immunological synapse. *Current Opinion in Cell Biology* 2012; 24: 107–115.
- 418 Wang X, Rodda LB, Bannard O, Cyster JG. Integrin-Mediated Interactions between B Cells and Follicular Dendritic Cells Influence Germinal Center B Cell Fitness. *The Journal of Immunology* 2014; 192: 4601–4609.
- 419 Bouti P, Webbers SDS, Fagerholm SC, Alon R, Moser M, Matlung HL et al.  $\beta$ 2 Integrin Signaling Cascade in Neutrophils: More Than a Single Function. *Frontiers in Immunology* 2021; 11: 1–20.
- 420 Jin H, Su J, Garmy-Susini B, Kleeman J, Varner J. Integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 promotes monocyte trafficking and angiogenesis in tumors. *Cancer Research* 2006; 66: 2146–2152.
- 421 Gupta N, Edelmann B, Schnoeder TM, Saalfeld FC, Wolleschak D, Kliche S et al. JAK2-V617F activates  $\beta$ 1-integrin-mediated adhesion of granulocytes to vascular cell adhesion molecule 1. *Leukemia* 2017; 31: 1223–1226.
- 422 Edelmann B, Gupta N, Schnoeder TM, Oelschlegel AM, Shahzad K, Goldschmidt J et al. JAK2-V617F promotes venous thrombosis through  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 integrin activation. *Journal of Clinical Investigation* 2018; 128: 4359–4371.
- 423 Medeiros RB, Dickey DM, Chung H, Quale AC, Nagarajan LR, Billadeau DD et al. Protein kinase D1 and the beta 1 integrin cytoplasmic domain control beta 1 integrin function via regulation of Rap1 activation. *Immunity* 2005; 23: 213–26.

- 424 Katagiri K, Shimonaka M, Kinashi T. Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *The Journal of biological chemistry* 2004; 279: 11875–81.
- 425 Crittenden JR, Bergmeier W, Zhang Y, Piffath CL, Liang Y, Wagner DD et al. CalDAG-GEFI integrates signaling for platelet aggregation and thrombus formation. *Nature Medicine* 2004; 10: 982–986.
- 426 Schorr W, Swandulla D, Zeilhofer HU. Mechanisms of IL-8-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in human neutrophil granulocytes. *European Journal of Immunology* 1999; 29: 897–904.
- 427 Streb H, Irvine RF, Berridge MJ, Schulz I. Release of Ca<sup>2+</sup> from a nonmitochondrial intracellular store in pancreatic acinar cells by inositol-1,4,5-trisphosphate. *Nature* 1983; 306: 67–69.
- 428 Falkenburger BH, Dickson EJ, Hille B. Quantitative properties and receptor reserve of the DAG and PKC branch of Gq-coupled receptor signaling. *Journal of General Physiology* 2013; 141: 537–555.
- 429 Kawasaki H, Springett GM, Toki S, Canales JJ, Harlan P, Blumenstiel JP et al. A Rap guanine nucleotide exchange factor enriched highly in the basal ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95: 13278–83.
- 430 Eto K, Murphy R, Kerrigan SW, Bertoni A, Stuhlmann H, Nakano T et al. Megakaryocytes derived from embryonic stem cells implicate CalDAG-GEFI in integrin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2002; 99: 12819–12824.
- 431 Ghandour H, Cullere X, Alvarez A, Luscinskas FW, Mayadas TN. Essential role for Rap1 GTPase and its guanine exchange factor CalDAG-GEFI in LFA-1 but not VLA-4 integrin-mediated human T-cell adhesion. *Blood* 2007; 110: 3682–3690.
- 432 Bergmeier W, Goerge T, Wang H-W, Crittenden JR, Baldwin ACW, Cifuni SM et al. Mice lacking the signaling molecule CalDAG-GEFI represent a model for leukocyte adhesion deficiency type III. *The Journal of clinical investigation* 2007; 117: 1699–707.
- 433 Shimonaka M, Katagiri K, Nakayama T, Fujita N, Tsuruo T, Yoshie O et al. Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *Journal of Cell Biology* 2003; 161: 417–427.
- 434 Kinashi T. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nature Reviews Immunology* 2005; 5: 546–559.
- 435 Duchniewicz M, Zemojtel T, Kolanczyk M, Grossmann S, Scheele JS, Zwartkuis FJT. Rap1A-Deficient T and B Cells Show Impaired Integrin-Mediated Cell Adhesion. *Molecular and Cellular Biology* 2006; 26: 643–653.
- 436 Chrzanowska-Wodnicka M, Smyth SS, Schoenwaelder SM, Fischer TH, White GC. Rap1b is required for normal platelet function and hemostasis in mice. *Journal of Clinical Investigation* 2005; 115: 680–687.
- 437 Katagiri K, Kinashi T. Rap1 and integrin inside-out signaling. *Methods in Molecular Biology* 2011; 757: 279–296.
- 438 Schmid MC, Franco I, Kang SW, Hirsch E, Quilliam LA, Varner JA. PI3-Kinase  $\gamma$  Promotes Rap1a-Mediated Activation of Myeloid Cell Integrin  $\alpha 4\beta 1$ , Leading to Tumor Inflammation and Growth. *PLoS ONE* 2013; 8: e60226.
- 439 Kortholt A, Bolourani P, Rehmann H, Keizer-Gunnink I, Weeks G, Wittinghofer A et al. A Rap/Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway Controls Pseudopod Formation. *Molecular Biology of the Cell* 2010; 21: 936–945.

- 440 Watanabe M, Fiji HDG, Guo L, Chan L, Kinderman SS, Slamon DJ et al. Inhibitors of Protein Geranylgeranyltransferase I and Rab Geranylgeranyltransferase Identified from a Library of Allenoate-derived Compounds. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 9571–9579.
- 441 Hanna CC, Kriegesmann J, Dowman LJ, Becker CFW, Payne RJ. Chemische Synthese und Semisynthese von lipidierten Proteinen. *Angewandte Chemie* 2022; 134. doi:10.1002/ange.202111266.
- 442 Bromberger T, Klapproth S, Rohwedder I, Zhu L, Mittmann L, Reichel CA et al. Direct Rap1/Talin1 interaction regulates platelet and neutrophil integrin activity in mice. *Blood* 2018; 132: 2754–2762.
- 443 Su W, Wynne J, Pinheiro EM, Strazza M, Mor A, Montenont E et al. Rap1 and its effector RIAM are required for lymphocyte trafficking. *Blood* 2015; 126: 2695–2703.
- 444 Lee HS, Lim CJ, Puzon-McLaughlin W, Shattil SJ, Ginsberg MH. RIAM activates integrins by linking talin to Ras GTPase membrane-targeting sequences. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 5119–5122.
- 445 Yang J, Zhu L, Zhang H, Hirbawi J, Fukuda K, Dwivedi P et al. Conformational activation of talin by RIAM triggers integrin-mediated cell adhesion. *Nature communications* 2014; 5: 5880.
- 446 Han J, Lim CJ, Watanabe N, Soriani A, Ratnikov B, Calderwood DA et al. Reconstructing and Deconstructing Agonist-Induced Activation of Integrin  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$ . *Current Biology* 2006; 16: 1796–1806.
- 447 Yan B, Calderwood DA, Yaspan B, Ginsberg MH. Calpain cleavage promotes talin binding to the beta 3 integrin cytoplasmic domain. *The Journal of biological chemistry* 2001; 276: 28164–70.
- 448 Ye X, McLean MA, Sligar SG. Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Modulates the Affinity of Talin-1 for Phospholipid Bilayers and Activates Its Autoinhibited Form. *Biochemistry* 2016; 55: 5038–5048.
- 449 Calderwood DA, Yan B, de Pereda JM, Alvarez BG, Fujioka Y, Liddington RC et al. The phosphotyrosine binding-like domain of talin activates integrins. *The Journal of biological chemistry* 2002; 277: 21749–58.
- 450 Patil S, Jedsadayanmata A, Wencel-Drake JD, Wang W, Knezevic I, Lam SC-T. Identification of a Talin-binding Site in the Integrin  $\beta\text{3}$  Subunit Distinct from the NPLY Regulatory Motif of Post-ligand Binding Functions. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 28575–28583.
- 451 Calderwood DA, Zent R, Grant R, Rees DJG, Hynes RO, Ginsberg MH. The talin head domain binds to integrin  $\beta$  subunit cytoplasmic tails and regulates integrin activation. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 28071–28074.
- 452 Wegener KL, Partridge AW, Han J, Pickford AR, Liddington RC, Ginsberg MH et al. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 2007; 128: 171–82.
- 453 Beglova N, Blacklow SC, Takagi J, Springer TA. Cysteine-rich module structure reveals a fulcrum for integrin rearrangement upon activation. *Nature Structural Biology* 2002; 9: 282–287.
- 454 Abram CL, Lowell CA. The Ins and Outs of Leukocyte Integrin Signaling. *Annual Review of Immunology* 2009; 27: 339–362.
- 455 Olberding JE, Thouless MD, Arruda EM, Garikipati K. The Non-Equilibrium Thermodynamics and Kinetics of Focal Adhesion Dynamics. *PLoS ONE* 2010; 5: e12043.
- 456 Goldmann WH. Kinetic Determination of Focal Adhesion Protein Formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000; 271: 553–557.
- 457 Berginski ME, Vitriol EA, Hahn KM, Gomez SM. High-Resolution Quantification of Focal Adhesion Spatiotemporal Dynamics in Living Cells. *PLoS ONE* 2011; 6: e22025.

- 458 Schneck JL, Briand J, Chen S, Lehr R, McDevitt P, Zhao B et al. Kinetic Mechanism and Rate-Limiting Steps of Focal Adhesion Kinase-1. *Biochemistry* 2010; 49: 7151–7163.
- 459 Hamadi A, Bouali M, Dontenwill M, Stoeckel H, Takeda K, Rondé P. Regulation of focal adhesion dynamics and disassembly by phosphorylation of FAK at tyrosine 397. *Journal of Cell Science* 2005; 118: 4415–4425.
- 460 Xiang X, Lee C, Li T, Chen W, Lou J, Zhu C. Structural Basis and Kinetics of Force-Induced Conformational Changes of an  $\alpha$ A Domain-Containing Integrin. *PLoS ONE* 2011; 6: e27946.
- 461 Blystone SD. Kinetic Regulation of  $\beta$ 3 Integrin Tyrosine Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 2002; 277: 46886–46890.
- 462 Goult BT, Bouaouina M, Harburger DS, Bate N, Patel B, Anthis NJ et al. The Structure of the N-Terminus of Kindlin-1: A Domain Important for  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Integrin Activation. *Journal of Molecular Biology* 2009; 394: 944–956.
- 463 Montanez E, Ussar S, Schifferer M, Bösl M, Zent R, Moser M et al. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes & Development* 2008; 22: 1325–1330.
- 464 Li H, Deng Y, Sun K, Yang H, Liu J, Wang M et al. Structural basis of kindlin-mediated integrin recognition and activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017; 114: 9349–9354.
- 465 Harburger DS, Bouaouina M, Calderwood DA. Kindlin-1 and -2 Directly Bind the C-terminal Region of  $\beta$  Integrin Cytoplasmic Tails and Exert Integrin-specific Activation Effects. *Journal of Biological Chemistry* 2009; 284: 11485–11497.
- 466 Moser M, Nieswandt B, Ussar S, Pozgajova M, Fässler R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nature Medicine* 2008; 14: 325–330.
- 467 Aretz J, Aziz M, Strohmeyer N, Sattler M, Fässler R. Talin and kindlin use integrin tail allostery and direct binding to activate integrins. *Nature Structural & Molecular Biology* 2023; 30: 1913–1924.
- 468 Haydari Z, Shams H, Jahed Z, Mofrad MRK. Kindlin Assists Talin to Promote Integrin Activation. *Biophysical Journal* 2020; 118: 1977–1991.
- 469 Bodescu MA, Aretz J, Grison M, Rief M, Fässler R. Kindlin stabilizes the talin·integrin bond under mechanical load by generating an ideal bond. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2023; 120. doi:10.1073/pnas.2218116120.
- 470 Kolanus W, Nagel W, Schiller B, Zeitlmann L, Godar S, Stockinger H et al.  $\alpha$ L $\beta$ 2 Integrin/LFA-1 Binding to ICAM-1 Induced by Cytohesin-1, a Cytoplasmic Regulatory Molecule. *Cell* 1996; 86: 233–242.
- 471 Geiger C, Nagel W, Boehm T, van Kooyk Y, Figdor CG, Kremmer E et al. Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *The EMBO journal* 2000; 19: 2525–36.
- 472 Perez OD, Mitchell D, Jager GC, South S, Murriel C, McBride J et al. Leukocyte functional antigen 1 lowers T cell activation thresholds and signaling through cytohesin-1 and Jun-activating binding protein 1. *Nature Immunology* 2003; 4: 1083–1092.
- 473 Berridge MJ. Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochemical Journal* 1984; 220: 345–360.
- 474 Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989; 341: 197–205.

