

Aus der
Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

**Die Rolle von neutrophilem und thrombozytärem
ADAM10 und ADAM17 auf die Aktivierung,
Rekrutierung und Migration von Neutrophilen und
Thrombozyten-Neutrophilen-Komplexen im Rahmen
der akuten pulmonalen Inflammation.**

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

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

vorgelegt von

Fuhr, Anika Silvia

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professorin Dr. F. Konrad

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Köppen

3. Berichterstatter: Professorin Dr. T. Proikas-Cezanne

4. Berichterstatter: Professor Dr. M. Schick

Tag der Disputation: 27.07.2026

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Akute Lungenschädigung und ARDS	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Ätiologie und Epidemiologie	3
1.1.3	Klinik und Therapie	3
1.1.4	Grundlagenforschung zum ARDS mit Tiermodellen	4
1.2	Pathophysiologie der akuten pulmonalen Inflammation	6
1.2.1	Vermittlung der Immunreaktion	6
1.2.2	Chemotaxis	7
1.2.3	Migration der Leukozyten	7
1.2.4	Die Rolle der Thrombozyten in der Leukozytenmigration	9
1.3	A Disintegrin And Metalloproteinasen	11
1.3.1	Struktur und Funktion von ADAM-Proteasen	11
1.3.2	ADAM17	13
1.3.3	ADAM10	14
1.4	Substrate von ADAM10 und ADAM17 und ihre Bedeutung in der Inflammation	15
1.4.1	TNF α und TNFR	15
1.4.2	CD62L	16
1.4.3	CD44	17
1.4.4	JAM-A	17
1.4.5	CD40L	18
1.4.6	GPV	18
1.4.7	VE-Cadherin	18
1.5	ADAM-Proteasen als Therapieansatz gegen Inflammation	19
1.6	Fragestellung	20
2	Materialliste	22
2.1	Antikörper	22
2.1.1	FACS-Antikörper	22
2.1.2	Histologie-Antikörper	23
2.2	Chemikalien und Reagenzien	24
2.3	Enzyme	27
2.4	Geräte	27
2.5	Inhibitoren	29
2.6	Lösungen und Puffer	29
2.6.1	ELISA PBS	29
2.6.2	ELISA Stopp Lösung	29
2.6.3	Erythrozyten Lysepuffer	30

Inhaltsverzeichnis

2.6.4	ACD-Puffer	30
2.7	Medikamente	30
2.8	RT-qPCR Primer	31
2.9	Software	31
2.10	Verbrauchsmaterialien	32
3	Methoden	36
3.1	Tiere	36
3.2	Genotypisierung	37
3.3	LPS-induziertes pulmonales Inflammationsmodell	38
3.4	<i>In vivo</i> Migrationsversuch	38
3.5	Verarbeitung der Proben	41
3.6	Inflammationsmodell der Ventilator-induzierten Lungenschädigung	42
3.7	Durchflusszytometrie	43
3.7.1	Prinzip	43
3.7.2	Kompensation	44
3.7.3	Probenvorbereitung	45
3.7.3.1	Färbung für die Migrationsanalyse	45
3.7.3.2	Färbung zur Quantifizierung der Adhäsionsmoleküle	46
3.7.4	Messung	48
3.7.5	Auswertung	48
3.8	Proteinanalysen	49
3.8.1	MPO	49
3.8.2	BCA	51
3.8.3	ELISA	51
3.8.3.1	Prinzip	51
3.8.3.2	Durchführung	52
3.8.3.3	Messung und Auswertung	53
3.8.4	Immunhistochemie	53
3.8.4.1	Probengewinnung	53
3.8.4.2	Histologische Aufarbeitung	54
3.8.4.3	Immunhistochemische Färbung der Neutrophilen und PNCs	54
3.8.5	Immunfluoreszenz	56
3.9	Genexpression	57
3.9.1	RNA-Extraktion	57
3.9.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	58
3.9.3	Umschrieb der RNA in cDNA	58
3.9.4	Polymerase Kettenreaktion	59
3.9.4.1	Prinzip	59
3.9.4.2	Durchführung	60
3.9.4.3	Messung und Auswertung	61
3.10	<i>In vitro</i> Inflammationsmodell	61
3.10.1	Adhäsionsassay	61
3.10.2	Transmigrationsassay	63
3.10.3	siRNA Transfektion	65
3.11	Statistik	66

