

**Der Einfluss der neuronalen guidance Proteine
Semaphorin 7A und Plexin C1 auf die granulozytäre
und thrombozytäre Reaktion in der akuten pulmonalen
Inflammation**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Klammer, Lothar Peter

- 2020 -

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Rosenberger

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Feil

Tag der Disputation: 05.10.2020

Inhaltsverzeichnis

1	Abbildungsverzeichnis	6
2	Abkürzungsverzeichnis	7
3	Einleitung	10
3.1	Das zelluläre, angeborene Immunsystem, die akute Inflammation und lokale Mechanismen der Pathogenabwehr	10
3.2	Endotheliale Aktivierung und leukozytäre Migration	12
3.3	Platelet-Neutrophil Complexes (PNCs)	15
3.4	Neutrophil extracellular TRAPs (NETs)	17
3.5	Das akute Lungenversagen (acute respiratory distress syndrome = ARDS)	20
3.6	Neuronale Guidance Proteine (NGP)	22
3.6.1	Semaphorine und Plexine	23
3.6.1.1	Semaphorin 7A (Sema7a) und Plexin C1 (Plxnc1)	27
3.6.1.2	Die Rolle der β 1-Integrine	28
3.7	Wissenschaftliche Hypothesen	28
4	Materialien und Methoden	30
4.1	Verbrauchsgegenstände und labortechnische Gerätschaften	30
4.2	Isolation von PMNs und Thrombozyten aus venösen Blut	31
4.2.1	Blutentnahmen	31
4.2.2	Thrombozytenisolation	31
4.2.3	PMN-Isolation	33
4.3	NET-Essay	34
4.3.1	Grundlagen	34
4.3.2	NET Diff-Quick Färbung	35
4.3.3	Quantifizierung von NET spezifischer NE	37
4.4	Photometrisch quantitative Analysen	38
4.4.1	Grundlagen	38
4.4.2	NE-Aktivitätsbestimmung	39
4.4.3	MPO-Aktivitätsbestimmung	39
4.4.4	Proteingehaltbestimmung	40
4.4.5	Zytokin enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)	40
4.5	Flusskammer live cell Mikroskopie	41
4.5.1	Grundlagen	41
4.5.2	Verfahren	42
4.6	Fluorescence activated cell sorting (FACS)	44
4.6.1	Grundlagen	44

4.6.2	Kompensationen	45
4.6.3	Verfahren - humanes Vollblut.....	46
4.6.4	Antikörper-Templates - humanes Vollblut.....	47
4.6.5	Verfahren - murines Vollblut.....	48
4.6.6	Antikörper-Templates - murines Vollblut.....	48
4.7	Versuche am lebenden Tier	49
4.7.1	Rechtliche Rahmenbedingungen	49
4.7.2	Verwendete Mauslinien.....	49
4.7.3	Murines Modell der LPS induzierten Lungenschädigung.....	50
4.7.4	Lungenentnahme zur histologischen Aufarbeitung	51
4.7.5	Blut- und BAL-Gewinnung von Versuchstieren.....	52
4.8	Histologie	52
4.8.1	Aufarbeitung der histologischen Präparate.....	52
4.8.2	Immunofluoreszenz NET-Färbung	53
4.8.3	Immunhistochemische Färbungen	56
4.9	Cytometric bead Assay (CBA).....	57
4.9.1	Grundlagen	57
4.9.2	Verfahren	58
4.10	Sequentielle PMN-Migrationsanalyse	59
4.10.1	Grundlagen	59
4.10.2	Probengewinnung	60
4.10.3	Durchflusszytometrische Analyse	63
4.11	Multiplate Analyzer TRAP-6 Thrombozytenfunktionstestung	64
4.11.1	Grundlagen	64
4.11.2	Verfahren	64
4.12	Statistische Analyse	65
5	Ergebnisse.....	66
5.1	Etablierung.....	66
5.1.1	Neutrophil-extracellular TRAP Induktion und Quantifizierung.....	66
5.1.2	Immunfluoreszenz NET-Visualisierung <i>in-vivo</i>	68
5.1.3	Quantifizierung von PNCs in humanem Vollblut <i>ex-vivo</i>	69
5.2	Einfluss von Sema7a auf die NET- und PNC-Bildung	72
5.2.1	Stimulation von PMNs mit rhSema7a <i>in-vitro</i>	72
5.2.2	Stimulation von humanem Vollblut mit rhSema7a <i>ex-vivo</i>	73
5.2.3	Pulmonale NETose in Plxnc1 ^{-/-} -Mäusen nach LPS-Inhalation.....	74
5.2.4	Ein Plxnc1 Defizit beeinflusst die PNC-Bildung in murinem Vollblut <i>ex-vivo</i>	75
5.3	Plxnc1 ^{-/-} -Mäuse reagieren auf LPS-Inhalation mit einer gesteigerten inflammatorischen Antwort	77

5.3.1	Immunhistochemische Aufarbeitung der Lungen	77
5.3.2	BAL-Diagnostik	78
5.3.3	Serum-Diagnostik.....	79
5.3.4	Sequentielle Migration von PMNs	81
5.4	Sema7a beeinflusst die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen in humanem Vollblut <i>ex-vivo</i>	82
5.4.1	Sema7a verstärkt zelluläres Rolling im Flusskammer-Modell.....	82
5.4.2	Einfluss von rhSema7a auf die Adhäsionsmolekülexpression.....	84
5.5	Eine Blockade von Sema7a und Plxnc1 hemmt die thrombozytäre Aggregation <i>ex-vivo</i>	87
6	Diskussion	88
6.1	Sema7a und Plxnc1 als Akteure der NETose und PNC-Bildung.....	88
6.2	Die inflammatorische Reaktion von Plxnc1 ^{-/-} gegenüber inhalativer LPS Exposition.....	90
6.3	Endovaskuläre Funktionen von Sema7a und Migrationsverhalten von PMNs in Plxnc1 ^{-/-}	93
6.4	Einfluss von rhSema7a auf die Oberflächenmolekülexpression.....	95
6.5	Interaktion von Sema7a, Plxnc1 und β 1-Intergrinen im Kontext der akuten Inflammation	96
6.6	Rolle von Sema7a, Plxnc1 und β 1-Intergrinen auf die thrombozytäre Aggregation.....	96
6.7	Probleme und Limitationen dieser Studie.....	98
6.8	Aussichten.....	99
7	Zusammenfassung	101
8	Veröffentlichungen	103
9	Literaturverzeichnis.....	104
10	Erklärung zum Eigenanteil	115
11	Danksagung.....	116
12	Lebenslauf	118

1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Endotheliale Aktivierung und leukozytäre Interaktion	12
Abbildung 2 Endovaskuläres Crawling und Extravasation	14
Abbildung 3 Schematische Darstellung der PNC Bindung	16
Abbildung 4 Schematischer Ablauf der NETose.....	18
Abbildung 5 Die Semaphorin Proteinfamilie	24
Abbildung 6 Übersicht der Semaphorin Rezeptoren	26
Abbildung 7 Versuchsablauf: Thrombozytenisolation.....	31
Abbildung 8 Versuchsablauf: PMN-Isolation	33
Abbildung 9 Versuchsablauf: NET Diff-Quick Färbung.....	35
Abbildung 10 Versuchsablauf: Quantifizierung von NET-NE.....	37
Abbildung 11 Versuchsablauf: ELISAs.....	40
Abbildung 12 Schematischer Aufbau der Flusskammer.....	42
Abbildung 13 Versuchsablauf: FACS - humanes Vollblut.....	46
Abbildung 14 Versuchsablauf: FACS - murines Vollblut.....	48
Abbildung 15 Versuchsablauf: LPS-Inhalation	50
Abbildung 16 Versuchsablauf: IF NET-Färbung	53
Abbildung 17 Versuchsablauf: IHC-Färbung	56
Abbildung 18 Versuchsablauf: CBA	58
Abbildung 19 Versuchsablauf: Probengewinnung	60
Abbildung 20 Versuchsablauf: FACS Analyse.....	63
Abbildung 21 Neutrophile extrazelluläre TRAP Induktion und Quantifizierung <i>in-vitro</i>	66
Abbildung 22 NET Quantifizierung durch Immunfluoreszenz <i>in-vivo</i>	69
Abbildung 23 PNC Induktion und Quantifizierung in humanem Vollblut	71
Abbildung 24 Stimulation von humanen PMNs mit rhSema7a <i>in-vitro</i>	72
Abbildung 25 Einfluss von rhSema7a auf die PNC-Formation in humanem Vollblut	73
Abbildung 26 Pulmonale NETose in Plxnc1 ^{-/-} -Mäusen nach LPS-Inhalation....	74
Abbildung 27 PNC-FACS-Analyse von murinem Blut nach LPS-Inhalation	76
Abbildung 28 Immunhistochemische Darstellung von Plxnc1 ^{-/-} Lungen nach LPS-Inhalation.....	77
Abbildung 29 BAL-Diagnostik von Plxnc1 ^{-/-} und WT nach LPS-Inhalation	78
Abbildung 30 Serum-Diagnostik von Plxnc1 ^{-/-} und WT Mäusen nach LPS-Inhalation.....	80
Abbildung 31 Sequentielle PMN-Migration in Plxnc1 ^{-/-} nach LPS-Inhalation	81
Abbildung 32 Flusskammer-Modell des granulozytären Rolling	83
Abbildung 33 Einfluss von rhSema7A auf die Adhäsionsmolekülexpression in humanem Vollblut <i>ex-vivo</i>	86
Abbildung 34 Multiplate Analyse der Thrombin induzierten Aggregation	87

2 Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ALI	<i>acute lung injury</i>
AMPs	antimikrobielle Peptide
APC	Allophycocyanin
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
Art.-Nr.	Artikelnummer
AU	<i>aggregation units</i>
BAL	broncho-alveoläre Lavage
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BSA	bovines Serum Albumin
CBA	<i>cytometric bead assay</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cu ²⁺	bivalentes Kupfer Kation
DAMPs	<i>damage associated molecular patterns</i>
DAPI	Diamidin-2-phenylindol
DCC	<i>deleted in colorectal carcinoma</i>
DZs	Dendritische Zellen
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Forward-Scatter
GAP	GTPasen aktivierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulation factor</i>
GPCR	<i>G protein coupled receptor</i>
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPIb	Glykoprotein Ib
GPIIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ O _{aq.dest}	destilliertes Wasser
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HCl	Salzsäure
HMGB-1	<i>high mobility group box-1</i>
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
ICAM-2	<i>intercellular adhesion molecule 2</i>
IgG	Immunglobulin gamma
IgG ₁ Fc	Immunglobulin gamma-1 mit Fc-Fragment
IL-10	Interleukin 10
IL-1β	Interleukin 1β
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
INFγ	Interferon γ
IPT	Immunglobulin-Plexin-Transkription-Domäne

JAMs	<i>junctional adhesion molecules</i>
KGW	Körpergewicht
LFA-1	<i>lymphocyte function antigen 1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
Ly6B	<i>lymphocyte antigen 6 complex locus B</i>
Mac-1	<i>macrophage-1 antigen</i>
MAP-Kinase	<i>mitogen activated protein Kinase</i>
MHC-II	<i>major histocompatibility complex II</i>
MPO	Myeloperoxidase
NaCl	isotonische Kochsalzlösung
NE	Neutrophile Elastase
NET	<i>neutrophile extracellular TRAP</i>
NGPs	<i>neuronal guidance proteins</i>
NKZs	Natürliche Killerzellen
NLRs	<i>NOD-like receptors</i>
N-MeOSuc-AAPV-pNA	<i>N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide</i>
OD	optische Dichte
PacBlue	<i>Pacific Blue</i>
PAD4	Peptidylarginin Deiminase 4
PAMPs	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PAR-1	Protease-aktivierter-Rezeptor 1
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule 1</i>
PeCy-7	Phycoerythrin-Cy-7 tandem Konjugat
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PF-4	<i>platelet-factor-4</i>
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
Plxnc1	Plexin C1
Plxnc1 ^{-/-}	Plexin C1-Knockout Mäuse
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMNs	<i>polymorphonuclear neutrophils</i>
PMTs	photomultiplier Tubes
PNCs	<i>platelet-neutrophil-complexes</i>
PRP	<i>platelet-rich plasma</i>
PRRs	<i>pattern recognition receptors</i>
PSGL-1	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin-Domäne
RGB	Rho GTPasen Bindungsstelle
RGMa	<i>repulsive guidance molecule a</i>
rhSema7a	rekombinantes humanes Sema7a
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
Sema7a	Semaphorin 7A

SemaV	virales Semaphorin
SSC	Side-Scatter
TEM	transendotheliale Migration
Tim-2	<i>T-cell Ig and mucin domain containing protein 2</i>
TLRs	<i>toll-like receptors</i>
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRAP-6	Thrombin-Rezeptor-Aktivierendes-Peptid 6
VCAM1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VESPR	<i>viral encoded semaphorin protein receptor</i>
VLA-4	<i>very late antigen 4</i>
WT	C57BL/6 Wildtyp Mäuse
xg	Vielfaches der Erdanziehungskraft
ZNS	zentrales Nervensystem

3 Einleitung

3.1 Das zelluläre, angeborene Immunsystem, die akute Inflammation und lokale Mechanismen der Pathogenabwehr

Lebende Organismen stehen permanent in Interaktion mit ihrer Umwelt. Dabei ist eine funktionierende Abwehr essentiell um potentielle Schädlinge, wie Bakterien, Viren, Pilze oder mehrzellige Parasiten zurückzuweisen. Schon einfache Lebensformen sind hierfür mit Zellwänden, antimikrobiellen Peptiden (AMPs), Antibiotika und weiteren intrazellulären Systemen zur Erkennung von Fremd-DNA/-RNA ausgestattet [1]. Frühe wirbellose Organismen entwickelten die ersten *pattern recognition receptors* (PRRs) in Form von intrazellulären *NOD-like receptors* (NLRs) und transmembranären *toll-like receptors* (TLRs). Deren Funktion besteht darin *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) und *damage associated molecular patterns* (DAMPs) zu erkennen und dadurch zellulären Stress im Sinne von viralem, oder bakteriellem Befall sowie Zelluntergängen bekämpfen zu können [2, 3].

Im Zusammenspiel mit den ersten immunkompetenten Zellen entstand so die Fähigkeit zielgerichtete Antworten wie Enkapsulierung, Phagozytose oder Freisetzung von AMPs bei Erkennung von PAMPs oder DAMPs einzuleiten [4]. Dieser Mechanismus bildet die zelluläre Grundlage des angeborenen Immunsystems und hat sich im Laufe der Evolution auf hochspezialisierten Zelltypen verteilt. Zu diesem zählen gewebeständige Makrophagen, dendritischen Zellen (DZs) und Mastzellen, aber auch neutrophilen Granulozyten, Monozyten und natürliche Killerzellen (NKZs) [1, 5, 6].

Makrophagen und Monozyten können in beinahe jedem Organsystem angetroffen werden und scannen dort nach PRR Liganden und erfüllen homöostatische Aufgaben [7]. Kommt es zur Aktivierung, beginnen sie augenblicklich zu phagozytieren und aufgenommene Antigene über den *major histocompatibility complex II* (MHC-II) zu präsentieren [8]. Für die erfolgreiche Abwehr sind sie jedoch auf die Rekrutierung von weiteren Zellen angewiesen. Hierfür werden inflammatorische Mediatoren wie Tumor Nekrose Faktor α (TNF α), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6), sowie Histamine und Interferon γ (INF γ) in das umliegende Parenchym freigesetzt [9, 10]. Dies erfüllt,

neben der Sensibilisierung von weiteren gewebeständigen Immunzellen, die Aktivierung von Endothelzellen, welche hierauf mit einer Steigerung der Gefäßpermeabilität reagieren [11]. Durch einschwemmendes Wasser kommt es zur Ödembildung und nachfolgend zur Extravasation von neutrophilen Granulozyten (*polymorphonuclear neutrophils* = PMNs) (siehe 3.4). Diese setzen antimikrobielle Substanzen, wie die neutrophilen Elastase (NE), Myeloperoxidase (MPO), Lysozym und Defensine frei [12]. Darüber hinaus sind sie zur Phagozytose fähig [13] und können die Rekrutierung weiterer Leukozyten durch Ausstoßung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-1 β , IL-6 und CXCL2 beeinflussen [14]. In aktiven Entzündungsherden streben sie so durch breitflächige Sterilisation des Areal Keimfreiheit an. Dieser Prozess findet eine Kehrtwende, wenn apoptotische, nicht lytische PMNs von Makrophagen erkannt und phagozytiert werden. Hierdurch wird ein Wechsel von pro- hin zu anti-inflammatorischer Zytokinsekretion (zum Beispiel IL-10 und TGF- β) eingeleitet [15]. Es kommt zur Hemmung der Migration zusätzlicher PMNs. Weiter beginnen Makrophagen mit der Beseitigung von abgestorbenen Zellen und leiten so die Resolution der Entzündung ein [15].

Betont werden muss an dieser Stelle die Bedeutung einer exakten Regulation aller beteiligten Zellpopulationen. Aus der Unspezifität granulozytären Wirkens resultiert im Rahmen einer Immunreaktion unumgänglich ein kollateraler Gewebeschaden, dessen Ausmaß fatale Folgen haben kann [16]. Paradebeispiele hierfür sind virale Pneumonien oder septisch verlaufende Infektionen, bei denen eine unkoordinierte Überreaktion, ein sogenannter Zytokinsturm, in lebensbedrohlichen Krankheitsbildern gipfelt [17, 18]. Daneben steht eine inadäquate Rekrutierung von PMNs im Zentrum des Pathomechanismus von autoimmun entzündlichen Erkrankungen, beispielhaft derer des rheumatischen Formenkreises [19], oder neurologischer Autoimmunerkrankungen [20]. Zuletzt kann eine nicht ausreichend limitierte lokale Entzündungsreaktion den Regenerationsprozess verhindern und in einer exzessiven Bildung von Narbengewebe und dadurch zum Funktionsverlust führen [21].

Die Beeinflussung der inflammatorischen Prozesse des angeborenen Immunsystems ist ein attraktives Ziel für Therapieansätze. Herausforderung bleibt nach wie vor die Balance aus effektiver Hemmung der Entzündung und Stimulation der Regeneration mit der einhergehenden Anfälligkeit gegenüber Infektionen zu finden [22].

3.2 Endotheliale Aktivierung und leukozytäre Migration

Ist die lokale Reaktion der gewebsständigen, immunkompetenten Zellen auch von zentraler Bedeutung in der Erkennung sowie Verteidigung gegen Pathogene, so ist ihre Kapazität und Kompetenz im Umgang mit diesen beschränkt. Deswegen ist der Organismus für eine effektive Abwehrfunktion zwingend auf die Rekrutierung von Leukozyten an den Entzündungsherd angewiesen. Postkapilläre Venolen stellen im Rahmen einer akuten Entzündung den primären Schauplatz der leukozytäre Rekrutierung dar [23].

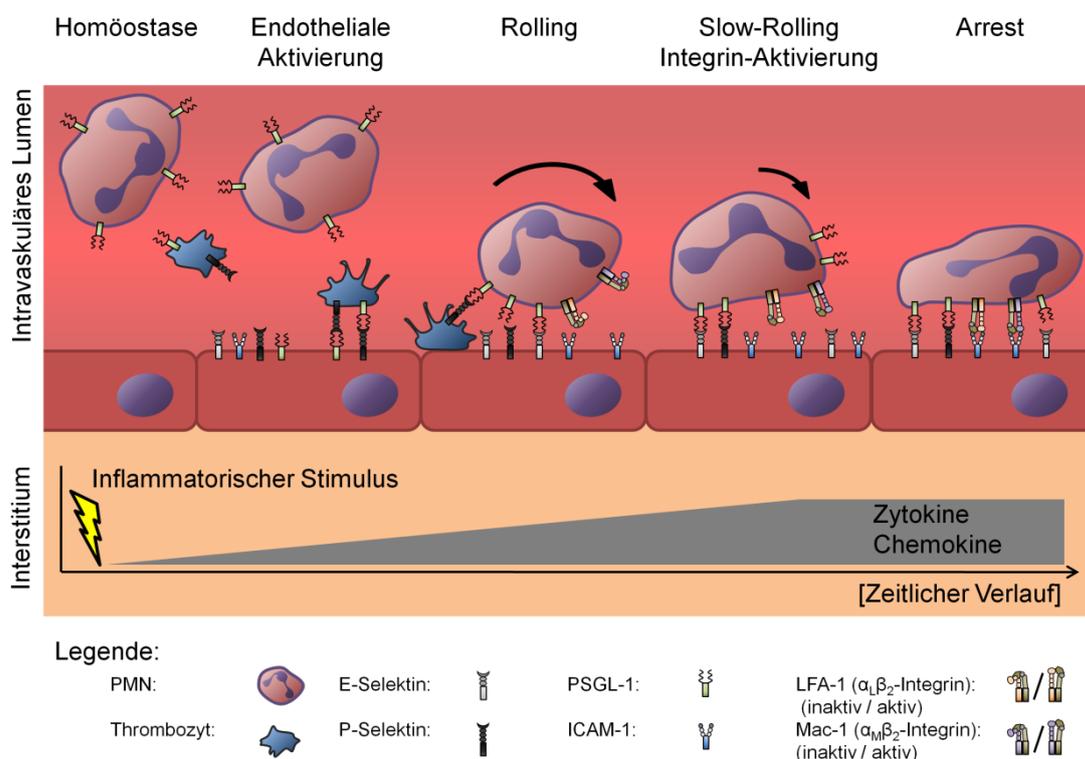


Abbildung 1 Endotheliale Aktivierung und leukozytäre Interaktion

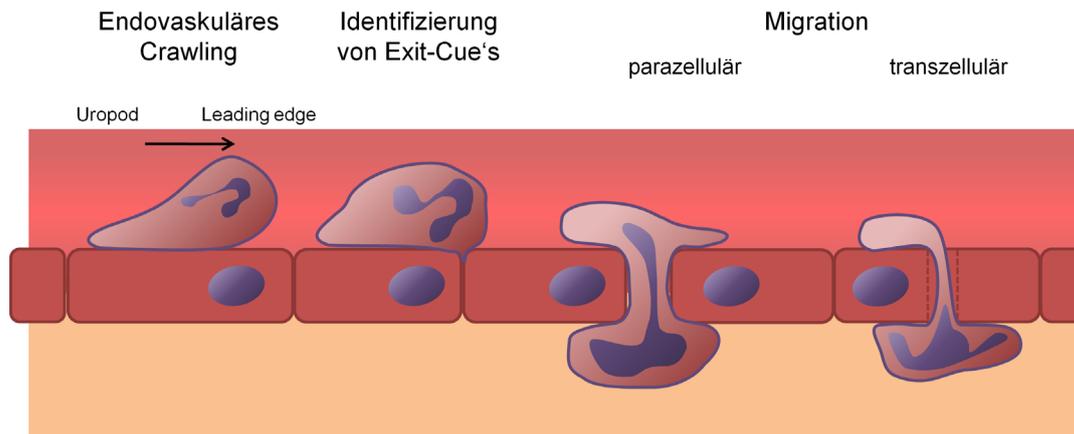
Schematische Darstellung der endothelialen Interaktion von Leukozyten, Thrombozyten und den zentralen Adhäsionsmolekülen [24-26].

Diese wird unter anderen vermittelt durch die Exposition gegenüber proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-1 β , dem akute Phase Protein CRP, synthetisiert in der Leber nach Kontakt mit IL-6, oder direkter Exposition gegenüber LPS [27]. Speziell TNF α und IL-1 β stehen im zeitlichen Verlauf dieses Prozesses an vorderster Stelle und werden von gewebeständigen Makrophagen sezerniert, welche in Kontakt mit PAMPs oder DAMPs gekommen sind [11]. Endotheliale Zellen reagieren hierauf mit einer luminalen Expression von E-Selektin [28], P-Selektin [29], sowie dem *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1) [30, 31] (siehe Abbildung 1).

Thrombozyten können nun durch die eigene Expression von P-Selektin und PSGL-1 mit dem Endothel in Verbindung treten und verstärken damit das Migrationssignal für PMNs und andere Zellen [31]. Granulozyten erkennen das reiche Angebot an Selektinen und können eine initiale Verbindung mit dem Endothel eingehen, welche sich durch eine rollende Bewegung entlang der Gefäßwand äußert. Die Zellen nutzen ebenfalls PSGL-1, durch dessen Bindung mit Selektinen ein sogenanntes *outside-in signaling* angestoßen und eine Konformationsänderung der β 2-Integrine ($\alpha_L\beta_2$ = *lymphocyte function antigen 1* = LFA-1 und $\alpha_M\beta_2$ = *macrophage -1 antigen* = Mac-1) auf ihrer Oberfläche induziert wird [32]. Durch intrazelluläre Kaskaden kommt es zur Aktivierung und Bindung von Talin-1 an die intrazelluläre Domäne der Integrin- β_2 -Untereinheit. Daraus resultiert die Entfaltung der Bindungsstelle (sogenanntes *inside-out signaling*) in einen intermediären Affinitätszustand des *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1), welches vom Endothel exprimiert wird [33]. Durch den zusätzlichen Einfluss von Chemokinen, wie endothelial exponiertem CXCL1 und dessen Bindung an CXCR2, wird die zusätzliche intrazelluläre Bindung von Kindlin-3 angeregt [34, 35]. Dieses bewirkt in Kombination mit Talin-1 den Übergang der Integrine in den Zustand der höchsten Affinität, wodurch die Zellen zunehmend verlangsamen (sogenanntes *Slow-Rolling*). Diesen Prozessen schließt sich die Interaktion des $\alpha_4\beta_1$ Integrin, auch *very late antigen 4* (VLA-4) genannt, mit dem *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM1) an [36,

37], wodurch der Leukozyt in Zusammenspiel mit ICAM-1 schließlich am Endothel zum Stillstand (= Arrest) kommt [38].

Jetzt stehen die Zellen vor der Herausforderung, sich innerhalb des Blutstromes hin zu endothelialen Austrittspunkten zu bewegen.



Beteiligte Akteure:

GPCR - GTPasen	ICAM-1 / VCAM-1 Cluster	VE-Cadherin	
Chemokingradienten (CXCR2 – CXCL1)		LFA-1 / Mac-1 - ICAM-1	LFA-1 / Mac-1 - ICAM-1
LFA-1 / Mac-1 - ICAM-1		VLA-4 / VCAM-1	VLA-4 / VCAM-1
LFA-1 / Mac-1/ ICAM-1		PECAM-1	PECAM-1
VLA-4 / VCAM-1		CD99	CD99
		JAMs	JAMs

Abbildung 2 Endovaskuläres Crawling und Extravasation

Schematische Darstellung des endovaskulären Crawling hin zu Exit-Cues mit anschließender TEM, para- oder transzellulär [23, 25, 39]. Darunter aufgelistet sind beteiligte Adhäsionsmoleküle und Proteine [24, 40, 41].

Dieser Prozess, der als Crawling bezeichnet wird (siehe Abbildung 2), ist abhängig von einem streng regulierten Ausmaß an zytoskelettaler Reorganisation [25]. Verantwortlich dafür sind erneut Integrine und eine durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (*G protein coupled receptor* = GPCR) vermittelte GTPasen-Aktivität [42]. GPCRs werden durch Chemokine wie CXCR2 aktiviert und orientieren die Zelle durch Konzentrationsverhältnisse zum Herd der Entzündung [43]. Es kommt zur Polarisierung innerhalb der neutrophilen Granulozyten. Diese geht einher mit der Umverteilung von

Integrinen aus einem retraktiven Pol (Uropod) an den führenden Pol (*leading edge*) [44]. Durch die Polarisation sind die Zellen in der Lage Bewegungen selbst entgegen der Blutströmung auf der Suche nach Austrittspunkten (*exit cues*) durchzuführen [45], welche das Endothel durch Anhäufungen von ICAM-1 und VCAM-1 markiert [46, 47].

Dort angelangt führt die Bindung der neutrophilen Adhäsionsmoleküle durch eine Reihe von *outside-in signaling* zur Öffnung der endothelialen Barriere durch lokale Reorganisation und Internalisation von VE-Cadherin [48] sowie den *junctional adhesion molecules* (JAMs) [49]. Durch die Bindung von *platelet endothelial cell adhesion molecule 1* (PECAM-1) sowie CD99, welche an der junctionalen Grenze zwischen zwei Endothelzellen exprimiert werden [50], drängt sich der PMN durch die entstandene Öffnung und gelangt so in das Interstitium [51]. Diesersogenannten parazelluläre transendotheliale Migration (TEM) steht die transzellulären TEM gegenüber. Hierbei stehen erneut Interaktionen von ICAM-1, VCAM-1, JAMs, PECAM-1 und CD99 im Vordergrund, ohne dass es dabei zu einer Öffnung der VE-Cadherin Bindung kommt [52] und die Zellen das Gefäß durch eine Endothelzelle hindurch verlassen. Diese Form der Extravasation scheint physiologisch nur für einen Bruchteil der Zellen innerhalb der peripheren Zirkulation relevant zu sein [40] und soll daher an dieser Stelle nicht weiter vertieft werden.

3.3 Platelet-Neutrophil Complexes (PNCs)

Thrombozyten sind die zentralen Akteure der zellulären Blutgerinnung und dabei spezialisiert auf Interaktionen mit der extrazellulären Matrix, aktivierten Endothelzellen und Fibrinpolymeren. Das Aufbauen eines stabilen Netzwerkes an einer Endothelläsion, sowie die Bindung und Aktivierung der Proteine der Gerinnungskaskade, sind dabei unabdingbare Bausteine der Hämostase. Durch Einfangen von Erythrozyten und Leukozyten [53, 54] können Leckagen abgedichtet und Blutverluste minimiert werden. Darüber besitzen Thrombozyten Eigenschaften, die klassischer Weise Zellen des Immunsystems zugesprochen werden. Blutplättchen besitzen Rezeptoren für Faktoren des Komplementsystems [55], können Fremdkörper phagozytieren [56] und sind in

der Lage chemotaktische Mediatoren, wie *platelet-factor-4* (PF-4) und Metabolite der Arachidonsäure, freizusetzen [57, 58]. So sind sie durch P-Selektin Exposition mitverantwortlich für eine zielgerichtete Migration von PMNs in entzündetes Gewebe [59] (siehe 3.2).

Daneben können aktivierte Thrombozyten auch mit zirkulierenden PMNs interagieren und mit diesen in eine funktionelle Einheit übergehen [60, 61] (schematisch dargestellt in Abbildung 3). Im Zusammenhang mit PMNs spricht man hierbei von sogenannten *platelet-neutrophil-complexes* (PNCs), einer Formation, die durch die Bindung von thrombozytärem P-Selektin an granulozytäres PSGL-1 initiiert wird [62].

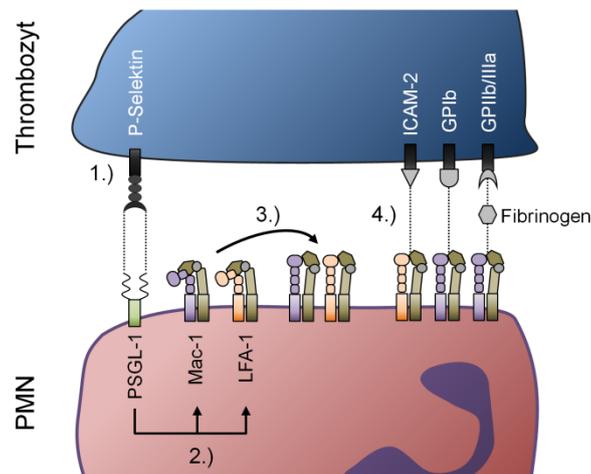


Abbildung 3 Schematische Darstellung der PNC Bindung

Vereinfachtes Schaubild des zeitlichen Ablauf der Interaktion von PMNs und Thrombozyten zur Bildung eines PNCs sowie beteiligter Oberflächenmoleküle [60, 63, 64].

Durch *outside-in signaling* werden intrazelluläre Kaskaden in Gang gesetzt, welche β_2 -Integrine, Mac-1, sowie LFA-1 aktivieren. Ruhend liegen die extrazellulären Domänen in einem gefalteten Zustand vor, welche nicht in der Lage sind Liganden zu binden [65]. Die Aktivierung ist notwendig, damit LFA-1 *intercellular adhesion molecule 2* (ICAM-2) [66], Mac-1 Glykoprotein Ib (GPIb) [63] direkt, oder Fibrinogen vermittelt Glykoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa) binden

kann [64]. Durch die Integrinbindungen entsteht eine stabile Verbindung, welche den endgültigen PNC darstellt.

Funktionell betrachtet wird durch die Komplexbildung die Fähigkeit der Extravasation des PMNs verstärkt [67] und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species* = ROS) gesteigert [68, 69]. Des Weiteren zeigen PMNs eine erhöhte Phagozytoserate [69] und werden darüber hinaus durch die Bindung von P-Selektin zur Formation von *neutrophil extracellular TRAPs* (NETs) angeregt [70].

PNCs stellen somit eine hochaktive Subpopulation an PMNs dar, deren Einfluss bereits in bakteriellen und aseptischen, ebenso wie akut und chronisch inflammatorischen Prozessen wie Sepsis [71], myokardialer Ischämie und Reperfusionstraumata [72], akuter Lungenschädigung [73, 74], sowie den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [75] gezeigt werden konnte.

3.4 Neutrophil extracellular TRAPs (NETs)

PMNs sind die erste Front der zellulären Antwort des angeborenen Immunsystems auf inflammatorische Stimuli und hierfür ausgestattet mit einem breiten Arsenal an Fähigkeiten um aktiv in den Entzündungsprozess einzugreifen. Dabei folgen sie PRR getriggerten Signalen, um den Blutkreislauf zu verlassen und zielgerichtet in geschädigtes Gewebe zu migrieren (siehe 3.2). Hier bekämpfen sie Pathogene durch Phagozytose sowie das Sezernieren von antimikrobiellen Substanzen und die Rekrutierung weiterer Immunzellen mittels Zytokinausschüttung (siehe 3.1).

Jüngere Arbeiten haben eine weitere, in ihren Grundzügen außerordentliche Form der neutrophilen Abwehr entdeckt, die auf der Externalisierung von dekondensierter DNA beruht (siehe Abbildung 4). Das Phänomen wurde erstmals 2004 von Brinkmann *et al.* [76] beschrieben und ist unter dem Begriff der *neutrophil extracellular TRAPs* (NETs) ein zentrales Thema der aktuellen Forschung geworden. Die ausgeworfene DNA nimmt dabei netzartige Strukturen an und ist in der Lage Mikroben einzufangen und zu eliminieren [77, 78]. Die Grundlage hierfür liegt in der Beschaffenheit der NETs, welche bestückt sind mit einer Vielzahl der Granulakomponenten, allen voran NE und

MPO, aber auch Cathepsin G, Defensinen und Lysozymen [79]. Das DNA Gerüst dieser Strukturen ist zusätzlich durchsetzt mit Histonen, für welche ein starkes antimikrobielles Potential nachgewiesen wurde [80]. Bemerkenswert ist hierbei eine intakte endovaskuläre Aktivität dieser Enzyme ungeachtet der Gegenwart von inhibitorisch wirkenden Plasmaproteinen [81].

Voraussetzung für die NET-Bildung ist die Aktivierung von PMNs durch adäquate Stimuli [82]. Als solche identifiziert wurden unter anderem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), pro-inflammatorische Zytokine [83], Bakterien und deren Komponenten, wie Lipopolisaccharide (LPS) [84, 85], Pilze [78], Viren [86], sowie aktivierte Thrombozyten [78]. Am Beispiel von PMA sollen die intrazellulären Mechanismen der NET-Bildung verdeutlicht werden.