- 475 Wolf A, Eulenfeld R, Gäbler K, Rolvering C, Haan S, Behrmann I et al. JAK2-V617F-induced MAPK activity is regulated by PI3K and acts synergistically with PI3K on the proliferation of JAK2-V617F-positive cells. *JAK-STAT* 2013; 2: e24574.
- 476 Li Y, Wu J, Xu L, Wu Q, Wan Z, Li L et al. Regulation of Leukocyte Recruitment to the Spleen and Peritoneal Cavity during Pristane-Induced Inflammation. *Journal of Immunology Research* 2017; 2017: 1–12.
- 477 Li J, Springer TA. Integrin extension enables ultrasensitive regulation by cytoskeletal force. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2017; 114: 4685–4690.
- 478 Li J, Springer TA. Energy landscape differences among integrins establish the framework for understanding activation. *Journal of Cell Biology* 2018; 217: 397–412.
- 479 Sun Z, Costell M, Fässler R. Integrin activation by talin, kindlin and mechanical forces. *Nature Cell Biology* 2019; 21: 25–31.
- 480 Tadokoro S, Shattil SJ, Eto K, Tai V, Liddington RC, de Pereda JM et al. Talin Binding to Integrin  $\beta$  Tails: A Final Common Step in Integrin Activation. *Science* 2003; 302: 103–106.
- 481 Theodosiou M, Widmaier M, Böttcher RT, Rognoni E, Veelders M, Bharadwaj M et al. Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *eLife* 2016; 5. doi:10.7554/eLife.10130.
- 482 McLeod SJ, Shum AJ, Lee RL, Takei F, Gold MR. The Rap GTPases Regulate Integrin-mediated Adhesion, Cell Spreading, Actin Polymerization, and Pyk2 Tyrosine Phosphorylation in B Lymphocytes. *Journal of Biological Chemistry* 2004; 279: 12009–12019.
- 483 Caron E, Self AJ, Hall A. The GTPase Rap1 controls functional activation of macrophage integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2 by LPS and other inflammatory mediators. *Current Biology* 2000; 10: 974–978.
- 484 Chen Y, Li Z, Kong F, Ju LA, Zhu C. Force-Regulated Spontaneous Conformational Changes of Integrins  $\alpha$ 5  $\beta$ 1 and  $\alpha$ V  $\beta$ 3. *ACS Nano* 2024; 18: 299–313.
- 485 Morikis VA, Masadeh E, Simon SI. Tensile force transmitted through LFA-1 bonds mechanoregulate neutrophil inflammatory response. *Journal of Leukocyte Biology* 2020; 108: 1815–1828.
- 486 Cheng B, Wan W, Huang G, Li Y, Genin GM, Mofrad MRK et al. Nanoscale integrin cluster dynamics controls cellular mechanosensing via FAKY397 phosphorylation. *Science Advances* 2020; 6. doi:10.1126/sciadv.aax1909.
- 487 Galbraith CG, Yamada KM, Sheetz MP. The relationship between force and focal complex development. *The Journal of Cell Biology* 2002; 159: 695–705.
- 488 Zhu J, Luo B-H, Xiao T, Zhang C, Nishida N, Springer TA. Structure of a Complete Integrin Ectodomain in a Physiologic Resting State and Activation and Deactivation by Applied Forces. *Molecular Cell* 2008; 32: 849–861.
- 489 Horton ER, Byron A, Askari JA, Ng DHJ, Millon-Frémillon A, Robertson J et al. Definition of a consensus integrin adhesome and its dynamics during adhesion complex assembly and disassembly. *Nature Cell Biology* 2015; 17: 1577–1587.
- 490 Zaidel-Bar R, Itzkovitz S, Ma'ayan A, Iyengar R, Geiger B. Functional atlas of the integrin adhesome. *Nature Cell Biology* 2007; 9: 858–867.
- 491 Zhou J, Aponte-Santamaría C, Sturm S, Bullerjahn JT, Bronowska A, Gräter F. Mechanism of Focal Adhesion Kinase Mechanosensing. *PLOS Computational Biology* 2015; 11: e1004593.
- 492 Yao M, Goult BT, Klapholz B, Hu X, Toseland CP, Guo Y et al. The mechanical response of talin. *Nature Communications* 2016; 7. doi:10.1038/ncomms11966.

- 493 Goult BT, Yan J, Schwartz MA. Talin as a mechanosensitive signaling hub. *Journal of Cell Biology* 2018; 217: 3776–3784.
- 494 Gough RE, Jones MC, Zacharchenko T, Le S, Yu M, Jacquemet G et al. Talin mechanosensitivity is modulated by a direct interaction with cyclin-dependent kinase-1. *Journal of Biological Chemistry* 2021; 297: 100837.
- 495 Garakani K, Shams H, Mofrad MRK. Mechanosensitive Conformation of Vinculin Regulates Its Binding to MAPK1. *Biophysical Journal* 2017; 112: 1885–1893.
- 496 Chakraborty S, Banerjee S, Raina M, Haldar S. Force-Directed “Mechanointeractome” of Talin–Integrin. *Biochemistry* 2019; 58: 4677–4695.
- 497 Antenucci L, Hytönen VP, Yläne J. Phosphorylated immunoreceptor tyrosine-based activation motifs and integrin cytoplasmic domains activate spleen tyrosine kinase via distinct mechanisms. *Journal of Biological Chemistry* 2018; 293: 4591–4602.
- 498 Liu Y, Medda R, Liu Z, Galior K, Yehl K, Spatz JP et al. Nanoparticle tension probes patterned at the nanoscale: Impact of integrin clustering on force transmission. *Nano Letters* 2014; 14: 5539–5546.
- 499 Miyamoto S, Teramoto H, Coso OA, Gutkind JS, Burbelo PD, Akiyama SK et al. Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. *The Journal of cell biology* 1995; 131: 791–805.
- 500 Miyamoto S, Teramoto H, Gutkind JS, Yamada KM. Integrins can collaborate with growth factors for phosphorylation of receptor tyrosine kinases and MAP kinase activation: roles of integrin aggregation and occupancy of receptors. *The Journal of cell biology* 1996; 135: 1633–1642.
- 501 Leitinger B, Hogg N. The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *Journal of Cell Science* 2002; 115: 963–972.
- 502 Cluzel C, Saltel F, Lussi J, Paulhe F, Imhof BA, Wehrle-Haller B. The mechanisms and dynamics of  $\alpha v \beta 3$  integrin clustering in living cells. *The Journal of Cell Biology* 2005; 171: 383–392.
- 503 Saez de Guinoa J, Barrio L, Carrasco YR. Vinculin Arrests Motile B Cells by Stabilizing Integrin Clustering at the Immune Synapse. *The Journal of Immunology* 2013; 191: 2742–2751.
- 504 Lu F, Zhu L, Bromberger T, Yang J, Yang Q, Liu J et al. Mechanism of integrin activation by talin and its cooperation with kindlin. *Nature Communications* 2022; 13: 2362.
- 505 Ye F, Petrich BG, Anekal P, Lefort CT, Kasirer-Friede A, Shattil SJ et al. The Mechanism of Kindlin-Mediated Activation of Integrin  $\alpha 1 b \beta 3$ . *Current Biology* 2013; 23: 2288–2295.
- 506 Carman CV, Springer TA. Integrin avidity regulation: are changes in affinity and conformation underemphasized? *Current Opinion in Cell Biology* 2003; 15: 547–556.
- 507 Diaz C, Neubauer S, Rechenmacher F, Kessler H, Missirlis D. Recruitment of  $\alpha v \beta 3$  integrin to  $\alpha 5 \beta 1$  integrin-induced clusters enables focal adhesion maturation and cell spreading. *Journal of Cell Science* 2020; 133. doi:10.1242/jcs.232702.
- 508 Braeutigam A, Simsek AN, Gompper G, Sabass B. Generic self-stabilization mechanism for biomolecular adhesions under load. *Nature Communications* 2022; 13: 2197.
- 509 Berniak K, Ura DP, Piórkowski A, Stachewicz U. Cell–Material Interplay in Focal Adhesion Points. *ACS Applied Materials & Interfaces* 2024; 16: 9944–9955.
- 510 Plopper GE, McNamee HP, Dike LE, Bojanowski K, Ingber DE. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Molecular Biology of the Cell* 1995; 6: 1349–1365.