4	Ergebnisse	67
4.1	Migration von Neutrophilen und PNCs mit systemischer Inhibition von ADAM10 und ADAM17	67
4.2	Adhäsion humaner Neutrophiler <i>in vitro</i>	69
4.3	Migration und Aktivierung von Neutrophilen im <i>in vitro</i> Transwell-Migrationsassay	69
4.4	Visualisierung des Aufbaus des <i>in vitro</i> Transwell-Migrationsassays	72
4.5	Nachweis des Knockouts von ADAM10 und ADAM17 in den konditionalen Knockout-Mauslinien	72
4.6	<i>In vivo</i> Neutrophilen-Migration in den Knockout-Mauslinien	76
4.7	<i>In vivo</i> PNC-Migration in den konditionalen Knockout-Mauslinien	78
4.8	Aktivierung von Neutrophilen und Thrombozyten und Zytokinfreisetzung	80
4.9	Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen	83
4.10	Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen in murinem Lungengewebe	85
4.11	Oberflächenexpression von CD44 und CD62P auf Thrombozyten und PNCs	86
4.12	Expression von CD40L und GPV in murinen Lungenschnitten	90
4.13	Mikrovaskuläre Permeabilität und endotheliale Adhäsionsmoleküle	92
4.14	TNF-Signalweg als potenzieller Schlüsselspieler der Wirkung von ADAM10 und ADAM17	96
4.15	Untersuchung der TNF α -Signalwege über TNFR1 und TNFR2	98
4.16	Neutrophilen-Migration im murinen Modell der Ventilator-induzierten Lungenschädigung	100
4.17	Zusammenfassung der Ergebnisse	103
5	Diskussion	105
5.1	Diskussion der Ergebnisse mit bestehender Literatur	105
5.1.1	Einfluss der systemischen Inhibition von ADAM10 oder ADAM17 auf die Adhäsion und Migration von Neutrophilen und PNCs	105
5.1.2	Nachweis der konditionalen Knockouts von ADAM10 oder ADAM17 auf Neutrophilen oder Thrombozyten	108
5.1.3	Migration von Neutrophilen und PNCs nach konditionalen Knockouts von ADAM10 oder ADAM17	109
5.1.4	Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen und Thrombozyten	112
5.1.5	Adhäsionsmolekülexpression auf Neutrophilen, Thrombozyten und PNCs	114
5.1.6	Mikrovaskuläre Permeabilität und Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen	119
5.1.7	TNF-Signalweg als zentraler Regulator der Wirkung von ADAM10 und ADAM17	121
5.1.8	Ventilations-induzierte akute Lungenschädigung als Ausblick auf klinisch relevante Folgeprojekte	123
5.2	Methodische Überlegungen und Limitationen	124
5.3	Einfluss auf das Verständnis der Krankheitsmechanismen	125
5.4	Ausblick und zukünftige Forschungsrichtungen	125
5.5	Schlussfolgerung aus der Arbeit	126

Inhaltsverzeichnis

6	Zusammenfassung	128
7	Literatur	130
8	Eigenanteil	154
9	Danksagung	155

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der transendothelialen Migration von Neutrophilen.	8
1.2	Schematische Darstellung der Bindungen von Thrombozyten mit Neutrophilen und Endothelzellen.	10
1.3	Schematische Darstellung der allgemeinen und der ADAM10/17-spezifischen Struktur der ADAMs.	12
3.1	Prinzip des Cre/loxP-Rekombinationssystems.	37
3.2	Versuchsaufbau für die LPS-Inhalation.	39
3.3	Prinzip der Durchflusszytometrie.	44
3.4	Absorptions- und Emissionsspektren der FACS-Fluorochrome.	45
3.5	Gatingstrategie für Neutrophile, Thrombozyten und PNCs.	50
3.6	Prinzip des Sandwich-ELISA.	52
3.7	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion.	60
3.8	Versuchsaufbau des <i>in vitro</i> Transmigrationsassays.	63
3.9	Prinzip der siRNA-Transfektion.	65
4.1	<i>In vivo</i> Migration von Neutrophilen und PNCs nach systemischer Inhibition von ADAM10 und ADAM17.	68
4.2	Einfluss der ADAM-Inhibition auf die Adhäsion von Neutrophilen und PNCs <i>in vitro</i>	70
4.3	<i>In vitro</i> Migration von Neutrophilen und PNCs mit Quantifizierung von CD62L und JAM-A.	71
4.4	Immunfluoreszenzaufnahmen der Zellen am Transwellinsert mit Färbung von CD62L und JAM-A.	73
4.5	Nachweis der konditionalen Knockouts von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen oder Thrombozyten.	75
4.6	<i>In vivo</i> Neutrophilen-Migration im murinen Modell der akuten pulmonalen Inflammation.	77
4.7	Migration der PNCs <i>in vivo</i> in der akuten pulmonalen Inflammation.	79
4.8	Einfluss der konditionalen Knockouts auf die Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen, Thrombozyten und PNCs.	82
4.9	Oberflächenexpression diverser Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen nach Inflammation.	84
4.10	Immunfluoreszenzfärbung von CD62L und JAM-A auf Neutrophilen in murinen Lungenschnitten.	87
4.11	Oberflächenexpression von CD44 und CD62P auf Thrombozyten und PNCs.	88
4.12	Immunfluoreszenzaufnahmen von CD40L und GPV auf PNCs in murinen Lungenschnitten.	91

Abbildungsverzeichnis

4.13 Mikrovaskuläre Permeabilität und endotheliale Adhäsionsmoleküle.	93
4.14 Immunfluoreszenzfärbung von JAM-A und VE-Cadherin auf Endothelzellen.	95
4.15 Voruntersuchung und schematische Darstellung der TNFR-Signalwege. . .	97
4.16 Genexpression verschiedener Signalproteine der TNFR1- und TNFR2-Signalwege.	99
4.17 Neutrophilen-Akkumulation in murinen Lungenschnitten nach Ventilator-induzierter Lungenschädigung.	102