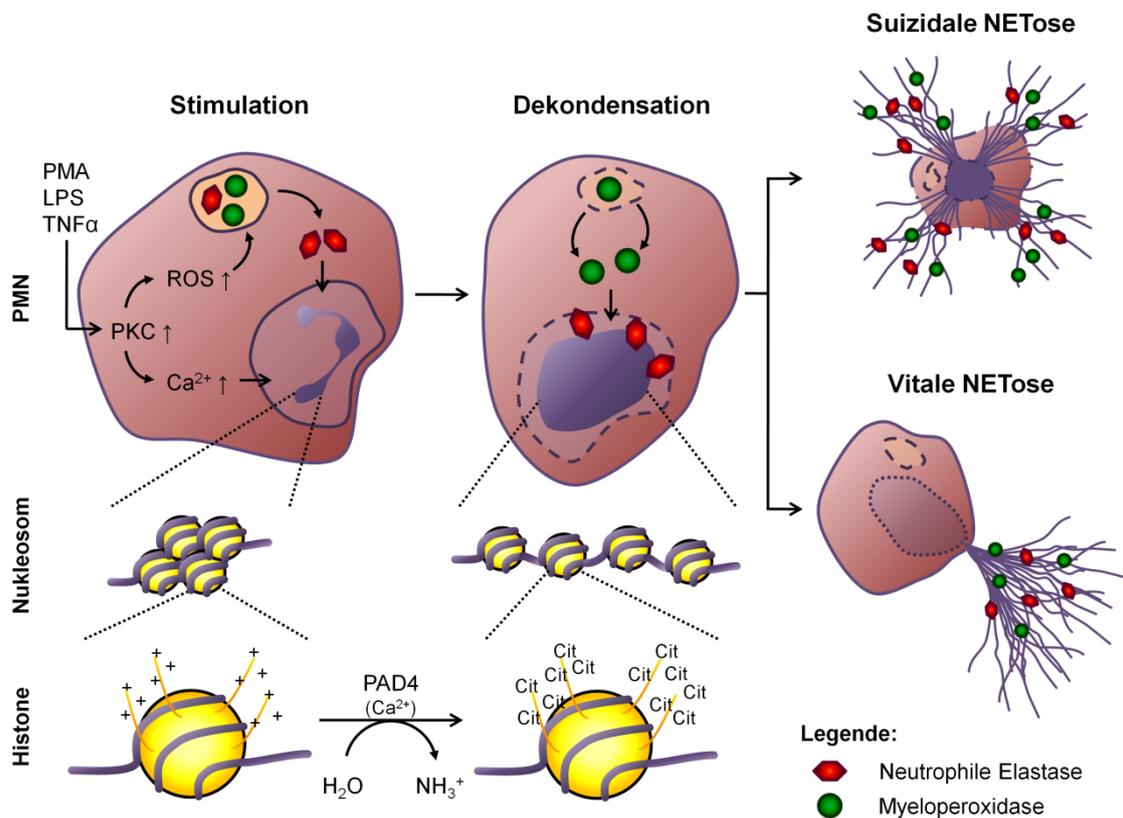


Abbildung 4 Schematischer Ablauf der NETose

Schematischer Ablauf der NETose am Beispiel der PMA-Stimulation. Nach der Aktivierung durch PMA, werden sowohl die intrazelluläre Kalzium-Konzentration als auch die ROS-Produktion erhöht. Kalzium bildet die Grundlage zur Citrullinierung von Histonen durch PAD4 und der Dekondensation von DNA [87].

ROS führen zur Liberalisation von NE aus Granula, welche die Dekondensation der DNA fördert und durch die zusätzliche Freisetzung von MPO diesen Prozess amplifiziert. Der skizzierte Ablauf gipfelt in der Lyse des PMNs und wird als

suizidale NETose bezeichnet. Dem gegenüber steht die vitale NETose, bei welcher die DNA letztlich in Vesikeln aus der Zelle geschleust wird und eine intakte Zelle erhalten bleibt [88].

Durch das Stimulans kommt es zu einer Proteinkinase C (PKC) Aktivierung, die eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration herbeiführt [89]. Diese wiederum aktiviert die nukleäre Peptidylarginin Deiminase 4 (PAD4), welche eine Citrullinierung von Histonen und damit eine Dekondensation der DNA durch das Entfernen von positiven Ladungen bewirkt [87]. Dieser Schritt konnte als essentielle Voraussetzung einer suffizienten NET-Bildung identifiziert werden [90-92]. Zeitgleich führt die PMN Aktivierung zur Bildung von ROS, die eine selektive Freisetzung von NE aus den α -Granula in das Zytoplasma nach sich zieht [93]. Von hier aus wandert das Enzym in den Zellkern, wo es durch Histonabspaltung eine weitere Dekondensation fördert und sich an die DNA bindet. Nachgeschaltet wird MPO freigesetzt und dadurch der Prozess zusätzlich amplifiziert [93]. Es kommt zu einer deutlichen Vergrößerung des Zellkerns, bis der PMN rupturiert und das NET ausgeworfen wird.

PKC unabhängige Mechanismen sind für andere Stimuli beschrieben worden, sodass von mehreren Kaskaden ausgegangen werden muss, die für die NET Bildung verantwortlich sind. Da viele Arbeiten teils widersprüchliche Aussagen bezüglich der Bedeutung von ROS, Ca^{2+} , PAD4, NE und MPO [94, 95] treffen, muss eine klare Zuordnung einzelner Akteure das Thema zukünftiger Arbeiten bleiben.

Der im Vorausgegangenen beschriebene Prozess setzt den lytischen Untergang des PMNs voraus, um eine Freisetzung der DNA zu bewirken. Initial wurde dieser Vorgang daher mit einer eigenständigen Form des Zelltodes assoziiert und als suizidale NETose bezeichnet [96, 97]. Dem gegenüber konnte die sogenannte vitale NETose, beschrieben werden, wobei PMNs ihre DNA in Vesikeln aus der Zelle schleusen und als lebendige Zelle verbleiben [88]. Es bleibt kontrovers, welche physiologische Bedeutung innerhalb des Organismus beide Formen der NETose einnehmen [97]. Fortlaufend wird daher nur an den Stellen zwischen suizidaler und vitaler NETose unterschieden, wo diese Einteilung auch sinnvoll erscheint.

Das große antimikrobielle Potential der NETs geht einher mit einer möglichen Gefährdung des Organismus. Die zielgerichtete Induktion von NETs ist hierbei genauso von Bedeutung wie ein adäquater Abbau und die Beseitigung der DNA Reste nach Ablauf der NETose. Bei einer in-vitro Stabilität der NETs von über 90 Stunden sind DNasen hierfür verantwortlich [98]. Gleichzeitig nutzen einige Bakterien Endonukleasen um NETs zu entkommen [99, 100]. Eine Einschränkung der körpereigenen DNase Aktivität konnte im Rahmen multipler autoimmuner Erkrankungen nachgewiesen werden [98]. Darüber hinaus stehen NETs in Zusammenhang mit Lungenentzündungen, sowohl pathogenem [101], als auch mechanischem Ursprungs durch künstliche Beatmung [102], Ischämie-Reperfusionsschäden [103-105], sowie Organschädigungen im Rahmen septischer Geschehen [106, 107] und thrombotischer Ereignisse [108].

3.5 Das akute Lungenversagen (*acute respiratory distress syndrome* = ARDS)

Das *acute respiratory distress syndrome* (ARDS) ist definiert als eine innerhalb einer Woche auftretende respiratorische Insuffizienz auf dem Boden einer pulmonalen Schädigung (*acute lung injury* = ALI) variabler Genese. Besonders der akute Progress sowie beidseitig diffuse Infiltrate der Lunge unter Ausschluss einer kardialen Ursache zählen zu den klassischen Zeichen und der Definition dieses schweren Krankheitsbildes [109]. Unterteilt wird das ARDS ätiologisch in ein pulmonales ARDS, beispielhaft verursacht durch Pneumonien, thoraxchirurgischen Eingriffen und Lungentraumata, sowie ein extrapulmonales ARDS verursacht durch Bluttransfusionen, nicht-pulmonale Sepsis und unerwünschten Arzneimittelwirkungen [110].

Die Inzidenz des Krankheitsbildes wird angegeben mit 1,5 bis 79 Fällen pro 100.000 Einwohnern, wobei geografische Einflüsse in diese Statistiken einfließen [111]. Bei einer seit dem Ende des zwanzigsten Jahrhunderts trotz vieler Bemühungen der Therapieoptimierung annähernd unverändert hohen Mortalität von 40-45% stellt diese schwerste Form des Lungenversagens weiterhin eines der bedeutendsten Krankheitsbilder der Intensivmedizin dar [112].

Der zugrunde liegende Pathomechanismus wird in drei Phasen unterteilt. Die Erste ist charakterisiert durch eine rasch einsetzende Steigerung der Kapillarpermeabilität, wodurch es zum Austritt von Flüssigkeit ins Lungenparenchym und als Folge zur Ausbildung eines interstitiellen Lungenödems (exsudative Phase) kommt [113]. Der Übertritt des Ödems in den Alveolarraum bestimmt die zweite Phase welche einher geht mit einem eingeschränkten Gasaustausch [114] sowie einem durch einströmende Plasmaproteine bedingtem Funktionsverlust des Surfactant [115] und der Migration von neutrophilen Granulozyten [116] (detailliert in 3.1 sowie 3.2). Surfactant ist verantwortlich für die Reduktion der alveolären Oberflächenspannung und essentiell um ein Kollabieren der Atemwege zu verhindern [117]. Im zeitlichen Verlauf setzen Umbauprozesse des Parenchyms ein, die zur irreparablen Schädigung der Lunge im Sinne einer Fibrose führen können (proliferative Phase) [118].

PMNs kommen hierbei eine zentrale Rolle in der Entstehung der Organschädigung zu. Durch ihr inertes Bestreben den Entzündungsfokus zu beseitigen verursachen sie über die Freisetzung von antimikrobiellen Substanzen ein hohes Ausmaß an Kollateralschaden [119, 120]. Weiter konnte gezeigt werden, dass durch Hemmung der granulozytären Aktivität der Schweregrad einer Lungenschädigung in experimentellen Versuchen gesenkt werden konnte [121].

Todesursache im Rahmen eines ARDS wird in den seltensten Fällen einem inkompensierbaren respiratorischen Versagen zugeschrieben [122], sondern steht am häufigsten im Zusammenhang eines Multiorganversagen im Kontext septischer Vorgänge [123].

Die exakte Regulation von pro- sowie anti-inflammatorischen Signalen des Immunsystems wird daher neben der kausalen Therapie des ARDS und supportiven Maßnahmen als Schlüssel einer erfolgreicherer Behandlung der Erkrankung angesehen [124, 125].

3.6 Neuronale Guidance Proteine (NGP)

Als Schaltstelle elektrischer und elektrochemischer Signale bilden Neurone mit ihren Milliarden an synaptischen Verbindungen eine hochspezialisierte Zellpopulation innerhalb eines Organismus. Die Kommunikation durch Neurotransmitter inner- und außerhalb des Nervensystems, sensorisch, motorisch sowie vegetativ an Zielorganen steht dabei an zentraler Stelle.

Nervenzellen bestehen aus dem Zellkörper (Soma), einem Zellkern (Nukleus), einer variablen Anzahl afferenter Dendriten, sowie einem efferenten Axon, welches die Fortleitung eines Aktionspotenziales bis hin zur präsynaptischen Endigung ermöglicht. Die reibungslose Erregungsausbreitung entlang des Axons ist dabei genauso essentiell für die Funktionalität wie eine während des neuronalen Wachstums präzise angelegte Verknüpfung der synaptischen Endköpfchen. Vor dem Hintergrund, dass menschliche Axone eine Länge von bis zu einem Meter erreichen können und damit auf zellulärer Ebene Distanzen von astronomischen Dimensionen überbrücken, wurden 1892 bereits von dem spanischen Neuroanatom Ramon y Cajal Mechanismen theoretisiert, die ein solch koordiniertes Wachstum ermöglichen konnten [126]. Über viele Jahre weiter ausgebaut, formte sich aus der Idee des axonalen Wachstumkegels, ein Konzept der Chemoattraktion [127]. 1990 wurden Gene identifiziert, die neuronales Wachstum maßgeblich beeinflussen [128]. Weiterführend erkannte man ein filigranes Zusammenspiel aus Chemoattraktion, aber auch –repulsion [129, 130], bevor die Gruppe der Netrine 1994 sowie die Semaphorine 1993 als die ersten *neuronal guidance proteins* (NGPs) entdeckt wurden [131, 132]. Innerhalb eines Jahrzehnts wurde ein breites Spektrum an NGP-Familien, sowie –Subtypen und deren Rezeptoren (SLIT [133], Neogenin [134, 135], *repulsive guidance molecule a* (RGMa) [136], Plexin [137]) identifiziert und der entscheidende Einfluss der NGPs auf das zielgerichtete Wachstum sowohl in der embryonalen Entwicklung [136, 138], als auch im adulten Organismus erforscht [139, 140].

Außerhalb des Nervensystems wurden funktionelle Einflüsse der NGPs bereits 1993 von Kolodkin *et al.* theoretisiert [132]. Im Jahr 1996 konnten für den Netrin-1 Rezeptor UNC-40 homologe Eigenschaften zum sogenannten *deleted*

in colorectal carcinoma (DCC) Gen, einem Tumorsuppressorgen, nachgewiesen werden [134, 141]. Zusätzlich wurde durch die Identifikation von neuen Semaphorin Klassen, welche im Rahmen von Lungenkrebskrankungen als deletiert vorgefunden wurden, endgültig eine Verbindung zur Onkologie hergestellt [142, 143]. Darüber hinaus zeigen neuronales und vaskuläres Wachstum eine nahe Verwandtschaft, sodass auch die Angiogenese vom Einfluss der NGPs mitbestimmt wird [144]. Eine weitere Verbindung zum Immunsystem wurde erstmalig 2001 von Wu *et al.* belegt. Es konnte gezeigt werden, dass Zytokin-vermittelte, leukozytäre Migration durch SLIT-2 gehemmt wird [145]. Aus diesen initialen Erkenntnissen entwickelte sich eine komplett neue Betrachtungsweise der neuronalen Entwicklung, mit Parallelen zu zellulären Abwehrprozessen in höheren Lebensformen. Ähnlich wie für SLIT-2 konnten anti-inflammatorische Eigenschaften unter anderen für Netrin-1 in Sepsis und Hypoxie [146, 147], RGMa in einer Zymosan A induzierten Peritonitis [148], sowie Sema3a auf die T-Zell Funktionalität [149] nachgewiesen werden. Dem gegenüber ließen sich pro-inflammatorische Effekte von NGPs, beispielhaft von Sema4a auf T-Zellen [150], oder SLIT-3 auf monozytäre Migration [151] belegen. Wie erst kürzlich in einem Artikel von Mirakaj und Rosenberger beleuchtet [152], entwickelt sich hieraus das seit 2001 zunehmende funktionelle Verständnis dieser Signalstoffe zu einem immunmodulatorischen Konzept, bestehend aus einem spezialisierten Zusammenspiel dieser heterogenen Gruppe an Proteinen und ihrer Rezeptoren.

3.6.1 Semaphorine und Plexine

Seit den vor 20 Jahren die NGPs entdeckt wurden ist das Wissen über die Semaphorine stetig gewachsen. Der sich aus dem altgriechischen ableitende Name dieser Proteine steht übersetzt für „Signalgeber“ und nimmt vor allem direkten Bezug auf die weitreichend untersuchte Rolle der Semaphorine innerhalb des neuronalen Wachstums [153].

Die Familie aus 30 transmembranären, extrazellulären oder membranständigen Molekülen lässt sich in 8 Klassen unterteilen [154]. Semaphorine der

Klasse 1 und 2 werden ausschließlich in wirbellosen Organismen gefunden, während die Klassen 3 bis 7 bei Vertebraten vorkommen und die achte Gruppe virales Semaphorin (SemaV) erfasst [155]. Allen gemein ist eine ca. 500 Aminosäuren lange extrazelluläre Sema-Domäne, sowie die sogenannte Plexin-Semaphorin-Integrin-Domäne (PSI) [156, 157]. Die weitere Unterteilung der Klassen erfolgt anhand der Zusammensetzung der verbleibenden extrazellulären Domänen sowie ihrer Verbindung zur Zellmembran [154, 155].

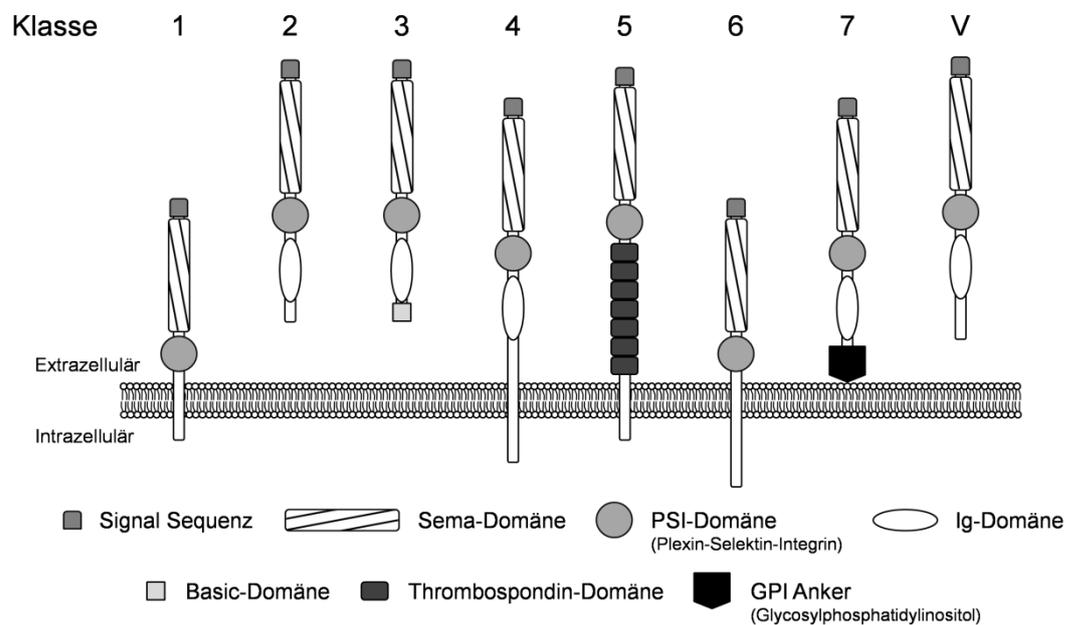


Abbildung 5 Die Semaphorin Proteinfamilie

Schematische Darstellung der Primärstruktur der Semaphorine. Die Proteinfamilie, bestehend aus mittlerweile 30 Mitgliedern, lässt sich in 8 Klassen unterteilen. Den Invertebraten werden Klasse 1 und 2 zugeordnet, wohingegen Klasse 3-7 in Wirbeltieren und die sogenannte V Klasse Semaphorine in Viren gefunden werden können. Semaphorine der Klassen 1, 4, 6 besitzen transmembranäre Domänen, wohingegen Klasse 2, 3 und V sezerniert werden. Eine Sonderrolle kommt den Klasse 7 Semaphorinen zu, welche durch einen GPI-Anker membranassoziiert sind [155, 158].

Aus ihrem Aufbau ergeben sich für die membranassoziierten Semaphorin-Klassen 1, 4 und 6 eine Signalübermittlung durch Expression auf der Zelloberfläche, wohingegen Sema2, Sema3, Sema5 und SemaV als freie Mediatoren sezerniert werden können. Den mit einem Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Anker an der Zellmembran verbundenen

Klasse 7 Semaphorinen stehen durch die Möglichkeit der Abspaltung beide Optionen zur Verfügung [159]. Darüber hinaus konnte eine Loslösung von der Membran ebenfalls für Mitglieder der Semaphorinklassen 4 und 5 nachgewiesen werden [160, 161], weshalb spekuliert wird, dass weitere Klassen, wenn nicht sogar alle, hierzu in der Lage sein könnten [154].

Die Rolle der Semaphorine innerhalb der Entwicklung des zentralen Nervensystems (ZNS) ist detailliert erforscht worden. Das NGP vermittelt hier elementare Signale für das zielgerichtete Wachstum von Axonen an ihre Zielstrukturen, sorgt für die Entstehung von funktionsfähigen Synapsen und ist darüber hinaus involviert in regenerativer Prozesse nach Nervenläsionen [162]. Zudem konnten Einflüsse in neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Alzheimer [163] und der amyotrophen Lateralsklerose [164] sowie Krampfleiden und Epilepsie [165] nachgewiesen werden [166]. Außerhalb des ZNS werden Semaphorine unter anderem kardiovaskulär [167], muskuloskelettal [168], renal [169], hepatisch [170] und pulmonal [171] sowie innerhalb des Immunsystems [172] exprimiert.

Als Hauptrezeptoren aller Semaphorine konnten die transmembranären Plexine identifiziert werden [173, 174]. Zusätzliche Bindungspartner stellen die β 1-Integrine [175], Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTKs), wie Met und RON [176, 177], CD-72 [178], *T-cell Ig and mucin domain containing protein 2* (Tim-2) [150] sowie CLCP1 [179] dar.

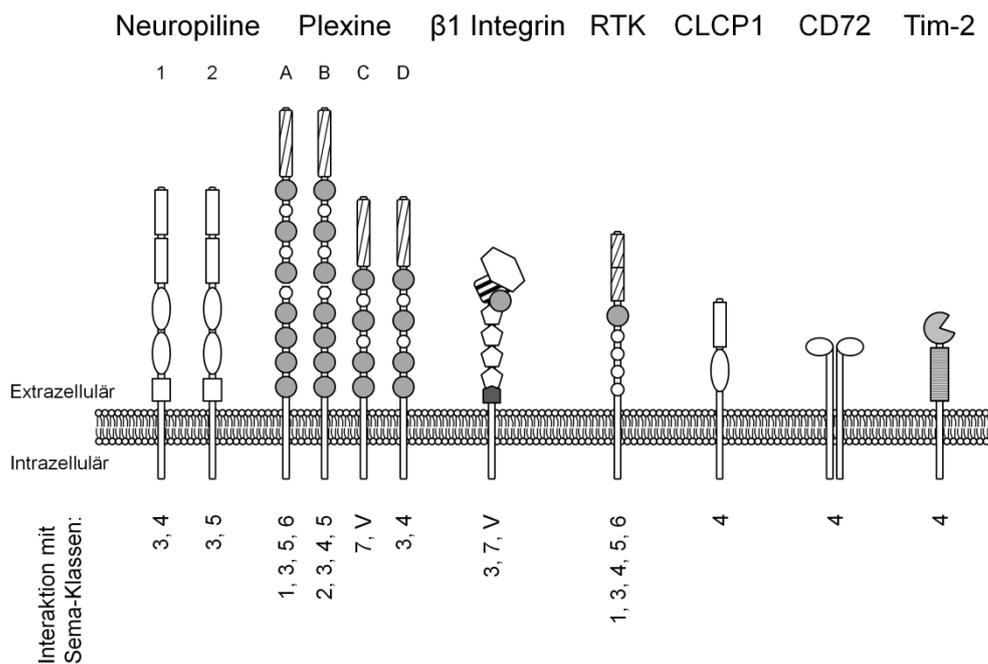


Abbildung 6 Übersicht der Semaphorin Rezeptoren

Grafische Darstellung der Semaphorin Bindungspartner. Neben den Hauptrezeptoren der in vier Klassen unterteilten Plexine, zählen die $\beta 1$ -Integrine, Neuropiline, RTKs, CD72, Tim-2 sowie CLCP1 zu potentiellen Liganden des NGPs [156, 172]. Unterhalb der schematischen Abbildungen sind die nachgewiesenen Interaktionen der Rezeptoren mit Semaphorin-Klassen aufgezählt.

Der strukturelle Aufbau der Plexine, welche in vier Klassen (A-D) unterteilt werden, besteht wie bei ihren Liganden aus einer extrazellulären Sema-Domäne, aber mehreren PSI und zusätzlichen Immunglobulin-Plexin-Transkription-Domänen (IPT) [180, 181]. Auf zyttoplasmatischer Seite besitzen Plexine aller vier Klassen hochgradig konservierte Domänen, welche strukturelle und funktionelle Übereinstimmungen zu GTPasen aktivierten Proteinen (GAPs) für Ras [182] aufweisen. Ras gehört zu den zentralen Akteuren der Zellproliferation und Zellmotorik und wird darüber hinaus den Protoonkogenen zugeordnet [183]. Plexine weisen im Gegensatz zu den klassischen Ras-GAPs eine ca. 200 Aminosäuren lange Domäne auf, welche als Rho GTPasen Bindungsstelle (RGB) Teil der Regulation der Plexin vermittelten Signalübertragung im Sinne einer Autoinhibition darstellen [184]. Diese RGB muss besetzt werden bevor eine Bindung von Semaphorinen eine

Konformationsänderung der Ras-GAP Domänen in einen aktiven Zustand möglich macht [184].

Die Semaphorine liegen durch ihre Sema-Domänen verbunden als Dimer vor und induzieren mit der Bindung an Plexine eine Dimerisation dieser [185]. Die Bindung erfolgt entweder direkt oder bei Semaphorinen der Klassen 3, 4 und 5 zusammen mit Neuropilinen als Co-Rezeptor [186].

3.6.1.1 Semaphorin 7A (Sema7a) und Plexin C1 (Plxnc1)

Semaphorin 7A (Sema7a) ist ein GPI verankertes Protein, auch bekannt als CD108. Sema7a wurde 1998 bei der Suche nach homologen Proteinen für virale Semaphorine entdeckt und initial als Semaphorin K1 beschrieben [187]. Die viralen Semaphorine wurden durch den *viral encoded semaphorin protein receptor* (VESPR) bekannt, welcher heute unter dem Namen Plexin C1 (Plxnc1) geführt wird [173]. Innerhalb der Sema- und Plxn- Rezeptor-Liganden Paarungen nehmen sie durch ihr überdurchschnittlich hohes Maß an Selektivität eine Sonderrolle ein. Sema7a sowie SemaV sind aus ihrer NGP Familie die einzig nachgewiesenen Liganden für Plxnc1 (siehe Abbildung 6). Sema7a bindet Plxnc1 als Dimer und bewirkt über eine Brückenstruktur die Approximation zweier Plxnc1-Monomere, welche dadurch in eine aktive Form übergehen und dimerisieren [188].

Innerhalb des Immunsystems ist Sema7a in der Lage Monozyten zur Zytokinfreisetzung und Zellmigration anzuregen [189, 190], hemmend auf T-Zell-Reaktionen zu wirken [191] und die Produktion von Thrombozyten aus Vorläuferzellen zu unterdrücken [192]. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass Sema7a fibrotische Umbauprozesse in Leber und Lunge fördert [193, 194] sowie stimulierend auf akute Inflammationen wirkt, indem es die Transmigration von immunkompetenten Zellen wie PMNs und dendritischen Zellen steigert [190, 195, 196].

Unterstützt werden diese Ergebnisse durch Arbeiten, welche sich explizit mit der Funktion von Plxnc1 befasst haben und zeigen konnten, dass eine Minderung der Entzündungsreaktion bei Inaktivierung des Rezeptor in Modellen des hyperbaren Lungentraumas [197], der Zymosan induzierten Peritonitis

[198], oder des hepatischen Ischämie- und Reperfusionsschadens eintritt [199]. Darüber hinaus ist es ein nachgewiesenes Tumorsuppressorgen der Melanomgenese und ein Inhibitor des metastatischen Progresses [200, 201].

3.6.1.2 Die Rolle der β 1-Integrine

Bei der Betrachtung dieser Arbeiten darf nicht vernachlässigt werden, dass ein zweiter Bindungspartner für Sema7a, die Integrine der Klasse β 1, bei der Signaltransduktion *in-vivo* beteiligt sind. Die Funktion dieser membranassoziierten Proteine der interzellulären Adhäsion und Kommunikation ist im Detail, unter anderem innerhalb der Embryogenese, der Immunologie und metastatischen Prozessen [202, 203], untersucht. In der Interaktion mit Sema7a vermitteln sie durch die Aktivierung von *mitogen activated protein* Kinasen (MAP-Kinase) neuronales, Plxnc1 unabhängiges Wachstum [204]. Zusätzlich induziert die Sema7a- β 1-Integrin-Bindung im Kontext einer Dextran-Sodiumsulfat Kolitis eine T-Zell vermittelte Zytokinproduktion und die Freisetzung von anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-10 [175, 205].

Der Mechanismus des Zusammenspiels von Plxnc1 und β 1-Integrinen ist noch nicht hinreichend untersucht, sodass es weiterer Forschung bedarf um ein abschließendes Verständnis für die Rolle von Sema7a als Mediator der inflammatorischen Reaktion zu etablieren.

3.7 Wissenschaftliche Hypothesen

Wie vorausgehend geschildert stehen NGPs im engen Verhältnis zum Immunsystem. Sie sind Modulatoren der zellulären Reaktion auf inflammatorische Stimuli. Im Bezug dazu haben Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe Sema7a bereits innerhalb der Entzündungsmodelle des hypoxischen, sowie des LPS-induzierten Lungenschadens, sowohl *in-vitro*, als auch *in-vivo* untersucht. Es konnten pro-inflammatorischen Eigenschaften auf die zelluläre Migration in das Lungengewebe und das Ausmaß der lokalen Entzündung nachgewiesen werden [195, 196]. Ähnliche Effekte konnten in Studien an Plxnc1 Knockout-Mauslinien innerhalb des hyperbaren

Lungentraumas, der Zymosan A induzierten Peritonitis und des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens beobachtet werden [197-199].

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Sema7a vermittelt durch Plxnc1 innerhalb der akuten LPS-induzierten pulmonalen Inflammation mit besonderem Fokus auf die granulozytäre Migration und deren Aktivität zu identifizieren. Wie in 3.3 beschrieben können PMNs einen Komplex mit Thrombozyten bilden, um ihr antimikrobielles Potential und ihre Fähigkeit zur Extravasation zu steigern. Zu diesem zählt auch die NETose (siehe 3.4). Diese beiden Charakteristika von PMNs, welche bei Dysregulation wiederholt in Zusammenhang mit pathologischen Entzündungsprozessen gestellt werden, wurden bisher nicht unter dem Aspekt einer Exposition gegenüber NGPs betrachtet.

Mit diesen Gedanken wurden die folgenden Hypothesen zur Prüfung formuliert:

1. Sema7a ist in der Lage PMNs zur Ausbildung von NETs anzuregen
2. Sema7a kann Interaktion von Thrombozyten und PMNs, speziell die PNC-Bildung, beeinflussen
3. Im murinen Modell der LPS-induzierten ALI resultiert ein genetischer Knockout an Plxnc1 in einer reduzierten Inflammation, zellulären Migration und Organschädigung
4. Grundlage der Effekte in Hypothesen 1.-3. ist die über Plxnc1 vermittelte Wirkung von Sema7a

4 Materialien und Methoden

4.1 Verbrauchsgegenstände und labortechnische Gerätschaften

Die an dieser Stelle aufgeführten Artikel wurden in einer Vielzahl von Experimenten verwendet und werden nachfolgend nicht weiter definiert, sondern gemäß ihrer Funktion und ihres Verwendungszwecks als bekannt vorausgesetzt.

Produktname	Artikelnummer	Hersteller mit Hauptsitz
21G Safety-Multifly	851638235	Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
S-Monovette	21067001	
Falcon Tubes (konisch) 15ml 50ml	352096 352070	BD Falcon Heidelberg, Deutschland
Einmal Pasteur Pipetten 1,8ml 3,0ml	LW4111 EA70.1	Alpha Laboratories Limited Hampshire, England
Kulturplatten 24 Wells 96 Wells	662160 655101	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
Reaction Tube 1,5ml 2,0ml	616201 623201	
Kulturmedien HBSS- HBSS ⁺	14175-053 14025-050	Sigma-Aldrich St. Louis, MO USA
PBS- PBS ⁺	D8537 D8662	Life Technologies Carlsbad, CA USA
FACS-Röhrchen	352052	BD Biosciences San Jose, CA USA
Objektträger	H868	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland

4.2 Isolation von PMNs und Thrombozyten aus venösen Blut

4.2.1 Blutentnahmen

Sämtliche Blutentnahmen erfolgten an gesunden Probanden nach Erhalt eines *informed consents* gemäß der Deklaration von Helsinki zur Erhaltung ethischer Normen in der medizinischen Forschung [206]. Die Punktion oberflächiger Venen im Ellenbogenbereich wurde durch medizinisch geschultes Personal durchgeführt. Nach Stauung wurde das Gefäß innerhalb einer Minute mit einer 21G Safety-Multifly Kanüle punktiert und Blut in eine 10ml Citrat-Monovette entnommen. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein gleichmäßig sanfter Sog aufrechterhalten wird, um eine mögliche Voraktivierung von Zellen zu vermeiden [207]. Im Falle von schlechten Flussbedingungen, oder beginnender Koagulation im Entnahmesystem wurde die Probe verworfen und gegebenenfalls am gegenüberliegenden Arm erneut punktiert.

4.2.2 Thrombozytenisolation

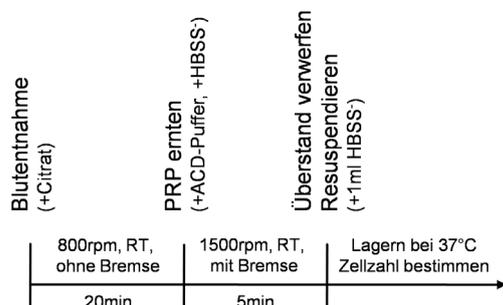


Abbildung 7 Versuchsablauf: Thrombozytenisolation

Direkt im Anschluss an die Entnahme wurden gefüllte Monovetten für 20 Minuten bei 800rpm auf Raumtemperatur (RT) ohne Bremsprofil zentrifugiert. Nachfolgend wurde mit einer Einmal-Pasteur-Pipette 3ml das *platelet-rich plasma* (PRP) aspiriert und in ein frisches 50ml Falcon Tube gegeben und im Verhältnis 1:100 ACD-Puffer hinzugegeben.

ACD-Puffer:

Substrat	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
Natriumcitrat	25g	3580.1 (Carl Roth GmbH & Co. KG)
Zitronensäure	15g	818707 (Merck Millipore)
D-(+)-Glucose	20g	G7528-250G (Sigma-Aldrich)
H ₂ O _{aq,dest}	100 ml	

mit HCl eingestellt auf pH 4,5

Zum Waschen der Zellsuspension wurde das Falcon Tube auf 45ml Gesamtvolumen mit HBSS⁻ aufgefüllt und für 5 Minuten bei 1500rpm, RT und unter Verwendung eines Bremsprofils zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Thrombozyten Pellet wurde in 1ml HBSS⁻ resuspendiert und bis zum weiterem Gebrauch bei 37°C in einem Environmental Shaker-Inkubator (Art.-Nr. ES-20, biosan, Riga, Lettland) aufbewahrt.

Zellzahlbestimmungen erfolgten in Neubauer Zählkammern (Art.-Nr 441/1, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland). Hierfür wurden 10µl der Zellsuspension 1:50 in HBSS⁻ vorverdünnt und weitere 10µl hiervon mit 10µl Türk'scher Lösung (Art.-Nr. 109277, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) vermengt und auf die Zählkammer pipettiert. Lichtmikroskopisch wurden 5 der zentralen Kammern ausgezählt und aus deren Durchschnitt, nach Verrechnung der Vorverdünnungen (Faktor 100) und des Kammervolumens (Faktor 250), die Zellkonzentration pro µl errechnet.

4.2.3 PMN-Isolation

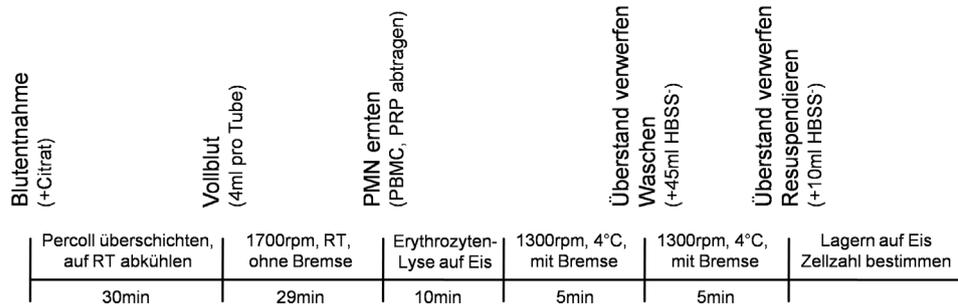


Abbildung 8 Versuchsablauf: PMN-Isolation

Das entnommene Blut kühlte in den Monovetten 30 Minuten auf RT ab. Für jeweils 20ml Blut wurden währenddessen 5 Culture Tubes (no. 163160, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit 4 ml 72%-Percoll-Lösung (72% Percoll (no. 17-0891, GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala, Schweden), 8% PBS⁻ 10x (no. D5652, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA), 20% PBS⁻) befüllt. In einem zweiten Schritt wurden 4ml 63%-Percoll-Lösung (63% Percoll, 7% PBS⁻ 10x, 30% PBS⁻) vorsichtig überschichtet. Das abgekühlte Blut wurde gepoolt und jeweils 4ml in jede Culture Tube gegeben. Es folgte eine Zentrifugation von 29 Minuten, bei 1700rpm, auf RT und ohne die Verwendung eines Bremsprofils, woraufhin die entstandene Phase an PRP sowie die *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) Bande mit einer 3ml Einmal-Pasteur-Pipette abgetragen und verworfen wurden. Die PMN Bande wurde vorsichtig mit einer 1,8 Einmal-Pasteur-Pipette in frische, auf Eis gelagerte 50ml Falcon Tubes zu maximal 15ml Zellsuspension pro Tube übertragen. Residuale Erythrozyten wurden durch Auffüllen der Suspensionen auf ein Volumen von 45ml mit Lyse-Puffer und 10-minütige Inkubation auf Eis beseitigt.