- 511 Erdmann T, Schwarz US. Stochastic dynamics of adhesion clusters under shared constant force and with rebinding. *The Journal of Chemical Physics* 2004; 121: 8997–9017.
- 512 Margraf A, Germena G, Drexler HCA, Rossaint J, Ludwig N, Prystaj B et al. The integrin-linked kinase is required for chemokine-triggered high-affinity conformation of the neutrophil  $\beta 2$ -integrin LFA-1. *Blood* 2020; 136: 2200–2205.
- 513 Michael KE, Dumbauld DW, Burns KL, Hanks SK, García AJ. Focal Adhesion Kinase Modulates Cell Adhesion Strengthening via Integrin Activation. *Molecular Biology of the Cell* 2009; 20: 2508–2519.
- 514 Glodek AM, Le Y, Dykxhoorn DM, Park S-Y, Mostoslavsky G, Mulligan R et al. Focal adhesion kinase is required for CXCL12-induced chemotactic and pro-adhesive responses in hematopoietic precursor cells. *Leukemia* 2007; 21: 1723–1732.
- 515 Grönholm M, Jahan F, Bryushkova EA, Madhavan S, Agliarolo F, Soto Hinojosa L et al. LFA-1 integrin antibodies inhibit leukocyte  $\alpha 4\beta 1$ -mediated adhesion by intracellular signaling. *Blood* 2016; 128: 1270–1281.
- 516 van Kooyk Y, van de Wiel-van Kemenade E, Weder P, Huijbens RJ, Figdor CG. Lymphocyte function-associated antigen 1 dominates very late antigen 4 in binding of activated T cells to endothelium. *The Journal of experimental medicine* 1993; 177: 185–190.
- 517 Kornberg L, Earp HS, Parsons JT, Schaller M, Juliano RL. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267: 23439–23442.
- 518 Janus-Bell E, Mangin PH. The relative importance of platelet integrins in hemostasis, thrombosis and beyond. *Haematologica* 2023; 108: 1734–1747.
- 519 Legate KR, Wickstrom SA, Fassler R, Wickström SA, Fässler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes & Development* 2009; 23: 397–418.
- 520 De Fougerolles AR, Kotliansky VE. Regulation of monocyte gene expression by the extracellular matrix and its functional implications. *Immunological Reviews* 2002; 186: 208–220.
- 521 Zhou DW, Fernández-Yagüe MA, Holland EN, García AF, Castro NS, O'Neill EB et al. Force-FAK signaling coupling at individual focal adhesions coordinates mechanosensing and microtissue repair. *Nature Communications* 2021; 12: 2359.
- 522 Yu Q, Xue Y, Liu J, Xi Z, Li Z, Liu Y. Fibronectin Promotes the Malignancy of Glioma Stem-Like Cells Via Modulation of Cell Adhesion, Differentiation, Proliferation and Chemoresistance. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2018; 11. doi:10.3389/fnmol.2018.00130.
- 523 Somaiah C, Kumar A, Mawrie D, Sharma A, Patil SD, Bhattacharyya J et al. Collagen Promotes Higher Adhesion, Survival and Proliferation of Mesenchymal Stem Cells. *PLOS ONE* 2015; 10: e0145068.
- 524 Turner CE, Pietras KM, Taylor DS, Molloy CJ. Angiotensin II stimulation of rapid paxillin tyrosine phosphorylation correlates with the formation of focal adhesions in rat aortic smooth muscle cells. *Journal of Cell Science* 1995; 108: 333–342.
- 525 Huang M, Lipfert L, Cunningham M, Brugge J, Ginsberg M, Shattil S. Adhesive ligand binding to integrin alpha IIb beta 3 stimulates tyrosine phosphorylation of novel protein substrates before phosphorylation of pp125FAK. *The Journal of cell biology* 1993; 122: 473–483.
- 526 McGilvray ID, Lu Z, Bitar R, Dackiw APB, Davreux CJ, Rotstein OD. VLA-4 Integrin Cross-linking on Human Monocytic THP-1 Cells Induces Tissue Factor Expression by a Mechanism Involving Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 10287–10294.

- 527 Slack-Davis JK, Eblen ST, Zecevic M, Boerner SA, Tarcsafalvi A, Diaz HB et al. PAK1 phosphorylation of MEK1 regulates fibronectin-stimulated MAPK activation. *The Journal of Cell Biology* 2003; 162: 281–291.
- 528 Willeke T, Schymeinsky J, Prange P, Zahler S, Walzog B. A role for Syk-kinase in the control of the binding cycle of the beta2 integrins (CD11/CD18) in human polymorphonuclear neutrophils. *Journal of leukocyte biology* 2003; 74: 260–9.
- 529 Chang Chien C-Y, Chou S-H, Lee H-H. Integrin molecular tension required for focal adhesion maturation and YAP nuclear translocation. *Biochemistry and Biophysics Reports* 2022; 31: 101287.
- 530 Yurochko AD, Liu DY, Eierman D, Haskill S. Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992; 89: 9034–9038.
- 531 Walzog B, Weinmann P, Jeblonski F, Scharffetter-Kochanek K, Bommert K, Gaehtgens P. A role for  $\beta$  2 integrins (CD11/CD18) in the regulation of cytokine gene expression of polymorphonuclear neutrophils during the inflammatory response. *The FASEB Journal* 1999; 13: 1855–1865.
- 532 Santos ARC, Corredor RG, Obeso BA, Trakhtenberg EF, Wang Y, Ponmattam J et al.  $\beta$ 1 Integrin-Focal Adhesion Kinase (FAK) Signaling Modulates Retinal Ganglion Cell (RGC) Survival. *PLoS ONE* 2012; 7: e48332.
- 533 Saleem S, Li J, Yee S, Fellows GF, Goodyer CG, Wang R.  $\beta$ 1 integrin/FAK/ERK signalling pathway is essential for human fetal islet cell differentiation and survival. *The Journal of Pathology* 2009; 219: 182–192.
- 534 Cruet-Hennequart S, Maubant S, Luis J, Gauduchon P, Staedel C, Dedhar S.  $\alpha$ v integrins regulate cell proliferation through integrin-linked kinase (ILK) in ovarian cancer cells. *Oncogene* 2003; 22: 1688–1702.
- 535 Pirone DM, Liu WF, Ruiz SA, Gao L, Raghavan S, Lemmon CA et al. An inhibitory role for FAK in regulating proliferation: a link between limited adhesion and RhoA-ROCK signaling. *The Journal of Cell Biology* 2006; 174: 277–288.
- 536 Rooney N, Wang P, Brennan K, Gilmore AP, Streuli CH. The Integrin-Mediated ILK-Parvin- $\alpha$ Pix Signaling Axis Controls Differentiation in Mammary Epithelial Cells. *Journal of Cellular Physiology* 2016; 231: 2408–2417.
- 537 Moursi AM, Globus RK, Damsky CH. Interactions between integrin receptors and fibronectin are required for calvarial osteoblast differentiation in vitro. *Journal of Cell Science* 1997; 110: 2187–2196.
- 538 Strohmeyer N, Bharadwaj M, Costell M, Fässler R, Müller DJ. Fibronectin-bound  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrins sense load and signal to reinforce adhesion in less than a second. *Nature Materials* 2017; 16: 1262–1270.
- 539 Dubash AD, Wennerberg K, García-Mata R, Menold MM, Arthur WT, Burridge K. A novel role for Lsc/p115 RhoGEF and LARG in regulating RhoA activity downstream of adhesion to fibronectin. *Journal of Cell Science* 2007; 120: 3989–3998.
- 540 Ren X-D. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *The EMBO Journal* 1999; 18: 578–585.
- 541 Kanchanawong P, Shtengel G, Pasapera AM, Ramko EB, Davidson MW, Hess HF et al. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* 2010; 468: 580–584.
- 542 Shroff H, Galbraith CG, Galbraith JA, White H, Gillette J, Olenych S et al. Dual-color superresolution imaging of genetically expressed probes within individual adhesion complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2007; 104: 20308–20313.

- 543 Spiess M, Hernandez-Varas P, Oddone A, Olofsson H, Blom H, Waithe D et al. Active and inactive  $\beta 1$  integrins segregate into distinct nanoclusters in focal adhesions. *Journal of Cell Biology* 2018; 217: 1929–1940.
- 544 Norman JC, Jones D, Barry ST, Holt MR, Cockcroft S, Critchley DR. ARF1 Mediates Paxillin Recruitment to Focal Adhesions and Potentiates Rho-stimulated Stress Fiber Formation in Intact and Permeabilized Swiss 3T3 Fibroblasts. *The Journal of Cell Biology* 1998; 143: 1981–1995.
- 545 Brown MT, Andrade J, Radhakrishna H, Donaldson JG, Cooper JA, Randazzo PA. ASAP1, a Phospholipid-Dependent Arf GTPase-Activating Protein That Associates with and Is Phosphorylated by Src. *Molecular and Cellular Biology* 1998; 18: 7038–7051.
- 546 Schaller MD, Hildebrand JD, Parsons JT. Complex Formation with Focal Adhesion Kinase: A Mechanism to Regulate Activity and Subcellular Localization of Src Kinases. *Molecular Biology of the Cell* 1999; 10: 3489–3505.
- 547 Bellis SL, Miller JT, Turner CE. Characterization of Tyrosine Phosphorylation of Paxillin in Vitro by Focal Adhesion Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 17437–17441.
- 548 Schaller MD, Parsons JT. pp125 FAK -Dependent Tyrosine Phosphorylation of Paxillin Creates a High-Affinity Binding Site for Crk. *Molecular and Cellular Biology* 1995; 15: 2635–2645.
- 549 del Rio A, Perez-Jimenez R, Liu R, Roca-Cusachs P, Fernandez JM, Sheetz MP. Stretching Single Talin Rod Molecules Activates Vinculin Binding. *Science* 2009; 323: 638–641.
- 550 Jaumouillé V, Cartagena-Rivera AX, Waterman CM. Coupling of  $\beta 2$  integrins to actin by a mechanosensitive molecular clutch drives complement receptor-mediated phagocytosis. *Nature Cell Biology* 2019; 21: 1357–1369.
- 551 Humphries JD, Wang P, Streuli C, Geiger B, Humphries MJ, Ballestrem C. Vinculin controls focal adhesion formation by direct interactions with talin and actin. *The Journal of Cell Biology* 2007; 179: 1043–1057.
- 552 Gallant ND, Michael KE, García AJ. Cell Adhesion Strengthening: Contributions of Adhesive Area, Integrin Binding, and Focal Adhesion Assembly. *Molecular Biology of the Cell* 2005; 16: 4329–4340.
- 553 Mócsai A, Zhou M, Meng F, Tybulewicz VL, Lowell CA. Syk is required for integrin signaling in neutrophils. *Immunity* 2002; 16: 547–558.
- 554 Mócsai A, Abram CL, Jakus Z, Hu Y, Lanier LL, Lowell CA. Integrin signaling in neutrophils and macrophages uses adaptors containing immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *Nature Immunology* 2006; 7: 1326–1333.
- 555 Giagulli C, Ottoboni L, Cavegion E, Rossi B, Lowell C, Constantin G et al. The Src Family Kinases Hck and Fgr Are Dispensable for Inside-Out, Chemoattractant-Induced Signaling Regulating  $\beta 2$  Integrin Affinity and Valency in Neutrophils, but Are Required for  $\beta 2$  Integrin-Mediated Outside-In Signaling Involved in Sustained Adhesion. *The Journal of Immunology* 2006; 177: 604–611.
- 556 Pereira S, Zhou M, Mócsai A, Lowell C. Resting Murine Neutrophils Express Functional  $\alpha 4$  Integrins that Signal Through Src Family Kinases. *The Journal of Immunology* 2001; 166: 4115–4123.
- 557 Mócsai A, Ligeti E, Lowell CA, Berton G. Adhesion-Dependent Degranulation of Neutrophils Requires the Src Family Kinases Fgr and Hck. *The Journal of Immunology* 1999; 162: 1120–1126.
- 558 Wu J-C, Chen Y-CY-Q, Kuo C-T, Wenshin Yu H, Chen Y-CY-Q, Chiou A et al. Focal adhesion kinase-dependent focal adhesion recruitment of SH2 domains directs SRC into focal adhesions to regulate cell adhesion and migration. *Scientific Reports* 2015; 5: 18476.