Tabellenverzeichnis

1.1	Globale Definition für das ARDS	2
1.2	Übersicht inflammatorischer Substrate von ADAM10 und ADAM17	14
3.1	Länge der DNA für Wildtyp (WT) und Mutant der genetischen Targets für die konditionalen Knockouts.	38
3.2	Narkoselösung	40
3.3	Enzymlösung	41
3.4	Lysepuffer	42
3.5	Färbepuffer	42
3.6	Antikörpermix für den Migrationsversuch	46
3.7	Antikörpermix für den Migrationsversuch in Catchup-Tieren	46
3.8	Antikörpermix 1 und 2 für Neutrophile der WT- und PF4-Tiere.	47
3.9	Antikörpermix 1 und 2 für Neutrophile der Catchup-Tiere.	47
3.10	Antikörpermix 3 für Thrombozyten.	47
3.11	Antikörpermix 4 und 5 für Endothelzellen.	48
3.12	Ethanolreihe	55
3.13	Färbepanels für die Immunfluoreszenzaufnahmen muriner Lungenschnitte und des <i>in vitro</i> Transwell-Migrationsassays.	56
3.14	Primertemperaturen	61
3.15	Antikörpermix für Neutrophile des <i>in vitro</i> Transwell-Migrationsassays	64
5.1	Literaturbasierte Wirkung von Gen-Silencing und ADAM-Inhibition auf das TNF-Signalling.	122
5.2	Gemessene Effekte des Gen-Silencing und der ADAM-Inhibitionen und daraus geschlossene Wirkung auf die TNFR-Signalwege.	123

Abkürzungen

ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)	51
ACD	Acid-Citrate-Dextrose	64
ADAM	a disintegrin and metalloproteinase	11
ALI	akute Lungenschädigung (<i>Engl.</i> : acute lung injury)	1
ANOVA	unifaktorielle Varianzanalyse (<i>Engl.</i> : analysis of variance)	66
APC	Allophycocyanin	39
ARDS	akutes Lungenversagen (<i>Engl.</i> : acute respiratory distress syndrome)	1
BAL	bronchoalveoläre Lavage	7
BCA	Bicinchoninsäure (<i>Engl.</i> : bicinchoninic acid)	51
BSA	bovines Serumalbumin	52
CCL	C-C Motif Chemokin Ligand	10
CD	cluster of differentiation	8
cDNA	komplementäre DNA (<i>Engl.</i> : complementary DNA)	57
CLEC-2	C-type lectin-like receptor 2	112
CREB	cAMP response element-binding protein	16
CXCL	C-X-C Motif Chemokin Ligand	7
DAB	3,3'-Diaminobenzidin	55
DAMP	Schaden-assoziierte molekulare Muster (<i>Engl.</i> : damage-associated molecular pattern)	6
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	57
dest.	destilliert	51
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Engl.</i> : desoxyrybonucleic acid)	36
dNTP	desoxyNukleotidtriphosphat	37
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (<i>Engl.</i> : epidermal growth factor)	11
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	39
ESL-1	E-Selektin Ligand-1	8

FACS fluorescence activated cell scanning	43
FCS fetales Kälberserum (<i>Engl.</i> : fetal calf serum)	62
fMLP Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin	64
FP Färbepuffer	41
FSC Vorwärtsstreulicht (<i>Engl.</i> : forward scatter channel)	43
GP Glykoprotein	10
HBSS hanks' balanced salt solution	62
HEK293 human embryonic kidney 293	108
HMEC-1 human microvascular endothelial cells-1	61
HMGB-1 high mobility group box-1	11
HMVEC-L human lung microvascular endothelial cells	108
HRP Meerrettichperoxidase (<i>Engl.</i> : horseradish peroxidase)	52
Hsp70 heat shock protein 70	124
i.v. intravenös	39
ICAM interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (<i>Engl.</i> : intercellular adhesion molecule)	9
IFNγ Interferon-gamma	116
IKK I κ B Kinase	98
IL Interleukin	7
JAM junction adhesion molecule	9
KC keratinocyte-derived chemokine	7
LFA-1 lymphocyte function-associated antigen-1	9
LPS Lipopolysaccharide	5
Ly6 lymphocyte antigen 6 complex locus	36
MAC-1 macrophage-1 antigen	9
MAPK mitogen-activated protein kinase	114
MFI mittlere Fluoreszenzintensität	39
MIP-2 macrophage inflammatory protein-2	7
MMP Matrixmetalloproteinase	18
MPO Myeloperoxidase	49
NET neutrophil extracellular trap	81
NFW Nuklease-freies Wasser	37