Lyse-Puffer:

Substrat	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
NH ₄ Cl	4g	A0988 (AppliChem)
NaHCO ₃	420mg	K10720529 (Merck Millipore)
EDTA	18,5mg	E-7889 (Sigma-Aldrich)
H ₂ O _{aq,dest}	500 ml	

Es folgten das Pelletieren der PMNs durch 5-minütige Zentrifugation bei 1300rpm, 4°C unter Verwendung eines Bremsprofils, sowie ein Waschschriff mit 45ml HBSS⁻ und erneutem Zentrifugieren bei identischen Einstellungen. Die pelletierten PMNs wurden in HBSS⁻ resuspendiert, in einem 50ml Falcon Tube gesammelt und in einem Gesamtvolumen von 10ml bis zur weiteren Verwendung auf Eis verwahrt.

Zellzahlbestimmungen erfolgten in Neubauer Zählkammern. Hierfür wurden 10µl der Zellsuspension 1:5 in HBSS⁻ vorverdünnt und weitere 10µl hiervon mit 10µl Trypan Blau (Art.-Nr. T8154, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) vermenget und auf die Zählkammer pipettiert. Lichtmikroskopisch wurden die vier Eckkammern ausgezählt und aus deren Summe, nach Verrechnung der Vorverdünnungen (Faktor 10) und des Kammervolumens (Faktor 2500), die Zellkonzentration pro µl errechnet.

4.3 NET-Essay

4.3.1 Grundlagen

Der Nachweis von NETs basiert seit ihrer initialen Entdeckung entweder auf der histologischen Darstellung extrazellulärer DNA, oder dem Nachweis von NET-Komponenten innerhalb von Proben. Das HAEMA Diff-Quick Schnellfärbe-Kit folgt den Prinzipien der panoptischen Universalfärbung nach Pappenheim von 1912 [218], welche bis heute weite Verbreitung in der Diagnostik von Blutaussstrichen, zytologischen Präparaten der Onkologie sowie dem Nachweis von Mikroorganismen hat. Genutzt werden Methylenblau, Azur B und Eosin Y,

um zelluläre Bestandteile wie Nuklei, Granulae und Zytoplasma in Abhängigkeit von pH und Bindungsverhalten der Farbstoffe an den Strukturen differenziert darzustellen [219]. Speziell Azur B, welches in Färbelösung 2 enthalten ist, ist in der Lage durch Interaktion mit sauren Komponenten der DNA diese zu visualisieren [219] und wurde daher zur qualitativen Analytik der NETs herangezogen.

Parallel zu dieser Methode wurde anstelle einer Färbung die enzymatische Aktivität der neutrophilen NE als nachgewiesener Bestandteil von NETs [220] mithilfe des Neutrophil Extracellular Trap Assay Kit von Cayman Chemicals bestimmt. Hierbei wurde NET-assoziierte NE von den regulär durch aktivierte PMNs freigesetzten Enzymanteilen differenziert. Durch das Abtragen des Kulturmediums und das Waschen der Zellkulturen wurde die frei gelöste NE entfernt, bevor durch Spaltung des DNA-Gerüsts mittels DNase die NET-assoziierte NE freigesetzt wurde. Der Kulturüberstand konnte anschließend als Probe gewonnen und mittels Farbreaktion durch das NE spezifische Substrat *N-Methoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val p-nitroanilide* (N-MeOSuc-AAPV-pNA) anhand einer Standardkurve photometrisch quantifiziert werden [221] (siehe 3.4.1).

4.3.2 NET Diff-Quick Färbung

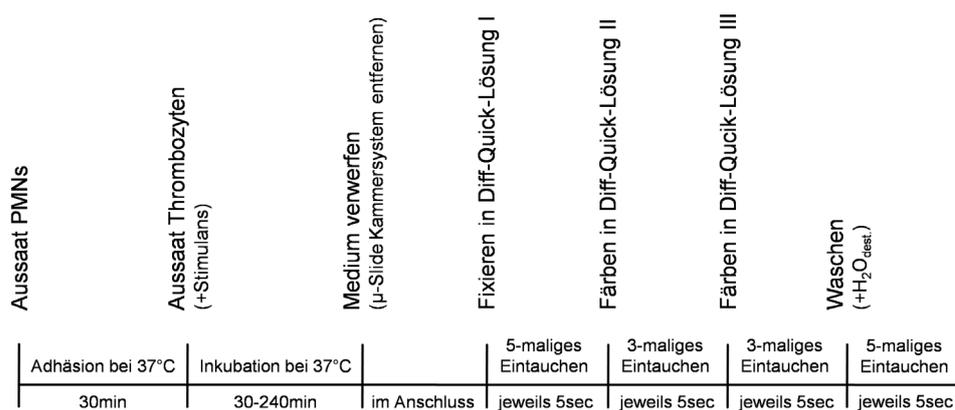


Abbildung 9 Versuchsablauf: NET Diff-Quick Färbung

5x10⁵ isolierte PMNs (siehe 4.2), suspendiert in 500µl NET-Puffer wurden pro µ-Slide VI Zell-Mikroskopie-Kammer (Art.-Nr. 079844, ibidi, München, Deutschland) ausgesät.

NET-Puffer:

Substrat	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
bovines Serum Albumin (BSA)	5g	400086 (Cayman Chemical)
CaCl	500µl	K10720529 (Cayman Chemical)
RPMI 1640	500ml	R7509 (Sigma-Aldrich)

Nach einer Inkubationsdauer von einer Stunde im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, Luftfeuchtigkeit 90%) wurde von einer adäquaten Adhäsion der Zellenausgegangen. Anschließend wurden, wo vorgesehen, 1x10⁷ Thrombozyten desselben Spenders co-kultiviert, sowie die Zellen mit 20nM PMA (Art.-Nr. 400145, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI USA), oder eine PBS-Kontrolle stimuliert und für einen Zeitraum zwischen 30 und 240 Minuten inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeitspanne erfolgte die Färbung mit dem HAEMA Diff-Quick Schnellfärbe-Kit (Art.-Nr. LT 001, LABOR + TECHNIK Eberhard Lehmann GmbH, Berlin, Deutschland). Hierfür wurde das Kulturmedium verworfen, bevor das Kammersystem von den µ-Slides entfernt wurde. Die verbleibenden gläsernen Objektträger, noch mit adhärenen Zellen bestückt, konnten nun durch fünf maliges Eintauchen für die Dauer von einer Sekunde in die Methanol-haltige Fixierlösung für die anschließende Färbung vorbereitet werden. Diese erfolgte durch dreimaliges Eintauchen für eine Sekunde in die auf Eosin-Basis bestehende Färbelösung 1, gefolgt von erneutem dreimaligem Eintauchen für eine Sekunde in die Azur-haltige Färbelösung 2. Die Färbung wurde durch mehrmaliges Spülen mit destilliertem Wasser (H₂O_{aq.dest}) und Lufttrocknung abgeschlossen.

Alle Aufnahmen wurden mit einem Lichtmikroskop unter Verwendung der AxioVision Software v4.8.2 angefertigt.

4.3.3 Quantifizierung von NET spezifischer NE

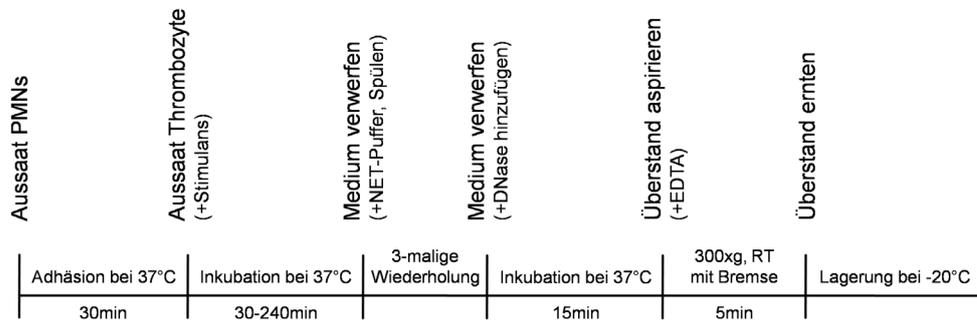


Abbildung 10 Versuchsablauf: Quantifizierung von NET-NE

Sämtliche Inkubationen und Stimulationen erfolgten in 24 Well Zellkulturplatten. Pro Well wurden 1×10^6 PMNs verwendet. Die für den Versuch benötigte Zellzahl wurde aus einer Zellsuspension an isolierten PMNs entnommen (siehe 4.2), mit HBSS⁻ auf ein Volumen von 40ml aufgefüllt und für 5 Minuten bei 1200rpm, auf RT und unter Verwendung eines Bremsprofils zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet in auf 37°C vorgewärmten NET-Puffer (siehe 4.3.2) zu 800µl pro 1×10^6 PMNs resuspendiert. Jeweils 1×10^6 PMNs wurden unverzüglich ausgesät und für 20 Minuten inkubiert (37°C, 5% CO₂, Luftfeuchtigkeit 90%), um die Zellen adhären zu lassen. Nachfolgend wurden die Zellen mit 20nM PMA, 100ng/ml rekombinantem humanem Sema7a (rhSema7a) (Art.-Nr. 2068-s7, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) oder einer PBS-Kontrolle versetzt. Wo für den Versuchsaufbau vonnöten, erfolgte zu diesem Zeitpunkt die zusätzliche Aussaat von 5×10^7 Thrombozyten. Die anschließende Inkubationsdauer betrug versuchsspezifisch zwischen 30 und 240 Minuten (37°C, 5% CO₂, Luftfeuchtigkeit 90%) und endete mit dem vorsichtigen Aspirieren des Kulturmediums. Es folgte ein Waschvorgang mit 1ml vorgewärmten NET-Puffer, welcher dreimal wiederholt wurde und an welchen sich die Zugabe von 500µl S7 Nuclease (Art.-Nr. 601011, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI USA), 15U/ml in NET-Puffer gelöst) anschloss. Nach 15-minütiger Inkubation (37°C, 5% CO₂, Luftfeuchtigkeit 90%) wurde der Kulturüberstand vorsichtig aspiriert und in ein frisches, mit 10µl EDTA (Art.-Nr. 601012, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI USA) versetztes 1,5ml Reaction-

Tube gegeben. Dieses wurde für 5 Minuten bei 300xg auf RT unter Verwendung eines Bremsprofils zentrifugiert und der zellfreie Überstand in einem neuen 1,5ml Reaction-Tube gesammelt. Diese Probe wurde sofort zur weiteren Analyse (siehe 4.4.2) verwendet oder bei -20°C eingefroren und für maximal 4 Wochen gelagert.

4.4 Photometrisch quantitative Analysen

4.4.1 Grundlagen

Das photometrische Grundprinzip beschreibt die Messung der Lichtabsorption und -brechung beim Durchtritt durch ein Medium. Dieses Prinzip wird genutzt, um anhand des Ausmaß der Intensitätsreduktion (= Extinktion) Rückschlüsse auf die Zusammensetzung einer Lösung zu ziehen und im weiteren Sinne Konzentrationsbestimmungen von Inhaltsstoffen anhand eines substratspezifischen Extinktionskoeffizienten gemäß des Lambert-Beerschen Gesetzes, oder anhand von Eichkurven durchzuführen. Da innerhalb von biologischem, stark inhomogenem Material nicht davon ausgegangen werden kann eine gemessene Extinktion auf einzelne Inhaltsstoffe zurückzuführen, verwendet man häufig Surrogatmarker. Hierbei werden Substanzen eingesetzt, deren selektive Spaltung in einer Farbreaktion und damit Änderung der optischen Dichte (OD) resultiert. Zum Enzymnachweis werden direkt verstoffwechselbare Reagenzien wie beispielhaft N-MeOSuc-AAPV-pNA für NE verwendet, welches nach hydrolytischer Spaltung die aromatische Verbindung p-Nitroanilid, messbar bei 405nm freisetzt [208]. MPO Aktivität kann durch den Einsatz von 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) bestimmt werden, welche in oxidativem Mileu radikalisiert und einen grünen Farbton, messbar bei 405nm annimmt [209]. Proteinbestimmungen utilitarisieren die Reaktion von Aminosäuren mit bivalenten Kupfer Kationen (Cu^{2+}) zu monovalenten Cu^+ , welches Bicinchoninsäure (*bicinchoninic acid* = BCA) bindet und dabei in einen bei 562nm messbaren, lilafarbenen Chelatkomplex übergeht [210].

Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) nutzen Antikörper gegen die zu untersuchende Testsubstanz, um sie in einem ersten Schritt aus einer Probe zu binden (Capture-AK) und anschließend mit einem zweiten, biotinyliertem Antikörper (Detection-AK) zu markieren. Dieser wird mit einer Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase Verbindung bestückt, welches mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) eine Farbreaktion durchführt und nach Fixation mit Schwefelsäure eine Gelbfärbung, messbar bei 450nm, durchmacht [211].

4.4.2 NE-Aktivitätsbestimmung

100µl des Probenmaterials wurden in einer 96 Well Zellkulturplatte pro Kammer pipettiert und mit 100µl N-MeOSuc-AAPV-pNA (Art.-Nr. 601013, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI USA), 5nM in PBS⁻ gelöst, versetzt. Die Platte wurde anschließend bei 37°C im Dunkeln für 2 Stunden inkubiert und die optische Dichte (OD) bei 405nm mittels TECAN Multiplaterreader (infinite M200 pro, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) gemessen und gegen einen NE-Standard verrechnet.

4.4.3 MPO-Aktivitätsbestimmung

50µl der Probe wurde mit 50µl 1M Citratpuffer (siehe 4.2.2) in eine 96 Well Zellkulturplatte und 100µl ABTS-Lösung für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurde die OD bei 405nm mit Hilfe eines TECAN Multiplaterreaders gemessen.

ABTS-Lösung:

Substrat	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
ABTS	28g	A1888 (Sigma-Aldrich)
H ₂ O ₂	50µl	108597 (Merck Millipore)
Citrat-Puffer (siehe 4.2.2)	5ml	
H ₂ O _{aq,dest}	45ml	

4.4.4 Proteingehaltsbestimmung

Die Analyse des Proteingehaltes erfolgte unter Verwendung des BCA Protein Assay Kit (Art.-Nr. 23225, Thermo Scientific, Rockford, IL USA) nach Angaben des Herstellers. 25µl der Lavage-Probe wurde mit 200µl BCA-Lösung 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert und die OD bei 594nm mit Hilfe eines TECAN Multiplateraders gemessen. Die Proteinkonzentration wurde dabei anhand einer Albumin-Standardkurve errechnet.

BCA-Lösung:

Substrat	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
BCA Reagent A	50ml	23225 (Thermo Scientific)
BCA Reagent B	1ml	23225 (Thermo Scientific)

4.4.5 Zytokin enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs)

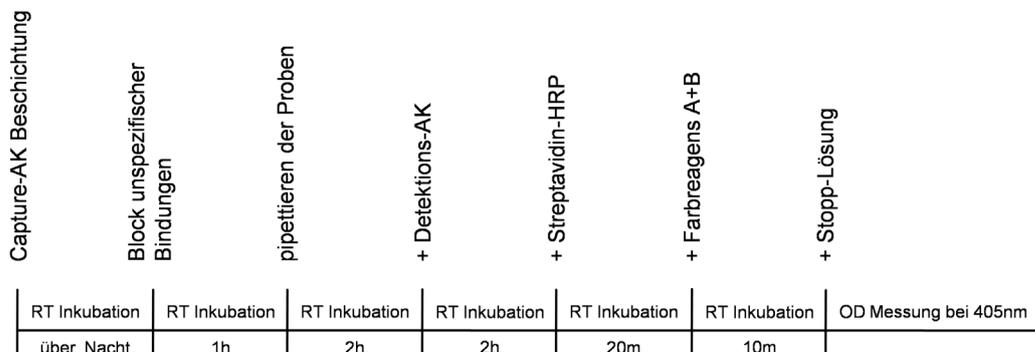


Abbildung 11 Versuchsablauf: ELISAs

Verwendet wurden R&D Systems DuoSet ELISAs für murines TNF α (Art.-Nr. DY410, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA), IL-6 (Art.-Nr. DY406, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) sowie CXCL2 (Art.-Nr. DY452, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) nach Anleitung des Herstellers. Hierfür wurden 96 Well Zellkulturplatten mit 100µl einer Capture-AK-Lösung des jeweiligen Zytokins gelöst in einem Beschichtungspuffer (Art.-Nr. 896036, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) über Nacht bei RT inkubiert. Fortlaufend erfolgten alle

Inkubationen unter Verschluss der Platten durch Klebestreifen. Des Weiteren wurde zwischen jedem, der beschriebenen Arbeitsschritte das Verwerfen der Restflüssigkeit sowie ein Waschvorgang mit dreimal 300µl Wasch-Lösung (Art.-Nr. 895003, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) vorgenommen. Anschließend wurden die Platten mit 150µl der Substrat-Verdünnungslösung (Art.-Nr. 841380, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) für eine Stunde bei RT gegen unspezifische Bindungen geblockt. Darauf wurden 100µl der BAL Probe (für IL-6-ELISA erfolgte eine Vorverdünnung 1:5 in Substrat-Verdünnungslösung), sowie die vom Hersteller bereitgestellten Referenzen in einer Verdünnungsreihe in die Platten pipettiert und für zwei Stunden bei RT inkubiert. 100µl der ELISA-spezifischen Detektions-Antikörper, erneut gelöst in Substrat-Verdünnungslösung, wurden anschließend für zwei Stunden bei RT in die Kammern gegeben. Zur späteren Umsetzung einer Farbreaktion wurden die Wells des Weiteren mit 100µl Streptavidin-HRP (Art.-Nr. 890803, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) für 20 Minuten bei RT inkubiert und darauf mit 100µl einer zu gleichen Anteilen aus Farbreagens A (Art.-Nr. 895000, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) und B (Art.-Nr. 895001, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) bestehenden Mischung versetzt. Die augenblicklich einsetzende Reaktion wurde nach zehn Minuten durch Hinzufügen von 50µl Stop-Lösung (Art.-Nr. 895926, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) beendet. Die Bestimmung der OD bei 405nm erfolgte mit Hilfe des TECAN Multiplatereaders und Proteinkonzentrationen wurden anhand der Kit-spezifischen Standardkurve bestimmt.

4.5 Flusskammer live cell Mikroskopie

4.5.1 Grundlagen

Die Flusskammer stellt ein elegantes System dar, um selektiv Abschnitte der leukozytären Adhäsion in Vollblut *ex-vivo* zu simulieren und zu untersuchen. Kernelement ist dabei eine rechteckige Kapillare mit abgerundeten Ecken aus Borosilikatglas mit einer Hohlräumweite und -höhe von 200µm x 20µm. Fixiert auf einem Glasobjektträger und beschichtet mit versuchsabhängigen

Kombinationen von rekombinantem ICAM-1, E-Selektin und weiteren Testsubstanzen, ist man so in der Lage einen Zustand inflammatorischer Aktivität mit stimulierten Endothelzellen zu imitieren.

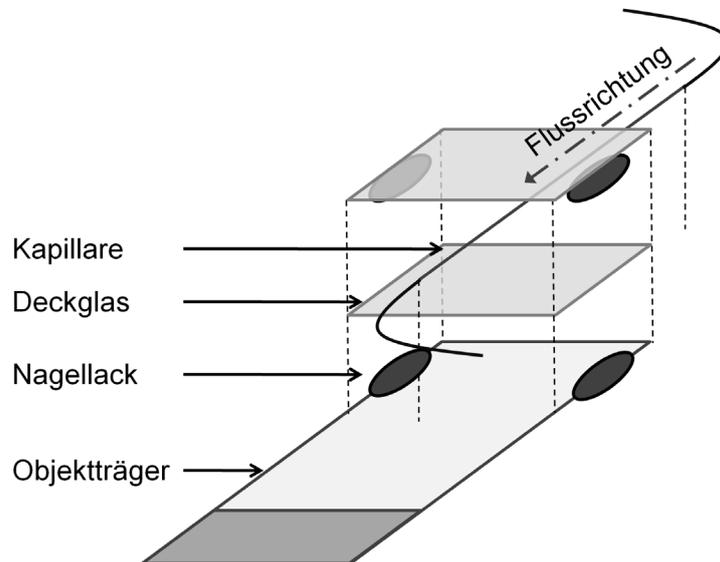


Abbildung 12 Schematischer Aufbau der Flusskammer

Über ein Schlauchsystem kann die Kapillare mit einem Sog versehen werden und so heparinisiertes Vollblut in einer laminären Strömung durch die Flusskammer geleitet werden. Dabei lassen sich lichtmikroskopisch zelluläres Roll-, Adhäsions- und Bindungsverhalten untersuchen.

4.5.2 Verfahren

Auf einen Glasobjektträger (Art.-Nr. H868, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) wurde mit zwei Tropfen handelsüblichen Nagellack ein Deckglas (Art.-Nr. H876, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mittig verklebt und eine auf 3cm Länge zugeschnittene Kapillare (Art.-Nr. 5002, VitroCom, Mountain Lakes, NJ, USA) darauf platziert. Mithilfe eines weiteren Deckglases und erneut etwas Nagellack wurde die Kapillare in dieser Position fixiert. Für die Beschichtung der Flusskammern wurden Mastermixturen mit E-Selektin und einer E-Selektin + ICAM-1 Kombination erstellt und diese jeweils mit rhSema7a oder IgG₁ Fc versetzt in vier Testgruppen unterteilt.

Beschichtung-Mastermixturen:

Substanz (Arbeitskonzentration)	Artikelnummer (Hersteller)	1	2	3	4
E-Selektin (3,8µg/ml)	724-ES (R&D Systems)	3,8µl	3,8µl	3,8µl	3,8µl
ICAM-1 (3,5µg/ml)	720-IC (R&D Systems)	X	X	3,5µl	3,5µl
rhSema7a (50µg/ml)	2068-s7 (R&D Systems)	50µl	X	50µl	X
IgG ₁ Fc (50µg/ml)	110-HG (R&D Systems)	X	50µl	X	50µl

Aufgefüllt auf ein Gesamtvolumen von 100µl mit PBS⁻

Über Kapillarkräfte wurden diese eingebracht und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. PE 50 Polyethylene Schläuche (Innendurchmesser 58mm, Art.-Nr. 427411, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) mit einer Länge von 40cm wurden mit isotonischer Kochsalzlösung (NaCl) gespült, mit einem Luftreservoir an die Flusskammer angeschlossen und mit einem 2-Komponenten Epoxydharz Kleber (Art.-Nr. 155110 und 155105, R&G Faserverbundwerkstoffe GmbH, Waldenbuch, Deutschland) versiegelt. Es folgt eine Blockade unspezifischer Bindungen mit 1% Casein in PBS⁻ (Art.-Nr. 37528, Thermo Scientific, Rockford, IL USA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde frisch gewonnenes Heparinblut in einer Insulinspritze (Art.-Nr. 896456, B. Braun Melsungen AG, Glandorf, Deutschland) an die Flusskammer gebracht und ein konstanter Fluss durch Sogkräfte des herabhängenden Schlauches eingestellt.

Videoaufnahmen zellulärer Bewegungen wurden mit einem LEITZ Lichtmikroskop (DM IRB, Camera AG, Wetzlar, Deutschland) angefertigt. Die Bestimmung der Rollgeschwindigkeit erfolgte mittels der ImageJ Software (National Institutes of Health).

4.6 Fluorescence activated cell sorting (FACS)

4.6.1 Grundlagen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren, das sich durch die Möglichkeit auszeichnet, eine exorbitante Menge Zellen innerhalb kürzester Zeit zu scannen und dabei eine Fülle an Informationen zu jedem einzelnen Event zu sammeln. Ausgang der Entwicklung hin zum heutigen *fluorescence activated cell sorting* (FACS) stammen aus dem Jahre 1969, als Dittrich und Goehde die Technik unter dem Namen Impulszytometrie veröffentlichten [212]. Den zentralen Aspekt dieser Methode stellt ein Laserstrahl dar, durch den in Suspension befindliche Zellen geleitet werden, wodurch es zur Brechung des Lichts und damit zu Streuung kommt. Die Streuung, welche in Richtung des Strahlengangs gelangt wird dort von einem Sensor, dem sogenannten Forward-Scatter (FSC) aufgefangen. Dabei korreliert das vom FSC wahrgenommene Signal direkt mit der Größe des Events [213] und kann vereinfacht mit dem Schatten der Zelle verglichen werden. Jene Strahlen, die sich orthograd verteilen, werden von einer weiteren Photodiode, dem Side-Scatter (SSC), aufgefangen. Das Ausmaß dieser Streuung ist dabei unter anderem von der Form der Zellen, sowie intrazellulären Strukturen, wie Granulae oder dem Nukleus beeinflusst [214] und ermöglicht im Zusammenhang mit den FSC-Eigenschaften so bereits eine erste Unterteilung von Leukozyten [215].

Die letzte Ebene der Datenerfassung in Form der Farbsignale erfolgt durch den Einsatz von Farbfiltern innerhalb des SSC-Strahlenganges, durch welche das Signal an mehrere Sensorelemente, sogenannte photomultiplier Tubes (PMTs) geleitet wird.

Der in dieser Arbeit verwendete BD FACSCanto II ermöglicht die simultane Auswertung von bis zu acht durch Filter getrennten Farbkanäle. Diese sind selektiv auf einer spezifischen Wellenlänge und können die jeweilige Signalintensität, welche von einem Event ausgeht, erfassen. Viele der gängigen Fluoreszenzfarbstoffe geben jedoch nicht ausschließlich auf einen Kanal passende Strahlen ab, sondern streuen beeinflusst von multiplen Faktoren in einem gewissen Ausmaß um ihre maximale Emissionswellenlänge [216]. Werden nun mehrere Farbstoffe in einer Probe kombiniert, ist nicht sicher

festzustellen, wie stark ein Signal durch gestreute Strahlen beeinflusst ist. Um diesen Effekt so gut wie möglich zu beherrschen, besteht die Möglichkeit diese Streusignale rechnerisch auszugleichen. Diesen Schritt nennt man die Kompensation und sie basiert auf dem Konzept, dass der Software vorausgehend jedweder Testung eine einzelgefärbte Probe jedes antikörpergekoppelten Farbstoffes präsentiert wird. Aus den hieraus resultierenden Daten können Streuprofile erstellt werden, die das Gerät verwendet, um die Rate an falsch positiven Events zu reduzieren.

Zusammenfassend können so durch den Einsatz von Fluorophor-gekoppelten Antikörpern Eigenschaften und Prozesse außer- sowie innerhalb von Zellen dargestellt und untersucht werden.

4.6.2 Kompensationen

Für jeden Antikörper wurden Einzelfärbungen in FACS-Röhrchen gefüllt mit 100µl PBS⁻ durchgeführt. Diesen wurde jeweils ein Tropfen der Anti-Rat Ig, κ Kompensationsbeads (51-90-9001189, BD Biosciences, San Jose, CA USA), sowie ein weiterer Tropfen Kontrollbeads (Art.-Nr. 51-90-9001291, BD Biosciences, San Jose, CA USA) hinzugefügt. Für jeden einzelnen der in 4.6.4 und 4.6.6 aufgelisteten Antikörpern wurde eine Färbung mit dem dort angegebenen µl-Volumen pro Probe angefertigt und direkt eingelesen.

Mit den Bead-Daten als Basis wurden zusätzlich für jedes FACS-Experiment, das innerhalb dieser Dissertation entstanden ist, Einzelfärbungen von Probenmaterial durchgeführt. Wenn hierbei ein deutliches Signal erfasst werden konnte, wurde dieser Datensatz der korrelierenden Bead-Kompensation vorgezogen.

Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der FlowJo-Software (Version 10.0).

4.6.3 Verfahren - humanes Vollblut

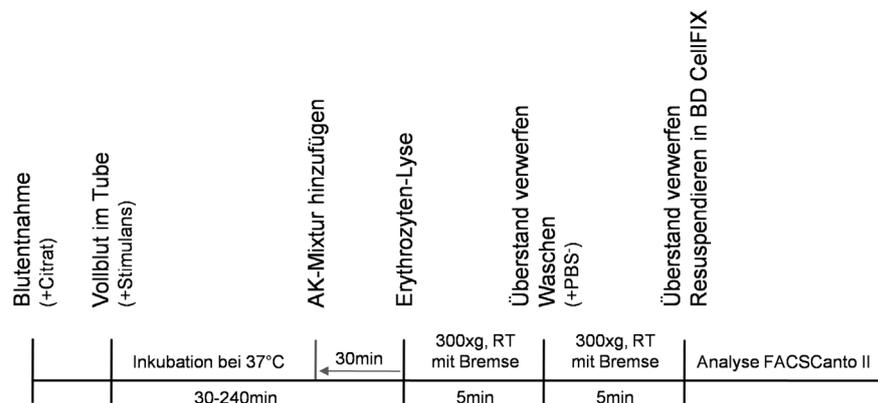


Abbildung 13 Versuchsablauf: FACS - humanes Vollblut

100µl peripher entnommenes Citrat-antikoaguliertes Blut wurden pro FACS-Röhrchen pipettiert. Die Proben wurden anschließend mit entweder 20nM PMA (Art.-Nr. 400145, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI USA), 500ng/ml LPS (Art.-Nr. L8274, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA), 100ng/ml rhSema7a (Art.-Nr. 2068-s7, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) oder 100ng/ml IgG₁ Fc (Art.-Nr. 110-HG, R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA) stimuliert und bei 37°C unter Abschirmung von Licht für einen Zeitraum von 30 bis 240 Minuten inkubiert. Die Färbung der Zellen erfolgte jeweils 30 Minuten vor Ablauf der Inkubationsdauer durch Hinzufügen einer versuchsspezifischen Antikörper-Mixtur (siehe 4.6.4). Mit 2ml Lysepuffer (Art.-Nr. 349202, BD Biosciences, San Jose, CA USA) wurden durch milde Hypoosmolarität Erythrozyten eliminiert. Der Prozess wurde bis zum Erreichen völliger Klarheit der Proben beobachtet und die Röhrchen anschließend für fünf Minuten bei 300xg unter Verwendung eines Bremsprotokolls zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben in 2ml PBS⁻ als Waschmedium unter sachtem vortexen resuspendiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation (fünf Minuten, 300xg, RT, Bremsprofil) und erneutes Verwerfen des Überstandes, bevor die gereinigten Zellen in 300µl Zellfix (Art.-Nr. 340181, BD Biosciences, San Jose, CA USA), ebenfalls unter sanftem vortexen, resuspendiert wurden. Die so präparierten Proben wurden umgehend mittels BD FACSCanto II (Art.-Nr. 338962, BD Biosciences, San

Jose, CA USA) analysiert. Zu jedem Zeitpunkt wurde auf eine ausreichende Abschirmung gegenüber Lichtexposition geachtet.

4.6.4 Antikörper-Templates - humanes Vollblut

Antikörper-Mixtur für PNC-Etablierung:
(Verwendet in: 5.1.3)

Antikörper gegen:	Konjugierter Farbstoff	Volumen pro Probe:	Artikelnummer: (Hersteller)
CD66b	PeCy-7	1µl	25-0666-42 (eBioscience)
CD41	FITC	1µl	IM1756U (Beckman Coulter)
CD11b	PacBlue	1µl	101236 (BioLegend)

Antikörper-Mixtur für Analyse der Adhäsionsmolekülexpression:
(Verwendet in 5.2.2 und 5.4.2)

Antikörper gegen:	Konjugierter Farbstoff	Volumen pro Probe:	Artikelnummer: (Hersteller)
CD66b	PeCy-7	1µl	25-0666-42 (eBioscience)
CD42b	PerCP	2µl	303910 (BioLegend)
CD11b	APC	2µl	301410 (BioLegend)
PSGL-1	PE	2µl	328806 (BioLegend)
LFA-1	FITC	2µl	363404 (BioLegend)

4.6.5 Verfahren - murines Vollblut

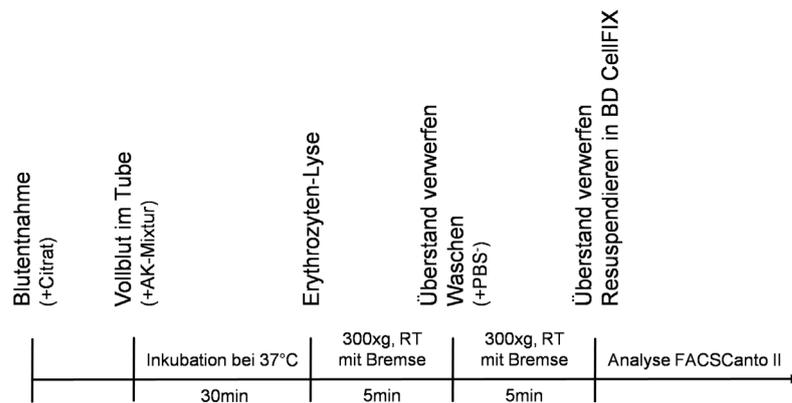


Abbildung 14 Versuchsablauf: FACS - murines Vollblut

In jedes FACS-Röhrchen wurden 100µl Blut, entnommen aus abdominalen Gefäßen (siehe 4.7.5), pipettiert. Direkt im Anschluss wurden die versuchsspezifischen Antikörper-Mixturen (siehe 4.6.6) hinzugefügt, sanft gevortext und die Proben für 30 Minuten bei 37°C in einem lichtgeschützten Wasserbad inkubiert. Es folgte die optische Lyse der Erythrozyten durch 2ml BD-Lysepuffer bis zur vollständigen Enttrübung mit anschließender Zentrifugation für 5 Minuten bei 300xg unter Verwendung eines Bremsprofils. Nach Abwurf des Überstandes wurden die Proben mit 2ml PBS⁻ gewaschen, erneut bei den gleichen Einstellungen zentrifugiert und anschließend unter sanftem vortexen in 300µl BD-Zellfix resuspendiert. Die Analyse der Proben am BD FACSCanto II erfolgte mit geringstmöglicher Verzögerung innerhalb der ersten Stunde nach Fixation. Zu jedem Zeitpunkt wurde dabei auf einen ausreichenden Lichtschutz geachtet.

4.6.6 Antikörper-Templates - murines Vollblut

Antikörper-Mixtur für murine PNC-Analyse:
(Verwendet in 5.2.4)

Antikörper gegen:	Konjugierter Farbstoff	Volumen pro Probe:	Artikelnummer: (Hersteller)
CD45	PerCP	1µl	103132 (BioLegend)
Ly6G/C	PeCy-7	1µl	108416 (BioLegend)
CD42b	FITC	1µl	M040-1 (EMFRET)
CD11b	PacBlue	1µl	101236 (BioLegend)

4.7 Versuche am lebenden Tier

4.7.1 Rechtliche Rahmenbedingungen

Alle Experimente an Tieren die während dieser Dissertation durchgeführt wurden erfolgten nach den Vorgaben des Tierschutzgesetzes § 8 in der Fassung vom 18.05.2006, geändert durch das dritte Gesetz zur Änderung des Tierschutzgesetzes vom 04.07.2013, sowie der Verordnung zum Schutz von Versuchszwecken oder anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren vom 12.09.2013. Im Rahmen des Antrags eines Tierversuchvorhabens Aktenzeichen 35/9185.81-2 / Tierversuch-Nr. A5/15 sind diese durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt worden.

4.7.2 Verwendete Mauslinien

Internationale Bezeichnung des verwendeten Plexin C1-Knockout Stammes: B6.129-Plxnc1^{tm1Alk}/J [204] mit C57BL/6 als genetischem Hintergrund. Die Zucht der Tiere erfolgte in der Versuchstierhaltung der Pharmakologie und Toxikologie Tübingen. Fortlaufend werden diese Tiere als Plxnc1^{-/-} bezeichnet. C57BL/6 Wildtyp Tiere wurden bezogen von der Firma Charles River (im Folgenden als WT deklariert). Bei der Auswahl der Versuchsgruppen wurden die Tiere nach Geschlecht und Alter sortiert und verpaart.