- 559 Arias-Salgado EG, Lizano S, Sarkar S, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ. Src kinase activation by direct interaction with the integrin  $\beta$  cytoplasmic domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100: 13298–13302.
- 560 Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Phillips DR. Outside-in Integrin Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 10811–10815.
- 561 Sakai T, Jove R, Fässler R, Mosher DF. Role of the cytoplasmic tyrosines of  $\beta$ 1A integrins in transformation by v-src. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001; 98: 3808–3813.
- 562 Oxley CL, Anthis NJ, Lowe ED, Vakonakis I, Campbell ID, Wegener L. An Integrin Phosphorylation Switch. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 5420–5426.
- 563 Qu H, Tu Y, Guan J-L, Xiao G, Wu C. Kindlin-2 Tyrosine Phosphorylation and Interaction with Src Serve as a Regulatable Switch in the Integrin Outside-in Signaling Circuit. *Journal of Biological Chemistry* 2014; 289: 31001–31013.
- 564 Vaynberg J, Fukuda K, Lu F, Bialkowska K, Chen Y, Plow EF et al. Non-catalytic signaling by pseudokinase ILK for regulating cell adhesion. *Nature Communications* 2018; 9: 4465.
- 565 Nikolopoulos SN, Turner CE. Integrin-linked Kinase (ILK) Binding to Paxillin LD1 Motif Regulates ILK Localization to Focal Adhesions. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 23499–23505.
- 566 Wachsstock DH, Wilkins JA, Lin S. Specific interaction of vinculin with  $\alpha$ -actinin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1987; 146: 554–560.
- 567 Persad S, Attwell S, Gray V, Mawji N, Deng JT, Leung D et al. Regulation of Protein Kinase B/Akt-Serine 473 Phosphorylation by Integrin-linked Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 27462–27469.
- 568 Filipenko NR, Attwell S, Roskelley C, Dedhar S. Integrin-linked kinase activity regulates Rac- and Cdc42-mediated actin cytoskeleton reorganization via  $\alpha$ -PIX. *Oncogene* 2005; 24: 5837–5849.
- 569 Schaller MD, Otey CA, Hildebrand JD, Parsons JT. Focal adhesion kinase and paxillin bind to peptides mimicking beta integrin cytoplasmic domains. *The Journal of cell biology* 1995; 130: 1181–1187.
- 570 Perez Salazar E, Rozengurt E. Src Family Kinases are Required for Integrin-mediated but Not for G Protein-coupled Receptor Stimulation of Focal Adhesion Kinase Autophosphorylation at Tyr-397. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 17788–17795.
- 571 Yan SR, Huang M, Berton G. Signaling by adhesion in human neutrophils: activation of the p72syk tyrosine kinase and formation of protein complexes containing p72syk and Src family kinases in neutrophils spreading over fibrinogen. *The Journal of Immunology* 1997; 158: 1902–1910.
- 572 Schlaepfer DD, Hunter T. Focal Adhesion Kinase Overexpression Enhances Ras-dependent Integrin Signaling to ERK2/Mitogen-activated Protein Kinase through Interactions with and Activation of c-Src. *Journal of Biological Chemistry* 1997; 272: 13189–13195.
- 573 Wu C, You J, Fu J, Wang X, Zhang Y. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Mediates Integrin Signaling To Control RNA Polymerase I Transcriptional Activity. *Molecular and Cellular Biology* 2016; 36: 1555–1568.
- 574 Choma DP, Milano V, Pumiglia KM, Michael DiPersio C. Integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1-Dependent Activation of FAK/Src Regulates Rac1-Mediated Keratinocyte Polarization on Laminin-5. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127: 31–40.
- 575 Oktay M, Wary KK, Dans M, Birge RB, Giancotti FG. Integrin-mediated Activation of Focal Adhesion Kinase Is Required for Signaling to Jun NH2-terminal Kinase and Progression through the G1 Phase of the Cell Cycle. *The Journal of Cell Biology* 1999; 145: 1461–1470.

- 576 Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH et al. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nature Cell Biology* 2000; 2: 249–256.
- 577 Eberwein P, Laird D, Schulz S, Reinhard T, Steinberg T, Tomakidi P. Modulation of focal adhesion constituents and their down-stream events by EGF: On the cross-talk of integrins and growth factor receptors. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 2015; 1853: 2183–2198.
- 578 Van Ziffle JA, Lowell CA. Neutrophil-specific deletion of Syk kinase results in reduced host defense to bacterial infection. *Blood* 2009; 114: 4871–82.
- 579 Vakaloglou KM, Chrysanthis G, Rapsomaniki MA, Lygerou Z, Zervas CG. IPP Complex Reinforces Adhesion by Relaying Tension-Dependent Signals to Inhibit Integrin Turnover. *Cell Reports* 2016; 14: 2668–2682.
- 580 Sieg DJ, Hauck CR, Schlaepfer DD. Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration. *Journal of Cell Science* 1999; 112: 2677–2691.
- 581 Zhao J-H, Reiske H, Guan J-L. Regulation of the Cell Cycle by Focal Adhesion Kinase. *The Journal of Cell Biology* 1998; 143: 1997–2008.
- 582 Woodside DG, Oberfell A, Leng L, Wilsbacher JL, Miranti CK, Brugge JS et al. Activation of Syk protein tyrosine kinase through interaction with integrin  $\beta$  cytoplasmic domains. *Current Biology* 2001; 11: 1799–1804.
- 583 Bakthavatsalam D, Craft JW, Kazansky A, Nguyen N, Bae G, Caivano AR et al. Identification of Inhibitors of Integrin Cytoplasmic Domain Interactions With Syk. *Frontiers in Immunology* 2021; 11: 1–15.
- 584 Ulanova M, Puttagunta L, Marcet-Palacios M, Duszyk M, Steinhoff U, Duta F et al. Syk tyrosine kinase participates in  $\beta$  1 -integrin signaling and inflammatory responses in airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2005; 288: L497–L507.
- 585 Liu W, Wang X, Wang S, Ba X, Xu T, Wang X et al. RhoGDI2 positively regulates the Rho GTPases activation in response to the  $\beta$ 2 outside-in signaling in T cells adhesion and migration on ICAM-1. *Journal of Leukocyte Biology* 2019; 106: 431–446.
- 586 Zou W, Kitaura H, Reeve J, Long F, Tybulewicz VLJ, Shattil SJ et al. Syk, c-Src, the  $\alpha$  $\beta$ 3 integrin, and ITAM immunoreceptors, in concert, regulate osteoclastic bone resorption. *The Journal of Cell Biology* 2007; 176: 877–888.
- 587 Bianchi E, Denti S, Granata A, Bossi G, Geginat J, Villa A et al. Integrin LFA-1 interacts with the transcriptional co-activator JAB1 to modulate AP-1 activity. *Nature* 2000; 404: 617–621.
- 588 Shimizu Y. LFA-1: more than just T cell Velcro. *Nature Immunology* 2003; 4: 1052–1054.
- 589 Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-fos protein interacts with c-JunAP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell* 1988; 54: 541–552.
- 590 Uotila LM, Guenther C, Savinko T, Lehti TA, Fagerholm SC. Filamin A Regulates Neutrophil Adhesion, Production of Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Trap Release. *The Journal of Immunology* 2017; 199: 3644–3653.
- 591 Xu Y, Bismar TA, Su J, Xu B, Kristiansen G, Varga Z et al. Filamin A regulates focal adhesion disassembly and suppresses breast cancer cell migration and invasion. *Journal of Experimental Medicine* 2010; 207: 2421–2437.
- 592 Cox EA, Bennin D, Doan AT, O'Toole T, Huttenlocher A. RACK1 Regulates Integrin-mediated Adhesion, Protrusion, and Chemotactic Cell Migration via Its Src-binding Site. *Molecular Biology of the Cell* 2003; 14: 658–669.

- 593 Katsube M, Kato T, Kitagawa M, Noma H, Fujita H, Kitagawa S. Calpain-mediated regulation of the distinct signaling pathways and cell migration in human neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 2008; 84: 255–263.
- 594 Lokuta MA, Nuzzi PA, Huttenlocher A. Calpain regulates neutrophil chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003; 100: 4006–4011.
- 595 Rafiq K, Guo J, Vlasenko L, Guo X, Kolpakov MA, Sanjay A et al. c-Cbl Ubiquitin Ligase Regulates Focal Adhesion Protein Turnover and Myofibril Degeneration Induced by Neutrophil Protease Cathepsin G. *Journal of Biological Chemistry* 2012; 287: 5327–5339.
- 596 Sanjay A, Houghton A, Neff L, DiDomenico E, Bardelay C, Antoine E et al. Cbl Associates with Pyk2 and Src to Regulate Src Kinase Activity,  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  Integrin-Mediated Signaling, Cell Adhesion, and Osteoclast Motility. *The Journal of Cell Biology* 2001; 152: 181–196.
- 597 Takaishi K, Sasaki T, Kotani H, Nishioka H, Takai Y. Regulation of Cell–Cell Adhesion by Rac and Rho Small G Proteins in MDCK Cells. *The Journal of Cell Biology* 1997; 139: 1047–1059.
- 598 Smolewski P, Bedner E, Du L, Hsieh T-C, Wu JM, Phelps DJ et al. Detection of caspases activation by fluorochrome-labeled inhibitors: Multiparameter analysis by laser scanning cytometry. *Cytometry* 2001; 44: 73–82.
- 599 Bedner E, Smolewski P, Amstad P, Darzynkiewicz Z. Activation of Caspases Measured in Situ by Binding of Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspases (FLICA): Correlation with DNA Fragmentation. *Experimental Cell Research* 2000; 259: 308–313.
- 600 Komoriya A, Packard BZ, Brown MJ, Wu M-L, Henkart PA. Assessment of Caspase Activities in Intact Apoptotic Thymocytes Using Cell-Permeable Fluorogenic Caspase Substrates. *The Journal of Experimental Medicine* 2000; 191: 1819–1828.
- 601 Darzynkiewicz Z, Pozarowski P, Lee BW, Johnson GL. Fluorochrome-Labeled Inhibitors of Caspases: Convenient In Vitro and In Vivo Markers of Apoptotic Cells for Cytometric Analysis. In: Didenko VV (ed). *Bone*. Humana Press: Totowa, NJ, 2011, pp 103–114.
- 602 Thygesen SJ, Burgener SS, Mudai P, Monteleone M, Boucher D, Sagulenko V et al. Fluorochrome-labeled inhibitors of caspase-1 require membrane permeabilization to efficiently access caspase-1 in macrophages. *European Journal of Immunology* 2024; 54. doi:10.1002/eji.202350515.
- 603 Wang X, Li H, Li W, Xie J, Wang F, Peng X et al. The role of Caspase-1/GSDMD-mediated pyroptosis in Taxol-induced cell death and a Taxol-resistant phenotype in nasopharyngeal carcinoma regulated by autophagy. *Cell Biology and Toxicology* 2020; 36: 437–457.
- 604 Kan H, Zhao M, Wang W, Sun B. Understanding Propofol's Protective Mechanism in Tubular Epithelial Cells: Mitigating Pyroptosis via the miR-143-3p/ATPase Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> Transporting Subunit Alpha 2 Pathway in Renal Ischemia–Reperfusion. *Molecular Biotechnology* 2024. doi:10.1007/s12033-024-01116-7.
- 605 Harjunpää H, Lloret Asens M, Guenther C, Fagerholm SC. Cell Adhesion Molecules and Their Roles and Regulation in the Immune and Tumor Microenvironment. *Front Immunol* 2019; 10: 1078.
- 606 Reyes-Reyes M, Mora N, Gonzalez G, Rosales C. B1 and B2 Integrins Activate Different Signalling Pathways in Monocytes. *Biochemical Journal* 2002; 363: 273–280.
- 607 Lukacs NW, Strieter RM, Elnor V, Evanoff HL, Burdick MD, Kunkel SL. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte:endothelial cell interactions. *Blood* 1995; 86: 2767–2773.