NFκB	nuclear factor "kappa-light chain-enhancer" of activated B-cells	15
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>Engl.</i> : pattern-associated molecular pattern)	6
PBS	Phosphat-gepufferte Saline (<i>Engl.</i> : phosphate-buffered saline)	40
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Engl.</i> : polymerase chain reaction)	37
PEEP	positiv-endexpiratorischer Druck (<i>Engl.</i> : positive endexpiratory pressure)	4
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein	44
PF4	Plättchenfaktor 4	36
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen	98
PKC	Proteinkinase C	109
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat	106
PNC	Thrombozyten-Neutrophilen-Komplex (<i>Engl.</i> : platelet-neutrophil-complex)	10
PRR	Pattern-Recognition-Rezeptor	6
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1	8
RANTES	regulated and normal t-cell expressed and secreted	11
RIP1	receptor-interacting protein-1	15
RISC	RNA-induced silencing complex	65
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Engl.</i> : ribonucleic acid)	57
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (<i>Engl.</i> : reactive oxygen species)	10
ROUT	robust regression and outlier removal	66
RPMI	Roswell Park Memorial Institute	62
RT-qPCR	quantitative Echtzeit-PCR (<i>Engl.</i> : real time quantitative PCR)	57
S1PR3	Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1	123
SD	Standardabweichung (<i>Engl.</i> : standard deviation)	66
siRNA	small interfering RNA	65
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>Engl.</i> : side scatter channel)	43
TACE	Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme	13
TAK 1	Transforming growth factor beta-activated kinase 1	98
THP-1	Tohoku Hospital Pediatrics-1	106
TLR	Toll-like Rezeptor	124
TNF	Tumornekrosefaktor	7

TNFR Tumornekrosefaktor-Rezeptor	15
TRADD TNFR1-associated death domain protein	15
TRAF TNFR-assoziierter Faktor	15
VCAM vascular cell adhesion molecule	9
VE-Cadherin vascular endothelial-cadherin	9
VILI Ventilator-induzierte Lungenschädigung (<i>Engl.:</i> ventilator-induced lung injury) .	101
VLA-4 very late antigen-4	9
vWF von-Willebrand-Faktor	11
WT Wildtyp	36

1 Einleitung

1.1 Akute Lungenschädigung und ARDS

1.1.1 Definition

Das akute Lungenversagen (ARDS) wurde 1967 in einem Fall-bezogenen Bericht erstmals von Ashbaugh *et al.* beschrieben und als Syndrom mit akut einsetzender Tachykardie, Hypoxämie und Verschlechterung der Lungencompliance durch verschiedene Ursachen definiert (Ashbaugh *et al.*, 1967). Seither wurde die klinische Definition des ARDS immer wieder überarbeitet. Zunächst 1988 von John Murray und anschließend 1992 durch die *American-European Consensus Conference*, die vor allem den Horowitz-Index, das Verhältnis von arteriellem Sauerstoffpartialdruck zur Fraktion des eingeatmeten Sauerstoffs ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) ≤ 200 mmHg und das Auftreten bilateraler Infiltrate mit fehlendem Hinweis auf linksarterielle Hypertonie hinzufügten (Murray *et al.*, 1988; Bernard *et al.*, 1994). Zusätzlich wurde eine neue Klassifikation, die akute Lungenschädigung (ALI) eingeführt, welche sich vom ARDS durch einen weniger stringenten $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Wert von ≤ 300 mmHg unterschied.

Diese Kriterien wurden 2012 durch die *ARDS Definition Task Force* in der sogenannten Berlin-Definition aktualisiert (Ranieri *et al.*, 2012). Demnach liegt ein ARDS vor, wenn akute Symptome innerhalb einer Woche mit diffusen bilateralen Infiltraten im Röntgen-Thorax auftreten, die nicht durch Ergüsse, Raumforderungen oder Atelektasen erklärt werden können. Eine kardiale Ätiologie des pulmonalen Ödems muss zudem echokardiographisch ausgeschlossen werden und eine therapierefraktäre Hypoxämie vorliegen. Die Hypoxämie bestimmt in der Berlin-Definition den Grad der akuten Lungenschädigung. Lungengesunde erreichen einen Wert von 350-450 mmHg, bei einem Horowitz-Index von 201-300 mmHg spricht man von einem milden ARDS, 101-200 mmHg beschreiben ein moderates ARDS und bei Werten unter 100 mmHg liegt ein schweres ARDS vor.

Seit Veröffentlichung der Berlin-Definition haben Studien gezeigt, dass weitere Aspekte in der Diagnose mitberücksichtigt werden sollten (Grasselli *et al.*, 2023). Grund hierfür war

1 Einleitung

hauptsächlich die Tatsache, dass einige Diagnosekriterien, wie Röntgenaufnahmen, arterielle Blutgasmessung und mechanische Beatmung in ressourcenbeschränkter Umgebung nicht verfügbar waren (Ferguson *et al.*, 2012; Matthay *et al.*, 2021; Ware, 2022). Aufgrund dessen wurde 2021 eine *Global Consensus Conference* abgehalten, die zu einer neuen, globalen Definition des ARDS führte (Matthay *et al.*, 2024). In dieser wurde das zeitliche Kriterium für indolentere Verläufe (z.B. COVID-19) erweitert, Ultraschall als Alternative für Röntgenaufnahmen aufgenommen, die arteriellen Blutgasmessung durch die pulsoximetrische Messung erweitert, und eine neue Kategorie für nicht-intubierte Patienten, sowie eine modifizierte Definition für ressourcenlimitierte Umgebungen eingeführt (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Globale Definition für das ARDS