4.7.3 Murines Modell der LPS induzierten Lungenschädigung

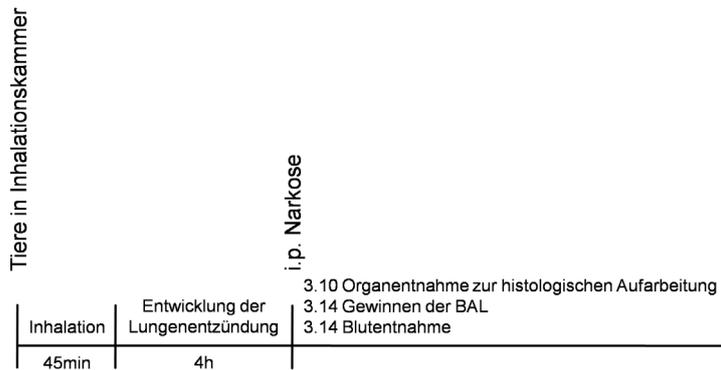


Abbildung 15 Versuchsablauf: LPS-Inhalation

Bis zu 6 Mäuse wurden in eine Wassersog-Inhalationskammer gegeben, in welcher sie für 45 Minuten mit vernebeltem LPS (e.coli 026:B6) (no. L8274, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) oder NaCl exponiert wurden. Ein Taschenvernebler Micro-AIR (Art.-Nr. NE U22, Omron, Kyoto, Japan) setzte dabei eine LPS-Lösung von 0,5mg/ml in 0,9% NaCl, oder eine 0,9% NaCl-Kontrolle gleichmäßig als Aerosol frei. Es folgte eine Inkubationszeit von 4 Stunden, in denen sich eine moderate Lungentzündung entwickeln kann. In dieser Zeit befanden sich die Mäuse in ihren Käfigen und erhielten Zugang zu Wasser und Trockenfutter ad libidum. Kurz vor Ende der Inkubationszeit wurden die Tiere mittels intraperitonealer (i.p.) Applikation von 150-300µl einer Fentanyl-Midazolam Lösung, abhängig von Größe und Gewicht des Tieres, in Narkose versetzt.

Substanz:	Volumen:
Fentanyl	1,0ml (=0,05 mg/kg KGW)
Midazolam (Dormicum®)	1,0ml (=5,00 mg/kg KGW)
Medetomidin (Domitor®)	0,5ml (=0,50 mg/kg KGW)
Aqua ad injekt.	7,5ml (ergibt 10 ml/kg KGW)

Eine ausreichende Narkosetiefe wurde während des gesamten Verlaufes durch das Erlöschen des Zwischenzehenreflexes kontrolliert und bei Bedarf eine

erneute fraktionierte i.p. Applikation der Fentanyl-Midazolam-Lösung vorgenommen.

4.7.4 Lungenentnahme zur histologischen Aufarbeitung

Das zuvor nach den jeweiligen Versuchsanordnungen behandelte Tier wurde in tiefer Narkose rücklings auf die Wärmeplatte des Operationstisches (Art.-Nr. 08321, Klaus Effenberger Med. Techn. Gerätebau, Pfaffing, Deutschland) gelegt und mit handelsüblichen Klebestreifen an den vorsichtig abduzierten Extremitäten fixiert. Über einen sanften Zug an einem um die oberen Inzisiven gelegten Stückes Nähfaden wurde eine suffiziente Reklination des Kopfes und damit die notwendige Zugänglichkeit des Halses erreicht. Es folgte eine Längseröffnung der Haut von suprapubisch bis submental, ohne dabei präformierte Körperhöhlen, wie das Peritoneum, oder den Thorax, zu verletzen. In einem nächsten Schritt wurden die Glandula parotis, sublingualis und submaxillaris mitsamt den einliegenden Lymphknoten von der Trachea mobilisiert. Diese wurde mit einer Pinzette unterminiert und ein Faden zur späteren Fixierung der endotrachealen Kanüle locker vorgelegt. Nun wurde das Peritoneum inzidiert, um von diaphragmal kommend den Thorax mit einer Schere durch das Sternum hindurch zu eröffnen. Anschließend wurde mit einer Schere durch einen tiefen axillären Schnitt die Arteriabrachialis durchtrennt um einen Abfluss für die PBS-Spülung der Lunge zu ermöglichen. Hierfür wurde mit einer 22G Kanüle der rechte Ventrikel punktiert und mit ca. 1ml NaCl 0,9% gefüllt, bis das Lungengewebe sichtbar aufhellte. Sofort danach wurde die Trachea durch eine Inzision eines Ligamentum annularia eröffnet und mit einem 22G Venenverweilkatheter (Art.-Nr. 381223, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) intubiert, sowie durch zuziehen des vorbereiteten Fadens fixiert. Über diese Kanüle wurde 1ml einer 4% Formaldehydlösung (Art.-Nr. A0936, AppliChem, Darmstadt, Deutschland) in die Lunge appliziert, um den Alveolarraum auszufüllen. Daraufhin wurde der Katheter entfernt, die Trachea mit dem Faden dicht verschlossen und Lunge mitsamt Herz en-bloc reseziert. Das Präparat wurde anschließend in Formaldehyd eingelegt und für die weitere Aufbereitung bei Raumtemperatur gelagert.

4.7.5 Blut- und BAL-Gewinnung von Versuchstieren

In gleichem Verfahren, wie unter 4.7.4 aufgeführt, wurde das narkotisierte Tier auf dem Präparationstisch fixiert, sowie die Haut von suprapubisch bis nach submental hin eröffnet und nach lateral mobilisiert. Es folgte die Inzision des Peritoneums und das Aufspannen der Schnittländer um eine atraumatische Mobilisation der Innereien und damit einen guten Zugang zur abdominalen V. cava zu ermöglichen. Diese wurde mit einer BD Microlance™ 3 (Art.-Nr. 302200, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) punktiert und 500-1000µl Blut in eine mit 100µl Citrat gefüllten BD Plastipak™ 1ml (Art.-Nr. 300013, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) entnommen.

Im Anschluss wurde zur Gewinnung der broncho-alveolären Lavage (BAL), ebenfalls wie in 4.7.4, die Trachea präpariert und nach Einschnitt eines Ligamentum annularia durch einen 22G Venenverweilkatheter intubiert. Über diesen wurden 600µl isotone Kochsalzlösung in die Lunge injiziert und gleich darauf wieder aspiriert. Dieser Vorgang erfolgte dreimal, wobei das gewonnene Material gepoolt wurde.

Nach Abschluss der Probenentnahme wurde das weiterhin tief anästhetisierte Tier durch zervikale Dislokation euthanasiert und eine Zellzahlbestimmung der BAL durch den CASY-Zellzähler (Model TI, Roche, Rotkreuz, Schweiz) durchgeführt. Die Proben wurden direkt weiterverwendet, oder bis zur weiteren Bearbeitung bei -20°C eingefroren.

4.8 Histologie

4.8.1 Aufarbeitung der histologischen Präparate

Die Entwässerung der in Formaldehyd eingelegten Präparate erfolgte durch einen Gewebeeinfiltrationsautomaten (Art.-Nr. TP1020, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland), bevor diese anschließend in Paraffin zur finalen Fixierung eingegossen wurden. An einem Rotationsmicrotom (Art.-Nr. RM2235, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden aus den Paraffinblöcken Schnittpräparate von 3µm Dicke angefertigt. Über ein auf 40°C

vorgewärmtes Wasserbad (Art.-Nr. HI1210, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden die Schnitte gestreckt und anschließend jeweils zu dritt auf einem Objektträger nebeneinander platziert. Dieser wurde über Nacht auf einem Paraffinstrecktisch (Art.-Nr. HI1220, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) bei 37°C getrocknet.

4.8.2 Immunofluoreszenz NET-Färbung

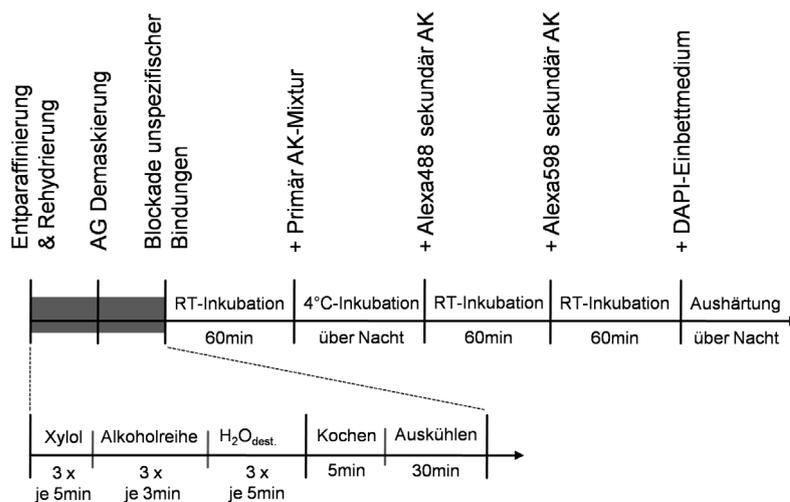


Abbildung 16 Versuchsablauf: IF NET-Färbung

Zur Entparaffinierung wurden die Objektträger dreimal für fünf Minuten in Xylol (Art.-Nr. 9713.3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gestellt, gefolgt von einer absteigenden Alkoholreihe, bestehend aus zweimal drei Minuten 100% Ethanol sowie jeweils drei Minuten 96%, 70% und 50%. Durch dreimaliges Bad in H₂O_{aq.dest.} für jeweils fünf Minuten wurde die Rehydrierung des Gewebes abgeschlossen. Die zu jedem Zeitpunkt feucht gehaltenen Objektträger wurden nun für fünf Minuten in Citratpuffer gebadet und anschließend in einem AG-Demaskierungspuffer (Art.-Nr. H-3300, Vector Laboratories, Peterborough, Vereinigtes Königreich) für fünf Minuten gekocht. Zur Auskühlung wurde das Präparat für 30 Minuten in Citratpuffer eingelegt. Um bei weiteren Arbeitsschritten ein Übertreten von Flüssigkeiten zwischen den Schnitten eines Objektträgers zu verhindern wurden mit einem PAP-Pen Liquidblocker (Art.-Nr. Z377821, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) Kreise um diese gezogen. Die

Blockade gegenüber unspezifischen Antikörperbindungen erfolgte für eine Stunde bei RT mit 100µl Blockierungslösung.

Blockierlösung:

Substrat	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
Normal Hähnchen Serum	10µl	Sc-2479 (Santa Cruz Biotechnology)
Normal Ziegen Serum	10µl	Sc-2043 (Santa Cruz Biotechnology)
BSA	50mg	100018 (Boehringer)
PBS ⁻	1ml	

Seren Spezies richteten sich nach den Ursprungstieren der Alexa-gekoppelten AK

Nach Abgießen der Blockierungslösung wurden 100µl der Primärantikörper-Mixtur, einer IgG-Kontrolle, sowie einer 1% BSA negativ Kontrolle ohne Zusätze auf jeweils einen der drei Schnitte gegeben und diese bei 4°C über Nacht inkubiert.

Primärantikörper-Mixtur:

Substrat	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
Kaninchen Anti-NE-AK	10µl	Bs-6982R (Bioss)
Ratte Anti-Ly6B.2-AK	10µl	MCA771GA (Bio-Rad Laboratories)
BSA	10mg	100018 (Boehringer)
PBS ⁻	1ml	

IgG-Kontrolle:

Substrat	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
Normal Kaninchen IgG	10µl	Sc-2027 (Santa Cruz Biotechnology)
Normal Ratte IgG	10µl	Sc-2026 (Santa Cruz Biotechnology)
BSA	10mg	100018 (Boehringer)
PBS ⁻	1ml	

Am darauffolgenden Tag wurden die Schnitte viermal für jeweils fünf Minuten in PBS⁻ gewaschen, bevor 100µl Ziege Alexa488-anti-Kaninchen (Art.-Nr. A-11008, Thermo Scientific, Rockford, IL USA), gelöst in BSA 1% im Verhältnis 1:1000, aufgetragen wurden. Dieser inkubierte abgeschirmt von Licht für eine Stunde bei RT, bevor erneut vier Waschvorgänge mit PBS⁻ á fünf Minuten durchgeführt wurden. Die zweite Färbung erfolgte mit 100µl Hähnchen Alexa598-anti-Ratte (Art.-Nr. A-21471, Thermo Scientific, Rockford, IL USA) gelöst in 1% BSA im Verhältnis 1:1000, welche erneut für eine Stunde lichtgeschützt bei RT inkubiert wurde. Diesem Schritt folgte der finale Waschzyklus aus vier mal fünf Minuten, bevor wenige Tropfen Roti®-Mount FluorCare DAPI Einbettmedium (Art.-Nr. HP20.1, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet wurden um die Schnitte mit einem Deckglas zu versiegeln. Vor weiterer Verwendung der Objektträger wurde dem Einbettmedium für eine Nacht Zeit gegeben bei 4°C auszuhärten.

Alle Aufnahmen wurden angefertigt an einem Axiophot Zeiss Mikroskop (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland) unter Verwendung einer digitalen Kamera, gesteuert durch die AxioVision Software V4.8 (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland).

4.8.3 Immunhistochemische Färbungen

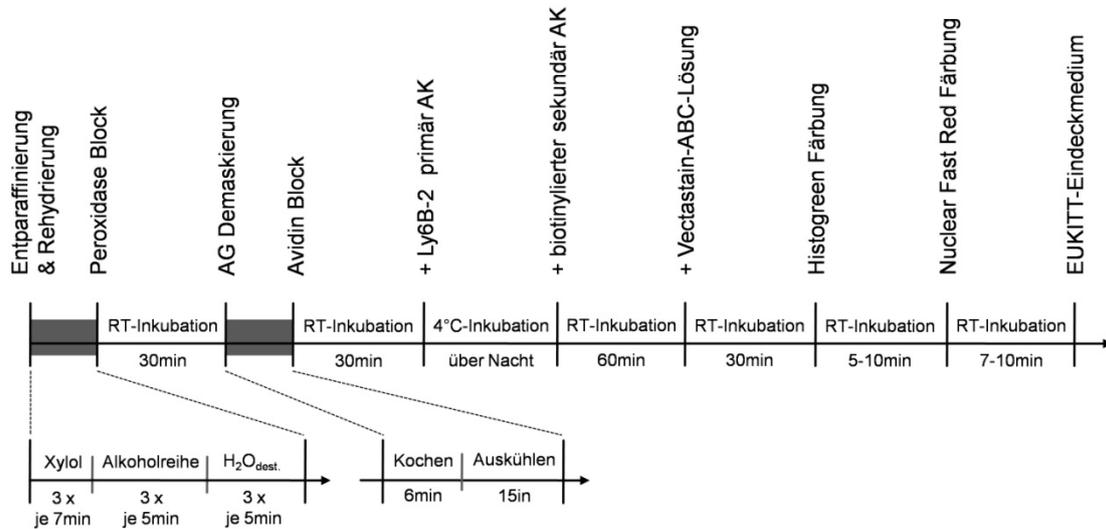


Abbildung 17 Versuchsablauf: IHC-Färbung

Die beladenen Objektträger wurden für dreimal sieben Minuten in Xylol entparaffiniert und anschließend wie unter 4.8.2 beschrieben mit einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert. Zur Blockade residualer, endogener Peroxidaseaktivitäten wurden die Schnitte für 30 Minuten bei RT in einer Lösung aus Methanol, versetzt mit 1,5% Wasserstoffperoxid (H₂O₂) inkubiert. Anschließend wurden die Präparate für fünf Minuten in H₂O_{aq,dest.} gewaschen bevor sie in eine Kunststoffküvette gefüllt mit einem Antigen-Demaskierungspuffer (Art.-Nr. H-3300, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) für sechs Minuten gekocht wurden. Hierbei wurde mit besonderer Sorgfalt darauf geachtet, dass die Schnitte zu keinem Zeitpunkt austrocknen und gegebenenfalls zusätzlicher Demaskierungspuffer hinzugefügt. Vor einer weiteren Bearbeitung kühlten die Schnitte für 15 Minuten ab und wurden anschließend für fünf Minuten in H₂O_{aq,dest.} gewaschen. Mittels PAP-Pen-Liquidblocker um die Schnitte gezeichneten Kreisen wurden diese vor dem Übertreten von Flüssigkeit zwischen den Schnitten geschützt. Es folgte die 30 minütige Blockierung mit einer Avidin-Blocking-Lösung (Art.-Nr. SP-2002, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA), ein fünf minütiger Waschschrift, sowie eine Inkubation der Schnitte bei 4°C über Nacht mit einer Mischung aus der Biotin-Blocking-Lösung (Art.-Nr. SP-2002, Vector Laboratories, Burlingame,

CA USA) versetzt mit Ratte anti-Ly6B.2 Alloantigen Klon 7/4 Antikörper (Art.-Nr. MCA771GA, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) in einem Verhältnis von 1:1000. Nach erneutem Waschen für fünf Minuten wurde der biotinylierte, sekundäre Kaninchen Anti-Ratte-IgG Antikörper (Art.-Nr. BA-4000, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) durch Inkubation für 60 Minuten bei RT aufgetragen und ungebundene AK anschließend für fünf Minuten in PBS⁻ abgewaschen. 100µl der Vectastain-ABC-Lösung (Art.-Nr. PK-4004, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) wurden für 30 Minuten auf jeden Organschnitt gegeben und anschließend mit 120µl PBS⁻ gespült. Die Färbung erfolgte mit 100µl Histogreen-Lösung (Art.-Nr. E109, Linaris, Dossenheim, Deutschland) für fünf bis zehn Minuten bei RT im Dunkeln unter Sichtkontrolle. Nach drei minütigem Waschen erfolgte die Gegenfärbung mit 100µl Fast NuclearRed (Art.-Nr. H-3403, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) für sieben bis zehn Minuten bei RT im Dunkeln unter Sichtkontrolle. Nach einer finalen Waschung mit PBS⁻ für 5 Minuten wurden die Schnitte drei Mal durch 100% Ethanol, sowie zwei Mal durch Xylol geschwenkt und noch feucht durch einen Tropfen EUKITT-Einbettmedium (Art.-Nr. 03989, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) mit einem Deckglas versiegelt.

Alle Aufnahmen wurden mit einem Leitz DM IRB Mikroskop (Leica Camera AG, Wetzlar, Deutschland), unter Verwendung der AxioVision Software v4.8.2 (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland), angefertigt.

4.9 Cytometric bead Assay (CBA)

4.9.1 Grundlagen

In Anlehnung an quantitative Zytokinbestimmungen mittels ELISA aus BAL-Proben wurde zur Erfassung ähnlicher Parameter des murinen Serums ein *cytometric bead assay* (CBA) verwendet. Grundlage dieser Entscheidung war die gewonnene Probenmenge pro Tier, welche sich bei einer Lavage auf etwas mehr als einen Milliliter beläuft, bei Serum jedoch mit knapp 300µl sehr gering ausfällt. Ein einzelner ELISA Well für einen singulären Parameter benötigt in der Regel zwischen 50-100µl Material. Der CBA bietet den klaren Vorteil pro

Test lediglich 25µl Probe zu verwenden, aus welcher bis zu zwölf Testsubstanzen simultan ermittelt werden können. Durch den Einsatz von AK beschichteten Mikropartikeln (= Beads) werden zunächst die Zielmoleküle gebunden und sekundär mit einem AK konjugiertem Farbstoff markiert. Die durchflusszytometrisch gemessene Intensität des Farbsignals kann dann anhand einer Standardkurve mit der Proteinkonzentration innerhalb der Probe korreliert werden. Für die Auswertung von mehreren Testparametern werden in einer Probe die jeweiligen beschichteten Beads vermischt und gemeinsam inkubiert. Der Hersteller bietet dabei diese in verschiedenen Größen an, sodass die Partikel in der Datenauswertung getrennt nach SSC und FSC differenzierbare Populationen bilden, nach denen spezifische Gates gelegt werden können.

4.9.2 Verfahren

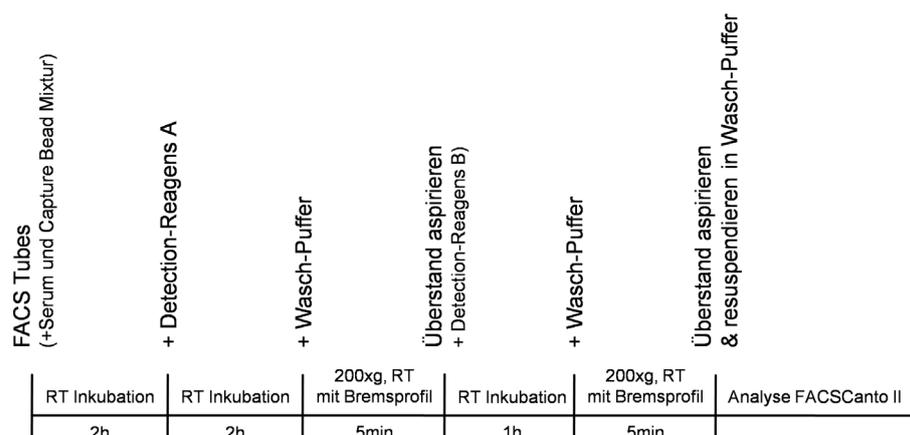


Abbildung 18 Versuchsablauf: CBA

Verwendet wurde das BD CBA Masterkit (Art.-Nr. 562246, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) in Kombination mit PE-Sets für TNF α (Art.-Nr. 562336, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland), IL-6 (Art.-Nr. 562236, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland), Kreatinkinase (Art.-Nr. 558340, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland), Il-1 β (Art.-Nr. 562278, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland), INF γ (Art.-Nr. 562232, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) und IL-10 (Art.-Nr. 562263, BD Falcon, Heidelberg, Deutschland) nach Angaben des

Herstellers. FACS-Röhrchen wurden mit 50µl Serum (1:2 verdünnt) befüllt und 20µl eines Capture Bead Mix, bestehend aus jeweils 1µl Capture Bead Lösung jedes Kits in ein Gesamtvolumen von 20µl pro Probe hinzugefügt, bevor diese für zwei Stunden bei RT inkubiert wurden. Der nächste Schritt bestand aus dem Hinzufügen von 20µl Detection-Reagens A und einer erneuten Inkubation für zwei Stunden bei RT. Anschließend wurden die Röhrchen mit 1ml Wasch-Puffer aufgefüllt und bei 200xg für fünf Minuten unter Verwendung eines Bremsprofils zentrifugiert. Der Überstand wurde behutsam aspiriert und 100µl des Detection-Reagens B für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach erneutem Spülen mit 1ml Wasch-Puffer und fünf minütiger Zentrifugation bei 200xg konnte der Überstand abgesaugt und die fertigen Proben in 300µl Wasch-Puffer resuspendiert werden.

Die Daten Akquisition erfolgte ohne zeitliche Verzögerung mittels BD FACS Canto II (Art.-Nr. 338962, BD Biosciences, San Jose, CA USA) unter Verwendung der Diva Software (BD Biosciences, San Jose, CA USA). Zur weiteren Auswertung der Ergebnisse wurde die FlowJo Software v10.0 verwendet und Konzentrationen anhand Standard-Verdünnungsreihen der jeweiligen Kits ermittelt.

4.10 Sequentielle PMN-Migrationsanalyse

4.10.1 Grundlagen

Der Versuchsaufbau zielt darauf ab PMNs durch Mehrfachfärbungen auf ihrem Weg von intravasal nach vaskulär adhärent, intraparenchymatös und letztendlich alveolär differenzierbar zu machen. Das bereits von Reutershan und Konrad etablierte Protokoll [217, 218] verwendet hierfür zwei konjugierte AK gegen unterschiedliche PMN Epitope. Der erste, ein Gr1-APC AK, wird dabei unmittelbar vor Blut-/BAL-Gewinnung und Organentnahme i.v. appliziert. Dieser färbt somit sämtliche PMNs, welche frei zirkulieren, oder maximal an Endothelzellen der Lunge adhärent sind. Nachfolgend wird die resezierte Lunge mazeriert, gewaschen und gefiltert um die hierin enthaltenen Zellen freizulegen. Diese werden mit dem Zweiten, einem 7/4-FITC AK, gefärbt und fixiert. In der

FACS Analyse dieser Proben existieren nun Zellen, die APC und FITC doppelt positiv sind und als endothelial adhärenente PMNs identifiziert werden können. Zusätzlich lassen sich FITC positive und APC negative Zellen identifizieren. Diese waren zum Zeitpunkt der i.v. Applikation des APC-AK bereits in das Lungenparenchym migriert und konnten somit lediglich Kontakt zum 7/4-FITC AK haben. Blut und BAL werden in eigenen Färbungen vorbereitet und gesondert analysiert, um die vier Etappen der Extravasation zu komplementieren.

4.10.2 Probengewinnung

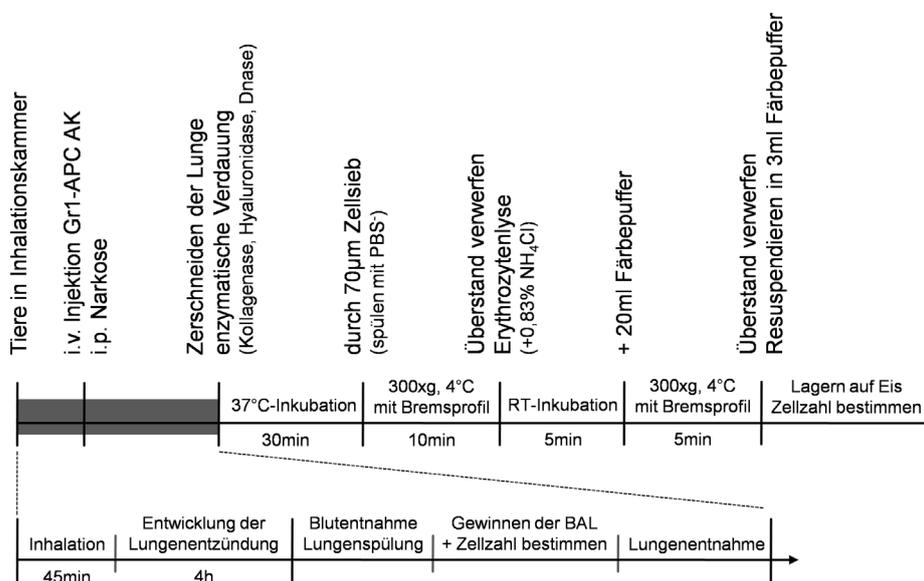


Abbildung 19 Versuchsablauf: Probengewinnung

Die Versuchstiere wurden wie unter 4.7.3 beschrieben für 45 Minuten mit LPS inhaliert. Eine Applikation von 10µg des Gr-1 APC-konjugierten Antikörpers (Art.-Nr. RB6-8C5, Lymphocyte Culture Center Core, University of Virginia, Charlottesville, VA USA), gelöst in 300µl NaCl, erfolgte unmittelbar vor i.p. Narkotisierung der Tiere in die Schwanzvene. Anschließend wurde mit der Präparation der Mäuse begonnen, das Mediastinum eröffnet und durch die Punktion des rechten Ventrikels 500µl Blut entnommen. Dieses wurde mit Citrat antikoaguliert und nach dem Protokoll für murines Vollblut (siehe 4.6.5) unter Verwendung der in 4.10.3 aufgeführten Antikörpermixtur prozessiert. Ohne die

Kanüle zu entfernen wurde die infradiaphragmale V.cava eröffnet um die Lunge durch Applikation von 3ml PBS⁻ in den noch schlagenden rechten Ventrikel von zirkulierenden PMNs zu reinigen. Es folgte die Gewinnung der BAL durch einführen einer 22G Venenverweilkanüle in die eröffnete Trachea. Hierüber wurden rezidivierend 1ml PBS⁻ appliziert und als Lavage aspiriert, bis ein Gesamtvolumen von 5ml erreicht worden ist. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert und die Zellzahl wie unter 4.2.3 beschrieben mittels Zählkammern bestimmt.

Anschließend wurde die Lunge en-bloc reseziert und mediastinale Strukturen entfernt, bevor das Gewebe zerkleinert und für 30 Minuten bei 37°C in einem Schüttelinkubator bei 200rpm in einen Enzymcocktail inkubiert.

Enzymcocktail:

Substrat (Arbeitskonz.)	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
Kollagenase XI (125 U/ml)	5µl	C7657 (Sigma-Aldrich)
Hyaluronidase I-s (60 U/ml)	5µl	H3506 (Sigma-Aldrich)
DNase (60 U/ml)	5µl	D4527 (Sigma-Aldrich)
Gr-1 unkonjugiert	5µl	RB6-8C5 (Lymphocyte Culture Center)
PBS ⁻	5 ml	

Das zerschnittene Parenchym samt der Enzymlösung wurde darauf durch 70µm Zellsiebe (Art.-Nr. 352350, Corning Life Sciences, Corning, NY USA) in ein 50ml Falcon gegeben und die Organstücke mit einem Spritzenstempel sanft hindurchgepresst. Dabei wurde das Sieb mehrmals mit PBS⁻ gespült und das Auffanggefäß am Ende auf ein Gesamtvolumen von 20ml mit PBS⁻ aufgefüllt. Die Proben wurden anschließend bei 300xg und 4°C für 10 Minuten unter Verwendung eines Bremsprofils zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 5ml Lysepuffers zur Elimination residualer Erythrozyten resuspendiert.

Lysepuffer (10x):

(vor Anwendung 1:10 in H₂O_{aq.bidest} verdünnt)

Substrat	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
NH ₄ Cl (1,5 M)	10,03 g	A0988 (AppliChem)
NaHCO ₃ (0,1 M)	1,05 g	K10720529 (Merck)
Na ₂ -EDTA (0,01 M)	465,00 mg	A2937 (AppliChem)
H ₂ O _{aq.bidest}	125,00 ml	

Nach fünfminütiger Inkubation bei RT wurden 20ml Färbepuffer hinzugefügt und eine weitere Zentrifugation bei 300xg und 4°C für fünf Minuten unter Verwendung eines Bremsprofils angeschlossen.

Färbepuffer:

Substrat	Menge	Artikelnummer (Hersteller)
Na ₂ N ₃	2,5 ml	S-8032 (Sigma-Aldrich)
BSA	5 g	100018 (Boehringer)
PBS ⁻	500 ml	

Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 3ml Färbepuffer resuspendiert und eine Zellzahlbestimmung wie unter 4.2.3 beschrieben durchgeführt.

4.10.3 Durchflusszytometrische Analyse

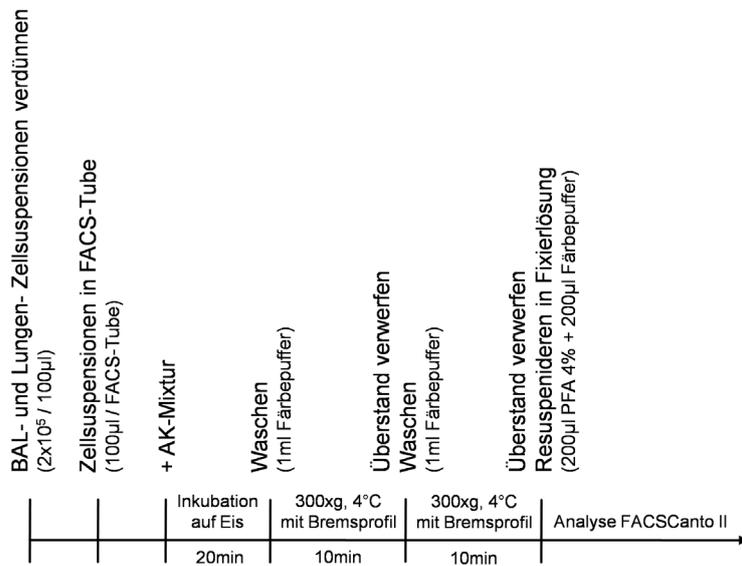


Abbildung 20 Versuchsablauf: FACS Analyse

Die gewonnenen Zellsuspensionen an BAL und Lungenparenchym wurden auf eine Konzentration von 2×10^5 Zellen / 100µl in Färbepuffer (siehe 4.10.2) verdünnt und 100µl pro FACS-Tube pipettiert. Es folgte die Inkubation der Proben nach Beimengung der AK-Mixtur für 20 Minuten auf Eis unter ausreichendem Schutz gegen Lichtexposition.

Antikörper-Mixtur:

Antikörper gegen:	Konjugierter Farbstoff	Volumen pro Probe: (Vorverdünnung)	Artikelnummer: (Hersteller)
CD45	PerCP	1µl (1:10)	557235 (BD)
7/4	FITC	1µl (1:5)	MCA771F (AbD Serotec)

Im Anschluss wurden die Proben zweimal mit 1ml Färbepuffer gewaschen, für 10 Minuten bei 300xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen, bevor sie in 400µl einer Mischung aus gleichen Teilen Paraformaldehyd (PFA) 4% (Art.-Nr. P6148, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA) und Färbepuffer

resuspendiert, sowie fixiert wurden. Die Analyse erfolgte umgehend mittels FACSCanto II.

4.11 Multiplate Analyzer TRAP-6 Thrombozytenfunktionstestung

4.11.1 Grundlagen

Die Thrombozytenfunktionsdiagnostik des Roche Multiplate Analyzer basiert auf dem Prinzip der Impedanzänderung von Elektroden durch aktivierte Plättchen. Als elektronisches Aggregometer zuerst 1980 von Cardinal und Flower beschrieben macht sich das Verfahren die adhäsiven Eigenschaften der Zellen zunutze [219]. Durch ihren Kontakt auf den Leitungselementen erhöhen sie den elektrischen Widerstand des Systems und lassen somit Rückschlüsse vom Stromfluss auf das Aggregationsverhalten zu. Durch die Verwendung von spezifischen Stimulanzen wie Adenosindiphosphat (ADP), Arachidonsäure, Kollagen und dem Thrombin-Rezeptor-Aktivierendem-Peptid 6 (TRAP-6) lässt sich so die pharmakologische Antikoagulation monitoren. Im wissenschaftlichen Kontext ermöglicht das Verfahren eine selektive Beurteilung einzelner Aktivitätskaskaden, wie die Thrombinstimulation von Thrombozyten durch TRAP-6 über den Protease-aktivierten-Rezeptor 1 (PAR-1) [220]. Physiologischer Weise löst die Bindung von Thrombin an PAR-1 und PAR-4 eine gesteigerte Oberflächenexpression von GPIIb/IIIa, sowie die extrazelluläre Spaltung von Fibrinogen zu Fibrin aus und fördert sowie stabilisiert die Koagulation [221]. Das Peptid induziert dabei im Gegensatz zu Thrombin selbst eine Aggregation der Zellen ohne die Spaltung von Fibrinogen [222].

Die Vollblutproben werden dabei mit Hirudin antikoaguliert um einen Einfluss auf den physiologischen Kalziumspiegel von 1.1-1.2mmol/l zu vermeiden [223].

4.11.2 Verfahren

Das Versuchsprotokoll folgt den standardisierten Angaben des Herstellers. Es begann mit dem vorwärmen des Multiplate Analyzer (Art.-Nr. 06675069001, Roche, Rotkreuz, Schweiz) auf Betriebstemperatur. Anschließend wurden 300µl auf 37°C vorgewärmtes NaCl 0,9% sowie 300µl Vollblut, antikoaguliert mit 25µg/ml Hirudin (Art.-Nr. 94581, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO USA), in die

Testkammer pipettiert. Nach einer drei minütigen Inkubation folgte das Hinzufügen von 20µl TRAP-6 [1mM] (Art.-Nr. 06675875190, Roche, Rotkreuz, Schweiz) und sofortiger Beginn der sechs minütigen Impedanzmessung. Die thrombozytäre Aktivität als Korrelat der Impedanzzunahme wird dabei in Aggregationseinheiten (*aggregation units* = AU) angegeben.

4.12 Statistische Analyse

Statistische Auswertungen erfolgten unter Verwendung von Prism v5.0 (GraphPad Software). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler. Signifikanzen wurden bestimmt mittels One-way-Anova und Tukey's multiple comparison post Test sowie, wo angebracht gepaartem und ungepaartem t-Test. Als signifikant wurden p-Werte von $p < 0,05$ angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Etablierung

5.1.1 Neutrophil-extracellular TRAP Induktion und Quantifizierung

Die NETose als relativ junges Themengebiet stand bereits im Fokus intensiver Forschung [76, 96, 224]. Um definierte Abläufe und Grundlagen für die qualitative und quantitative Bestimmung dieser extrazellulären Strukturen zu schaffen, wurden histologische und photometrische Methoden hierfür etabliert und für weitere Versuchszwecke optimiert. In der Forschungsgruppe bereits etablierte Verfahren zur Trennung und Aufreinigung von neutrophilen Granulozyten sowie Thrombozyten (siehe 4.2) konnten zur Anwendung gebracht werden. Die PMA induzierte NETose von kultivierten PMNs wurden über einen Zeitraum von 30 bis 240 Minuten durch den Einsatz des HAEMA Diff-Quick Schnellfärbe-Kits (LABOR + TECHNIK Eberhard Lehmann GmbH, Berlin, Deutschland) sowie der Neutrophil Extracellular Trap (NET) Assay Kit (Art.-Nr. 601010, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI USA) untersucht.