- 608 Lukacs N, Strieter R, Eliner V, Evanoff H, Burdick M, Kunkel S. Intercellular adhesion molecule-1 mediates the expression of monocyte-derived MIP-1 alpha during monocyte-endothelial cell interactions. *Blood* 1994; 83: 1174–1178.
- 609 Cuzzola M, Mancuso G, Beninati C, Biondo C, Genovese F, Tomasello F et al.  $\beta$ 2 Integrins Are Involved in Cytokine Responses to Whole Gram-Positive Bacteria. *The Journal of Immunology* 2000; 164: 5871–5876.
- 610 Yurochko AD, Liu DY, Eierman D, Haskill S. Integrins as a primary signal transduction molecule regulating monocyte immediate-early gene induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992; 89: 9034–9038.
- 611 Miyake S, Yagita H, Maruyama T, Hashimoto H, Miyasaka N, Okumura K. Matrix Proteins Regulates Cytokine Gene Expression in Synovial Fluid Cells of Rheumatoid Arthritis. *Journal of Experimental Medicine* 1993; 177: 863–868.
- 612 Fan ST, Mackman N, Cui MZ, Edgington TS. Integrin regulation of an inflammatory effector gene. Direct induction of the tissue factor promoter by engagement of beta 1 or alpha 4 integrin chains. *The Journal of Immunology* 1995; 154: 3266–3274.
- 613 Eierman DF, Johnson CE, Haskill JS. Human monocyte inflammatory mediator gene expression is selectively regulated by adherence substrates. *The Journal of Immunology* 1989; 142: 1970–1976.
- 614 Lin TH, Rosales C, Mondal K, Bolen JB, Haskill S, Juliano RL. Integrin-mediated Tyrosine Phosphorylation and Cytokine Message Induction in Monocytic Cells. *Journal of Biological Chemistry* 1995; 270: 16189–16197.
- 615 Baldauf CK, Charakopoulos E, Böttcher M, Zeremski V, Mougiakakos D, Schraven B et al. JAK2-V617F Promotes up-Regulation of Pro-Inflammatory Cytokines Including IL-1 upon Adhesion-Induced Activation of  $\beta$ 1/ $\beta$ 2 Integrins. *Blood* 2023; 142: 2749–2749.
- 616 Haage TR, Charakopoulos E, Bhuria V, Baldauf CK, Korthals M, Handschuh J et al. Neutrophil-specific expression of JAK2-V617F or CALRmut induces distinct inflammatory profiles in myeloproliferative neoplasia. *Journal of Hematology & Oncology* 2024; 17: 43.
- 617 Geyer HL, Dueck AC, Scherber RM, Mesa RA. Impact of Inflammation on Myeloproliferative Neoplasm Symptom Development. *Mediators of Inflammation* 2015; 2015: 1–9.
- 618 Hoermann G, Greiner G, Valent P. Cytokine Regulation of Microenvironmental Cells in Myeloproliferative Neoplasms. *Mediators of Inflammation* 2015; 2015: 1–17.
- 619 Masselli E, Pozzi G, Gobbi G, Merighi S, Gessi S, Vitale M et al. Cytokine Profiling in Myeloproliferative Neoplasms: Overview on Phenotype Correlation, Outcome Prediction, and Role of Genetic Variants. *Cells* 2020; 9: 2136.
- 620 Longhitano L, Li Volti G, Giallongo C, Spampinato M, Barbagallo I, Di Rosa M et al. The Role of Inflammation and Inflammasome in Myeloproliferative Disease. *Journal of Clinical Medicine* 2020; 9: 2334.
- 621 Koschmieder S, Chatain N. Role of inflammation in the biology of myeloproliferative neoplasms. *Blood Reviews* 2020; 42: 100711.
- 622 Hasselbalch HC. The role of cytokines in the initiation and progression of myelofibrosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2013; 24: 133–145.
- 623 Jojic V, Shay T, Sylvia K, Zuk O, Sun X, Kang J et al. Identification of transcriptional regulators in the mouse immune system. *Nature Immunology* 2013; 14: 633–643.

- 624 Choi J, Baldwin TM, Wong M, Bolden JE, Fairfax KA, Lucas EC et al. Haemopedia RNA-seq: a database of gene expression during haematopoiesis in mice and humans. *Nucleic Acids Research* 2019; 47: D780–D785.
- 625 Lepage A, Leboeuf M, Cazenave J-P, de la Salle C, Lanza F, Uzan G. The  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  integrin and GPIb-V-IX complex identify distinct stages in the maturation of CD34+cord blood cells to megakaryocytes. *Blood* 2000; 96: 4169–4177.
- 626 Perdomo J, Yan F, Leung HHL, Chong BH. Megakaryocyte Differentiation and Platelet Formation from Human Cord Blood-derived CD34+ Cells. *Journal of Visualized Experiments* 2017. doi:10.3791/56420.
- 627 Aichberger KJ, Fleischman AG, Doratotaj S, Bumm TGP, Silver RT, Deloughery TG et al. Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF) Expression Is Elevated in Myelo-Proliferative Neoplasms (MPN) and Modulated by Inhibition of JAK2 V617F. *Blood* 2009; 114: 2917–2917.
- 628 Heaton WL, Senina AV, Pomicter AD, Salama ME, Clair PM, Yan D et al. Autocrine Tnf signaling favors malignant cells in myelofibrosis in a Tnfr2-dependent fashion. *Leukemia* 2018; 32: 2399–2411.
- 629 Schnöder TM, Eberhardt J, Koehler M, Bierhoff HB, Weinert S, Pandey AD et al. Cell autonomous expression of CXCL-10 in JAK2V617F-mutated MPN. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 2017; 143: 807–820.
- 630 Fournier BM, Parkos CA. The role of neutrophils during intestinal inflammation. *Mucosal Immunology* 2012; 5: 354–366.
- 631 Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology* 2013; 13: 159–175.
- 632 Kiem D, Wagner S, Magnes T, Egle A, Greil R, Melchardt T. The role of neutrophilic granulocytes in philadelphia chromosome negative myeloproliferative neoplasms. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22. doi:10.3390/ijms22179555.
- 633 Holloway AF, Rao S, Shannon MF. Regulation of cytokine gene transcription in the immune system. *Molecular Immunology* 2002; 38: 567–580.
- 634 Fenton MJ. Review: Transcriptional and post-transcriptional regulation of interleukin 1 gene expression. *International Journal of Immunopharmacology* 1992; 14: 401–411.
- 635 Palanisamy V, Jakymiw A, Van Tubergen EA, D’Silva NJ, Kirkwood KL. Control of Cytokine mRNA Expression by RNA-binding Proteins and microRNAs. *Journal of Dental Research* 2012; 91: 651–658.
- 636 Mino T, Takeuchi O. Post-transcriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 2013; 29: 49–60.
- 637 Masuda K, Ripley B, Nishimura R, Mino T, Takeuchi O, Shioi G et al. Arid5a controls IL-6 mRNA stability, which contributes to elevation of IL-6 level in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013; 110: 9409–9414.
- 638 Chen C-YA, Shyu A-B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends in Biochemical Sciences* 1995; 20: 465–470.
- 639 Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. Methuen & Co Ltd.: London, 1959<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/19601401516>.
- 640 Hubrecht, Carter. *The 3Rs and Humane Experimental Technique: Implementing Change*. *Animals* 2019; 9: 754.

- 641 Nimmagadda SC, Frey S, Müller P, Wolleschak D, Weinert S, Keller U et al. SDF1 $\alpha$ -induced chemotaxis of JAK2-V617F-positive cells is dependent on Bruton tyrosine kinase and its downstream targets PI3K/AKT, PLC $\gamma$ 1 and RhoA. *Haematologica* 2019; 104: e288–e292.
- 642 Hakobyan M, Rohdjeß H, Lipka DB. High interleukin-3 concentrations prime murine myeloid progenitor cells towards granulocytic differentiation. *bioRxiv* 2024; : 2024.01.24.576972.
- 643 Schnöder TM, Arreba-Tutusaus P, Griehl I, Bullinger L, Buschbeck M, Lane SW et al. Epo-induced erythroid maturation is dependent on Plc $\gamma$ 1 signaling. *Cell Death and Differentiation* 2015; 22: 974–985.
- 644 Obergfell A, Eto K, Mocsai A, Buensuceso C, Moores SL, Brugge JS et al. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *The Journal of Cell Biology* 2002; 157: 265–275.
- 645 Visavadiya NP, Keasey MP, Razskazovskiy V, Banerjee K, Jia C, Lovins C et al. Integrin-FAK signaling rapidly and potently promotes mitochondrial function through STAT3. *Cell Communication and Signaling* 2016; 14: 1–15.
- 646 Klein S, de Fougères AR, Blaikie P, Khan L, Pepe A, Green CD et al.  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 Integrin Activates an NF- $\kappa$ B-Dependent Program of Gene Expression Important for Angiogenesis and Inflammation. *Molecular and Cellular Biology* 2002; 22: 5912–5922.
- 647 Snider JL, Allison C, Bellaire BH, Ferrero RL, Cardelli JA. The  $\beta$ 1 Integrin Activates JNK Independent of CagA, and JNK Activation Is Required for Helicobacter pylori CagA+-induced Motility of Gastric Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 13952–13963.
- 648 Velling T, Nilsson S, Stefansson A, Johansson S.  $\beta$ 1-Integrins induce phosphorylation of Akt on serine 473 independently of focal adhesion kinase and Src family kinases. *EMBO reports* 2004; 5: 901–905.
- 649 Schaller MD, Hildebrand JD, Shannon JD, Fox JW, Vines RR, Parsons JT. Autophosphorylation of the Focal Adhesion Kinase, ppl25 FAK, Directs SH2-Dependent Binding of pp60 src. *Molecular and Cellular Biology* 1994; 14: 1680–1688.
- 650 Chiu Y-W, Liou L-Y, Chen P-T, Huang C-M, Luo F-J, Hsu Y-K et al. Tyrosine 397 phosphorylation is critical for FAK-promoted Rac1 activation and invasive properties in oral squamous cell carcinoma cells. *Laboratory Investigation* 2016; 96: 296–306.
- 651 Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine Phosphorylation of Focal Adhesion Kinase at Sites in the Catalytic Domain Regulates Kinase Activity: a Role for Src Family Kinases. *Molecular and Cellular Biology* 1995; 15: 954–963.
- 652 Owen JD, Ruest PJ, Fry DW, Hanks SK. Induced Focal Adhesion Kinase (FAK) Expression in FAK-Null Cells Enhances Cell Spreading and Migration Requiring Both Auto- and Activation Loop Phosphorylation Sites and Inhibits Adhesion-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Pyk2. *Molecular and Cellular Biology* 1999; 19: 4806–4818.
- 653 Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY et al. SIN1/MIP1 Maintains rictor-mTOR Complex Integrity and Regulates Akt Phosphorylation and Substrate Specificity. *Cell* 2006; 127: 125–137.
- 654 Park JE, Lee JA, Park SG, Lee DH, Kim SJ, Kim H-J et al. A critical step for JNK activation: isomerization by the prolyl isomerase Pin1. *Cell Death & Differentiation* 2012; 19: 153–161.
- 655 de Castro RO, Zhang J, Jamur MC, Oliver C, Siraganian RP. Tyrosines in the Carboxyl Terminus Regulate Syk Kinase Activity and Function. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 26674–26684.