Allgemeine Kriterien des ARDS	
Risikofaktoren und Herkunft des Ödems	Ausgelöst durch akuten prädisponierenden Risikofaktor Lungenödem ist nicht ausschließlich oder primär auf kardiogenes Ödem zurückzuführen Hypoxämie ist nicht primär auf Atelektasen zurückzuführen
Zeit	Akutes Auftreten Verschlimmerung einer hypoxämischen Insuffizienz innerhalb einer Woche nach Auftreten des prädisponierenden Risikofaktors
Bildgebung des Brustkorbs	bilaterale Trübungen im Röntgen/Computertomographie beidseitige B-Linien und/oder Konsolidierungen im Ultraschall
Kriterien zur Spezifizierung der ARDS Kategorien	
Nichtintubiertes ARDS	$\text{PaO}_2:\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$ (bei $\text{SpO}_2 \leq 97\%$)
Intubiertes ARDS	mild = $\text{PaO}_2:\text{FiO}_2$ 200-300 mmHg oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$ (bei $\text{SpO}_2 \leq 97\%$) moderat = $\text{PaO}_2:\text{FiO}_2$ 100-200 mmHg oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 235$ (bei $\text{SpO}_2 \leq 97\%$) schwer = $\text{PaO}_2:\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 148$ (bei $\text{SpO}_2 \leq 97\%$)
modifizierte Definition für ressourcenlimitierte Umgebung	$\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$ (bei $\text{SpO}_2 \leq 97\%$)

1.1.2 Ätiologie und Epidemiologie

Das ARDS kann durch eine Vielzahl verschiedener Ursachen ausgelöst werden und in unterschiedlichen Ausprägungen auftreten. Derzeit sind über 60 Ursachen für das Auftreten eines ARDS bekannt und werden in direkte, pulmonale und indirekte, systemische Auslöser unterteilt (Siegel, 2022). Die häufigsten Ursachen sind Pneumonie und nicht-pulmonale Sepsis (Pepe *et al.*, 1982; Bellani *et al.*, 2016). Die Pneumonie kann in ambulant und nosokomial, also nach Hospitalisierung erworben, unterteilt werden. 29% der Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie entwickeln im Verlauf ein ARDS (Ding *et al.*, 2019). Patienten, die nach der Hospitalisierung eine Pneumonie erleiden, bilden in einem Drittel der Fälle ein ARDS aus (Tietjen *et al.*, 1994). Weitere pulmonale Auslöser sind beispielsweise chemische Reizung oder mechanische Schädigung der Lunge. Das systemische inflammatorische Response-Syndrom, sowie Toxine, metabolische Entgleisung und extrapulmonales Organversagen sind einige der systemischen Ursachen für ARDS.

In den USA liegt die Inzidenz des ARDS bei ca. 200.000 Fällen pro Jahr (Rubenfeld *et al.*, 2005). Eine internationale, prospektive, multizentrische Studie aus dem Jahr 2014 zeigte, dass 10% der intensivmedizinisch betreuten Patienten und 23% der beatmungspflichtigen Patienten ein ARDS entwickelten (Bellani *et al.*, 2016). Bei 30% dieser Patienten handelt es sich um ein mildes, bei 47% um ein moderates und bei 23% der Patienten um ein schweres ARDS. Je nach Schweregrad wurde in dieser Studie eine Letalität der hospitalisierten Patienten von 35% (mildes ARDS), 40% (moderates ARDS) oder 46% (schweres ARDS) festgestellt. Die Lebensqualität der Überlebenden ist häufig eingeschränkt. Ein Jahr nach der Erkrankung mit ARDS zeigen 80% der Patienten eine eingeschränkte pulmonale Diffusionskapazität und nach fünf Jahren klagen 86% der Überlebenden über eine verminderte körperliche Leistungsfähigkeit (Orme *et al.*, 2003; Pfoh *et al.*, 2016). Dies unterstreicht, wie stark ein ARDS Patienten langfristig einschränkt und wie groß seine sozioökonomische Bedeutung weiterhin ist.

1.1.3 Klinik und Therapie

Klinisch präsentiert sich der Verlauf des ARDS mit den Symptomen einer Gasaustauschstörung, also einer rasch progredienten Dyspnoe mit Zyanose und Tachypnoe häufig bereits wenige Stunden nach Auslösen der Inflammation (Saguil und Fargo, 2020). Durch kompensatorische Hyperventilation kommt es zu einer respiratorischen Alkalose in der Blutgasanalyse und führt zu einer respiratorischen Insuffizienz mit sichtbaren Infiltraten im

1 Einleitung

Röntgen-Thorax (Mortelliti und Manning, 2002). Dies entwickelt sich weiter zu einer respiratorischen Globalinsuffizienz, welche mit einer arteriellen Hypoxämie und Hyperkapnie einhergeht (Nin *et al.*, 2017).