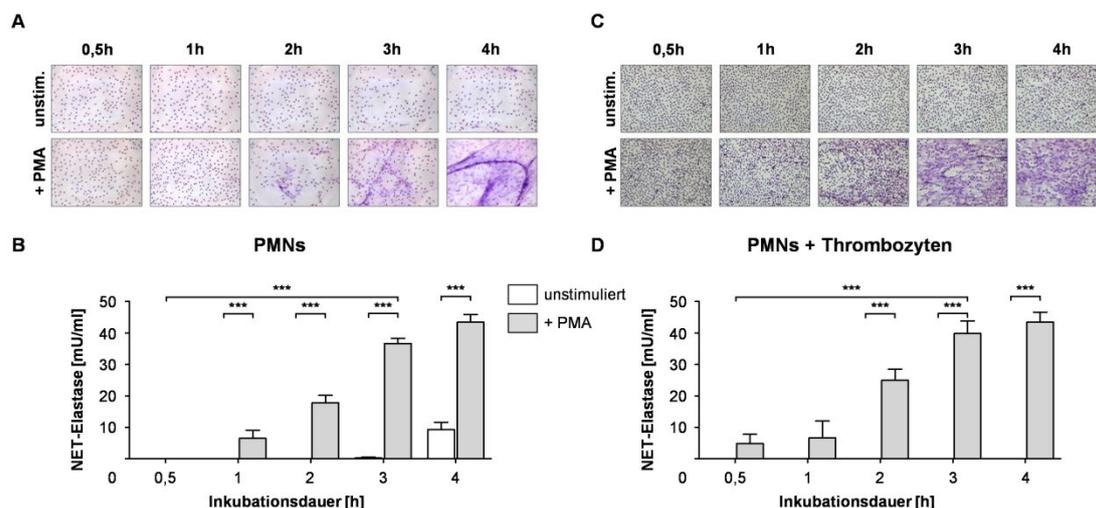


Abbildung 21 Neutrophile extrazelluläre TRAP Induktion und Quantifizierung *in-vitro*

Histologische Darstellung von A) 1×10^6 PMNs und C) 1×10^6 PMNs mit 5×10^7 Thrombozyten im zeitlichen Verlauf der Stimulation mit 20nM PMA angereichertem NET-Medium. Exemplarische Aufnahmen der Färbung mit HAEMA-Diff-Quick Färbe-Kit bei 20facher Vergrößerung.

Begleitende NET-NE Aktivität zu identischen Zeitpunkten zwischen 30 und 240 Minuten von B) 1×10^6 PMNs und C) 1×10^6 PMNs mit 5×10^7 Thrombozyten nach

PMA-Stimulation (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, *** P < 0,001, n=5/Gruppe).

In der mikroskopischen Untersuchung der Präparate ließen sich lediglich vereinzelt netzartige Strukturen innerhalb der ersten Stunde finden. Im Beisein von PMA jedoch begannen die Zellen ab der zweiten Stunde deutlich vermehrt NETs zu bilden und ab der dritten bereits makroskopisch sichtbar in NETose überzugehen. Ein Prozess der nach vier Stunden fast den kompletten Objektträger einnahm (Abbildung 21.A).

Begleitend zu dieser qualitativen Methode wurde im selben Setting anstelle einer Färbung die enzymatische Aktivität der neutrophilen Elastase (NE) als nachgewiesener Bestandteil von NETs [225] bestimmt. Die NET-NE Aktivität nach PMA-Stimulation begann ca. nach einer Stunde und steigerte sich kontinuierlich bis ca. 4 Stunden nach Induktion (Abbildung 21.B). Diese Daten korrelieren mit den Diff-Quick-Färbungen.

Weiterführend wurden die oben beschriebenen Methoden verwendet um den bereits beschriebenen Einfluss von Thrombozyten auf die Induktion von NETs in Experimenten zu untersuchen [70, 226]. Hierfür wurden humane, isolierte PMNs mit den ebenfalls isolierten Thrombozyten des gleichen Spenders co-kultiviert und das Ausmaß der NET Generierung zu identischen Zeitpunkten mikroskopisch sowie mittels NE-Aktivität analysiert. In Abbildung 21.C/D wird gezeigt, wie durch die Blutplättchen die PMNs bereits nach 30 Minuten PMA Gabe zur NET-Bildung angeregt werden. Des Weiteren kommt es durch den Thrombozytenzusatz zu einer Linksverschiebung der NETose mit einer früheren, ausgeprägten NET-Aktivität.

Nach dreistündiger Inkubation zeigte sich eine klare Schärfe zwischen Stimulation und Kontrolle, ohne dass dabei die NE-Aktivität bereits ihren Spitzenwert erreichte, oder der Objektträger überwuchert war.

Zusammenfassend wurden zwei Methoden etabliert und konstante Bedingungen zur Beurteilung der NETose *in-vitro* geschaffen. Diese wurden in nachstehenden Versuchen verwendet.

5.1.2 Immunfluoreszenz NET-Visualisierung *in-vivo*

Um die DNA-Externalisierung von PMNs über eine zusätzliche Methode beurteilen zu können, wurde eine Immunfluoreszenzfärbung für murine Lungenpräparate etabliert. Diese ermöglichte über die Farbmarkierung von *lymphocyte antigen 6 complex locus B* (Ly6B) die histologische Differenzierung und Auszählung von in die Lunge transmigrierten PMNs nach LPS Inhalation. Zusätzlich wurde ein Antikörper gegen murine NE zur weiteren Färbung eingesetzt. Die Kombination von NE Markierung mit einer 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Färbung für DNA ermöglichte die Unterteilung in NETende und nicht-NETende PMNs.

Exemplarisch ist in Abbildung 22.A/B ein Ausschnitt dieser Mehrfachfärbung bei 40facher Vergrößerung nach Kontrollbehandlung mit NaCl und inflammatorischem Stimulus durch LPS abgebildet, wobei DAPI blau, NE grün und Ly6B rot gefärbt wurde. Die in Abbildung 22.A mit Pfeilen markierten, nicht NETenden PMNs sind durch ein starkes Ly6B Signal sowie die NE Akkumulation innerhalb der Zelle identifizierbar. Im Vergleich dazu sind in Abbildung 22.B mit Pfeilen extrazelluläre Ansammlungen von NE nebst PMN-Zellkernen markiert, welche über diese Färbung als NETende PMNs identifiziert werden können.

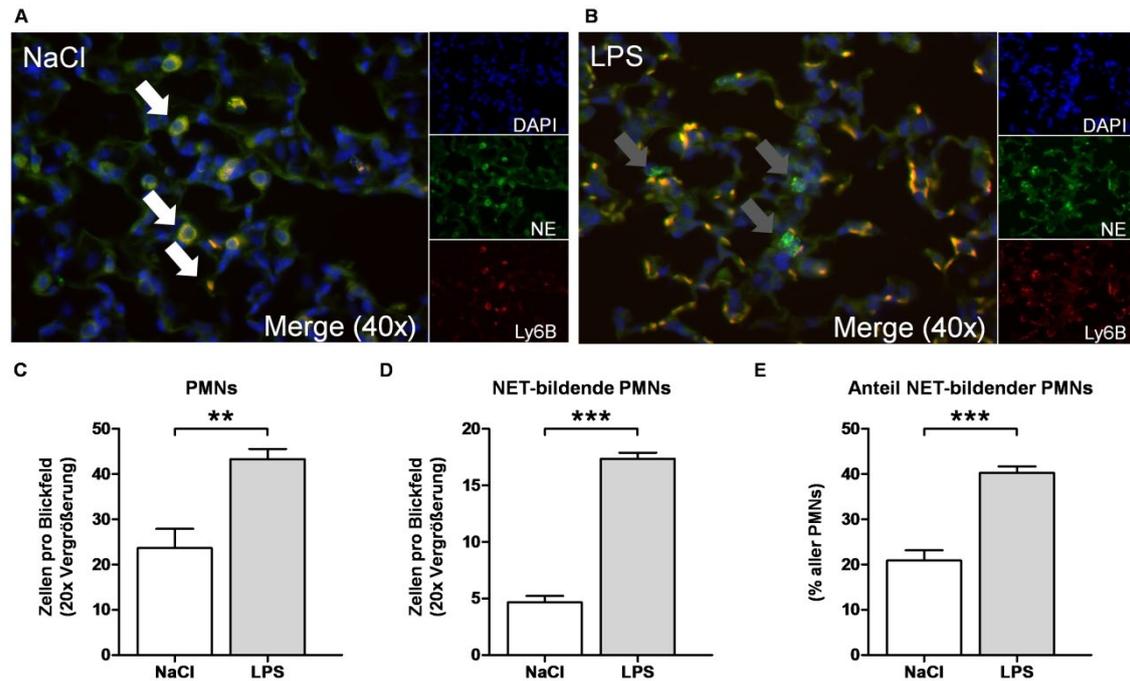


Abbildung 22 NET Quantifizierung durch Immunfluoreszenz *in-vivo*

Aufnahmen von histologischen Präparaten von WT C57BL/6 Mäusen nach **A**) NaCl oder **B**) LPS Inhalation, gefärbt mit NE (grün), Ly6B (rot) und DAPI (blau) in 40facher Vergrößerung. Dargestellt sind in groß die Overlay-Bilder der Farbkanäle, welche getrennt in klein abgebildet sind. PMNs und NETende PMNs sind mit weißen Pfeilen beziehungsweise grauen Pfeilen markiert. Auszählungen von **C**) PMNs insgesamt, **D**) NETenden PMNs und **E**) dem Anteil der NETenden PMNs an der Gesamtpopulation (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$, $n=6$ /Gruppe).

Die Auswertung der Schnitte erfolgte bei 20facher Vergrößerung (nicht abgebildet) durch Auszählung pro Blickfeld. Nach 45 minütiger inhalativer LPS oder NaCl (Kontrolle) Exposition von WT (C57BL/6) gefolgt von 4 Stunden Inkubationszeit konnte bei WT Mäusen eine signifikante Zunahme der zellulären PMN Migration in die Lunge festgestellt werden. Zusätzlich waren in LPS behandelten WTs auch die nachweisbaren NETs pro Blickfeld erhöht (Abbildung 22.D).

5.1.3 Quantifizierung von PNCs in humanem Vollblut *ex-vivo*

Während durch die Untersuchung der NETs ein Aspekt des antimikrobiellen Potentials von Granulozyten mikroskopisch und indirekt durch Surrogatmarker erschlossen werden konnte, wurde die Exploration von interzellulären

Verbindungen, wie sie die PNCs darstellen, mit Hilfe der fluoreszenzaktivierten Durchflusszytometrie durchgeführt.

Hierbei wurde für die ersten Ansätze Citrat-antikoaguliertes venöses Vollblut verwendet, welches bei 37°C für einen Zeitraum von 30 bis 240 Minuten mit 20nM PMA oder PBS⁻ als Kontrolle inkubiert wurde. Nach Erythrozyten-Lyse erfolgte die Färbung der PMNs durch markierte Antikörper gegen PMN- (CD66b, PE-Cy7 markiert) und Thrombozyten-Oberflächenantigene (CD41, FITC markiert). Um die differenzierte Betrachtung einzelner Zellpopulationen zu ermöglichen wurden die Proben nach Fixierung zeitnah gemessen. Anhand der Größe und Granularität (FSC und SSC) der Events wurde zunächst eine Vorauswahl (Prä-gating), wie in Abbildung 23.B dargestellt angewendet. Durch dieses Prä-gating ist es möglich die durch das FACS ermittelten Events, zusammengesetzt aus einer inhomogenen Mischung aus Zellen, Zelldetritus, kleineren Aggregaten von Thrombozyten und Luftblasen, durch Ausschluss von Events aufzureinigen. Der Inhalt des gewählten Gates kann nun weiter nach PMNs (CD66b positiven Events), sowie PNCs (CD66 und CD41 positiven Events) getrennt werden (Abbildung 23.D). Der Schwellenwert für die benötigte FITC Signalstärke ist so gewählt, dass nur jene PMNs als PNCs gewertet werden, die eine ausreichende Intensität abgeben (Abbildung 23.C). Durch diese Unterteilung ist es für spätere Experimente möglich die Eigenschaften der PNCs und der nicht-PNC-PMNs als eigenständige Populationen innerhalb einer Probe zu betrachten.

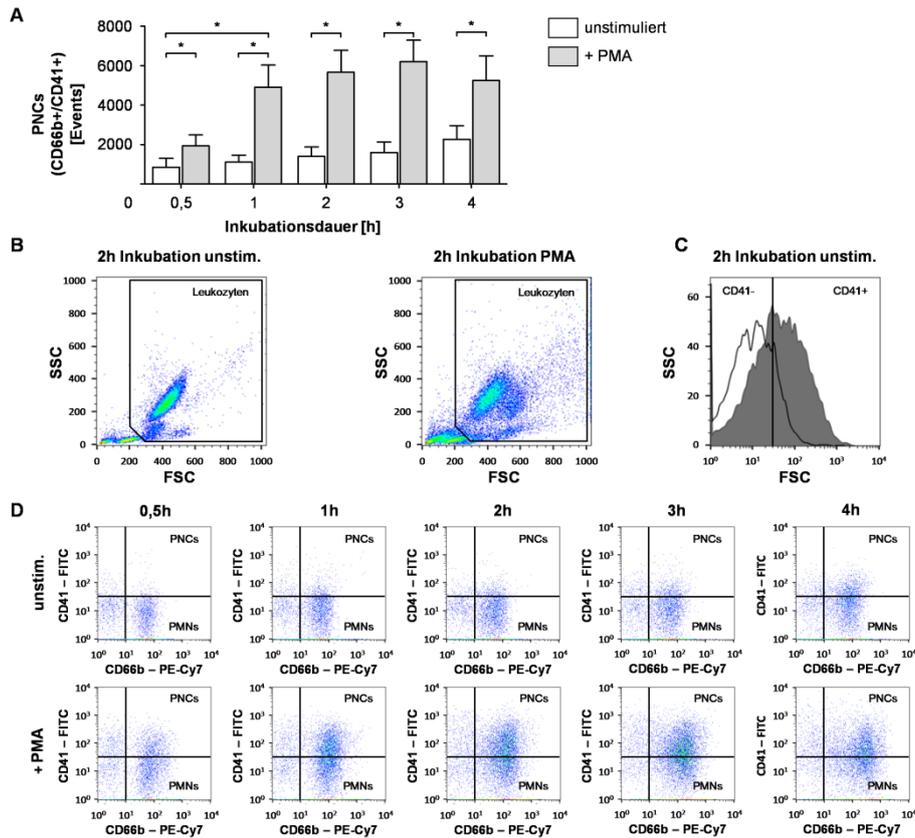


Abbildung 23 PNC Induktion und Quantifizierung in humanem Vollblut

Durchflusszytometrische Analyse von venösem Vollblut nach Stimulation mit 20nM PMA (PBS- als Kontrolle) im zeitlichen Verlauf zwischen 30 und 240 Minuten. **A)** Zeitreihe der PNC-Induktion, definiert als CD66b und CD41 positive Events (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, * $P < 0,05$, $n=3$ /Gruppe). **B)** Exemplarische Darstellung des Gates nach FSC und SSC zur Eliminierung von zu kleinen Events. **C)** Darstellung des CD41-FITC Intensitätsschwellenwertes zur Identifikation als signal-positives Event. **D)** Dotplots, aufgetragen nach der Signalintensität von CD41-FITC gegen CD66b-PE-Cy7 mit Schwellenwert im zeitlichen Verlauf.

Die Auswertung der Proben lieferte eine Zeitreihe der PMA induzierten PNC Bildung. Dabei konnte durch PMA eine signifikante Zunahme der Komplexe zu jedem der fünf Zeitpunkte gezeigt werden (Abbildung 23.A/D), mit einer deutlichen Trennschärfe bereits nach einer Stunde. Dieser Zeitpunkt wurde daher für spätere Versuche an humanem Vollblut als optimal angesehen und so als Standard definiert.

5.2 Einfluss von Sema7a auf die NET- und PNC-Bildung

5.2.1 Stimulation von PMNs mit rhSema7a *in-vitro*

In mehreren Arbeiten wurde bereits gezeigt, dass Sema7a in der Lage ist als pro-inflammatorisches Signal für diverse Zellen des Immunsystems zu agieren [189, 195], ohne dass dabei extrazelluläre TRAPs im Fokus dieser Untersuchungen standen.

Auf der Grundlage der in 5.1.1 beschriebenen Versuche wurde das neuronale-guidance-Protein daher als Stimulans für isolierte PMNs über einen Zeitraum von drei Stunden eingesetzt. Hierfür wurde ein mit 100ng/ml rhSema7a angereichertes NET-Medium sowie das unbehandelte Medium als Kontrolle verwendet. Zusätzlich wurde eine Co-Kultur aus PMNs und Thrombozyten für diesen Versuch verwendet.

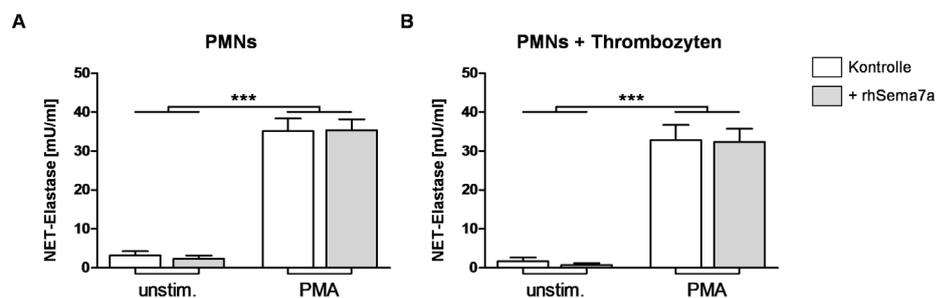


Abbildung 24 Stimulation von humanen PMNs mit rhSema7a *in-vitro*

NET-NE Aktivitätsmessung nach dreistündiger Inkubation mit 100ng/ml rhSema7A in nativem oder PMA angereichertem NET-Medium. **A)** 1×10^6 PMNs oder **B)** 1×10^6 PMNs mit 5×10^7 Thrombozyten co-kultiviert (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, *** $P < 0,001$, $n=5$ /Gruppe).

Entgegen unserer Erwartungen ließ sich durch Sema7a keine NET-Bildung induzieren. Die Zellen reagierten weder isoliert (Abbildung 24.A), noch in der Gegenwart von Thrombozyten (Abbildung 24.B) signifikant auf das Protein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Sema7a ebenfalls keine Beeinflussung der PMA vermittelten NETose in beiden Ansätzen bewirkt.

5.2.2 Stimulation von humanem Vollblut mit rhSema7a ex-vivo

Vor demselben theoretischen Hintergrund wie in 5.1.3 beschrieben, wurde rhSema7a mit der passenden IgG₁ Fc Kontrolle auch für den FACS-Versuchsaufbau zur PNC-Quantifizierung verwendet. Wieder wurde humanes Citrat-antikoaguliertes Vollblut eingesetzt. Das Blut wurde entweder nativ oder mit 500ng/ml LPS stimuliert verwendet und jeweils in Verbindung mit 100ng/ml der Testsubstanzen, bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

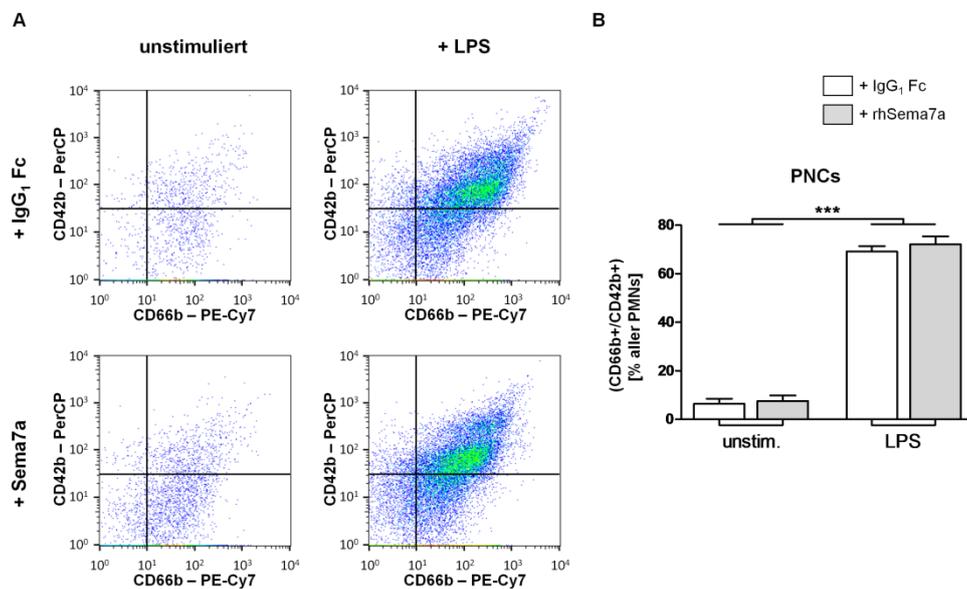


Abbildung 25 Einfluss von rhSema7a auf die PNC-Formation in humanem Vollblut

FACS Analyse von venösem Blut, welches für eine Stunde mit 100ng/ml rhSema7a, oder einer IgG1 Fc Kontrolle inkubiert wurde. Zusätzlich wurden diese Gruppen unterteilt in jeweils eine native oder mit 500ng/ml LPS stimulierte Probe. **A)** Representative Dotblots der vier Gruppen, aufgetragen nach CD42b-PerCP gegen CD66b-PeCy7 mit Signalintensitätsschwellenwerten. **B)** Auszählung der PNCs als prozentualer Anteil aller PMNs (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, *** P < 0,001, n=5/Gruppe).

Erneut wurde anhand der Fluoreszenzintensität in PMNs und PNCs getrennt. Abbildung 25.A zeigt repräsentative Dot-Blot Diagramme der Gruppen mit den darin eingetragenen Schwellenwerten für PE-Cy7 und PerCP. Die in Abbildung 25.B präsentierte Auszählung aller PNCs, anteilig an der gesamten PMN-Population in Prozent, zeigte keine signifikante Induktion von PNCs innerhalb der nativen Blutprobe nach einer Stunde. Gleichzeitig konnte gezeigt werden,

dass *Sema7a* ebenso keinen direkten Einfluss auf die LPS induzierte PNC-Formation nahm.

5.2.3 Pulmonale NETose in *Plxnc1*^{-/-}-Mäusen nach LPS-Inhalation

Um weitere Erkenntnisse über das Zusammenwirken zwischen *Sema7a* und dessen Rezeptor *Plxnc1* zu erlangen, wurden Versuche mit *Plxnc1*^{-/-} im LPS-Inhalations-Modell durchgeführt. Als Kontrolltiere ohne genetische Veränderung wurden WT verwendet. Die Mäuse wurden wie unter 4.7.3 beschrieben für 45 Minuten mit LPS in Inhalationskammern vernebelt um eine Entzündungsreaktion der Lunge herbeizuführen. Nach einer Zeitspanne von vier Stunden wurde den Tieren in tiefer Fentanyl-Midazolam-Narkose das Atmungsorgan entnommen (siehe 4.7.4) und in 3µm dicken Schnitten histologisch aufgearbeitet. Diese wurden wie in 5.1.2 geschildert mit markierten Antikörpern gegen NE, Ly6B und DAPI gefärbt.

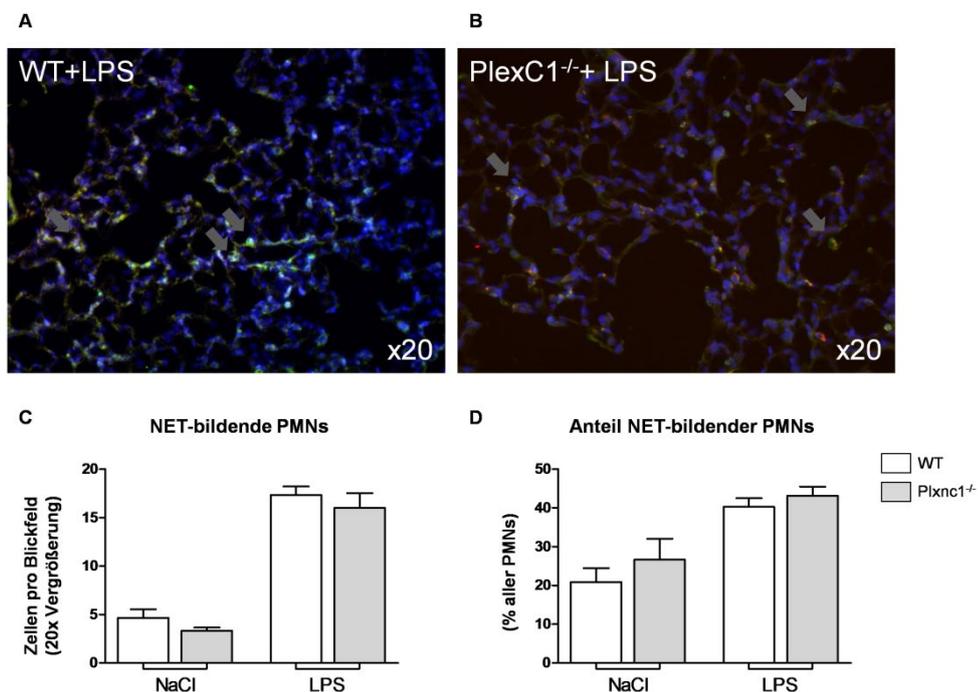


Abbildung 26 Pulmonale NETose in *Plxnc1*^{-/-}-Mäusen nach LPS-Inhalation

Exemplarische Immunfluoreszenzfärbung mit NE (Grün), Ly6B (rot) und DAPI (blau) in 20facher Vergrößerung von **A**) WT und **B**) *Plxnc1*^{-/-}. Mit grauen Pfeilen markiert sind PMNs in NETose.

Auszählung der NETenden PMNs pro Blickfeld bei 20facher Vergrößerung als **C)** absolut Wert der NETenden Zellen und **D)** anteilig an der Gesamtpopulation der PMNs in Prozent (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, * $P < 0,05$, $n=4$ /Gruppe).

Nach mikroskopischer Auszählung der PMNs und NET bildenden Zellen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den *Plxnc1*^{-/-} und WT nachgewiesen werden (Abbildung 26.B). Auffällig war hingegen, dass die Zellen, welche dem inflammatorischen Stimulus gefolgt und in die Lunge transmigriert sind, ungeachtet ihres Genotyps zu einem Anteil von knapp 40% NETs bildeten (Abbildung 26.C).

5.2.4 Ein *Plxnc1* Defizit beeinflusst die PNC-Bildung in murinem Vollblut *ex-vivo*

In einem weiteren Versuchsansatz wurden *Plxnc1*^{-/-} und WT-Mäusen post LPS-Inhalation Blut aus abdominalen Gefäßen entnommen. Diese Proben wurden, angelehnt an die Stimulationsreihen des humanen Blutes aus 5.1.3, nach Gewinnung mit Citrat antikoaguliert und 30 Minuten mit markierten Antikörpern bei 37°C inkubiert. Da sich die Zellzusammensetzung murinen Blutes unter anderem durch einen ausgesprochen hohen Thrombozyten- und Lymphozyten-Anteil sowie einem verhältnismäßig geringen Anteil an Granulozyten auszeichnet [227, 228] wurde eine geringe Alterierung des Versuchsaufbaus durchgeführt. Neben der Anpassung von CD41-FITC gegen CD42b-FITC als Thrombozytenmarker und CD66b-PeCy7 gegen Ly6G/C-PeCy7 für die PMNs, wurde der leukocyte-common-Antigen-Antikörper (CD45-AK)-PerCP ergänzt. Exprimiert von einer Reihe hämatopoetischer Zellen, wie auch den Granulozyten [229], ermöglicht dieser Antikörper eine höhere Trennschärfe der relativ geringen Menge an PMNs durch die doppelt positive Selektion.

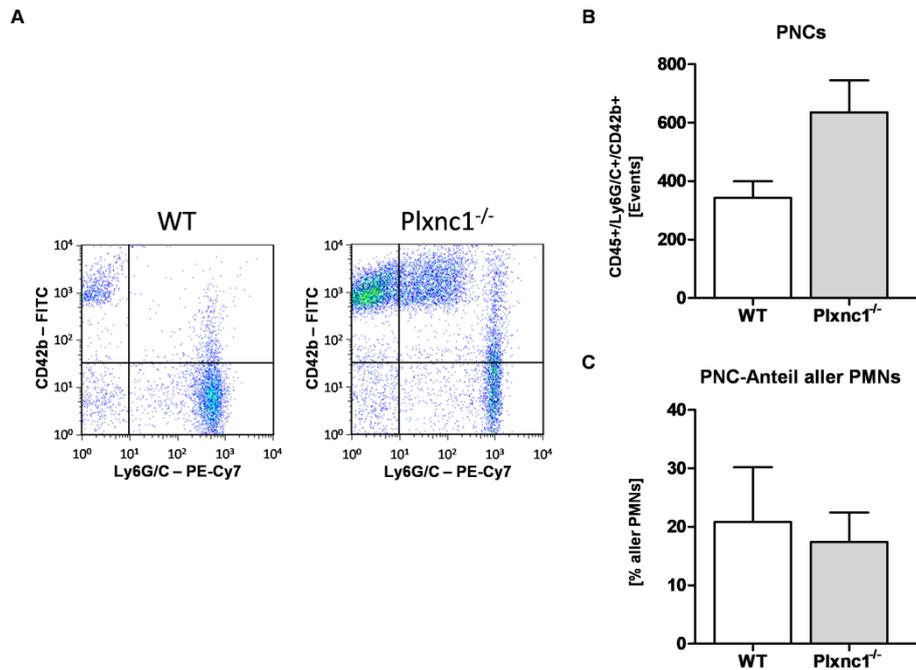


Abbildung 27 PNC-FACS-Analyse von murinem Blut nach LPS-Inhalation

Citrat-antikoaguliertes Vollblut wurde *Plxnc1^{-/-}* und WT nach 45 minütiger Exposition gegenüber vernebeltem LPS und vierstündiger Inkubation entnommen. Die Markierung der Zellen erfolgte mit Antikörpern gegen CD45-PerCP, Ly6G/C-PeCy7 und CD42b-FITC.

A) repräsentative Dotplots, vorselektiert nach FSC und SSC, sowie CD45-Positivität, aufgetragen nach Ly6G/C-PeCy7 gegen CD42b-FITC. Auszählung der PNCs, gewertet als triple positive Events für CD45, Ly6G/C und FITC als **B)** absolute Zahl pro Probe, sowie **C)** Anteil an allen PMNs (CD45, Ly6G/C positiv) in Prozent (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, * $P < 0,05$, $n=4$ /Gruppe).

Wie in Abbildung 27.B gezeigt, konnte eine signifikant gesteigerte Anzahl an zirkulierenden PNCs in *Plxnc1^{-/-}* nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist dabei jedoch das Verhältnis von singulären PMNs zu PNCs wie in Abbildung 27.C dargestellt. Trotz der Differenz in der Populationsgröße der Granulozyten gingen anteilmäßig annähernd gleich viele Zellen in einen Komplex mit Thrombozyten über, ohne dass der Gendefizit für den Sema7a Rezeptor hierbei einen Einfluss zu haben schien.

5.3 Plxnc1^{-/-}-Mäuse reagieren auf LPS-Inhalation mit einer gesteigerten inflammatorischen Antwort

5.3.1 Immunhistochemische Aufarbeitung der Lungen

Der erste Schritt in der Untersuchung der gentechnisch Modifizierten Plxnc1^{-/-} Linie stellte die immunhistochemische Färbung des Lungenparenchyms dar. Hierfür wurden 3µm Schnitte der Lungenpräparate hergestellt. Durch Markierung der PMNs mit Hilfe des Ly6B.2 Alloantigen 7/4-AK und anschließender Färbung mit Histogreen ließen sich die Zellen mikroskopisch deutlich hervorheben.

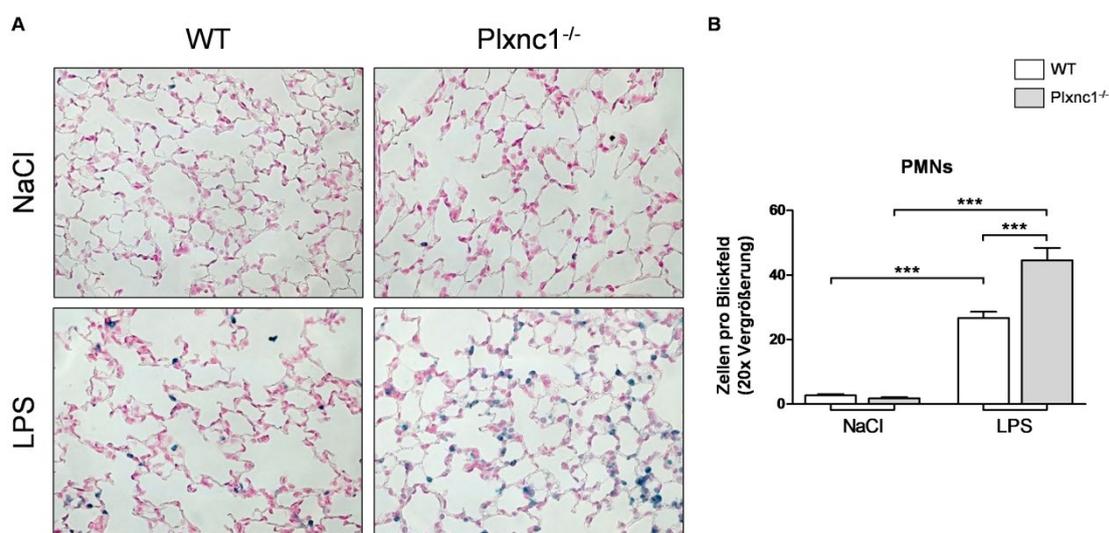


Abbildung 28 Immunhistochemische Darstellung von Plxnc1^{-/-} Lungen nach LPS-Inhalation

Histologische Lungenpräparate von Plxnc1^{-/-} und WT-Mäusen nach inhalativer LPS oder NaCl Exposition wurden mittels Ly6B.2 Alloantigen 7/4-AK auf PMNs (blau) gefärbt.

A) Repräsentative Bilder der vier Gruppen, aufgenommen bei 20facher Vergrößerung.

B) Auszählung der PMNs pro Blickfeld (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, *** P < 0,001, n=4/Gruppe).

In den Aufnahmen bei 20facher Vergrößerung ließen sich bereits auf den ersten Blick parenchymatöse Veränderungen im Sinne einer Ödembildung, hervorgerufen durch die LPS-Inhalation, erkennen (Abbildung 28.A). Die unterschiedliche Ausprägung dieses Prozesses zwischen Plxnc1^{-/-} und WT

wurde erst in der Auszählung mehrerer Aufnahmen desselben Organs und der statistischen Auswertung der Gruppen deutlicher. In Abbildung 28.B wird die signifikante Zunahme der PMN-Zahl innerhalb der *Plxnc1*^{-/-}-Lungen nach LPS-Exposition dargestellt. Dieses unerwartete Ergebnis der gesteigerten Zellmigration soll zunächst den Analysen der broncho-alveolären Lavage, sowie des Serums vorausgehen.

5.3.2 BAL-Diagnostik

Erneut wurden Tiere in einer Inhalationskammer für 45 Minuten vernebeltem LPS ausgesetzt und dabei *Plxnc1*^{-/-} mit WT verglichen. Nach Ablauf der Inkubationsdauer von vier Stunden wurden die Tiere in tiefer Fentanyl-Midazolam-Narkose für die Lavagierung vorbereitet (siehe 4.7.5). Die gewonnenen Proben wurden anschließend bezüglich der Zellzahl, der MPO-Aktivität, sowie des Proteingehalts untersucht und darüber hinaus Zytokinbestimmungen mittels ELISAs durchgeführt.