- 656 Lin Y-C, Huang D-Y, Chu C-L, Lin Y-L, Lin W-W. The Tyrosine Kinase Syk Differentially Regulates Toll-like Receptor Signaling Downstream of the Adaptor Molecules TRAF6 and TRAF3. *Science Signaling* 2013; 6. doi:10.1126/scisignal.2003973.
- 657 Wen Z, Zhong Z, Darnell JE. Maximal activation of transcription by stat1 and stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995; 82: 241–250.
- 658 Sakurai H, Chiba H, Miyoshi H, Sugita T, Toriumi W. I $\kappa$ B Kinases Phosphorylate NF- $\kappa$ B p65 Subunit on Serine 536 in the Transactivation Domain. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 30353–30356.
- 659 Bagaev AV, Garaeva AY, Lebedeva ES, Pichugin AV, Ataulakhanov RI, Ataulakhanov FI. Elevated pre-activation basal level of nuclear NF- $\kappa$ B in native macrophages accelerates LPS-induced translocation of cytosolic NF- $\kappa$ B into the cell nucleus. *Scientific Reports* 2019; 9: 4563.
- 660 Hanke JH, Gardner JP, Dow RL, Changelian PS, Brissette WH, Weringer EJ et al. Discovery of a Novel, Potent, and Src Family-selective Tyrosine Kinase Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 695–701.
- 661 Law DA, Nannizzi-Alaimo L, Ministri K, Hughes PE, Forsyth J, Turner M et al. Genetic and pharmacological analyses of Syk function in  $\alpha$ (IIb) $\beta$ 3 signaling in platelets. *Blood* 1999; 93: 2645–2652.
- 662 O'Brien S, Golubovskaya VM, Conroy J, Liu S, Wang D, Liu B et al. FAK inhibition with small molecule inhibitor Y15 decreases viability, clonogenicity, and cell attachment in thyroid cancer cell lines and synergizes with targeted therapeutics. *Oncotarget* 2014; 5: 7945–7959.
- 663 Wymann MP, Bulgarelli-Leva G, Zvelebil MJ, Pirola L, Vanhaesebroeck B, Waterfield MD et al. Wortmannin Inactivates Phosphoinositide 3-Kinase by Covalent Modification of Lys-802, a Residue Involved in the Phosphate Transfer Reaction. *Molecular and Cellular Biology* 1996; 16: 1722–1733.
- 664 Shin H-M, Kim M-H, Kim BH, Jung S-H, Kim YS, Park HJ et al. Inhibitory action of novel aromatic diamine compound on lipopolysaccharide-induced nuclear translocation of NF- $\kappa$ B without affecting I $\kappa$ B degradation. *FEBS Letters* 2004; 571: 50–54.
- 665 Kanda K, Hayman GT, Silverman MD, Lelkes PI. Comparison of ICAM-1 and VCAM-1 Expression in Various Human Endothelial Cell types and Smooth Muscle Cells. *Endothelium* 1998; 6: 33–44.
- 666 Yarbro JW. Mechanism of action of hydroxyurea. *Seminars in oncology* 1992; 19: 1–10.
- 667 Ratnadiwakara M, Änkö M-L. mRNA Stability Assay Using Transcription Inhibition by Actinomycin D in Mouse Pluripotent Stem Cells. *Bio-Protocol* 2018; 8: 1–8.
- 668 Pozarowski P, Huang X, Halicka DH, Lee B, Johnson G, Darzynkiewicz Z. Interactions of fluorochrome-labeled caspase inhibitors with apoptotic cells: A caution in data interpretation. *Cytometry Part A* 2003; 55A: 50–60.
- 669 den Hartigh AB, Fink SL. Pyroptosis Induction and Detection. *Current protocols in immunology* 2018; 122: e52.
- 670 Xie M, Lu C, Wang J, McLellan MD, Johnson KJ, Wendl MC et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. *Nature Medicine* 2014; 20: 1472–1478.
- 671 McKerrell T, Park N, Moreno T, Grove CS, Ponstingl H, Stephens J et al. Leukemia-Associated Somatic Mutations Drive Distinct Patterns of Age-Related Clonal Hemopoiesis. *Cell Reports* 2015; 10: 1239–1245.

- 672 Watari K, Mayani H, Lee F, Dragowska W, Lansdorp PM, Schrader JW. Production of interleukin 1beta by human hematopoietic progenitor cells. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 97: 1666–1674.
- 673 Rabolli V, Badissi AA, Devosse R, Uwambayinema F, Yakoub Y, Palmi-Pallag M et al. The alarmin IL-1 $\alpha$  is a master cytokine in acute lung inflammation induced by silica micro- and nanoparticles. *Particle and Fibre Toxicology* 2014; 11: 69.
- 674 Denis MM, Tolley ND, Bunting M, Schwertz H, Jiang H, Lindemann S et al. Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets. *Cell* 2005; 122: 379–391.
- 675 Thornton P, McColl BW, Greenhalgh A, Denes A, Allan SM, Rothwell NJ. Platelet interleukin-1 $\alpha$  drives cerebrovascular inflammation. *Blood* 2010; 115: 3632–3639.
- 676 Hasgur S, Fan R, Zwick DB, Fairchild RL, Valujskikh A. B cell-derived IL-1 $\beta$  and IL-6 drive T cell reconstitution following lymphoablation. *American Journal of Transplantation* 2020; 20: 2740–2754.
- 677 Lim KH, Chen CGS, Chang YC, Chiang YH, Kao CW, Wang WT et al. Increased B cell activation is present in JAK2V617F-mutated, CALR-mutated and triple-negative essential thrombocythemia. *Oncotarget* 2017; 8: 32476–32491.
- 678 Di Staulo AM, Ayemoba CE, Petenkaya A, Zhang S, Maryanovich M, Chronis K et al. Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Regulates Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell Maintenance and Niche Function. *Blood* 2023; 142: 1328–1328.
- 679 Liu Y, Zhang S, Chen Y, Shi K, Zou B, Liu J et al. ICAM-1 Deficiency in the Bone Marrow Niche Impairs Quiescence and Repopulation of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 2018; 11: 258–273.
- 680 Wong D, Dorovini-Zis K. Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) by Human Brain Microvessel Endothelial Cells in Primary Culture. *Microvascular Research* 1995; 49: 325–339.
- 681 Aziz KE, Wakefield D. Modulation of endothelial cell expression of ICAM-1, E-selectin, and VCAM-1 by beta-estradiol, progesterone, and dexamethasone. *Cellular immunology* 1996; 167: 79–85.
- 682 Kim I, Moon S-O, Hoon Kim S, Jin Kim H, Soon Koh Y, Young Koh G. Vascular Endothelial Growth Factor Expression of Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1), Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation in Endothelial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 2001; 276: 7614–7620.
- 683 Henninger DD, Panés J, Eppihimer M, Russell J, Gerritsen M, Anderson DC et al. Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse. *The Journal of Immunology* 1997; 158: 1825–1832.
- 684 Liew EL, Araki M, Hironaka Y, Mori S, Tan TZ, Morishita S et al. Identification of AIM2 as a downstream target of JAK2V617F. *Experimental Hematology & Oncology* 2015; 5: 2.
- 685 Fidler TP, Xue C, Yalcinkaya M, Hardaway B, Abramowicz S, Xiao T et al. The AIM2 inflammasome exacerbates atherosclerosis in clonal haematopoiesis. *Nature* 2021; 592: 296–301.
- 686 De Luca G, Lev PR, Camacho MF, Goette NP, Sackmann F, Castro Ríos MA et al. High cell-free DNA is associated with disease progression, inflammasome activation and elevated levels of inflammasome-related cytokine IL-18 in patients with myelofibrosis. *Frontiers in Immunology* 2023; 14. doi:10.3389/fimmu.2023.1161832.
- 687 Watanabe Y, Akaike T. Possible involvement of caspase-like family in maintenance of cytoskeleton integrity. *Journal of cellular physiology* 1999; 179: 45–51.

- 688 Lin Y-C, Huang D-Y, Wang J-S, Lin Y-L, Hsieh S-L, Huang K-C et al. Syk is involved in NLRP3 inflammasome-mediated caspase-1 activation through adaptor ASC phosphorylation and enhanced oligomerization. *Journal of Leukocyte Biology* 2015; 97: 825–835.
- 689 Thinwa J, Segovia JA, Bose S, Dube PH. Integrin-Mediated First Signal for Inflammasome Activation in Intestinal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology* 2014; 193: 1373–1382.
- 690 Berlanga O, Emambokus N, Frampton J. GPIIb (CD41) integrin is expressed on mast cells and influences their adhesion properties. *Experimental Hematology* 2005; 33: 403–412.
- 691 Mauler M, Seyfert J, Haenel D, Seeba H, Guenther J, Stallmann D et al. Platelet-neutrophil complex formation—a detailed in vitro analysis of murine and human blood samples. *Journal of Leukocyte Biology* 2016; 99: 781–789.
- 692 Granja T, Schad J, Schüssel P, Fischer C, Häberle H, Rosenberger P et al. Using six-colour flow cytometry to analyse the activation and interaction of platelets and leukocytes – A new assay suitable for bench and bedside conditions. *Thrombosis Research* 2015; 136: 786–796.
- 693 Cunin P, Bouzlama R, Machlus KR, Bonet MM, Lee PY, Wactor A et al. Megakaryocyte emperipolesis mediates membrane transfer from intracytoplasmic neutrophils to platelets. *eLife* 2019; 8: 1–22.
- 694 Hu Y, Jiang L, Zhou G, Liu S, Liu Y, Zhang X et al. Emperipolesis is a potential histological hallmark associated with chronic hepatitis B. *Current Molecular Medicine* 2015; 15: 873–881.
- 695 Centurione L, Di Baldassarre A, Zingariello M, Bosco D, Gatta V, Rana RA et al. Increased and pathologic emperipolesis of neutrophils within megakaryocytes associated with marrow fibrosis in GATA-1low mice. *Blood* 2004; 104: 3573–3580.
- 696 St. John AL, Rathore APS, Ginhoux F. New perspectives on the origins and heterogeneity of mast cells. *Nature Reviews Immunology* 2023; 23: 55–68.
- 697 Larsen TE. Emperipolesis of Granular Leukocytes within Megakaryocytes in Human Hemopoietic Bone Marrow. *American Journal of Clinical Pathology* 1970; 53: 485–489.
- 698 Schmitt A, Jouault H, Guichard J, Wendling F, Drouin A, Cramer EM. Pathologic interaction between megakaryocytes and polymorphonuclear leukocytes in myelofibrosis. *Blood* 2000; 96: 1342–1347.
- 699 Schino M, Fiorentino V, Rossi E, Betti S, Di Cecca M, Ranucci V et al. Bone marrow megakaryocytic activation predicts fibrotic evolution of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2020; 106: 3162–3169.
- 700 Cashell AW, Buss DH. The frequency and significance of megakaryocytic emperipolesis in myeloproliferative and reactive states. *Annals of Hematology* 1992; 64: 273–276.
- 701 Gupta S, Barrett T, Whitmarsh AJ, Cavanagh J, Sluss HK, Dérijard B et al. Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *The EMBO Journal* 1996; 15: 2760–2770.
- 702 Schlaepfer DD, Hauck CR, Sieg DJ. Signaling through focal adhesion kinase. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 1999; 71: 435–478.
- 703 Petzold T, Orr AW, Hahn C, Jhaveri KA, Parsons JT, Schwartz MA. Focal adhesion kinase modulates activation of NF- $\kappa$ B by flow in endothelial cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 2009; 297: C814–C822.
- 704 Murphy JM, Jeong K, Cioffi DL, Campbell PM, Jo H, Ahn E-YE et al. Focal Adhesion Kinase Activity and Localization is Critical for TNF- $\alpha$ -Induced Nuclear Factor- $\kappa$ B Activation. *Inflammation* 2021; 44: 1130–1144.