Über 55 Jahre nach Erstbeschreibung des ARDS und trotz jahrzehntelanger, intensiver Forschung beschränkt sich die Therapie bisher lediglich auf präventive und supportive Maßnahmen in der intensivmedizinischen Behandlung. Dabei spielt die lungenprotektive Beatmung mit niedrigen Atemzugvolumina von < 6 ml/kg Körpergewicht und einem positiv-endexpiratorischen Druck (PEEP) von ≥ 5 cmH₂O eine wichtige Rolle (Brower *et al.*, 2000). Zudem werden die Patienten zur Verbesserung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses zeitweise in Bauchlage gelagert und eine restriktive Volumentherapie zur Vermeidung eines erhöhten hydrostatischen Drucks angewandt (Wiedemann *et al.*, 2006; Guérin *et al.*, 2013; Grissom *et al.*, 2015). Weitere Strategien sind die Früherkennung von Risikopatienten und verschiedene Ansätze zur medikamentösen Therapie zum Beispiel mit Glukokortikoiden und neuromuskulärer Blockade (Marshall *et al.*, 2004; Papazian *et al.*, 2010; Gajic *et al.*, 2011; Festic *et al.*, 2015). Versagen diese Strategien, ist eine zusätzliche veno-venöse extrakorporale Membranoxygenierung als Rescue-Therapie indiziert (Combes *et al.*, 2018). Die neueste Entwicklung stammt aus einer multizentrischen, randomisierten Studie auf 17 Intensivstationen zwischen 2013 und 2018, in der Villar *et al.* nachwiesen, dass die frühe Verabreichung von Dexamethason zu einer Verkürzung der Dauer der mechanischen Beatmung, sowie der Mortalität in Patienten mit moderatem bis schwerem ARDS führt (Villar *et al.*, 2020).

1.1.4 Grundlagenforschung zum ARDS mit Tiermodellen

Die Forschung zum ARDS im Menschen gestaltet sich sehr schwierig. Einerseits ist die Gewinnung von Proben schwerkranker Patienten durch die häufig nicht vorhandene Fähigkeit zur Einwilligung langwierig. Andererseits sind die Testung und der Vergleich der Hypothesen aufgrund diverser klinischer Variablen schwer zu kontrollieren. Daher sind Tiermodelle als Brücke zwischen zellulären Systemen und Patienten Hauptwerkzeug für die Grundlagenforschung zum ARDS. In diesen können Hypothesen, welche in humanen Studien aufgestellt wurden, unter standardisierten Bedingungen getestet werden. Zusätzlich können aber auch Ergebnisse aus *in vitro* Modellen im lebenden Organismus validiert werden.

Was Tiermodelle des akuten Lungenschadens leisten sollten, ist die Reproduktion der physiologischen und pathologischen Veränderungen, die infolge der Schädigung im Menschen

1 Einleitung

auftreten. Dies bedeutet vor allem, dass die beiden Hauptmerkmale – die erhöhte endotheliale und epitheliale Permeabilität, sowie die überschießende Migration der Neutrophilen – möglichst genau nachgestellt werden sollten. Es gibt verschiedene Tiermodelle, die aktuell für die Forschung am ARDS genutzt werden. Keines davon ist in der Lage alle Charakteristika der Krankheit im Menschen nachzubilden und die meisten sind auf ein Merkmal beschränkt. Deshalb ist die Wahl des Tiermodells zu der entsprechenden Hypothese, die untersucht werden soll, ausschlaggebend.

Als Versuchstier wurde die Maus gewählt, da diese ein weit verbreitetes Modell für menschliche Krankheiten ist. Mäuse sind in kurzer Zeit in großer Anzahl verfügbar und die Generation genetisch modifizierter Mäuse ist weit verbreitet und meist einfach selbst zu züchten (Elias *et al.*, 2003; Ikegami *et al.*, 2007). Die häufigsten Modelle zur Forschung am ARDS sind mechanische Ventilation, Lipopolysaccharide (LPS), lebende Bakterien und Hyperoxie (Matute-Bello *et al.*, 2008). Allerdings wird die Relevanz der Hyperoxie als Lungenschädigungsmodell für humanes ARDS kontrovers diskutiert, da die Verabreichung von 100% Sauerstoff zwar in vielen Säugetieren zum Tod führt, nicht jedoch im Menschen (Frank *et al.*, 1978). Lebende Bakterien zur Induktion der Inflammation sind ein klinisch relevantes Modell und man kann bei einer Verabreichung über Aerosole ohne Anästhesie bei mehreren Tieren gleichzeitig eine Inflammation auslösen (Richardson *et al.*, 1979). Allerdings ist die Kultur der Bakterien zeit- und kostenaufwendig und muss in einer speziellen Einrichtung unter erhöhten Sicherheitsvorkehrungen für den Experimentator ablaufen. Die mechanische Ventilation ist ein klinisch sehr relevantes Modell und reproduziert vor allem die Migration von Neutrophilen, sowie die verringerte Compliance und Veränderung des Gasaustausches (Kawano *et al.*, 1987; Frank *et al.*, 2002). Allerdings hat dieses Modell auch einige Nachteile: es gibt viele technische Störfaktoren, die Tiere müssen während der Ventilation narkotisiert werden, es können nur wenige Tiere gleichzeitig an die Beatmung angeschlossen werden und die Tiere können nur für einen sehr geringen Zeitraum ventiliert werden (Dhanireddy *et al.*, 2006; Matute-Bello *et al.*, 2008). Für dieses Projekt wurde das Modell der intratrachealen LPS-vermittelten Lungenschädigung genutzt. Dies verursacht zwar keine so schweren endothelialen und epithelialen Schädigungen, wie im Menschen, bildet jedoch vor allem die Migration von Neutrophilen in den Alveolarraum nach, der hier im Fokus stand (Wiener-Kronish *et al.*, 1991). Außerdem ist die Verabreichung von vernebeltem LPS relativ einfach, gut reproduzierbar zwischen den Experimenten und hat eine nur sehr geringe direkte Toxizität auf Zellen (Matute-Bello *et al.*, 2008).