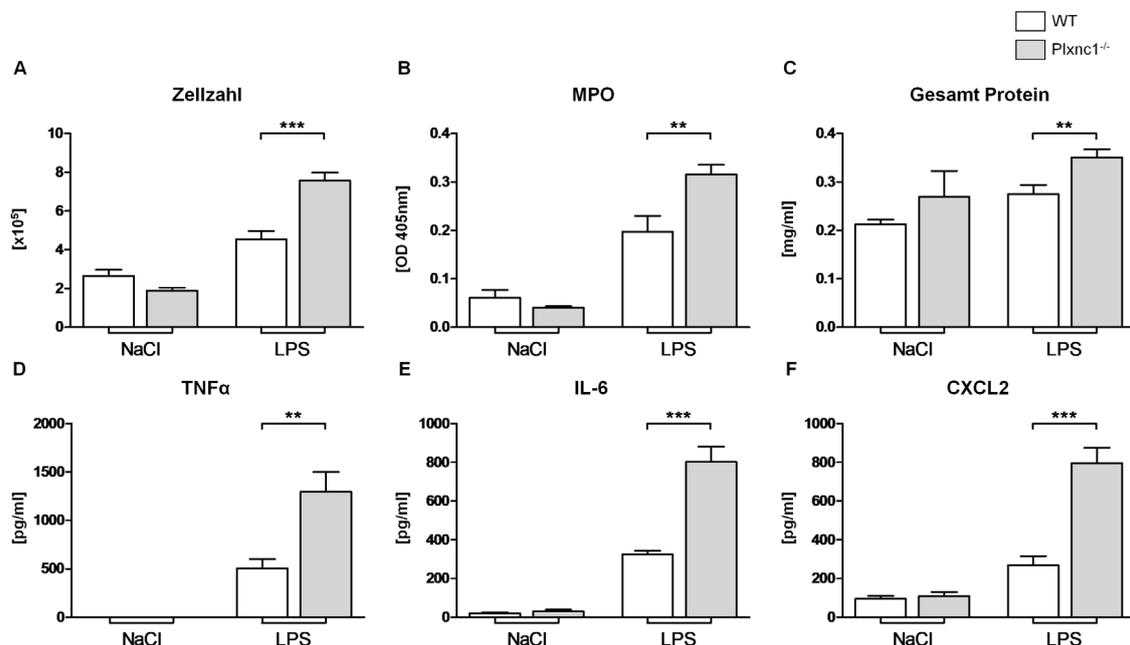


Abbildung 29 BAL-Diagnostik von *Plxnc1*^{-/-} und WT nach LPS-Inhalation

Quantitative Analysen aus der broncho-alveolären Lavage nach LPS, oder NaCl Inhalation. Statistische Auswertungen von **A)** Zellzahl, **B)** MPO **C)** gesamt

Proteingehalt **D**) TNF α **E**) IL-6, sowie **F**) CXCL2 (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, ** P < 0,01, *** P < 0,001, n=4-8/Gruppe).

Die Auswertung der BAL-Proben zeigte im Kontrast zu den bisherigen Ergebnissen klare Differenzen zwischen den Gruppen. Zum einen konnte durch die NaCl Kontrollreihe nachgewiesen werden, dass ein Gendefizit an Plxnc1 keine konstitutiv erhöhte inflammatorische Aktivität in der Lunge erzeugt (Abbildung 29.A-F). Darüber hinaus zeigten die KO Mäuse nach LPS-Exposition eine signifikant gesteigerte Zellzahl (Abbildung 29.A), Myeloperoxidase-Aktivität (Abbildung 29.B), sowie eine, wenn auch nicht statistisch signifikante, Tendenz des erhöhten Proteingehalts in der Lunge (Abbildung 29.C). Diese Funde korrelieren mit den durch die Reihe deutlich gesteigerten Zytokinspiegeln von TNF α , IL-6 und CXCL2 (Abbildung 29.D-F).

5.3.3 Serum-Diagnostik

Um neben der Untersuchung der lokalen Entzündung der Lunge durch die BAL auch Informationen bezüglich der systemischen Ausprägung zu gewinnen, wurden den Tieren zusätzlich 500 μ l Blut aus abdominalen Gefäßen entnommen (siehe 4.7.5). Die Proben wurden anschließend geronnen, um das Serum nach Zentrifugation vorsichtig zu aspirieren und so vom Koagel zu trennen. Aus dem Serum der Mäuse wurde TNF α , IL-6, Kreatinkinase (als Korrelat der Gesamt-Proteinbestimmung der BAL), IL-1 β , INF γ und IL-10 gemessen.

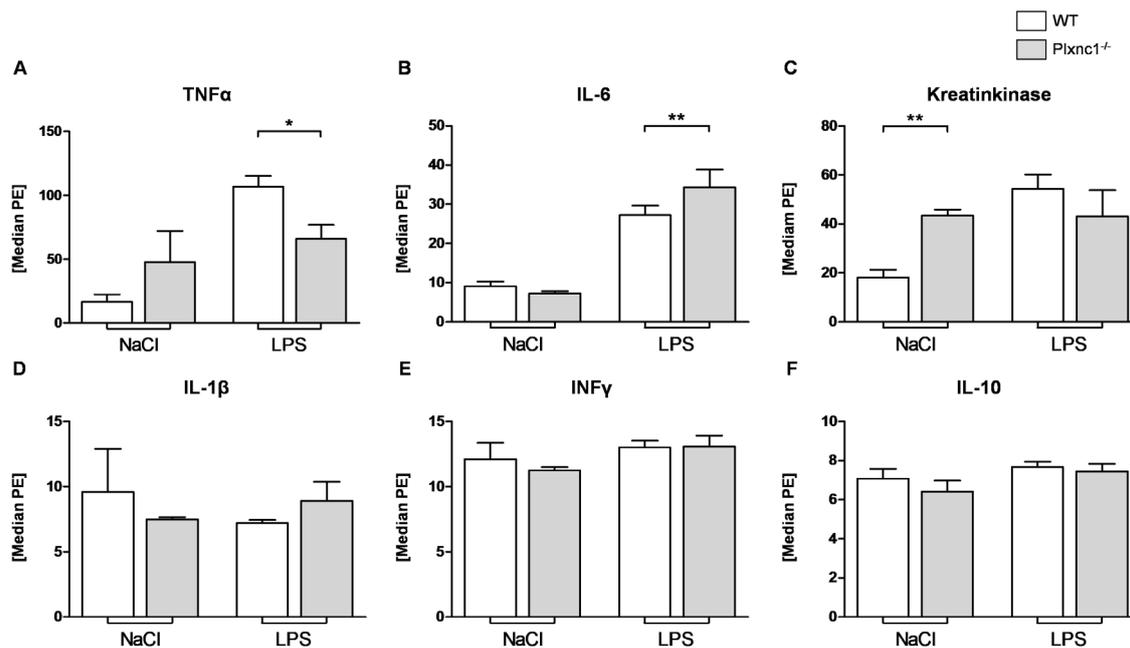


Abbildung 30 Serum-Diagnostik von Plxnc1^{-/-} und WT Mäusen nach LPS-Inhalation

Verwendet wurde ein cytometric bead array (CBA) FACS Protokoll zur quantitativen Bestimmung von Zytokinkonzentrationen innerhalb des murinen Serum. Dargestellt sind die Auswertungen von **A)** TNFα **B)** IL-6 **C)** Kreatinkinase **D)** IL-1β **E)** INFγ und **F)** IL-10 (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, * P < 0,05, ** P < 0,01, n=4-8/Gruppe).

Die Auswertung der FACS-Daten resultierte in einer inhomogenen Datenlage. Es konnte gezeigt werden, dass der Serumspiegel von TNFα (Abbildung 30.A) und IL-6 (Abbildung 30.A) in WT-Mäusen im Versuchsaufbau der LPS-Inhalation signifikant anstieg. Im Vergleich dazu wiesen Plxnc1^{-/-}-Tiere nach LPS-Inhalation signifikant niedrigere Werte an TNFα auf (Abbildung 30.A) und standen damit im direkten Gegensatz zum simultanen, signifikanten Anstieg von IL-6 (Abbildung 30.B). Im Serum ließen sich keine signifikanten Unterschiede der Zytokine bei IL-1β, INFγ, IL-10 sowie der Kreatinkinase zwischen den beiden Gruppen mit LPS Behandlung nachweisen (Abbildung 30.C-F).

5.3.4 Sequentielle Migration von PMNs

Wie in 5.3 gezeigt werden konnte, wiesen $Plxnc1^{-/-}$ -Tiere eine beeinträchtigte Reaktion gegenüber dem inflammatorischen Stimulus durch LPS auf, die sich nicht ausschließlich auf zelluläre Prozesse der Granulo- und Thrombozyten zurückführen ließ (siehe 5.2). Mithilfe eines bereits etablierten Protokolls [217, 218] ist es möglich die Migration von Granulozyten in die Lunge sequentiell zu untersuchen. Durch intravenös applizierte AK gegen Gr-1-APC wurden intravasal-zirkulierende und endothelial-adhärenente PMNs von bereits nach interstitiell migrierten Zellen, markiert mit 7/4-FITC-AK, differenziert. Die zusätzliche Entnahme von Blut und das Lavagierung der Lunge ermöglichte die getrennte Betrachtung von vier Kompartimenten.

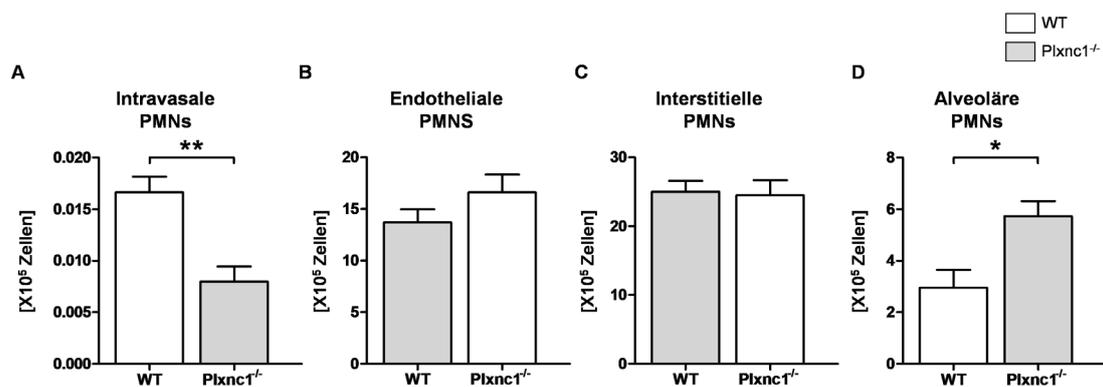


Abbildung 31 Sequentielle PMN-Migration in $Plxnc1^{-/-}$ nach LPS-Inhalation

Verglichen wurden $Plxnc1^{-/-}$ mit WT-Mäuse nach 45 minütiger LPS Exposition und 4 Stunden Inkubationszeit. Eine intravenöse Applikation des Gr-1-APC Antikörpers vor Präparation ermöglichte die Differenzierung in **A)** intravasale PMNs, **B)** endothelial adhärenente PMNs, **C)** interstitielle PMNs und **D)** alveolare PMNs (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardabweichung, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, $n=4$ /Gruppe).

Die Auswertung der FACS-Daten zeigte eine signifikante Veränderung des Migrationsverhalten von PMNs der $Plxnc1^{-/-}$ -Tiere. Bereits bei Betrachtung der intravasalen Verteilung der Zellen (Abbildung 31.A) fiel eine deutlich verringerte Zahl an zirkulierenden PMNs auf. Dieser Unterschied zeigte sich nicht im Vergleich der endothelial adhärenente und der interstitiellen PMNs (Abbildung 31.B/C), wo die Genotypen annähernd identische Ergebnisse präsentierten. Abschließend zeigten die durchflusszytometrisch ermittelten Werte eine

signifikant erhöhte Granulozytenzahl innerhalb des Alveolarraumes (Abbildung 31.D).

5.4 Sema7a beeinflusst die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen in humanem Vollblut *ex-vivo*

Durch die in 5.3 beschriebenen Versuchsreihen konnte ein definitiver Einfluss von Plxnc1 auf die inflammatorische Antwort innerhalb des murinen Organismus gegenüber dem LPS-Stimulus nachgewiesen werden. Da sich dieser Effekt nicht hinreichend durch eine veränderte NET- oder PNC-Bildung erklären ließ (siehe 5.2), wurde der Fokus dieser Arbeit im Folgenden auf die zelluläre Migration und granulozytäre Adhäsionsmoleküle gerichtet. Spezieller sollten die Einflüsse von Sema7a und Plxnc1 auf das Verhalten von PMNs während der Interaktion mit aktiviertem Endothel simuliert und deren Rolle auf die Oberflächenexpression zentraler Akteure der Selektin- und Integrin-vermittelten Prozesse betrachtet werden.

5.4.1 Sema7a verstärkt zelluläres Rolling im Flusskammer-Modell

Durch das Beschichten einer Glaskapillare mit Integrinen und Selektinen konnten mehrere Phasen der Interaktion von PMNs mit der Gefäßwand simuliert werden (siehe 4.5). Der an anderer Stelle etablierte Versuchsaufbau [230, 231] ermöglichte die hellfeldmikroskopische Beurteilung von Leukozyten aus Vollblut und deren Flussgeschwindigkeit als Parameter des Ausmaßes an zellulärer Interaktion.

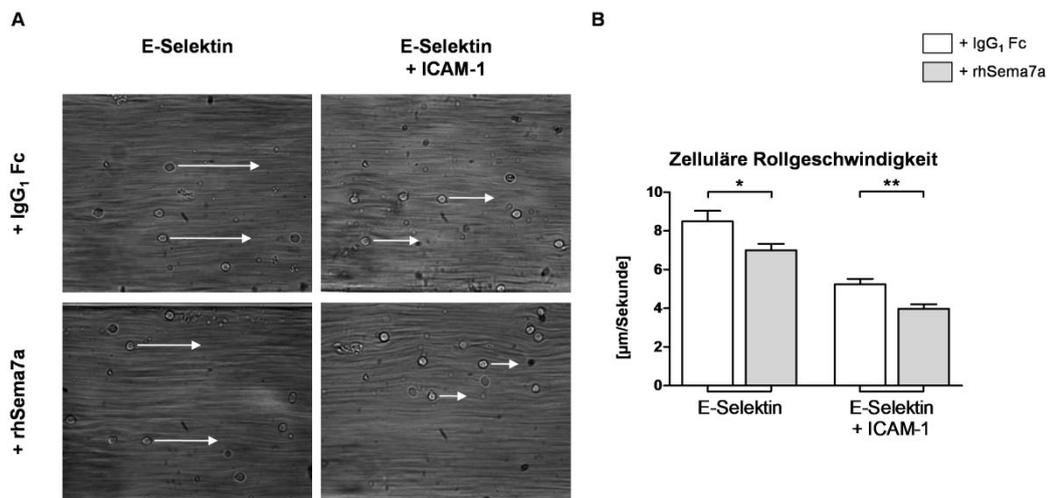


Abbildung 32 Flusskammer-Modell des granulozytären Rolling

Durch Beschichtung einer Glaskapillare mit E-Selektin, ICAM-1, oder einer Kombination beider kann das Lumen eines aktivierten Gefäßes in verschiedenen Phasen der Inflammation simuliert werden. Hellfeldmikroskopische Videoaufnahmen von 10 Sekunden Länge wurden angefertigt und die Geschwindigkeit der rollenden Zellen nativ (weiß) oder in Anwesenheit von rhSema7a (grau) ausgemessen. **A)** Repräsentative Momentaufnahmen der Videosequenzen. Markiert sind die zurückgelegten Distanzen einzelner Zellen während der gesamten Aufnahme. **B)** Auswertung der Flussgeschwindigkeiten in µm/Sekunde (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, * P < 0,05, ** P < 0,01 n=5/Gruppe).

Als Ausgangspunkt wurden zwei Kammersysteme erstellt, von denen eine mit E-Selektin und die zweite mit einer Kombination aus E-Selektin und ICAM-1 beschichtet wurden. So sollten die Phasen des schnellen und des verlangsamten Rollens initiiert werden. Um den Einfluss von endothelialelem Sema7a während dieses Prozesses zu identifizieren, wurden alle Flusskammern zusätzlich entweder mit rhSema7a, oder einer der entsprechenden IgG₁ Fc Kontrolle, beschichtet. In Abbildung 32.A werden exemplarisch hellfeldmikroskopische Momentaufnahmen der fünf Sekunden langen Videos gezeigt. Die Markierungen geben die zurückgelegte Entfernung einzelner Zellen während des Beobachtungszeitraumes wieder. Die statistische Auswertung der Dateien (Abbildung 32.B) zeigte, dass durch die rhSema7a-Beschichtung eine signifikante Abnahme der Flussgeschwindigkeit, sowohl im Beisein von E-Selektin, als auch ICAM-1, hervorgerufen werden konnte.

5.4.2 Einfluss von rhSema7a auf die Adhäsionsmolekülexpression

Der Einfluss von rhSema7a auf die Integrin und Selektin vermittelte Interaktion mit PMNs konnte in 5.4.1 gezeigt werden, ohne dass dieser Effekt wie in 5.2.2 demonstriert auf eine Induktion von PNCs zurückzuführen ist. Um der Ursache der verstärkten Adhäsion näher zu kommen sollte in nachfolgenden Versuchen eine Auswahl der von PMNs exprimierten Integrin- und Selektin-Liganden betrachtet werden. In einem durchflusszytometrischen Versuchsaufbau wurde, wie zuvor in 5.2.2, humanes Vollblut für eine Stunde nativ, oder mit 500ng/ml LPS, sowie zusätzlich 100ng/ml rhSema7a oder IgG₁ Fc inkubiert. Die Färbung der Zellen erfolgte mit Antikörpern gegen CD66b-PeCy7, CD42b-PerCP, CD11b-APC, PSGL-1-PE und LFA-1-FITC. Aus Gründen der Signalkompatibilität wurde für dieses Experiment ein alternativer Thrombozyten-Antikörper verwendet (siehe 4.6.4).

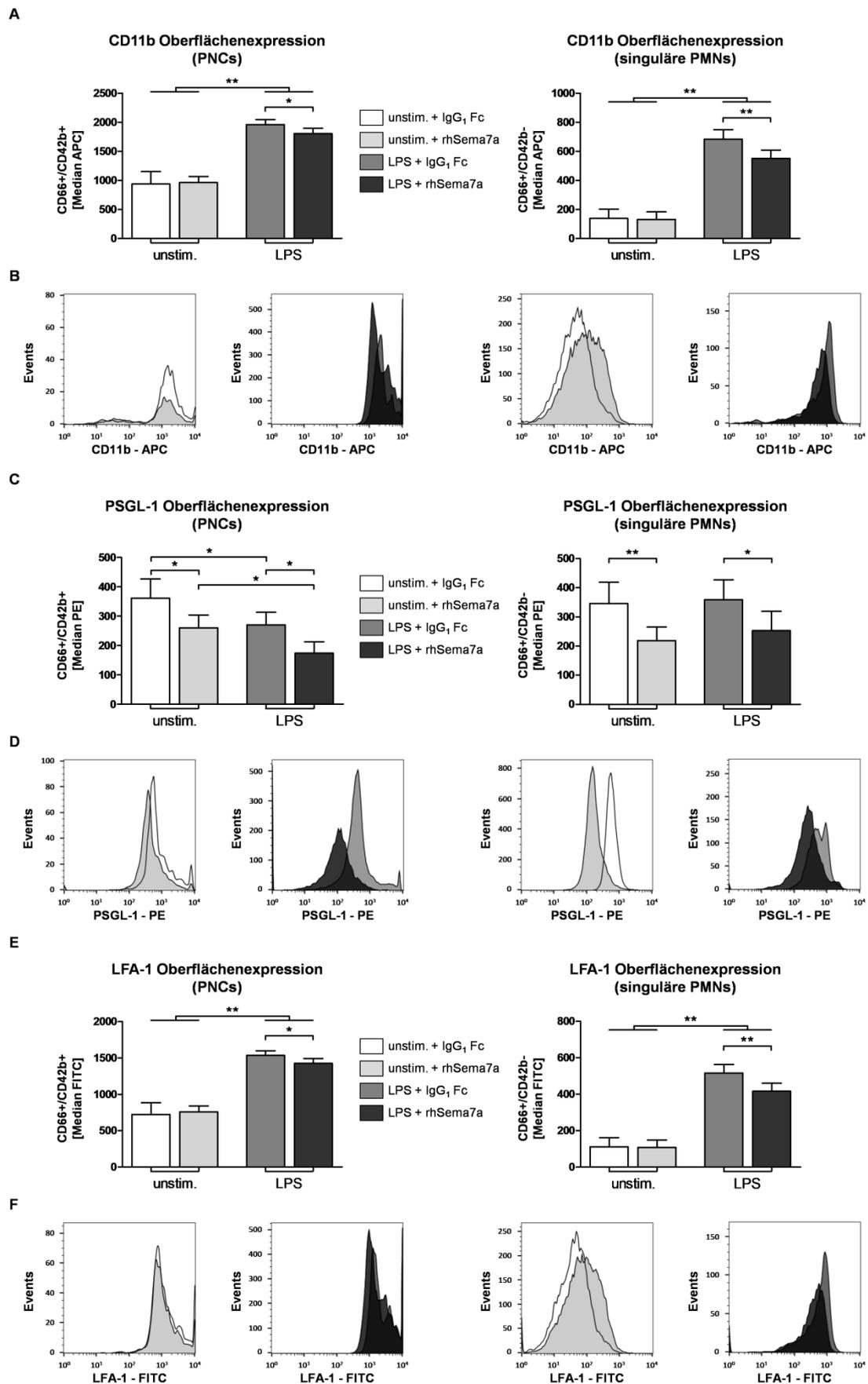


Abbildung 33 Einfluss von rhSema7A auf die Adhäsionsmolekülexpression in humanem Vollblut ex-vivo

Dargestellt sind die FACS-Auswertungen aus Citrat-antikoagulierte humanem Vollblut, nativ, oder mit 500ng/ml LPS über eine Stunde inkubiert. Ferner wurden die Gruppen unterteilt nach Stimulation mit 100ng/ml rhSema7A oder einer IgG1 Fc Kontrolle. Die Markierung der Zellen erfolgte mit Antikörpern gegen CD66b-PeCy7, CD42b-PerCP, CD11b-APC, PSGL-1-PE und LFA-1-FITC. Untersucht wurden PNCs (CD66b und CD42b doppelt positive Events) sowie singuläre PMNs (CD66b positive und CD42b negative Events). Die Auswertung zeigt die mediane Signalintensität an **A)** CD11b-APC, **C)** PSGL-1-PE, sowie **E)** LFA-1-FITC, getrennt für PNCs und singuläre PMNs. Zusätzlich dargestellt sind korrespondierende Histogramme für **B)** CD11b-APC, **D)** PSGL-1-PE, sowie **F)** LFA-1-FITC (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, * P < 0,05, ** P < 0,01, n=6/Gruppe).

Bei der Auswertung der Daten wurden identische Gating-Strategien, wie in 5.2.2 beschrieben, verwendet. Die Betrachtung der Expression der Oberflächenmoleküle wurde als mediane Signalintensität des jeweiligen Kanals angegeben und die gesamte PMN Population in PNCs (CD66b und CD42b positive Events) und singuläre PMNs (CD66b positive und CD42b negative Events) unterteilt. Es konnte gezeigt werden, dass rhSema7a in den unstimulierten Proben nicht in der Lage ist, eine Veränderung der Expression von CD11b sowie LFA-1, sowohl an PNCs, wie auch singulären PMNs zu induzieren (Abbildung 33.A/E). Der bekannte Effekt von LPS auf die CD11b und LFA-1 Expression [232, 233] konnte durch das NGP negativ regulatorisch modifiziert werden, wobei dieser Einfluss stärker bei singulären PMNs als bei PNCs zum Ausdruck kam (Abbildung 33.A/E).

In Abbildung 33.C ist die konstitutionell starke Expression von PSGL-1 im nativen Zustand dargestellt. Die LPS-Stimulation resultierte in einer signifikanten Reduktion der Signalstärke von PSGL-1; dies jedoch ausschließlich in PNCs. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass rhSema7a sowohl nativ als auch unter LPS-Stimulation zu einer verminderten Oberflächenexpression von PSGL-1 führt. Erneut zeigten singuläre PMNs hierbei keinen Unterschied, zwischen nativem, oder stimulierten Zustand, wobei PNCs unter rhSema7a das größte Ausmaß an Intensitätsreduktion aufwiesen.

5.5 Eine Blockade von Sema7a und Plxnc1 hemmt die thrombozytäre Aggregation *ex-vivo*

Nachdem in 5.4.1 gezeigt werden konnte, dass Sema7a in der Lage ist sowohl Selektin wie auch das Integrin vermittelte zelluläre Rollen zu verstärken, zielt der folgende Versuch darauf ab, den Einfluss des NGPs und seines Rezeptors auf die thrombozytäre Funktionalität zu erschließen. Durch Einsatz eines Multiplate Aggregometers und des selektiven Aktivator der Thrombin vermittelten Gerinnung TRAP-6 wurden die Einflüsse von Antikörpervermittelten Blockaden bestimmt.

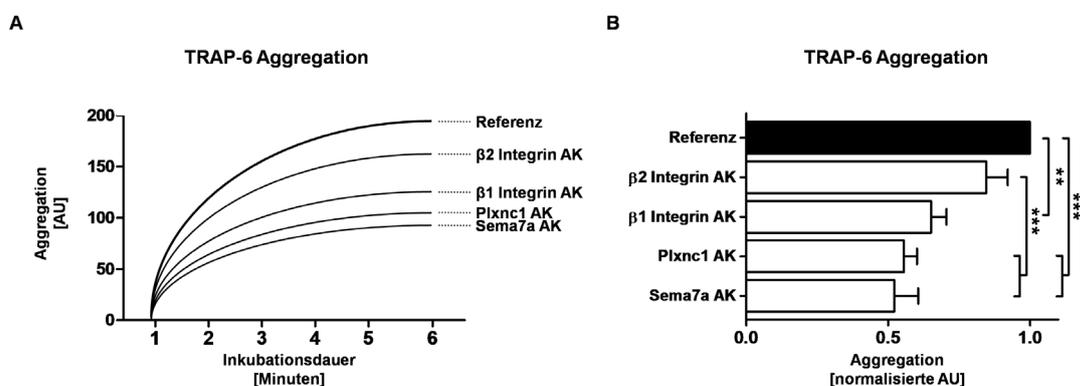


Abbildung 34 Multiplate Analyse der Thrombin induzierten Aggregation

Mithilfe des Multiplate Aggregometers wurde die Thrombozytenfunktionalität in humanem Vollblut nach Antikörperblockade gegen β 1-Integrin, β 2-Integrin, Sema7a sowie Plxnc1 gemessen. Die durch TRAP-6 induzierte Aggregation ist als Referenz angegeben.

A) Abgebildet ist die Widerstandserhöhung aufgetragen gegen die Zeit in AU. **B)** Relative Aggregation bezogen auf TRAP-6 (Daten sind dargestellt als Mittelwert mit Standardfehler, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, $n=5$ /Gruppe).

TRAP-6 diente als Stimulans und Referenzwert für die Impedanzzunahme über einen zeitlichen Verlauf von 6 Minuten. Dargestellt in Abbildung 34.A stehen dazu im Vergleich die Aggregationsverläufe bei zeitgleicher Antikörperblockade gegen β 1-Integrin, β 2-Integrin, Sema7a, oder Plxnc1. Die Inhibition von β 2-Integrinen resultiert in einer nicht signifikanten verringerten Aggregation durch TRAP-6. Der fehlende Einfluss von β 1-Integrin, Sema7a und Plxnc1 resultierte dagegen in einer signifikant herabgesetzten thrombozytären Aktivität nach 6 Minuten (Abbildung 34.B).

6 Diskussion

Semaphorin 7A vermittelt während des neuronalen Wachstums elementare Signale für die axonale Orientierung innerhalb des Organismus. Dieser Prozess basiert auf der Interaktion von Sema7a und den β 1-Integrinen durch die Aktivierung von MAP-Kinasen [204]. Innerhalb des Immunsystems ist es in der Lage Monozyten und T-Zellen zu stimulieren und fördert zelluläre Migration in entzündetes Gewebe [175, 189, 190]. Hierbei konnte vermehrt der Einfluss von β 1-Integrinen für die pro-inflammatorische Wirkung des NGPs auf Makrophagen nachgewiesen werden, wohingegen Plxnc1 als zweiter Bindungspartner verstärkt mit zellulärer Adhäsion und zytoskelettaler Reorganisation in Verbindung gebracht wurde [172, 234]. Aus vorausgegangenen Projekten unserer Arbeitsgruppe wurde ersichtlich, dass Sema7a eine Steigerung der endothelialen Migration von PMNs bewirkt [196] sowie bei Gendefizienz zu einer Reduktion der pulmonalen Entzündungsreaktion im Rahmen einer LPS Exposition führt [195]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass ein ähnlicher Effekt für Plxnc1 im Rahmen der Zymosan A induzierten Peritonitis [198] oder des hyperbaren Lungentraumas [197] bei Knockout-Tieren zu finden ist. Diese Erkenntnisse bildeten die Grundlage die Zielproteine Sema7a und Plxnc1 auf ihre Einflüsse sowohl hinsichtlich der zellulären Aktivität von neutrophilen Granulozyten *in-vitro* als auch innerhalb des Tierversuchsmodells der LPS-induzierten Lungenschädigung zu untersuchen. Die NETose und die Bildung von PNCs sollten dabei besondere Fokuspunkte darstellen. Beide Prozesse sind Bestandteil des angeborenen Immunsystems und konnten bei Dysregulation mit gesteigerten Entzündungsreaktionen und Organschädigungen assoziiert werden [60, 101], ohne dass sie bisher auf eine Verbindung zu den NGPs untersucht wurden.

6.1 Sema7a und Plxnc1 als Akteure der NETose und PNC-Bildung

Als Grundlage wurden die in 3.7 geschilderten Arbeitshypothesen aufgestellt, welche pro-inflammatorische Effekte von Sema7a auf neutrophile Granulozyten postulieren. Diese Effekte würden sich in einer gesteigerter NETose sowie PNC

Bildung äußern und damit die gesteigerte Entzündungsreaktion erklären, die in vorausgegangenen Arbeiten für Sema7a gefunden werden konnten [195, 196]. Die in 5.2 präsentierten Versuchsreihen zeigen wider Erwarten, sowohl in nativem Medium als auch co-inkubiert mit PMA, keinen Einfluss von Sema7a auf die NETose isolierter PMNs.

Pro-inflammatorische Reaktionen, die nachweislich von Sema7a induziert werden, sind unter anderem für Endothel- und Epithelzellen, Keratino- sowie Monocyten beschrieben [189, 195, 235]. Diese Zelllinien reagieren auf die Exposition mit dem NGP mit einer Produktion von TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8 sowie dem *granulocyte-macrophage colony-stimulation factor* (GM-CSF) [189, 235]. Zusätzlich berichten die Autoren in korrelierenden Versuchen an PMNs lediglich eine im Vergleich ca. 5%ige Produktion an IL-6 sowie IL-8 [189]. Sie postulierten eine stark auto-/parakrine Wirkung von Sema7a basierend auf dessen GPI-Anker und einer damit einhergehenden proteolytischen Freisetzung [236]. Die von uns präsentierten Ergebnisse bezüglich der Rolle von Sema7a auf die NETose *in-vitro* bestärken diese Befunde. Auch *in-vivo* ließ sich mittels Immunfluoreszenzfärbung kein Nachweis für eine NGP vermittelte NETose finden, wenngleich die Ergebnisse etwaige Differenzen der Genotypen in Bezug auf migrierte Zellzahlen im Vergleich mit den Daten der IHC-Färbung zu relativieren scheinen. Das hohe Maß an peribronchialer Autofluoreszenz des entzündeten Gewebes sowie die unter 6.7 näher erörterten technischen Herausforderungen werden in die Hauptverantwortung für diese Diskrepanzen an Zell- und NET-Zahlen gezogen. In Zusammenschau aller Daten scheint es zunehmend wahrscheinlich, dass das NGP nur in einem geringen Ausmaß als direkter Aktivator für PMNs fungiert. Besonders im Bezug auf die Ausprägung einer entzündungsbedingten Organschädigung sind Sema7a und Plxnc1 also vor allem als Modulator der zellulären Migration und der Koordination der Immunantwort auf inflammatorische Stimuli anzusehen.

Mit besonderem Augenmerk werden die Ergebnisse bezüglich der PNC-Bildung *ex-vivo* und post LPS Inhalation im Tierversuch betrachtet. Nicht nur muss kritisch bemerkt werden, dass die Inkubation von humanem Vollblut mit LPS verstärkt ein septisches Geschehen mit endovaskulärer

Pathogenausschwemmung initiiert und weniger ein organgebundenes Entzündungsgeschehen mit der Notwendigkeit der Extravasation abbildet. In Bezug auf 5.2.2 muss zusätzlich die Inkubationsdauer von einer Stunde hinterfragt werden. Diese wurde gewählt um eine klare Trennschärfe der PNC-Bildung durch LPS gegenüber der Kontrolle zu ermöglichen, doch kann hierbei der elementare Zeitpunkt einer NGP Interaktion bereits verpasst worden sein. Unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur und mit vorausgreifendem Verweis auf die Ergebnisse der Flusskammer- (siehe 5.4.1) und Multiplate-Versuche (siehe 5.5) deutet vieles darauf, dass die Interaktion von PMNs und Platelets bereits bei initialem Kontakt induziert wird und signifikante Effekte schon innerhalb weniger Minuten detektierbar sind [237, 238].

Das Bild, welches die Analyse von murinem Blut vier Stunden nach Induktion der ALI (siehe 5.2.4) präsentiert, unterliegt den gleichen Überlegungen. Nicht nur wurde ein sehr später Zeitpunkt betrachtet, sondern zusätzlich in peripherem Blut eine Zellpopulation untersucht, die dem inflammatorischen Stimulus innerhalb der Lunge nicht gefolgt ist. Die beschriebene Leukozytose innerhalb des *Plxnc1*-Knockouts (siehe 5.2.4) sowie die Analyse der lokalen Reaktion der Lunge mittels IHC und BAL (siehe 5.3.1, 5.3.2) belegen die gesteigerte Entzündungsreaktion. Es scheint plausibel, dass die Daten aus humanem Vollblut, sowie des Tierversuchs den späten Zustand einer vorangegangenen Reaktion wiedergeben. In Anbetracht des nachgewiesenen Effekts von PNCs bei der Entstehung von Lungenschädigungen [73] ergibt sich hieraus Grund zur Annahme, dass der pro-inflammatorische Effekt von *Sema7a* im Rahmen dieses pathologischen Prozesses [195] durch die Versuche bezüglich der PNC-Bildung nicht ausreichend abgebildet werden konnte.

6.2 Die inflammatorische Reaktion von *Plxnc1*^{-/-} gegenüber inhalativer LPS Exposition

Neben der Betrachtung von NETs und PNCs wurde in der dritten Arbeitshypothese zusätzlich eine reduzierte inflammatorische Antwort auf LPS Exposition von *Plxnc1*^{-/-} gegenüber dem WT untersucht. Basierend auf den Daten von Granja *et al.* und König *et al.* konnten solche Effekte des Genotyps

bereits in Modellen der hyperbaren Lungenschädigung und des Ischämie/Reperfusionsschadens nachgewiesen werden [197, 199]. Im direkten Gegensatz zu diesen Funden präsentierte sich *Plxnc1^{-/-}* in den hier dargestellten Versuchen mit einem Bild der gesteigerten Inflammation (siehe 5.3). Das vermehrte Vorkommen an PMNs innerhalb der immunhistochemisch aufgearbeiteten Präparate wird ebenfalls von den Analysen der BAL, welche einen Anstieg an Zellzahl, MPO, Proteingehalt sowie der Konzentration an pro-inflammatorischen Zytokinen zeigten, unterstützt. Zusätzlich wurden erhöhte Spiegel an IL-6 innerhalb des Serums, bei gleichzeitig reduzierten Werten an TNF α , ohne signifikante Differenzen bezüglich IL-1 β , INF γ und IL-10 gefunden. Wie in Abschnitt 6.7 ausgeführt zeigen diese Daten eine Momentaufnahme der pulmonalen Entzündung. TNF α und IL-1 β sind im zeitlichen Ablauf die frühesten Mediatoren, die durch gewebeständige Makrophagen und das lokale Epithel ausgeschüttet werden [239]. Ohne dies weiter belegen zu können, werden diese Daten als mögliche Indikatoren für eine andere Kinetik des Immunsystems innerhalb des *Plxnc1^{-/-}* interpretiert und sind möglicherweise Indikator für eine bereits rückläufige Produktion der first-line Zytokine. Dem gegenüber steht der unveränderte Parameter für IL-10, welches zentraler Vermittler der Entzündungsresolution ist. Ohne ergänzende Experimente bezüglich weiterer anti-inflammatorischer Proteine und Rezeptoren kann dieser Fund nicht expliziter gedeutet werden. Identisch niedrige Werte an INF γ in beiden Genotypen lassen sich argumentativ auf LPS als Stimulans zurückführen, welches durch Aktivierung von TLR4 klassischer Weise anti-bakterielle Kaskaden in Gang setzt, wohingegen INF γ primär anti-virale Prozesse initiiert [239].