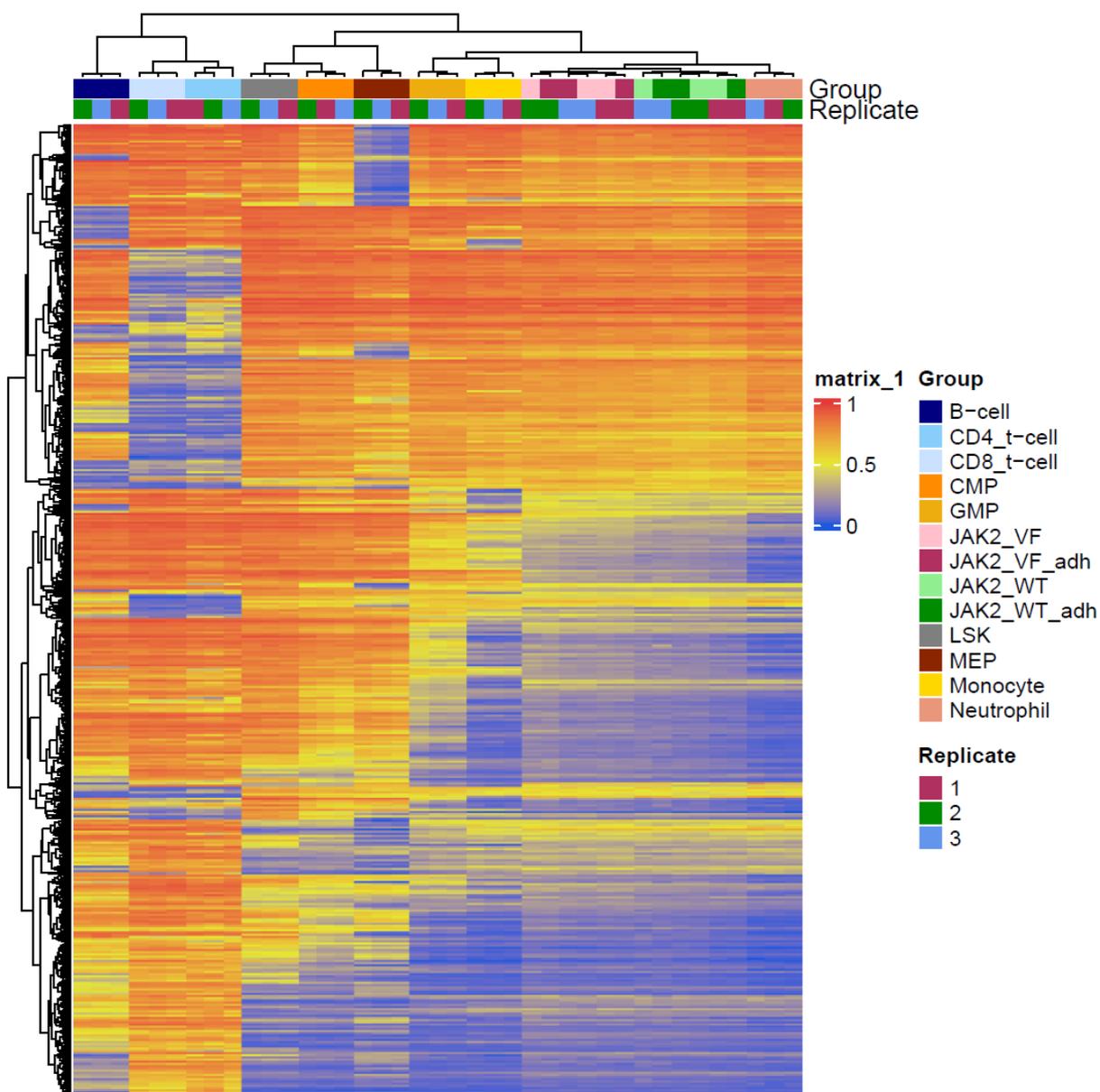
- 705 Luster AD, Ravetch JV. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *The Journal of experimental medicine* 1987; 166: 1084–1097.
- 706 Schönung M, Hartmann M, Krämer S, Stäble S, Hakobyan M, Kleinert E et al. Dynamic DNA methylation reveals novel cis-regulatory elements in mouse hematopoiesis. *Experimental Hematology* 2023; 117: 24-42.e7.
- 707 Liu F, Zhao X, Perna F, Wang L, Koppikar P, Abdel-Wahab O et al. JAK2V617F-Mediated Phosphorylation of PRMT5 Downregulates Its Methyltransferase Activity and Promotes Myeloproliferation. *Cancer Cell* 2011; 19: 283–294.
- 708 Dawson MA, Bannister AJ, Göttgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1 $\alpha$  from chromatin. *Nature* 2009; 461: 819–822.
- 709 Peecken JC, Jutzi JS, Wehrle J, Koellerer C, Staehle HF, Becker H et al. Epigenetic regulation of NFE2 overexpression in myeloproliferative neoplasms. *Blood* 2018; 131: 2065–2073.
- 710 Perez C, Pascual M, Martin-Subero JI, Bellosillo B, Segura V, Delabesse E et al. Aberrant DNA methylation profile of chronic and transformed classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms. *Haematologica* 2013; 98: 1414–1420.
- 711 McPherson S, Greenfield G, Andersen C, Grinfeld J, Hasselbalch HC, Nangalia J et al. Methylation age as a correlate for allele burden, disease status, and clinical response in myeloproliferative neoplasm patients treated with vorinostat. *Experimental Hematology* 2019; 79: 26–34.
- 712 Cowles EA, Brailey LL, Gronowicz GA. Integrin-mediated signaling regulates AP-1 transcription factors and proliferation in osteoblasts. *Journal of biomedical materials research* 2000; 52: 725–37.
- 713 Hato T, Pampori N, Shattil SJ. Complementary Roles for Receptor Clustering and Conformational Change in the Adhesive and Signaling Functions of Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *The Journal of Cell Biology* 1998; 141: 1685–1695.
- 714 Blue R, Li J, Steinberger J, Murcia M, Filizola M, Collier BS. Effects of Limiting Extension at the  $\alpha$ IIb Genu on Ligand Binding to Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3. *Journal of Biological Chemistry* 2010; 285: 17604–17613.
- 715 Moskowitz KA, Kudryk B, Collier BS. Fibrinogen coating density affects the conformation of immobilized fibrinogen: implications for platelet adhesion and spreading. *Thrombosis and haemostasis* 1998; 79: 824–31.
- 716 Maynard SA, Pchelintseva E, Zwi-Dantsis L, Nagelkerke A, Gopal S, Korchev YE et al. IL-1 $\beta$  mediated nanoscale surface clustering of integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 regulates the adhesion of mesenchymal stem cells. *Scientific reports* 2021; 11: 6890.
- 717 Lawson C, Lim S-T, Uryu S, Chen XL, Calderwood DA, Schlaepfer DD. FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *Journal of Cell Biology* 2012; 196: 223–232.
- 718 He X, Chen X, Li B, Ji J, Chen S. FAK inhibitors induce cell multinucleation and dramatically increase pro-tumoral cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *FEBS Letters* 2017; 591: 3861–3871.
- 719 Zhu H, Jian Z, Zhong Y, Ye Y, Zhang Y, Hu X et al. Janus Kinase Inhibition Ameliorates Ischemic Stroke Injury and Neuroinflammation Through Reducing NLRP3 Inflammasome Activation via JAK2/STAT3 Pathway Inhibition. *Frontiers in Immunology* 2021; 12: 1–16.
- 720 ZARUBIN T, HAN J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Research* 2005; 15: 11–18.
- 721 Zauberman A, Zipori D, Krupsky M, Ben-Levy R. Stress activated protein kinase p38 is involved in IL-6 induced transcriptional activation of STAT3. *Oncogene* 1999; 18: 3886–3893.

- 722 Zhao W, Liu M, Kirkwood KL. p38 $\alpha$  Stabilizes Interleukin-6 mRNA via Multiple AU-rich Elements. *Journal of Biological Chemistry* 2008; 283: 1778–1785.
- 723 Mahtani KR, Brook M, Dean JL, Sully G, Saklatvala J, Clark AR. Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Molecular and cellular biology* 2001; 21: 6461–9.
- 724 Bharadwaj M, Strohmeyer N, Colo GP, Helenius J, Beerenwinkel N, Schiller HB et al.  $\alpha$ V-class integrins exert dual roles on  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrins to strengthen adhesion to fibronectin. *Nature Communications* 2017; 8: 14348.
- 725 van den Berg JM, Mul FP, Schippers E, Weening JJ, Roos D, Kuijpers TW. Beta1 integrin activation on human neutrophils promotes beta2 integrin-mediated adhesion to fibronectin. *European journal of immunology* 2001; 31: 276–84.
- 726 Granstein RD, Margolis R, Mizel SB, Sauder DN. In vivo inflammatory activity of epidermal cell-derived thymocyte activating factor and recombinant interleukin 1 in the mouse. *Journal of Clinical Investigation* 1986; 77: 1020–1027.
- 727 Chicurel ME, Singer RH, Meyer CJ, Ingber DE. Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions. *Nature* 1998; 392: 730–733.
- 728 Benecke B-J, Ben-Ze'ev A, Penman S. The control of mRNA production, translation and turnover in suspended and reattached anchorage-dependent fibroblasts. *Cell* 1978; 14: 931–939.
- 729 Farmer SR, Ben-Ze'ev A, Benecke B-J, Penman S. Altered translatability of messenger RNA from suspended anchorage-dependent fibroblasts: Reversal upon cell attachment to a surface. *Cell* 1978; 15: 627–637.
- 730 Pabla R, Weyrich AS, Dixon DA, Bray PF, McIntyre TM, Prescott SM et al. Integrin-dependent Control of Translation: Engagement of Integrin  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 Regulates Synthesis of Proteins in Activated Human Platelets. *The Journal of Cell Biology* 1999; 144: 175–184.
- 731 Malik RK, Parsons JT. Integrin-dependent activation of the p70 ribosomal S6 kinase signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry* 1996; 271: 29785–29791.
- 732 Anderson P. Post-transcriptional control of cytokine production. *Nature Immunology* 2008; 9: 353–359.
- 733 Subramaniam D, Natarajan G, Ramalingam S, Ramachandran I, May R, Queimado L et al. Translation inhibition during cell cycle arrest and apoptosis: Mcl-1 is a novel target for RNA binding protein CUGBP2. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2008; 294: G1025–G1032.
- 734 Piecyk M, Wax S, Beck ARP, Kedersha N, Gupta M, Maritim B et al. TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF- $\alpha$ . *The EMBO Journal* 2000; 19: 4154–4163.
- 735 Bell SE, Sanchez MJ, Spasic-Boskovic O, Santalucia T, Gambardella L, Burton GJ et al. The RNA binding protein Zfp3611 is required for normal vascularisation and post-transcriptionally regulates VEGF expression. *Developmental Dynamics* 2006; 235: 3144–3155.
- 736 Stumpo DJ, Lai WS, Blackshear PJ. Inflammation: cytokines and RNA-based regulation. *WIREs RNA* 2010; 1: 60–80.
- 737 Ross EA, Smallie T, Ding Q, O'Neil JD, Cunliffe HE, Tang T et al. Dominant Suppression of Inflammation via Targeted Mutation of the mRNA Destabilizing Protein Tristetraprolin. *The Journal of Immunology* 2015; 195: 265–276.
- 738 Fan XC. Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *The EMBO Journal* 1998; 17: 3448–3460.