1.2 Pathophysiologie der akuten pulmonalen Inflammation

1.2.1 Vermittlung der Immunreaktion

Pathophysiologisch lässt sich der Verlauf der Schädigung des Lungengewebes im Rahmen eines ARDS in drei aufeinanderfolgende Phasen unterteilen (Thille *et al.*, 2013). Den Beginn bildet die exsudative Phase mit diffusen Schädigungen der alveolokapillären Barriere und Bildung eines proteinreichen, interstitiellen Lungenödems (Matthay *et al.*, 2019). Die Schädigung der Lunge startet durch die Aktivierung von Alveolarmakrophagen über die Bindung von Bestandteilen pathogener Mikroorganismen, den sogenannten Pathogen-assoziierten molekularen Mustern (PAMP), oder Produkten, die durch die Schädigung endogener Zellen entstehen, den Schaden-assoziierten molekularen Mustern (DAMP), an die Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRR) der Makrophagen (Taylor *et al.*, 2005). Die aktivierten Makrophagen setzen Zytokine und Chemokine frei, die zirkulierende Neutrophile aktivieren und rekrutieren (Swenson und Swenson, 2021). Neben ihrer Funktion Pathogene abzutöten, schädigen die Neutrophilen jedoch die endothelial-epitheliale Barriere durch die inflammatorischen Moleküle, die sie dabei ausschütten, und fördern damit die Bildung des Lungenödems (Wiener-Kronish *et al.*, 1991). Das Ausmaß des Lungenödems ist Hauptfaktor für die Schwere der Lungenschädigung, das Kollabieren der Alven und die Derekrutierung von Immunzellen (Ware und Matthay, 2001).

Anschließend folgt die proliferative Phase, in der sich zusätzlich ein alveoläres Lungenödem, sowie hyaline Membranen durch Typ-II-Pneumozyten und Atelektasen bilden (Sharp *et al.*, 2015; Matthay *et al.*, 2019). In dieser Phase steht im Vordergrund, Pathogene und beschädigte Zellen aus dem Alveolarraum abzutransportieren, wozu auch die Apoptose und der Abtransport der Neutrophilen gehört. Die Immunantwort ändert sich von der Beseitigung des Erregers hin zu Reparatur und Wiederaufbau der normalen Funktion, wozu das Wachstum von Fibroblasten und der Aufbau interstitieller Matrix und des Alveolarepithels gehören (Swenson und Swenson, 2021). Dies führt zur Bildung der hyalinen Membranen.

Wird die proliferative Phase beeinträchtigt oder verlängert, nimmt die Proliferation der Fibroblasten Überhand und es tritt die dritte, fibroproliferative Phase im Spätstadium der ARDS-Erkrankung ein (Pugin *et al.*, 1999). In ihr kommt es zu einer vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix, was in einem irreversiblen, fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms endet (Sharp *et al.*, 2015).

1.2.2 Chemotaxis

Das Anlocken von Immunzellen an den Ort des Infektionsherds wird als Chemotaxis bezeichnet (Bhatia *et al.*, 2012). Diese ist ein zentraler Prozess in der Entwicklung der ARDS (Steinberg *et al.*, 1994). Dabei gibt es verschiedene Substanzgruppen, die zu den chemotaktischen Botenstoffen gehören, wie beispielsweise Komponenten des Komplementsystems, Zytokine oder auch Bestandteile bakterieller Zellmembranen. Im Rahmen der pulmonalen Inflammation sind vor allem die proinflammatorischen Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF) α und Interleukin (IL)-6 an der Chemotaxis beteiligt (Beck-Schimmer *et al.*, 2005). Beide Zytokine werden unter anderem von Makrophagen, Monozyten und aktivierten B- und T-Lymphozyten ausgeschüttet (Horiuchi *et al.*, 2010; Choy und Rose-John, 2017). Eine Untergruppe der Zytokine, die in der pulmonalen Inflammation im Zusammenhang mit Chemotaxis ebenfalls eine wichtige Rolle spielt, ist die der Chemokine. Das wichtigste humane Chemokin für die Migration der Neutrophilen ist der C-X-C Motif Chemokin Ligand (CXCL)8, auch IL-8 genannt, dessen murine Homologe CXCL1 (auch keratinocyte-derived chemokine (KC) genannt) und CXCL2/3 (auch macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) genannt) sind (Zemans und Matthay, 2017). IL-8, wie auch seine murinen Homologe, werden neben Makrophagen auch von inflammatorisch aktivierten Epithelzellen und Endothelzellen sezerniert (Eckmann *et al.*, 1993; Utgaard *et al.*, 1998). Im Rahmen eines ARDS kommt es zu einer Dysregulation der Zytokinausschüttung, dem sogenannten Zytokinsturm, dessen Ausprägung entscheidend für die Schwere des ARDS ist, da erhöhte Zytokinlevel in bronchoalveolärer Lavage (BAL) und Plasma mit einer ungünstigeren Prognose in ARDS-Patienten korrelieren (Meduri *et al.*, 1995b, 1995a; Ye *et al.*, 2020).