Es entsteht ein direkter Kontrast zu vorausgegangenen Arbeiten mit der *Plxnc1^{-/-}*-Linie, welcher adressiert werden muss. In dieser Dissertation wurde das Modell der LPS induzierten ALI angewandt, welches eine bakterielle Infektion simuliert und damit den in Abschnitt 3.1 skizzierten Kaskaden über PRRs (TLR4) folgt. Das hyperbare Lungentrauma, die Hypoxie, oder der Ischämie-Reperfusionsschaden sind dahingegen als sterile Inflammationen anderen regulatorischen Prozessen unterworfen, die DAMPs vermittelt sind.

Selbst wenn am Ende der Signaltransduktion durch DAMPs häufig identische Mediatoren wie TNF α und IL-1 β zur Rekrutierung von Granulozyten und Makrophagen an den Ort der Entzündung freigesetzt werden, unterscheiden sie sich doch grundlegend an beteiligten Proteinen gegenüber einer PAMP-vermittelten Aktivierung des Immunsystems [240]. In Anbetracht des zunehmenden Verständnisses um NGPs als Immunmodulatoren [152] erscheint es daher plausibel, dass sich Differenzen aus dem Ursprung der Pathologie und dem klinischen Ausgang der Inflammation zwischen sterilen und septischen Prozessen im Kontext der Wirkung von Sema7a und Plxnc1 ergeben.

Speziell die Daten von König *et al.* zur Zymosan A induzierten Peritonitis, welche eine Reduktion der Entzündungsreaktion bei Plxnc1^{-/-} oder Plxnc1-AK Blockade demonstriert haben, sind an dieser Stelle hervorzuheben. Um die dort als pro-inflammatorisch gedeutete Wirkung des Sema7a Rezeptors Plexin C1 einzuordnen, soll besonderer Wert auf die Physiologie der unterschiedlichen Organsysteme gelegt werden. Roissant *et al.* verdeutlichten in ihrer Übersichtsarbeit Differenzen des Zusammenspiels inflammatorischer Adhäsionsmoleküle innerhalb von Lunge, Leber und Niere [241]. Sie hoben die spezielle Architektur der pulmonalen Mikrozirkulation hervor, welche PMNs bereits während der physiologischen Passage ein hohes Maß an zytoskellertaler Reorganisation abverlangt. Eine Tatsache, welche in der akuten Inflammation weiter zunimmt und in sich in diesem Ausmaß nicht innerhalb der abdominalen Zirkulation wiederfindet. In Anbetracht dieser Fakten, sowie früheren Daten, welche Plxnc1 bereits mit Veränderungen des Zytoskeletts in Verbindung gebracht haben [242], scheint die deutliche Diskrepanz der Ergebnisse zunehmend plausibel.

Weiterführend haben Roth *et al.* in einem ähnlichen Versuchsaufbau nachgewiesen, dass die LPS-induzierte Inflammation der Lunge in Sema7a^{-/-} reduziert ausfällt und bei i.v. Applikation von rekombinantem Sema7a verstärkt wird [195]. Bereits hier wurde ein möglicher Rückkopplungsmechanismus hypothetisiert, durch den kurzkettige Sema7a Peptide über Plxnc1 einen anti-inflammatorischen Stimulus vermitteln. Die im Rahmen dieser Dissertation erhobenen Daten stützen diese These weiter, indem sie demonstrieren, dass

die Abwesenheit von Plxnc1 nicht in der erwarteten Hemmung der Sema7a vermittelten pro-inflammatorischen Eigenschaften resultiert.

In Studien zur T-Zell Funktion haben Suzuki *et al.* die Bedeutung von α 1 β 1-Integrin für deren inflammatorische Immunantwort hervorgehoben und dieses sogar als Hauptrezeptor für Sema7a postuliert [175]. Zhang *et al.* konnten darüber hinaus in einem Modell der Meerwasseraspiration-ALI nachweisen, dass eine Blockade von Sema7a eine Aktivierung von NF- κ B die nachgeschaltete Freisetzung von Zytokinen sowie das Ausmaß der Entzündung hemmt. Dieser Effekt konnte durch den Einsatz von inhibitorischen β 1-Integrin AK reproduziert werden [234]. Weiterführend demonstrierten sie *in-vitro*, dass Sema7a über Plxnc1 die zytoskelettale Reorganisation von Endothelzellen durch Cofilin vermittelt und damit eine Erhöhung der Permeabilität bewirkt.

6.3 Endovaskuläre Funktionen von Sema7a und Migrationsverhalten von PMNs in Plxnc1^{-/-}

Nach den Auswertungen der Histologien, der BAL- und Serum-Diagnostik widmete sich die Aufmerksamkeit auf das durch Sema7a vermittelte endovaskuläre Verhalten von PMNs. Die sequenzielle Migrationsanalyse zeigte, dass PMNs im LPS Modell in Abwesenheit von Plxnc1 vermehrt die Mikrozirkulation der Lunge verlassen und vor allem eine komplette Diapedese durch das Parenchym in den Alveolarraum anstreben und erst dort akkumulieren (siehe 5.3.4). Wissend um die β 1-Integrine als weiteren Liganden für Sema7a, bestätigt dies die wiederholt getroffene Annahme, dass pro-inflammatorische Effekte verstärkt durch β 1-Integrine vermittelt werden [181, 234].

Bei rückblickender Betrachtung der durchflusszytometrischen Daten von Plxnc1^{-/-} Blut nach inhalativer LPS Exposition in Bezug auf die PNC-Bildung (siehe 5.2.4) fällt die Anzahl an zirkulierenden PMNs innerhalb der Proben auf. Das Gendefizit führte zu einer absoluten Zellzahlerhöhung, ohne dabei deren Funktionalität in Bezug auf die PNC Bildung zu beeinflussen. Eine solche Leukozytose ist dabei am ehesten auf eine gesteigerte Freisetzung von PMNs aus dem Knochenmark zurückzuführen. Da die molekularen Mechanismen der

Knochenmarkliberation immunkompetenter Zellen während einer Inflammation eng mit der Extravasation in entzündetes Gewebe verknüpft sind [243], könnte an dieser Stelle eine weiterer, bisher nicht untersuchter Wirkmechanismus des NGPs erkannt worden sein. Ein näheres Verständnis könnte durch Stimulation von *Plxnc1*^{-/-} Knochenmarkzellen oder Knochenmarktransplantationen von *Plxnc1* in WT und *vice versa* mit fokussierter Betrachtung des peripheren Blutes in akuten Entzündungsreaktionen gewonnen werden.

Die Flusskammerversuche, durch welche granulozytäre Interaktionen mit Adhäsionsmolekülen eines aktivierten Endothels verdeutlicht werden konnten (siehe 5.4.1), gaben weitere Aufschlüsse über die Rolle von endothelialelem *Sema7a*. Die Beschichtung von Glaskapillaren mit rekombinantem *Sema7a* bewirkte eine signifikante Reduktion der Rollgeschwindigkeit im Zusammenspiel mit E-Selektin und in der Kombination aus E-Selektin und ICAM-1. Die hier demonstrierte Verstärkung der Bindung an Venolenwände durch *Sema7a* würde dabei den nachgewiesenen Effekt unterstreichen, dass eine Zytokinaktivierung von Endothelzellen in einer Expression von *Sema7a* resultiert [195]. Zusätzlich kann aus dem Versuchsaufbau eine Aussage bezüglich der zeitlichen Komponente im Bezug auf die endovaskuläre Wirkung von *Sema7a* abgeleitet werden. Dem Durchfluss des Blutes innerhalb der beschichteten Kapillare ging keine Phase der Inkubation voraus. Dies ist von höchster Bedeutung, weil es verdeutlicht dass der beobachtete Effekt auf das Rollverhalten unmittelbar nach Kontakt mit endothelialelem *Sema7a* eintritt. Diese Tatsache ist sowohl innerhalb unserer Arbeitsgruppe wie auch in der Literatur nicht adressiert, wo das NGP wiederholt als Stimulans über einen längere Periode inkubiert wurde [195, 234]. Somit lässt sich daraus die beobachtete Wirkung des NGPs auf zirkulierende PMNs hin zu einer gesteigerten Migration durch eine Endothelstimulation, aber auch direkte Bindung erklären [196]. Hieraus ergibt sich eine elementare Rolle für *Sema7a* sowohl im initialen Kontakt, als auch im nachfolgenden *Slow-Rolling* von PMNs (siehe 3.2).

6.4 Einfluss von rhSema7a auf die Oberflächenmolekülexpression

Weiterführend wurde explizit die Expression von Oberflächenmolekülen auf PMNs untersucht, wenn diese in Vollblut für eine Stunde mit Sema7a inkubiert werden. Durch die Auswertung von CD11b, PSGL-1 und LFA-1 konnte ein negativ regulatorischer Effekt von Sema7a auf deren Oberflächenexpression nach LPS Exposition nachgewiesen werden (siehe 5.4.2). Am stärksten fiel dies bei PSGL-1 auf, weshalb an dieser Stelle betont werden soll, dass die Reduktion der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen durch proinflammatorische Stimuli ein bereits beschriebenes Phänomen ist [244, 245]. In Zusammenschau der bisherigen Ergebnisse wird hier aus den anfangs als widersprüchlich wirkenden Funden eine Autoregulation theoretisiert, welche die Zellen in Abwesenheit von endothelialer Zytokinfreisetzung und Adhäsionsmolekülkontakt vor unspezifischer Gefäßwandinteraktion bewahrt. Ein Phänomen, das speziell für Sema7a, Plxnc1 und β 1-Integrine in Melanozyten beobachtet wurde [246]. Die Vermutung liegt nahe, dass der in humanen Vollblutproben beobachtete Effekt von Sema7a über Plxnc1 verursacht wird (siehe 5.4.2). Speziell in Anbetracht der Diskrepanz dieser Daten zu den Funden des Tierversuches müssen erneut die Überlegungen bezüglich des LPS Stimulus *ex-vivo*, aber auch die zeitliche Dimension während der einstündigen Inkubation, einbezogen werden (siehe 6.1). Von besonderem Interesse wäre die Betrachtung der frühen Reaktionen innerhalb der Probe zu weiteren Zeitpunkten, um zu verstehen mit welcher Dynamik Sema7a die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle beeinflusst. Auch wenn an dieser Stelle nur eine Hypothese erstellt werden kann, wäre eine frühe Induktion der zellulären Oberflächenexpression mit nachfolgender autoregulatorischer Inhibition ein denkbarer Mechanismus, der bei Plxnc1^{-/-} zur überschießenden Extravasation von PMNs in die Lunge führt und womöglich durch β 1-Integrine vermittelt wird.

6.5 Interaktion von Sema7a, Plxnc1 und β 1-Intergrinen im Kontext der akuten Inflammation

Alto und Buck haben in ihrer Übersichtsarbeit der Plexin-vermittelten Signalmechanismen wiederholt das unzureichende Verständnis um involvierte Kaskaden der Klasse C und D Plexine bemängelt [181]. Detailliertere Daten existieren bezüglich der Klassen A und B, welche neben individuellen Pathways deutliche Gemeinsamkeiten teilen. Speziell die gleichartige Hemmung von R-Ras, RAP und Rac1 GTPasen sowie der Aktivierung von p190 RhoGAP veranlasste die Autoren zur Annahme diese ebenso bei C und D Plexinen zu erwarten. Die R-Ras Aktivität wird als Schaltstelle einer Plexin vermittelten Integrin-Inhibition vermutet, wohingegen Rac1 primär mit zytoskelettaler Reorganisation und Zellmotilität [247] und RAP mit Adhäsion und Migration [248] assoziiert werden. Speziell die Existenz der PSI Domäne in allen drei Molekülen und der nachgewiesene Effekt einer Konformationsänderung bei Ligandenbindung [249] unterstützt weiter die Existenz eines sensiblen Regulationsmechanismus, der bis dato nicht näher identifiziert werden konnte. Auch wenn dieses Forschungsprojekt nicht darauf ausgerichtet war, scheint es zunehmend unumgänglich bei der Untersuchung von Sema7a und Plxnc1 die Funktion der β 1-Integrine bezüglich intrazellulärer Prozesse während akuten Inflammation zu betrachten.

6.6 Rolle von Sema7a, Plxnc1 und β 1-Intergrinen auf die thrombozytäre Aggregation

Eine besondere Rolle in der Interpretation des gesamten Projekts kommt den Ergebnissen der aggregometrischen Untersuchung zu. Nachdem die unmittelbare zeitliche Reaktion von Zellen nativen Vollbluts auf Sema7a im Flusskammer-Modell verdeutlicht werden konnte (siehe 6.3), sollte isoliert der Einfluss der NGPs auf Thrombozyten betrachtet werden. Diese exprimieren Sema7a sowie Plxnc1 und setzen ersteres auf inflammatorische Stimuli hin frei [159], ohne dass eine Implikation auf hämostatische Prozesse untersucht worden ist.

In einem letzten Versuch wurde daher getestet, in welchem Ausmaß sich Sema7a, Plxnc1, β 1- aber auch β 2-Integrine auf die aggregatorischen Fähigkeiten von Thrombozyten auswirken. Neben Sema7a wurden Sema3a und Sema4d innerhalb von Thrombozyten nachgewiesen [250] und für letztere negativ regulatorische Wirkung für die Blutplättchen gefunden [251, 252]. Bezüglich Sema7a sind hierfür keine Informationen bekannt. Durch Antikörperblockaden gegenüber Sema7a, Plxnc1 und β 1-Integrine konnten Gerinnungskapazitäten signifikant reduziert werden, wobei β 2-Integrine als einzige eine Ausnahme darstellten (siehe 5.5). Erneut ist bemerkenswert, dass sich signifikante Effekte der AK-Blockaden bereits innerhalb weniger Minuten detektieren lassen. Auch wenn die Hämostase primär mit Gerinnungsfaktoren und Thrombozyten in Verbindung gebracht wird, muss bei Betrachtung der Aggregation von Vollblut ein nicht unbedeutender Effekt weiterer Zellpopulationen beachtet werden. Es ist bekannt, dass während des Gerinnungsprozess neben der direkten Verbindung, Thrombozyten untereinander, mit Bestandteilen der Extrazellulärmatrix und mit endothelialen Proteinen verkleben, aber auch Leukozyten einbinden [253]. Des Weiteren werden PNCs, als Inbegriff einer granulo-/thrombozytären Interaktion wiederholt mit der Pathogenese von thrombotischen Erkrankungen auch im inflammatorischen Kontext in Verbindung gebracht [254]. Die Annahme liegt nicht weit, dass in diesem Prozess die rapide Formierung und Akkumulation von PNCs von zentraler Bedeutung sein könnte und weiterführend eine Beeinträchtigung deren Bildung durch die NGP-Blockaden hierbei eine entscheidende Rolle einnimmt. Ohne weitere Experimente ist dem Versuch dennoch sicher zu entnehmen, dass Sema7a zusammen mit beiden Liganden Einfluss auf die PAR-1 vermittelte Kaskade nimmt, die physiologischerweise durch Thrombin aktiviert wird [255]. Dieser Pathway wird als führend in der Genese thrombotischer Ereignisse angesehen und bereits heute sind die ersten Thrombin-Rezeptor-Antagonisten in der klinischen Testung angekommen (Varoxapar und Atopaxar) [256]. Ob und in welchem Ausmaß Sema7a, Plxnc1 oder auch β 1-Integrin Antagonisten in der Zukunft einen Einzug in die Praxis finden können, ist angewiesen auf weitere Untersuchungen, speziell auch auf

deren Einfluss auf weitere Kaskaden der thrombozytären Gerinnung, induziert durch ADP, Adrenalin oder Thromboxan A2 [257].

6.7 Probleme und Limitationen dieser Studie

In-vitro Experimente wurden an isolierten Zellen des peripheren Blutes von gesunden Spendern durchgeführt und unter Bedingungen getestet, welche den physiologischen Rahmenbedingungen der Entzündung nicht ausreichend gerecht werden. Speziell der fehlende Einfluss des Blutflusses und die Interaktion mit Zellen der Gefäßwand, welche für die Wirkung von Sema7a und Plxnc1 eine bedeutende Rolle spielen [196, 234, 258], konnten in dem Umfang nicht simuliert werden und dürfen bei der Betrachtung der Daten nicht vernachlässigt werden.

Des Weiteren muss bei dem Einsatz von PMA als Stimulans der NETose (siehe 5.1.1) bedacht werden, dass dieser Aktivator der PKC durch die Zellmembran diffundiert und dort direkt Kinasen stimuliert [259]. In Anbetracht des zunehmenden Verständnisses um die Existenz einer Vielzahl an intrazellulären Kaskaden der NETose, welche teilweise PKC unabhängig fungieren [94], muss auch an dieser Stelle mit Umsicht auf die entstandenen Ergebnisse geblickt werden.

Immunofluoreszenzfärbungen zur Quantifizierung von NETs innerhalb von entzündetem Gewebe stellen eine besondere Herausforderung dar. Auch wenn die co-Lokalisation von NET-Bestandteilen wie NE, der DNA und PMN-Marker auch von anderen Autoren verwendet wurden [102, 260], bleibt für die saubere Identifikation dieser in den mehrschichtigen Organschnitten ein Restfaktor an Ungenauigkeit. Darüber hinaus wird durch die Autofluoreszenz des entzündeten Gewebes die Trennschärfe der Methode zusätzlich reduziert [261]. Es gibt keine Möglichkeit, NETs eindeutig von überlagernden Zellen, apoptotischem DNA Material umgeben von sekretorisch freigesetztem NE zu unterscheiden. Hier wären selektive AK auf NET-spezifische Bestandteile der nächste Schritt zur Optimierung dieser Methode, die bis dato noch nicht existieren. Somit kann die Immunfluoreszenz einen Anhalt geben, sollte aber bis auf weiteres unter Vorbehalt für die Betrachtung von NETs herangezogen werden [262].

Weiterführend darf dem Tierversuch als Modell zur Erforschung von pathologischen Abläufen und molekularen Prozessen seine Bedeutung für die Wissenschaft nicht abgesprochen werden. Es muss dabei an die grundlegende Möglichkeit der unvollständigen Übertragbarkeit von Ergebnissen zwischen den Spezies gedacht werden. Das Modell der LPS-induzierten ALI ist ein gut etabliertes Verfahren, welches verwendet wird, um nach dem initialen Onset der Entzündung eine Momentaufnahme der Lunge und des Organismus nach vier Stunden zu erhalten. Innerhalb des hochdynamischen Prozesses einer Entzündung bis hin zu ihrer Resolution entstehen so möglicherweise falsche Eindrücke bezüglich der Kinetik durch die Eindimensionalität der Daten, wie bereits diskutiert.

Schlussendlich demonstrierten die erhobenen Daten zunehmend die Bedeutung beider Sema7a Rezeptoren. Deutlich muss betont werden, dass in dieser Studie die Effekte von Sema7a nur bedingt spezifisch Plxnc1 oder den β 1-Integrinen zugewiesen werden können.

6.8 Aussichten

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit neue Erkenntnisse um die Wirkung von Sema7a in der akuten Entzündungsreaktion mit besonderem Augenmerk auf die noch nicht endgültig entschlüsselte Bedeutung des Zusammenspiels von Plxnc1 und den β 1-Integrinen gefunden werden. Wenig ist bisher bekannt um die intrazellulären Kaskaden, die hierbei in Gang gesetzt werden. Besonders an dieser Stelle werden weitere Experimente nötig sein, um den Mechanismus einer möglichen Plxnc1 vermittelten Regulation der von Sema7a über β 1-Integrine induzierten Wirkung aufzudecken. Vielversprechend wäre hierbei die bereits diskutierte Betrachtung des zeitlichen Verlaufs der Sema7a vermittelten Reaktionen mit besonderem Fokus auf die PNC-Bildung und die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle. Weiter wäre im Verlauf die Untersuchung der Differenzen zwischen sterilen und septischen Prozessen wichtig, um Klarheit zwischen diesem und den vorausgegangen Projekten zu schaffen. Ebenso geplant sind Studien mit gewebespezifischen Knockout-Mäusen unter Verwendung des Cre/loxP-Systems [263] um die Sema7a

induzierten Effekte, wie sie in ihrer Gesamtheit beobachtet werden konnten, besser spezifischen Akteuren zuordnen zu können.

Zusätzlich stellen die Funde um die aggregatorischen Eigenschaften von Sema7a, Plxnc1 sowie den β 1-Integrine neue Forschungsmöglichkeiten für weiterführende Experimente dar. Ein besseres Verständnis der Rolle der NGPs innerhalb der Hämostase könnte sogar der Auftakt für die von Wannemacher *et al.* diskutierten neuen Antikoagulantien auf der Basis von NGP-Inhibitoren sein [250].

7 Zusammenfassung

Sema7a und sein Rezeptorprotein Plxnc1 sind neben ihrer Rolle als Wegweiser des neuronalen Wachstums nachgewiesene Akteure des Immunsystems durch die Modulation von inflammatorischen Reizen. Hierbei konnten sie bereits als potente Stimulatoren von Monozyten, Keratinozyten, Endothel- wie auch Epithelzellen sowie in geringerem Ausmaß PMNs identifiziert werden. Ebenso zeigten gendefiziente Mauslinien für Sema7a wie auch Plxnc1 eine verminderte Reaktion auf entzündliche Prozesse. Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob ebenfalls ein Effekt auf den granulozytären Abwehrmechanismus der NETose und die Bildung von PNCs besteht. Durch den Einsatz von rhSema7a konnte jedoch gezeigt werden, dass die Entstehung von NETs *in-vitro*, sowie im Tierversuch der LPS-induzierten ALI unter Verwendung von Plxnc1^{-/-}-Mäusen unbeeinträchtigt von dem Einfluss der NGPs zu sein scheint. Der in diesem Projekt betrachtete Effekt auf die PNC-Bildung ermöglicht keine abschließende Beurteilung einer Funktion von Sema7a und Plxnc1. Viel mehr bietet er eine Grundlage für ergänzende Versuchen *in-vitro* und *in-vivo*, um differenzierter den Einfluss der NGPs im zeitlichen Kontext auf die Interaktion von Thrombozyten und PMNs zu untersuchen.

Nebenbefundlich präsentierte sich der Plxnc1-Knockout mit einer signifikant erhöhten inflammatorischen Antwort auf den bakteriellen Stimulus, welche im direkten Kontrast zu vorausgegangenen Arbeiten mit Sema7a^{-/-} steht. Um dieses Phänomen zu durchschauen wurde über sequentielle Migrationsanalysen demonstriert, dass Plxnc1^{-/-} PMNs verstärkt die Zirkulation verlassen und durch das Lungenparenchym in die Alveolen migrieren. Weiter wurde durch ein Flusskammermodell demonstriert, dass endotheliales Sema7a in der Lage ist, zelluläre Bindungen von PMNs an die Gefäßwand zu verstärken. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass PMNs unmittelbar auf endotheliales Sema7a reagieren und damit erste Erkenntnisse bezüglich der Kinetik der NGP Wirkung gewonnen werden. Da es gleichzeitig als freies Stimulans die Oberflächenexpression von granulozytären Adhäsionsmolekülen wie CD11b, PSGL-1 und LFA-1 nach einstündiger Inkubation negativ moduliert

deuten diese Daten auf komplexe Regulationsmechanismen hin, welche bisher nicht näher verstanden sind.

In Zusammenschau suggerieren diese Funde einen autoinhibitorischen Feedbackmechanismus zwischen Sema7a und Plxnc1. Die in der akuten Entzündung von Sema7a induzierten pro-inflammatorischen Effekte würden demnach womöglich von β 1-Integrinen vermittelt und dieser Prozess physiologischerweise von Plxnc1 reguliert. Elementare Signale, deren Charakter im Verlauf einem Wandel unterliegen könnte, werden hierbei potentiell innerhalb der ersten Sekunden induziert. Ergänzend konnte auch gezeigt werden, dass eine AK-Blockade gegenüber Sema7a, Plxnc1 sowie β 1-Integrin in der Lage ist die thrombozytäre Fähigkeit zur Aggregation innerhalb weniger Minuten zu kompromittieren.

In dieser Arbeit konnten klare Aussagen bezüglich einer untergeordneten Rolle von Sema7a und Plxnc1 für die NETose getroffen werden. Darüber hinaus konnten Anhaltspunkte für neue Regulationsmechanismen innerhalb der NGP modulierten Inflammation, genauso wie deren Effekt auf die PNC-Bildung sowie die Hämostase, gefunden werden. Zum Beleg dieser Hypothesen bedarf es ohne Fragen weiterer Forschung, doch konnte an dieser Stelle ein weiterer Schritt zum Verständnis um die Interaktion von Sema7a, Plxnc1 und den β 1-Integrinen innerhalb der akuten Entzündung beigetragen werden.

8 Veröffentlichungen

Teile dieser Dissertationsarbeit (siehe 5.5) wurden bereits auf dem 17. Kongress der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin vom 06.-08. Dezember 2017 (DIVI 2017) von Dr. rer. nat. Tiago Granja vorgestellt, in dessen Kooperation diese Daten entstanden sind [264].

9 Literaturverzeichnis

1. Danilova, N., *The evolution of immune mechanisms*. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2006. **306**(6): p. 496-520.
2. Zhang, Q., C.M. Zmasek, and A. Godzik, *Domain architecture evolution of pattern-recognition receptors*. Immunogenetics, 2010. **62**(5): p. 263-72.
3. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
4. Rowley, A.F. and A. Powell, *Invertebrate immune systems specific, quasi-specific, or nonspecific?* J Immunol, 2007. **179**(11): p. 7209-14.
5. Dey, A., J. Allen, and P.A. Hankey-Giblin, *Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 683.
6. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. Cell, 2001. **106**(3): p. 255-8.
7. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 986-95.
8. Blander, J.M., *Phagocytosis and antigen presentation: a partnership initiated by Toll-like receptors*. Ann Rheum Dis, 2008. **67 Suppl 3**: p. iii44-9.
9. Theoharides, T.C., et al., *Mast cells and inflammation*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1822**(1): p. 21-33.
10. Hirayama, D., T. Iida, and H. Nakase, *The Phagocytic Function of Macrophage-Enforcing Innate Immunity and Tissue Homeostasis*. Int J Mol Sci, 2017. **19**(1).
11. Arango Duque, G. and A. Descoteaux, *Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 491.
12. Faurischou, M. and N. Borregaard, *Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation*. Microbes Infect, 2003. **5**(14): p. 1317-27.
13. Cohn, Z.A. and J.G. Hirsch, *The influence of phagocytosis on the intracellular distribution of granule-associated components of polymorphonuclear leucocytes*. J Exp Med, 1960. **112**: p. 1015-22.
14. Tecchio, C., A. Micheletti, and M.A. Cassatella, *Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 508.
15. Ortega-Gomez, A., M. Perretti, and O. Soehnlein, *Resolution of inflammation: an integrated view*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(5): p. 661-74.
16. Kruger, P., et al., *Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury*. PLoS Pathog, 2015. **11**(3): p. e1004651.
17. Liu, Q., Y.H. Zhou, and Z.Q. Yang, *The cytokine storm of severe influenza and development of immunomodulatory therapy*. Cell Mol Immunol, 2016. **13**(1): p. 3-10.
18. Chousterman, B.G., F.K. Swirski, and G.F. Weber, *Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis*. Semin Immunopathol, 2017. **39**(5): p. 517-528.
19. Kaplan, M.J., *Role of neutrophils in systemic autoimmune diseases*. Arthritis Res Ther, 2013. **15**(5): p. 219.
20. Casserly, C.S., et al., *Neutrophil perversion in demyelinating autoimmune diseases: Mechanisms to medicine*. Autoimmun Rev, 2017. **16**(3): p. 294-307.
21. Rockey, D.C., P.D. Bell, and J.A. Hill, *Fibrosis--a common pathway to organ injury and failure*. N Engl J Med, 2015. **372**(12): p. 1138-49.
22. Hato, T. and P.C. Dagher, *How the Innate Immune System Senses Trouble and Causes Trouble*. Clinical Journal of the American Society of Nephrology, 2015. **10**(8): p. 1459-1469.
23. Schmid-Schonbein, G.W., et al., *The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels*. Microvasc Res, 1980. **19**(1): p. 45-70.
24. Zarbock, A. and K. Ley, *Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium*. Am J Pathol, 2008. **172**(1): p. 1-7.
25. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte Migration into Inflamed Tissues*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 694-707.
26. Pitchford, S., D. Pan, and H.C. Welch, *Platelets in neutrophil recruitment to sites of inflammation*. Curr Opin Hematol, 2017. **24**(1): p. 23-31.

27. Dauphinee, S.M. and A. Karsan, *Lipopolysaccharide signaling in endothelial cells*. Lab Invest, 2006. **86**(1): p. 9-22.
28. Rahman, A., et al., *E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation*. Am J Physiol, 1998. **275**(3 Pt 1): p. L533-44.
29. Gotsch, U., et al., *Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo*. Cell Adhes Commun, 1994. **2**(1): p. 7-14.
30. da Costa Martins, P., et al., *P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007. **27**(5): p. 1023-9.
31. Frenette, P.S., et al., *P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is expressed on platelets and can mediate platelet-endothelial interactions in vivo*. J Exp Med, 2000. **191**(8): p. 1413-22.
32. Lefort, C.T. and K. Ley, *Neutrophil arrest by LFA-1 activation*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 157.
33. Tadokoro, S., et al., *Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation*. Science, 2003. **302**(5642): p. 103-6.
34. Shamri, R., et al., *Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines*. Nat Immunol, 2005. **6**(5): p. 497-506.
35. Lefort, C.T., et al., *Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation*. Blood, 2012. **119**(18): p. 4275-82.
36. Lomakina, E.B. and R.E. Waugh, *Adhesion Between Human Neutrophils and Immobilized Endothelial Ligand Vascular Cell Adhesion Molecule 1: Divalent Ion Effects*. Biophysical Journal, 2009. **96**(1): p. 276-284.
37. Reinhardt, P.H., J.F. Elliott, and P. Kubes, *Neutrophils can adhere via alpha4beta1-integrin under flow conditions*. Blood, 1997. **89**(10): p. 3837-46.
38. Lu, L., et al., *Kindlin-3 Is Essential for the Resting alpha4beta1 Integrin-mediated Firm Cell Adhesion under Shear Flow Conditions*. J Biol Chem, 2016. **291**(19): p. 10363-71.
39. Lum, A.F., et al., *Dynamic regulation of LFA-1 activation and neutrophil arrest on intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in shear flow*. J Biol Chem, 2002. **277**(23): p. 20660-70.
40. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nature Reviews Immunology, 2007. **7**(9): p. 678-689.
41. Ley, K. and A. Zarbock, *Hold on to your endothelium: postarrest steps of the leukocyte adhesion cascade*. Immunity, 2006. **25**(2): p. 185-7.
42. Williams, M.R., et al., *Emerging mechanisms of neutrophil recruitment across endothelium*. Trends Immunol, 2011. **32**(10): p. 461-9.
43. McDonald, B., et al., *Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation*. Science, 2010. **330**(6002): p. 362-6.
44. Hyun, Y.M., et al., *Uropod elongation is a common final step in leukocyte extravasation through inflamed vessels*. Journal of Experimental Medicine, 2012. **209**(7): p. 1349-1362.
45. Phillipson, M., et al., *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2569-75.
46. Barreiro, O., et al., *Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes*. J Cell Biol, 2002. **157**(7): p. 1233-45.
47. Sumagin, R. and I.H. Sarelius, *Intercellular adhesion molecule-1 enrichment near tricellular endothelial junctions is preferentially associated with leukocyte transmigration and signals for reorganization of these junctions to accommodate leukocyte passage*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 5242-52.
48. Allport, J.R., et al., *Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions*. J Exp Med, 1997. **186**(4): p. 517-27.

49. Weber, C., L. Fraemohs, and E. Dejana, *The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(6): p. 467-77.
50. Newman, P.J., et al., *PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily*. Science, 1990. **247**(4947): p. 1219-22.
51. Sullivan, D.P. and W.A. Muller, *Neutrophil and monocyte recruitment by PECAM, CD99, and other molecules via the LBRC*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(2): p. 193-209.
52. Muller, W.A., *Mechanisms of leukocyte transendothelial migration*. Annu Rev Pathol, 2011. **6**: p. 323-44.
53. Henry, R.L., *Leukocytes and Thrombosis*. Thromb Diath Haemorrh, 1965. **13**: p. 35-46.
54. Palabrica, T.M., et al., *Leukocyte Accumulation, Which Promotes Fibrin Deposition, Is Mediated In Vivo by P-Selectin (Cd62) on Adherent Platelets*. Circulation, 1992. **86**(4): p. 406-406.
55. Peerschke, E.I., W. Yin, and B. Ghebrehiwet, *Platelet mediated complement activation*. Adv Exp Med Biol, 2008. **632**: p. 81-91.
56. Nagasawa, T., et al., *Phagocytosis by Thrombocytes is a Conserved Innate Immune Mechanism in Lower Vertebrates*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 445.
57. Power, C.A., et al., *Chemokine and chemokine receptor mRNA expression in human platelets*. Cytokine, 1995. **7**(6): p. 479-82.
58. Kuehl, F.A., Jr. and R.W. Egan, *Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation*. Science, 1980. **210**(4473): p. 978-84.
59. Mine, S., et al., *Activated platelets and endothelial cell interaction with neutrophils under flow conditions*. Intern Med, 2001. **40**(11): p. 1085-92.
60. Zarbock, A., R.K. Polanowska-Grabowska, and K. Ley, *Platelet-neutrophil-interactions: linking hemostasis and inflammation*. Blood Rev, 2007. **21**(2): p. 99-111.
61. Rossaint, J. and A. Zarbock, *Platelets in leucocyte recruitment and function*. Cardiovasc Res, 2015. **107**(3): p. 386-95.
62. Hidari, K.I., et al., *Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils*. J Biol Chem, 1997. **272**(45): p. 28750-6.
63. Simon, D.I., et al., *Platelet glycoprotein Ibalpha is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Exp Med, 2000. **192**(2): p. 193-204.
64. Bennett, J.S., *Structure and function of the platelet integrin alphaIIb beta3*. J Clin Invest, 2005. **115**(12): p. 3363-9.
65. Salas, A., et al., *Rolling adhesion through an extended conformation of integrin alphaLbeta2 and relation to alpha I and beta I-like domain interaction*. Immunity, 2004. **20**(4): p. 393-406.
66. Kuijper, P.H., et al., *Platelet associated fibrinogen and ICAM-2 induce firm adhesion of neutrophils under flow conditions*. Thromb Haemost, 1998. **80**(3): p. 443-8.
67. Kornerup, K.N., et al., *Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration*. J Appl Physiol (1985), 2010. **109**(3): p. 758-67.
68. Nagata, K., et al., *Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62)*. J Immunol, 1993. **151**(6): p. 3267-73.
69. Peters, M.J., et al., *Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing*. Br J Haematol, 1999. **106**(2): p. 391-9.
70. Rossaint, J., et al., *Synchronized integrin engagement and chemokine activation is crucial in neutrophil extracellular trap-mediated sterile inflammation*. Blood, 2014. **123**(16): p. 2573-84.
71. Hurley, S.M., et al., *The Dynamics of Platelet Activation during the Progression of Streptococcal Sepsis*. PLoS One, 2016. **11**(9): p. e0163531.
72. Kohler, D., et al., *Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein prevents platelet-neutrophil complex formation and dampens myocardial ischemia-reperfusion injury*. Circulation, 2011. **123**(22): p. 2579-90.
73. Zarbock, A., K. Singbartl, and K. Ley, *Complete reversal of acid-induced acute lung injury by blocking of platelet-neutrophil aggregation*. J Clin Invest, 2006. **116**(12): p. 3211-9.