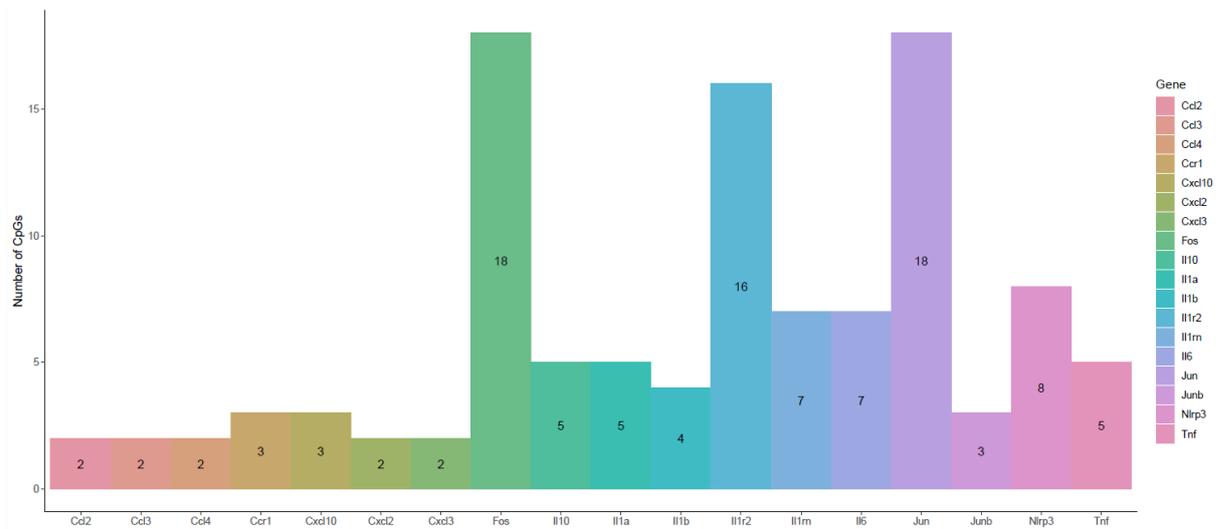
- 739 Chen Y-L, Huang Y-L, Lin N-Y, Chen H-C, Chiu W-C, Chang C-J. Differential regulation of ARE-mediated TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA stability by lipopolysaccharide in RAW264.7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2006; 346: 160–168.
- 740 Schaljo B, Kratochvill F, Gratz N, Sadzak I, Sauer I, Hammer M et al. Tristetraprolin Is Required for Full Anti-Inflammatory Response of Murine Macrophages to IL-10. *The Journal of Immunology* 2009; 183: 1197–1206.
- 741 Maitra S, Chou C-F, Lubber CA, Lee K-Y, Mann M, Chen C-Y. The AU-rich element mRNA decay-promoting activity of BRF1 is regulated by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *RNA (New York, NY)* 2008; 14: 950–9.
- 742 Lu J-Y, Sadri N, Schneider RJ. Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes & development* 2006; 20: 3174–84.
- 743 Tebo J, Der S, Frevel M, Khabar KSA, Williams BRG, Hamilton TA. Heterogeneity in control of mRNA stability by AU-rich elements. *The Journal of biological chemistry* 2003; 278: 12085–93.
- 744 Bagby GC, Shaw G, Heinrich MC, Hefeneider S, Brown MA, DeLoughery TG et al. Interleukin-1 stimulation stabilizes GM-CSF mRNA in human vascular endothelial cells: preliminary studies on the role of the 3' AU rich motif. *Progress in clinical and biological research* 1990; 352: 233–9.
- 745 Farh KK-H, Grimson A, Jan C, Lewis BP, Johnston WK, Lim LP et al. The Widespread Impact of Mammalian MicroRNAs on mRNA Repression and Evolution. *Science* 2005; 310: 1817–1821.
- 746 Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* 2005; 120: 15–20.
- 747 Asirvatham AJ, Magner WJ, Tomasi TB. miRNA regulation of cytokine genes. *Cytokine* 2009; 45: 58–69.
- 748 Wu L, Belasco JG. Let Me Count the Ways: Mechanisms of Gene Regulation by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell* 2008; 29: 1–7.
- 749 Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes & Development* 2004; 18: 504–511.
- 750 Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World Journal of Biological Chemistry* 2017; 8: 45.
- 751 Beilharz TH, Humphreys DT, Preiss T. miRNA Effects on mRNA Closed-Loop Formation During Translation Initiation. 2010, pp 99–112.
- 752 Xie W, Li M, Xu N, Lv Q, Huang N, He J et al. miR-181a Regulates Inflammation Responses in Monocytes and Macrophages. *PLoS ONE* 2013; 8: e58639.
- 753 Mattick JS, Amaral PP, Carninci P, Carpenter S, Chang HY, Chen L-L et al. Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2023; 24: 430–447.
- 754 Karakas D, Ozpolat B. The Role of LncRNAs in Translation. *Non-Coding RNA* 2021; 7: 16.
- 755 Wong NK, Luo S, Chow EYD, Meng F, Adesanya A, Sun J et al. The Tyrosine Kinase-Driven Networks of Novel Long Non-coding RNAs and Their Molecular Targets in Myeloproliferative Neoplasms. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021; 9. doi:10.3389/fcell.2021.643043.
- 756 Stutz A, Horvath GL, Monks BG, Latz E. ASC Speck Formation as a Readout for Inflammasome Activation. 2013, pp 91–101.

- 757 He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annual review of genetics* 2009; 43: 67–93.
- 758 Liu C, Chu D, Kalantar-Zadeh K, George J, Young HA, Liu G. Cytokines: From Clinical Significance to Quantification. *Advanced Science* 2021; 8. doi:10.1002/adv.202004433.
- 759 Schneider KS, Groß CJ, Dreier RF, Saller BS, Mishra R, Gorka O et al. The Inflammasome Drives GSDMD-Independent Secondary Pyroptosis and IL-1 Release in the Absence of Caspase-1 Protease Activity. *Cell Reports* 2017; 21: 3846–3859.
- 760 Fung C, Lock R, Gao S, Salas E, Debnath J. Induction of Autophagy during Extracellular Matrix Detachment Promotes Cell Survival. *Molecular Biology of the Cell* 2008; 19: 797–806.
- 761 Dinarello CA, Ikejima T, Warner SJ, Orencole SF, Lonnemann G, Cannon JG et al. Interleukin 1 induces interleukin 1. I. Induction of circulating interleukin 1 in rabbits in vivo and in human mononuclear cells in vitro. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 1987; 139: 1902–10.
- 762 Granowitz E, Clark B, Vannier E, Callahan M, Dinarello C. Effect of interleukin-1 (IL-1) blockade on cytokine synthesis: I. IL-1 receptor antagonist inhibits IL-1-induced cytokine synthesis and blocks the binding of IL-1 to its type II receptor on human monocytes. *Blood* 1992; 79: 2356–2363.
- 763 Toda Y, Tsukada J, Misago M, Kominato Y, Auron PE, Tanaka Y. Autocrine Induction of the Human Pro-IL-1 $\beta$  Gene Promoter by IL-1 $\beta$  in Monocytes. *The Journal of Immunology* 2002; 168: 1984–1991.
- 764 Tosato G, Jones KD. Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood* 1990; 75: 1305–10.
- 765 Myers CL, Wertheimer SJ, Schembri-King J, Parks T, Wallace RW. Induction of ICAM-1 by TNF- $\alpha$ , IL-1 beta, and LPS in human endothelial cells after downregulation of PKC. *The American journal of physiology* 1992; 263: C767-72.
- 766 Vogelpoel LTC, Baeten DLP, de Jong EC, den Dunnen J. Control of Cytokine Production by Human Fc Gamma Receptors: Implications for Pathogen Defense and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology* 2015; 6: 1–11.
- 767 Urwyler SA, Ebrahimi F, Burkard T, Schuetz P, Poglitsch M, Mueller B et al. IL (Interleukin)-1 Receptor Antagonist Increases Ang (Angiotensin [1–7]) and Decreases Blood Pressure in Obese Individuals. *Hypertension* 2020; 75: 1455–1463.
- 768 Zhang J, Rudemiller NP, Patel MB, Karlovich NS, Wu M, McDonough AA et al. Interleukin-1 Receptor Activation Potentiates Salt Reabsorption in Angiotensin II-Induced Hypertension via the NKCC2 Co-transporter in the Nephron. *Cell Metabolism* 2016; 23: 360–368.
- 769 Chamberlain J, Francis S, Brookes Z, Shaw G, Graham D, Alp NJ et al. Interleukin-1 Regulates Multiple Atherogenic Mechanisms in Response to Fat Feeding. *PLoS ONE* 2009; 4: e5073.
- 770 Hsieh C-T, Lee Y-J, Lee JW, Lu S, Tucci MA, Dai X et al. Interleukin-1 receptor antagonist ameliorates the pain hypersensitivity, spinal inflammation and oxidative stress induced by systemic lipopolysaccharide in neonatal rats. *Neurochemistry International* 2020; 135: 104686.
- 771 Mailhot B, Christin M, Tessandier N, Sotoudeh C, Bretheau F, Turmel R et al. Neuronal interleukin-1 receptors mediate pain in chronic inflammatory diseases. *Journal of Experimental Medicine* 2020; 217. doi:10.1084/jem.20191430.

## 8 Anhang



**Anhang 1: Globale Methylierungsanalysen der 5000 variabelsten CpGs isolierter Granulozyten im Vergleich zu Referenzdaten muriner hämatopoetischer Zellpopulationen.** Isolierte Granulozyten aus Knochenmark von Vav1-Cre x JAK2<sup>+/+</sup> (JAK2\_WT) sowie Vav1-Cre x JAK2<sup>VF/+</sup> (JAK2\_VF) Mäusen wurden für 1 h auf immobilisiertem mVCAM-1/mICAM-1 (\_adh) bzw. BSA als Kontrolle inkubiert. Die enthaltene DNA wurde isoliert und mittels „*Infinium Mouse Methylation BeadChip (MMBC) Array*“ (Illumina) bezüglich ihrer Methylierungsmuster untersucht. Dies erfolgte in der Microarray Core Facility des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg. Die 5000 variabelsten CpGs (engl.: *most variable CpGs*; mvCpGs) wurden im Rahmen einer globalen Methylierungsanalyse als Heatmap dargestellt (0 = nicht methyliert; 1 = vollständig methyliert). Die Referenzdaten muriner hämatopoetischer Zellpopulationen (B-Zellen, CD4/CD8 T-Zellen, CMP, GMP, LSK, MEP, Monozyten und neutrophile Granulozyten) wurden unter <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2022.11.001> abgerufen. Die Analyse erfolgt durch Dr. rer. nat. Mariam Hakobyan und PD Dr. med. Daniel Lipka. (LSK - Lin<sup>-</sup>, Sca-1<sup>+</sup>, c-Kit<sup>+</sup> Zellen, CMP - gesamte myeloische Progenitoren, MEP – megakaryozytäre-erythroide Progenitoren, GMP - granulozytäre-monozytäre Progenitoren)



**Anhang 2: Anzahl von CpGs pro untersuchtes Gen.** Der „*Infinium Mouse Methylation BeadChip (MMBC) Array*“ (Illumina) wurde zur Analyse von Methylierungsmustern verwendet. Dies erfolgte in der Microarray Core Facility des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg. Die Analyse erfolgt durch Dr. rer. nat. Mariam Hakobyan und PD Dr. med. Daniel Lipka. Der *Array* untersucht unterschiedlich viele CpGs pro Gen. Es wurden die gleichen Gene wie in Abbildung 27 in der RNA-Sequenzierung untersucht. Dargestellt ist die Anzahl der CpGs, die der Array für die entsprechenden Gene abdeckt. Dadurch werden nicht alle Gene gleichstark in der Abbildung 28 repräsentiert.

## Ehrenerklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; verwendete fremde und eigene Quellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich habe insbesondere nicht wissentlich:

- Ergebnisse erfunden oder widersprüchlich Ergebnisse verschwiegen,
- statistische Verfahren absichtlich missbraucht, um Daten in ungerechtfertigter Weise zu interpretieren,
- fremde Ergebnisse oder Veröffentlichungen plagiiert,
- fremde Forschungsergebnisse verzerrt wiedergegeben.

Mir ist bekannt, dass Verstöße gegen das Urheberrecht Unterlassungs- und Schadensersatzansprüche des Urhebers sowie eine strafrechtliche Ahndung durch die Strafverfolgungsbehörden begründen kann.

Ich erkläre mich damit einverstanden, dass die Arbeit ggf. mit Mitteln der elektronischen Datenverarbeitung auf Plagiate überprüft werden kann.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form als Dissertation eingereicht und ist als Ganzes auch noch nicht veröffentlicht.

Magdeburg, den 30.07.2024