74. Grommes, J., et al., *Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2012. **185**(6): p. 628-36.
75. Tekelioglu, Y. and H. Uzun, *Circulating platelet-leukocyte aggregates in patients with inflammatory bowel disease*. J Chin Med Assoc, 2013. **76**(4): p. 182-5.
76. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
77. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms*. Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 668-76.
78. Clark, S.R., et al., *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nature Medicine, 2007. **13**(4): p. 463-469.
79. Urban, C.F., et al., *Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000639.
80. Tagai, C., et al., *Antimicrobial properties of arginine- and lysine-rich histones and involvement of bacterial outer membrane protease T in their differential mode of actions*. Peptides, 2011. **32**(10): p. 2003-2009.
81. Kolaczowska, E., et al., *Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6673.
82. Brinkmann, V., *Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade*. J Innate Immun, 2018: p. 1-8.
83. Yipp, B.G., et al., *Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo*. Nature Medicine, 2012. **18**(9): p. 1386-+.
84. Marin-Esteban, V., et al., *Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli strain C1845 induces neutrophil extracellular traps that kill bacteria and damage human enterocyte-like cells*. Infect Immun, 2012. **80**(5): p. 1891-9.
85. Li, R.H.L., G. Ng, and F. Tablin, *Lipopolysaccharide-induced neutrophil extracellular trap formation in canine neutrophils is dependent on histone H3 citrullination by peptidylarginine deiminase*. Vet Immunol Immunopathol, 2017. **193-194**: p. 29-37.
86. Raftery, M.J., et al., *beta2 integrin mediates hantavirus-induced release of neutrophil extracellular traps*. J Exp Med, 2014. **211**(7): p. 1485-97.
87. Wang, Y., et al., *Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination*. Science, 2004. **306**(5694): p. 279-83.
88. Pilszczek, F.H., et al., *A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7413-25.
89. Vaaraniemi, J., et al., *The effects of PMA and TFP and alterations in intracellular pH and calcium concentration on the membrane associations of phospholipid-binding proteins fodrin, protein kinase C and annexin II in cultured MDCK cells*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1189**(1): p. 21-30.
90. Wang, Y., et al., *Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation*. J Cell Biol, 2009. **184**(2): p. 205-13.
91. Lewis, H.D., et al., *Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation*. Nature Chemical Biology, 2015. **11**(3): p. 189-+.
92. Li, P.X., et al., *PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps*. Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(9): p. 1853-1862.
93. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. J Cell Biol, 2010. **191**(3): p. 677-91.
94. Kenny, E.F., et al., *Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways*. Elife, 2017. **6**.
95. Konig, M.F. and F. Andrade, *A Critical Reappraisal of Neutrophil Extracellular Traps and NETosis Mimics Based on Differential Requirements for Protein Citrullination*. Front Immunol, 2016. **7**: p. 461.
96. Fuchs, T.A., et al., *Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps*. Journal of Cell Biology, 2007. **176**(2): p. 231-241.
97. Yipp, B.G. and P. Kubes, *NETosis: how vital is it?* Blood, 2013. **122**(16): p. 2784-94.
98. Hakkim, A., et al., *Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(21): p. 9813-8.

99. Beiter, K., et al., *An endonuclease allows Streptococcus pneumoniae to escape from neutrophil extracellular traps*. Current Biology, 2006. **16**(4): p. 401-407.
100. Buchanan, J.T., et al., *DNase expression allows the pathogen group A streptococcus to escape killing in neutrophil extracellular traps*. Current Biology, 2006. **16**(4): p. 396-400.
101. Lefrancais, E., et al., *Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury*. JCI Insight, 2018. **3**(3).
102. Yildiz, C., et al., *Mechanical ventilation induces neutrophil extracellular trap formation*. Anesthesiology, 2015. **122**(4): p. 864-75.
103. Ge, L., et al., *Neutrophil extracellular traps in ischemia-reperfusion injury-induced myocardial no-reflow: therapeutic potential of DNase-based reperfusion strategy*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2015. **308**(5): p. H500-9.
104. Arumugam, S., et al., *Neutrophil extracellular traps in acrolein promoted hepatic ischemia reperfusion injury: Therapeutic potential of NOX2 and p38MAPK inhibitors*. J Cell Physiol, 2018. **233**(4): p. 3244-3261.
105. Raup-Konsavage, W.M., et al., *Neutrophil peptidyl arginine deiminase-4 has a pivotal role in ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury*. Kidney International, 2018. **93**(2): p. 365-374.
106. Czaikoski, P.G., et al., *Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis*. PLoS One, 2016. **11**(2): p. e0148142.
107. Kambas, K., et al., *Autophagy mediates the delivery of thrombogenic tissue factor to neutrophil extracellular traps in human sepsis*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e45427.
108. Fuchs, T.A., A. Brill, and D.D. Wagner, *Neutrophil extracellular trap (NET) impact on deep vein thrombosis*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(8): p. 1777-83.
109. Force, A.D.T., et al., *Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition*. JAMA, 2012. **307**(23): p. 2526-33.
110. Rezoagli, E., R. Fumagalli, and G. Bellani, *Definition and epidemiology of acute respiratory distress syndrome*. Ann Transl Med, 2017. **5**(14): p. 282.
111. Confalonieri, M., F. Salton, and F. Fabiano, *Acute respiratory distress syndrome*. Eur Respir Rev, 2017. **26**(144).
112. Phua, J., et al., *Has Mortality from Acute Respiratory Distress Syndrome Decreased over Time? A Systematic Review*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2009. **179**(3): p. 220-227.
113. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
114. Domino, K.B., et al., *Effect of regional alveolar hypoxia on gas exchange in pulmonary edema*. Am Rev Respir Dis, 1992. **145**(2 Pt 1): p. 340-7.
115. Seeger, W., et al., *Surfactant Inhibition by Plasma-Proteins - Differential Sensitivity of Various Surfactant Preparations*. European Respiratory Journal, 1993. **6**(7): p. 971-977.
116. Wright, T.W., et al., *Pulmonary inflammation disrupts surfactant function during Pneumocystis carinii pneumonia*. Infect Immun, 2001. **69**(2): p. 758-64.
117. Han, S. and R.K. Mallampalli, *The Role of Surfactant in Lung Disease and Host Defense against Pulmonary Infections*. Ann Am Thorac Soc, 2015. **12**(5): p. 765-74.
118. Todd, N.W., I.G. Luzina, and S.P. Atamas, *Molecular and cellular mechanisms of pulmonary fibrosis*. Fibrogenesis Tissue Repair, 2012. **5**(1): p. 11.
119. Scott, B.N.V. and P. Kubes, *Death to the neutrophil! A resolution for acute respiratory distress syndrome?* Eur Respir J, 2018. **52**(2).
120. Williams, A.E. and R.C. Chambers, *The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS?* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(3): p. L217-30.
121. Lee, J.M., et al., *Inhibition of neutrophil elastase contributes to attenuation of lipopolysaccharide-induced acute lung injury during neutropenia recovery in mice*. J Anesth, 2017. **31**(3): p. 397-404.
122. Ferring, M. and J.L. Vincent, *Is outcome from ARDS related to the severity of respiratory failure?* European Respiratory Journal, 1997. **10**(6): p. 1297-1300.
123. Stapleton, R.D., et al., *Causes and timing of death in patients with ARDS*. Chest, 2005. **128**(2): p. 525-32.
124. Meduri, G.U., et al., *Activation and regulation of systemic inflammation in ARDS: rationale for prolonged glucocorticoid therapy*. Chest, 2009. **136**(6): p. 1631-1643.

125. Dushianthan, A., et al., *Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury*. Postgraduate Medical Journal, 2011. **87**(1031): p. 612-622.
126. Azmitia, E.C., *Cajal and brain plasticity: insights relevant to emerging concepts of mind*. Brain Res Rev, 2007. **55**(2): p. 395-405.
127. Sperry, R.W., *Chemoaffinity in the Orderly Growth of Nerve Fiber Patterns and Connections*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1963. **50**: p. 703-10.
128. Hedgecock, E.M., J.G. Culotti, and D.H. Hall, *The Unc-5, Unc-6, and Unc-40 Genes Guide Circumferential Migrations of Pioneer Axons and Mesodermal Cells on the Epidermis in C-Elegans*. Neuron, 1990. **4**(1): p. 61-85.
129. Goodman, C.S. and C.J. Shatz, *Developmental mechanisms that generate precise patterns of neuronal connectivity*. Cell, 1993. **72 Suppl**: p. 77-98.
130. Pini, A., *Chemorepulsion of axons in the developing mammalian central nervous system*. Science, 1993. **261**(5117): p. 95-8.
131. Serafini, T., et al., *The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6*. Cell, 1994. **78**(3): p. 409-24.
132. Kolodkin, A.L., D.J. Matthes, and C.S. Goodman, *The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1389-99.
133. Yuan, W., et al., *The mouse SLIT family: secreted ligands for ROBO expressed in patterns that suggest a role in morphogenesis and axon guidance*. Dev Biol, 1999. **212**(2): p. 290-306.
134. Chan, S.S.Y., et al., *UNC-40, a C-elegans homolog of DCC (Deleted in Colorectal Cancer), is required in motile cells responding to UNC-6 netrin cues*. Cell, 1996. **87**(2): p. 187-195.
135. Meyerhardt, J.A., et al., *Identification and characterization of neogenin, a DCC-related gene*. Oncogene, 1997. **14**(10): p. 1129-36.
136. Monnier, P.P., et al., *RGM is a repulsive guidance molecule for retinal axons*. Nature, 2002. **419**(6905): p. 392-5.
137. Ohta, K., et al., *Plexin - a Novel Neuronal Cell-Surface Molecule That Mediates Cell-Adhesion Via a Homophilic Binding Mechanism in the Presence of Calcium-Ions*. Neuron, 1995. **14**(6): p. 1189-1199.
138. Wu, W., et al., *Directional guidance of neuronal migration in the olfactory system by the protein Slit*. Nature, 1999. **400**(6742): p. 331-6.
139. Giger, R.J., E.R. Hollis, 2nd, and M.H. Tuszynski, *Guidance molecules in axon regeneration*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010. **2**(7): p. a001867.
140. Van Battum, E.Y., S. Brignani, and R.J. Pasterkamp, *Axon guidance proteins in neurological disorders*. Lancet Neurol, 2015. **14**(5): p. 532-46.
141. Keino-Masu, K., et al., *Deleted in Colorectal Cancer (DCC) encodes a netrin receptor*. Cell, 1996. **87**(2): p. 175-85.
142. Roche, J., et al., *Distinct 3p21.3 deletions in lung cancer and identification of a new human semaphorin*. Oncogene, 1996. **12**(6): p. 1289-97.
143. Xiang, R.H., et al., *Isolation of the human semaphorin III/F gene (SEMA3F) at chromosome 3p21, a region deleted in lung cancer*. Genomics, 1996. **32**(1): p. 39-48.
144. Eichmann, A. and J.L. Thomas, *Molecular Parallels between Neural and Vascular Development*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2013. **3**(1).
145. Wu, J.Y., et al., *The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 948-52.
146. Ly, N.P., et al., *Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14729-34.
147. Rosenberger, P., et al., *Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 195-202.
148. Mirakaj, V., et al., *Repulsive guidance molecule-A (RGM-A) inhibits leukocyte migration and mitigates inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(16): p. 6555-60.
149. Lepelletier, Y., et al., *Immunosuppressive role of semaphorin-3A on T cell proliferation is mediated by inhibition of actin cytoskeleton reorganization*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1782-93.
150. Kumanogoh, A., et al., *Class IV semaphorin Sema4A enhances T-cell activation and interacts with Tim-2*. Nature, 2002. **419**(6907): p. 629-33.

151. Geutskens, S.B., P.L. Hordijk, and P.B. van Hennik, *The chemorepellent Slit3 promotes monocyte migration*. J Immunol, 2010. **185**(12): p. 7691-8.
152. Mirakaj, V. and P. Rosenberger, *Immunomodulatory Functions of Neuronal Guidance Proteins*. Trends Immunol, 2017. **38**(6): p. 444-456.
153. Koncina, E., et al., *Role of semaphorins during axon growth and guidance*. Adv Exp Med Biol, 2007. **621**: p. 50-64.
154. Alto, L.T. and J.R. Terman, *Semaphorins and their Signaling Mechanisms*. Methods Mol Biol, 2017. **1493**: p. 1-25.
155. *Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins*. Semaphorin Nomenclature Committee. Cell, 1999. **97**(5): p. 551-2.
156. Yazdani, U. and J.R. Terman, *The semaphorins*. Genome Biol, 2006. **7**(3): p. 211.
157. Bork, P., et al., *Domains in plexins: links to integrins and transcription factors*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(7): p. 261-3.
158. Kumanogoh, A. and H. Kikutani, *Immune semaphorins: a new area of semaphorin research*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 17): p. 3463-70.
159. Fong, K.P., et al., *Deciphering the human platelet sheddome*. Blood, 2011. **117**(1): p. e15-26.
160. Browne, K., et al., *Transmembrane semaphorin5B is proteolytically processed into a repulsive neural guidance cue*. Journal of Neurochemistry, 2012. **123**(1): p. 135-146.
161. Zhu, L., et al., *Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1621-6.
162. Koropouli, E. and A.L. Kolodkin, *Semaphorins and the dynamic regulation of synapse assembly, refinement, and function*. Curr Opin Neurobiol, 2014. **27**: p. 1-7.
163. Good, P.F., et al., *A role for semaphorin 3A signaling in the degeneration of hippocampal neurons during Alzheimer's disease*. J Neurochem, 2004. **91**(3): p. 716-36.
164. Lesnick, T.G., et al., *Beyond Parkinson Disease: Amyotrophic Lateral Sclerosis and the Axon Guidance Pathway*. Plos One, 2008. **3**(1).
165. Barnes, G., et al., *Temporal specific patterns of semaphorin gene expression in rat brain after kainic acid-induced status epilepticus*. Hippocampus, 2003. **13**(1): p. 1-20.
166. Pasterkamp, R.J. and R.J. Giger, *Semaphorin function in neural plasticity and disease*. Curr Opin Neurobiol, 2009. **19**(3): p. 263-74.
167. Cora, D., et al., *Semaphorins in cardiovascular medicine*. Trends Mol Med, 2014. **20**(10): p. 589-98.
168. Suzuki, T., et al., *Comparative analysis of semaphorin 3A in soleus and EDL muscle satellite cells in vitro toward understanding its role in modulating myogenin expression*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(2): p. 476-82.
169. Reidy, K. and A. Tufro, *Semaphorins in kidney development and disease: modulators of ureteric bud branching, vascular morphogenesis, and podocyte-endothelial crosstalk*. Pediatr Nephrol, 2011. **26**(9): p. 1407-12.
170. Yagai, T., A. Miyajima, and M. Tanaka, *Semaphorin 3E secreted by damaged hepatocytes regulates the sinusoidal regeneration and liver fibrosis during liver regeneration*. Am J Pathol, 2014. **184**(8): p. 2250-9.
171. Kagoshima, M. and T. Ito, *Diverse gene expression and function of semaphorins in developing lung: positive and negative regulatory roles of semaphorins in lung branching morphogenesis*. Genes Cells, 2001. **6**(6): p. 559-71.
172. Suzuki, K., A. Kumanogoh, and H. Kikutani, *Semaphorins and their receptors in immune cell interactions*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 17-23.
173. Comeau, M.R., et al., *A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR*. Immunity, 1998. **8**(4): p. 473-82.
174. Tamagnone, L., et al., *Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates*. Cell, 1999. **99**(1): p. 71-80.
175. Suzuki, K., et al., *Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin*. Nature, 2007. **446**(7136): p. 680-4.
176. Chao, K.L., et al., *Crystal structure of the Sema-PSI extracellular domain of human RON receptor tyrosine kinase*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41912.

177. Stamos, J., et al., *Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor*. EMBO J, 2004. **23**(12): p. 2325-35.
178. Kumanogoh, A., et al., *Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: A novel mechanism for regulating B cell signaling*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 621-631.
179. Nagai, H., et al., *CLCP1 interacts with semaphorin 4B and regulates motility of lung cancer cells*. Oncogene, 2007. **26**(27): p. 4025-31.
180. Gherardi, E., et al., *The sema domain*. Curr Opin Struct Biol, 2004. **14**(6): p. 669-78.
181. Hota, P.K. and M. Buck, *Plexin structures are coming: opportunities for multilevel investigations of semaphorin guidance receptors, their cell signaling mechanisms, and functions*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(22): p. 3765-805.
182. Pascoe, H.G., Y. Wang, and X. Zhang, *Structural mechanisms of plexin signaling*. Prog Biophys Mol Biol, 2015. **118**(3): p. 161-8.
183. Gibbs, J.B. and M.S. Marshall, *The ras oncogene--an important regulatory element in lower eucaryotic organisms*. Microbiol Rev, 1989. **53**(2): p. 171-85.
184. He, H., et al., *Crystal structure of the plexin A3 intracellular region reveals an autoinhibited conformation through active site sequestration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(37): p. 15610-5.
185. Antipenko, A., et al., *Structure of the semaphorin-3A receptor binding module*. Neuron, 2003. **39**(4): p. 589-98.
186. Janssen, B.J., et al., *Structural basis of semaphorin-plexin signalling*. Nature, 2010. **467**(7319): p. 1118-22.
187. Xu, X., et al., *Human semaphorin K1 is glycosylphosphatidylinositol-linked and defines a new subfamily of viral-related semaphorins*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22428-34.
188. Liu, H., et al., *Structural basis of semaphorin-plexin recognition and viral mimicry from Sema7A and A39R complexes with PlexinC1*. Cell, 2010. **142**(5): p. 749-61.
189. Holmes, S., et al., *Sema7A is a potent monocyte stimulator*. Scand J Immunol, 2002. **56**(3): p. 270-5.
190. van Rijn, A., et al., *Semaphorin 7A Promotes Chemokine-Driven Dendritic Cell Migration*. J Immunol, 2016. **196**(1): p. 459-68.
191. Czopik, A.K., et al., *Semaphorin 7A is a negative regulator of T cell responses*. Immunity, 2006. **24**(5): p. 591-600.
192. Jaimes, Y., et al., *Semaphorin 7A inhibits platelet production from CD34(+) progenitor cells*. Journal of Thrombosis and Haemostasis, 2012. **10**(6): p. 1100-1108.
193. De Minicis, S., et al., *Semaphorin 7A contributes to TGF-beta-mediated liver fibrogenesis*. Am J Pathol, 2013. **183**(3): p. 820-30.
194. Gan, Y., et al., *Role of semaphorin 7a signaling in transforming growth factor beta1-induced lung fibrosis and scleroderma-related interstitial lung disease*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(8): p. 2484-94.
195. Roth, J.M., et al., *Semaphorin 7A Aggravates Pulmonary Inflammation during Lung Injury*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146930.
196. Morote-Garcia, J.C., et al., *Endothelial Semaphorin 7A promotes neutrophil migration during hypoxia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(35): p. 14146-51.
197. Granja, T., et al., *Crucial role of Plexin C1 for pulmonary inflammation and survival during lung injury*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(4): p. 879-91.
198. Konig, K., et al., *The plexin C1 receptor promotes acute inflammation*. Eur J Immunol, 2014. **44**(9): p. 2648-58.
199. Konig, K., et al., *Inhibition of Plexin C1 Protects Against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury*. Crit Care Med, 2016. **44**(8): p. e625-32.
200. Lazova, R., et al., *The semaphorin 7A receptor Plexin C1 is lost during melanoma metastasis*. Am J Dermatopathol, 2009. **31**(2): p. 177-81.
201. Scott, G.A., et al., *Plexin C1, a receptor for semaphorin 7a, inactivates cofilin and is a potential tumor suppressor for melanoma progression*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(4): p. 954-63.
202. Barczyk, M., S. Carracedo, and D. Gullberg, *Integrins*. Cell Tissue Res, 2010. **339**(1): p. 269-80.
203. Campbell, I.D. and M.J. Humphries, *Integrin structure, activation, and interactions*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2011. **3**(3).

204. Pasterkamp, R.J., et al., *Semaphorin 7A promotes axon outgrowth through integrins and MAPKs*. *Nature*, 2003. **424**(6947): p. 398-405.
205. Kang, S., et al., *Intestinal epithelial cell-derived semaphorin 7A negatively regulates development of colitis via alphavbeta1 integrin*. *J Immunol*, 2012. **188**(3): p. 1108-16.
206. World Medical, A., *World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects*. *JAMA*, 2013. **310**(20): p. 2191-4.
207. Novak, J. and J. Sejkorova, *[Withdrawal of Blood as Stress. I. Early Changes in the Eosinophil Count]*. *Cas Lek Cesk*, 1963. **102**: p. 1294-8.
208. Korkmaz, B., et al., *Discriminating between the activities of human neutrophil elastase and proteinase 3 using serpin-derived fluorogenic substrates*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39074-81.
209. Gallati, H., *[Horseradish peroxidase: a study of the kinetics and the determination of optimal reaction conditions, using hydrogen peroxide and 2,2'-azinobis 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) as substrates (author's transl)]*. *J Clin Chem Clin Biochem*, 1979. **17**(1): p. 1-7.
210. Smith, P.K., et al., *Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid*. *Analytical Biochemistry*, 1985. **150**(1): p. 76-85.
211. Martin, T.L., E.J. Mufson, and M.M. Mesulam, *The light side of horseradish peroxidase histochemistry*. *J Histochem Cytochem*, 1984. **32**(7): p. 793.
212. Dittrich, W. and W. Gohde, *[Impulse fluorometry of single cells in suspension]*. *Z Naturforsch B*, 1969. **24**(3): p. 360-1.
213. Robertson, B.R., D.K. Button, and A.L. Koch, *Determination of the biomasses of small bacteria at low concentrations in a mixture of species with forward light scatter measurements by flow cytometry*. *Appl Environ Microbiol*, 1998. **64**(10): p. 3900-9.
214. Salzman, G.C., *Light scatter: detection and usage*. *Curr Protoc Cytom*, 2001. **Chapter 1**: p. Unit 1 13.
215. Salzman, G.C., et al., *Cell classification by laser light scattering: identification and separation of unstained leukocytes*. *Acta Cytol*, 1975. **19**(4): p. 374-7.
216. Asbury, C.L., et al., *Fluorescence spectra of DNA dyes measured in a flow cytometer*. *Cytometry*, 1996. **24**(3): p. 234-42.
217. Reutershan, J., et al., *Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2005. **289**(5): p. L807-L815.
218. Konrad, F.M., et al., *The unrecognized effects of phosphodiesterase 4 on epithelial cells in pulmonary inflammation*. *PLoS One*, 2015. **10**(4): p. e0121725.
219. Cardinal, D.C. and R.J. Flower, *The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood*. *J Pharmacol Methods*, 1980. **3**(2): p. 135-58.
220. Kinlough-Rathbone, R.L., et al., *Degranulation of human platelets by the thrombin receptor peptide SFLLRN: comparison with degranulation by thrombin*. *Thromb Haemost*, 1993. **70**(6): p. 1019-23.
221. De Cristofaro, R. and E. De Candia, *Thrombin domains: structure, function and interaction with platelet receptors*. *J Thromb Thrombolysis*, 2003. **15**(3): p. 151-63.
222. Vassallo, R.R., Jr., et al., *Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(9): p. 6081-5.
223. Storey, R.F., R.G. Wilcox, and S. Heptinstall, *Differential effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists on platelet microaggregate and macroaggregate formation and effect of anticoagulant on antagonist potency. Implications for assay methodology and comparison of different antagonists*. *Circulation*, 1998. **98**(16): p. 1616-21.
224. Papayannopoulos, V. and A. Zychlinsky, *NETs: a new strategy for using old weapons*. *Trends in Immunology*, 2009. **30**(11): p. 513-521.
225. Papayannopoulos, V., et al., *Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps*. *Journal of Cell Biology*, 2010. **191**(3): p. 677-691.
226. Carestia, A., T. Kaufman, and M. Schattner, *Platelets: New Bricks in the Building of Neutrophil Extracellular Traps*. *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 271.
227. O'Connell, K.E., et al., *Practical Murine Hematopathology: A Comparative Review and Implications for Research*. *Comparative Medicine*, 2015. **65**(2): p. 96-113.

228. Mestas, J. and C.C.W. Hughes, *Of mice and not men: Differences between mouse and human immunology*. Journal of Immunology, 2004. **172**(5): p. 2731-2738.
229. Im, M., et al., *Comparative quantitative analysis of cluster of differentiation 45 antigen expression on lymphocyte subsets*. Korean J Lab Med, 2011. **31**(3): p. 148-53.
230. Zarbock, A., C.A. Lowell, and K. Ley, *Spleen tyrosine kinase syk is necessary for E-Selectin-induced alpha(L)beta 2 integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1*. Immunity, 2007. **26**(6): p. 773-783.
231. Stadtmann, A., et al., *The PSGL-1-L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow*. J Exp Med, 2013. **210**(11): p. 2171-80.
232. Gomes, N.E., et al., *Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood*. Braz J Med Biol Res, 2010. **43**(9): p. 853-8.
233. Basit, A., et al., *ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(2): p. L200-7.
234. Zhang, M., et al., *Endothelial semaphorin 7A promotes seawater aspiration-induced acute lung injury through plexin C1 and beta1 integrin*. Mol Med Rep, 2017. **16**(4): p. 4215-4221.
235. Kamata, M., et al., *Semaphorin 7A on keratinocytes induces interleukin-8 production by monocytes*. J Dermatol Sci, 2011. **62**(3): p. 176-82.
236. Angelisova, P., et al., *Characterization of the human leukocyte GPI-anchored glycoprotein CDw108 and its relation to other similar molecules*. Immunobiology, 1999. **200**(2): p. 234-45.
237. Slaba, I., et al., *Imaging the dynamic platelet-neutrophil response in sterile liver injury and repair in mice*. Hepatology, 2015. **62**(5): p. 1593-605.
238. Morrell, C.N., et al., *Emerging roles for platelets as immune and inflammatory cells*. Blood, 2014. **123**(18): p. 2759-2767.
239. Chen, L., et al., *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*. Oncotarget, 2018. **9**(6): p. 7204-7218.
240. Chen, G.Y. and G. Nunez, *Sterile inflammation: sensing and reacting to damage*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(12): p. 826-37.
241. Rossaint, J. and A. Zarbock, *Tissue-specific neutrophil recruitment into the lung, liver, and kidney*. J Innate Immun, 2013. **5**(4): p. 348-57.
242. Walzer, T., et al., *Plexin C1 engagement on mouse dendritic cells by viral semaphorin A39R induces actin cytoskeleton rearrangement and inhibits integrin-mediated adhesion and chemokine-induced migration*. J Immunol, 2005. **174**(1): p. 51-9.
243. Furze, R.C. and S.M. Rankin, *Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow*. Immunology, 2008. **125**(3): p. 281-8.
244. Davenpeck, K.L., et al., *Activation of human leukocytes reduces surface P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) and adhesion to P-selectin in vitro*. J Immunol, 2000. **165**(5): p. 2764-72.
245. Jilma, B., et al., *Rapid down modulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1, CD162) by G-CSF in humans*. Transfusion, 2002. **42**(3): p. 328-33.
246. Scott, G.A., L.A. McClelland, and A.F. Fricke, *Semaphorin 7a promotes spreading and dendricity in human melanocytes through beta1-integrins*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(1): p. 151-61.
247. Etienne-Manneville, S. and A. Hall, *Rho GTPases in cell biology*. Nature, 2002. **420**(6916): p. 629-35.
248. Lin, K.B., S.A. Freeman, and M.R. Gold, *Rap GTPase-mediated adhesion and migration: A target for limiting the dissemination of B-cell lymphomas?* Cell Adh Migr, 2010. **4**(3): p. 327-32.
249. Mould, A.P., et al., *Evidence that monoclonal antibodies directed against the integrin beta subunit plexin/semaphorin/integrin domain stimulate function by inducing receptor extension*. J Biol Chem, 2005. **280**(6): p. 4238-46.
250. Wannemacher, K.M., et al., *The role of semaphorins and their receptors in platelets: Lessons learned from neuronal and immune synapses*. Platelets, 2011. **22**(6): p. 461-5.
251. Kashiwagi, H., et al., *Negative regulation of platelet function by a secreted cell repulsive protein, semaphorin 3A*. Blood, 2005. **106**(3): p. 913-21.

252. Wannemacher, K.M., et al., *An expanded role for semaphorin 4D in platelets includes contact-dependent amplification of Clec-2 signaling*. J Thromb Haemost, 2013. **11**(12): p. 2190-3.
253. Swystun, L.L. and P.C. Liaw, *The role of leukocytes in thrombosis*. Blood, 2016. **128**(6): p. 753-62.
254. Lisman, T., *Platelet-neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease*. Cell Tissue Res, 2018. **371**(3): p. 567-576.
255. Andersen, H., et al., *Protease-activated receptor 1 is the primary mediator of thrombin-stimulated platelet procoagulant activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11189-93.
256. Tello-Montoliu, A., et al., *Antiplatelet therapy: thrombin receptor antagonists*. Br J Clin Pharmacol, 2011. **72**(4): p. 658-71.
257. Hou, Y., et al., *Platelets in hemostasis and thrombosis: Novel mechanisms of fibrinogen-independent platelet aggregation and fibronectin-mediated protein wave of hemostasis*. J Biomed Res, 2015. **29**.
258. Kessenbrock, K., et al., *Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis*. Nat Med, 2009. **15**(6): p. 623-5.
259. Jaken, S., *Protein kinase C isozymes and substrates*. Curr Opin Cell Biol, 1996. **8**(2): p. 168-73.
260. Sangaletti, S., et al., *Neutrophil extracellular traps mediate transfer of cytoplasmic neutrophil antigens to myeloid dendritic cells toward ANCA induction and associated autoimmunity*. Blood, 2012. **120**(15): p. 3007-18.
261. Davis, A.S., et al., *Characterizing and Diminishing Autofluorescence in Formalin-fixed Paraffin-embedded Human Respiratory Tissue*. J Histochem Cytochem, 2014. **62**(6): p. 405-423.
262. Nauseef, W.M. and P. Kubes, *Pondering Neutrophil Extracellular Traps (NETs) with healthy skepticism*. Cell Microbiol, 2016.
263. Hall, B., A. Limaye, and A.B. Kulkarni, *Overview: generation of gene knockout mice*. Curr Protoc Cell Biol, 2009. **Chapter 19**: p. Unit 19 12 19 12 1-17.
264. Granja, T., et al., *Neuronal guidance protein semaphorin 7A influences neutrophil arrest and aggravates inflammatory lung injury* Leipzig, Deutschland, 17. Kongress der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI), 2017. **Freier Vortrag**.

10 Erklärung zum Eigenanteil

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Univ.-Prof. Dr. Peter Rosenberger, ärztlicher Direktor der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikum Tübingen und Dr. rer. nat. David Köhler, Leitung der Arbeitsgruppe für Sepsis und Gewebe-Hypoxie.

Folgende Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Dr. rer. nat. Tiago Granja (Durchflusszytometrie, Aggregometrie), Dr. rer. nat. Claudia Eggstein (Immunfluoreszenz, ELISAs) und Frau Michaela Hoch-Gutbrod (Zellisolation und -kulturversuche, Immunhistochemie) von mir eigenständig durchgeführt.

Die Tierversuche erfolgten in Zusammenarbeit und unter direkter Aufsicht von Dr. rer. nat. David Köhler und Dr. rer. nat. Claudia Eggstein, als wissenschaftliche Leitung des zugrunde liegenden Tierversuchsantrages. Die hierfür erforderlichen Kompetenzen zum fachgerechten Umgang mit den Tieren wurden von mir im Rahmen des 40 stündigen versuchstierkundlichen Privatissimums der Eberhard Karls Universität Tübingen erlangt.

Die in diesem Manuskript verwendeten immunhistochemischen Aufnahmen wurden aus zeitlichen Gründen von Frau Michaela Hoch-Gutbrod angefertigt. Eine Einarbeitung in die Methodik ist erfolgt und ich habe eigenständig Färbungen vorgenommen, die jedoch keinen Einzug in diese Arbeit gefunden haben.

Die statistische Auswertung erfolgte nach initialer Einweisung von Dr. rer. nat. David Köhler eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Münster, den 11.11.2020

[Unterschrift]

11 Danksagung

Diese Arbeit ist entstanden in unzähligen Stunden der Zusammenarbeit mit vielen Kollegen und Freunden, denen ich allen meinen uneingeschränkten und herzlichsten Dank aussprechen möchte.

Ein ganz besonderer Dank geht an Univ.-Prof. Dr. med. Peter Rosenberger, Dr. rer. nat. David Köhler, Dr. rer. nat. Tiago Granja, Dr. rer. nat. Claudia Eggstein und Michaela Hoch-Gutbrod, die mich als Team von meinen ersten Tagen an begleitet haben und ohne deren Unterstützung dieses Projekt in keinsten Weise hätte entstehen können.

Ein kollegialer Dank geht zusätzlich an Dr. med. Franziska Konrad, Dr. med. Kristian Ngamsri und Anika Müller, durch deren Hilfe die Versuchsreihen zur sequentiellen PMN Migration entstanden sind.

Genauso danke ich Univ.-Prof. Dr. med. Alexander Zarbock und Priv.-Doz. Dr. med. Jan Rossaint aus der Arbeitsgruppe für Vascular Inflammation and Platelets der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie des Universitätsklinikum Münster für die freundliche Zusammenarbeit im Rahmen eines mehrtägigen Exkurses nach Münster. Hier wurde Tiago Granja und mir unter intensiver persönlicher Betreuung das Erlernen des Flusskammermodells ermöglicht, welches uneingeschränkt den Einzug in dieses Manuskript gefunden hat.

Zusätzlich möchte ich dem gesamten Team des Zentrum für medizinische Forschung Tübingen danken, die mir jederzeit während meiner Forschungsarbeit mit Rat und Tat beiseite standen.

In ganz besonderem Maß will ich Eike Reus, Vitali Kurnatowski, Victor Heinrich, Mark Smith, Inka Janssen, sowie Eda Der danken! Wie niemand sonst habt ihr als Fachfremde meine Texte in allen Stufen auf Fehler durchwühlt und mir zu jedem Zeitpunkt mit Rat und Tat beiseite gestanden.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Genoveva und Peter Klammer, die mich durch mein gesamtes Leben hin unterstützen und mir die Arbeit an dieser Dissertation ermöglicht haben.

12 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Lothar Peter Klammer
Geboren: 14.12.1991 in Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Sprachen:

Deutsch: Muttersprache
Englisch: verhandlungssicher in Schrift und Sprache

Schulische und akademische Ausbildung:

2011 – 2018 Studium der Humanmedizin
Note des dritten Staatsexamen: gut
(18.05.2018)
Note des zweiten Staatsexamen: befriedigend
(06.04.2017)
Note des Physikum: befriedigend
(Eberhard Karls Universität, Tübingen)

2007 – 2010 Allgemeine Hochschulreife
Abschlussnote: 1,7
(Internatsschule Schloss Hansenberg, Geisenheim)

Berufliche Laufbahn:

10/2018 – aktuell Arzt in Weiterbildung
Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin
und Schmerztherapie
(Universitätsklinikum Münster)

Praktische Erfahrungen:

12/2017 – 04/2018 PJ-Tertial: Innere Medizin
(Universitätsklinikum Dresden)

09/2017 – 12/2017 PJ-Tertial: Chirurgie
(Klinikum am Steinberg, Reutlingen)

05/2017 – 08/2017 PJ-Tertial: Anästhesie
(Universitätsklinikum Münster)

- 06/2016 Wahlfachveranstaltung: Simulation
Intensivmedizinischer Szenarien
(Tübinger Patientensicherheits- und
Simulationszentrum (tüpass))
- 04/2016 – 06/2016 Versuchstierkundliches Privatissimum
zur Erlangung von tierschutz- und
versuchstierkundlicher Fachkenntnisse nach Anhang
V Direktive 2010/63 der EU
(Universitätsklinikum Tübingen)
- 07/2015 – 10/2017 Studentische Hilfskraft
Zentrum für Medizinische Forschung
Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Universitätsklinikum Tübingen
Leitung: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Rosenberger
(Derendingen, Tübingen)
- 05/2015 – 04/2017 Laborarbeit im Rahmen dieser Doktorarbeit während
zweier Forschungssemester an Modellen in
Zellkultur- und Tierversuchen
Schwerpunkt: Frühe inflammatorische Antwort
des unspezifischen Immunsystems im Kontext der
LPS induzierten Lungenschädigung
Doktorvater: Univ.-Prof. Dr. med. Peter Rosenberger
Betreuer: Dr. rer. nat. David Köhler
- 03/2010 Jugend forscht - Projekt auf dem Gebiet der
Spieletheorie
Landessieger Hessen im Fachgebiet Mathematik /
Informatik

Publikationen:

Köhler D., S-I. Bibli, L.P. Klammer, J.M. Roth, R. Lehmann, I. Fleming, T.F. Granja, A. Straub, P.M. Benz und P. Rosenberger. 2018. Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein contributes to myocardial ischemic preconditioning. Basic Research in Cardiology 113:11
<https://doi.org/10.1007/s00395-018-0667-0>

Impact factor: 5,723