1.2.3 Migration der Leukozyten

Durch die Chemotaxis werden Leukozyten aus der Zirkulation zum Infektionsherd rekrutiert. Dabei durchwandern sie im Rahmen der pulmonalen Inflammation zunächst die Gefäßwand der Kapillaren, anschließend das Lungeninterstitium und das Lungenepithel, bis sie im Alveolarraum ankommen (Downey *et al.*, 1993; Reutershan *et al.*, 2005; Zemans und Matthay, 2017). Die transendotheliale Migration ist ein komplexer Prozess, welcher wiederum in mehrere aufeinanderfolgenden Schritte unterteilt werden kann (Abbildung 1.1). Der Vorgang beginnt mit der Adhäsion der Leukozyten am Endothel, wird gefolgt vom Rollen und dem anschließenden Arrest und Kriechen der Leukozyten und endet mit der Transmigration durch das Endothel, auch Diapedese genannt (Vestweber, 2015; Petri und Sanz, 2018).

1 Einleitung

Neben der chemotaktischen Aktivierung und Rekrutierung der Leukozyten, finden weitere Prozesse statt, die essenziell für eine erfolgreiche Migration sind. Parallel zur Aktivierung der Immunzellen werden auch Endothelzellen durch Binden von TNF α und IL-6 inflammatorisch aktiviert (Vassallo *et al.*, 2019). Dies führt zu einem Integritätsverlust der Barriere, wodurch die Bildung pulmonaler Ödeme und die Leukozytenmigration erleichtert werden (Broermann *et al.*, 2011; Vassallo *et al.*, 2019). Zusätzlich kommt es im Rahmen einer Inflammation zur Vasodilatation der Gefäße, was die Abnahme der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes bedingt und dadurch die Interaktion und Adhäsion der Leukozyten mit und am Endothel vereinfacht (Gabay und Kushner, 1999; Sherwood und Toliver-Kinsky, 2004).

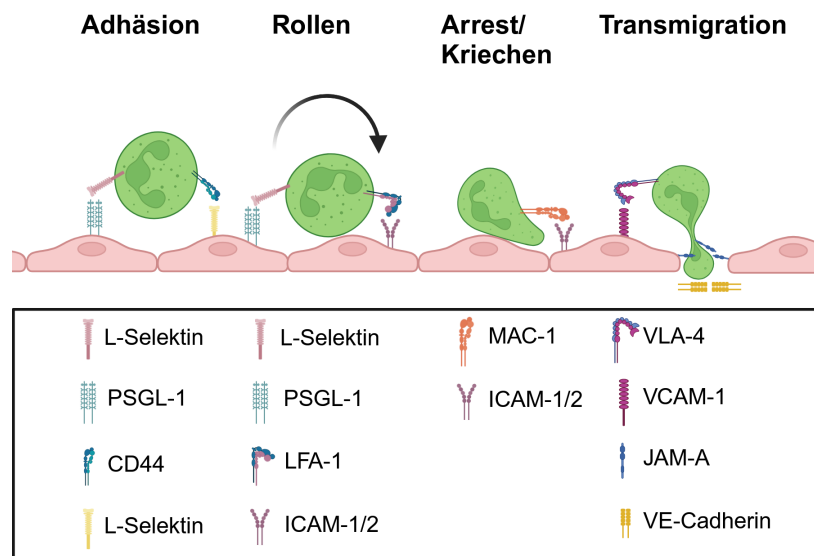


Abbildung 1.1: **Schematische Darstellung der transendothelialen Migration von Neutrophilen.** Vereinfachte Darstellung der einzelnen Schritte der transendothelialen Migration. Zuerst erfolgt die Selektin-vermittelte Adhäsion durch L-Selektin, P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), cluster of differentiation (CD)44 und E-Selektin. Anschließend das Rollen ebenfalls über L-Selektin und PSGL-1 zusammen mit dem Integrin lymphocyte fuction-associated antigen-1 (LFA1) und Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (ICAM)-1/2. Darauf folgt der feste Arrest und das Kriechen der Neutrophilen durch macrophage-1 antigen (MAC-1) und interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (ICAM)-1/2. Der letzte Schritt ist die eigentliche Transmigration, auch Diapedese genannt, vermittelt durch very late antigen-4 (VLA4), vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, junction adhesion molecule (JAM)-A und vascular endothelial (VE)-Cadherin. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com. <https://BioRender.com/k35r879>.

Diese verringerte Strömungsgeschwindigkeit erleichtert die Selektin-vermittelte Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothelzellen. Selektine sind Glykoproteine, die zu den Zelladhäsionsmolekülen zählen und auf Endothelzellen (cluster of differentiation (CD)62E), Leukozyten (CD62L) und Thrombozyten (CD62P) exprimiert werden (McEver, 2015). Die wichtigsten Bindungspartner der Selektine sind P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1), E-Selektin Ligand-1 (ESL-1) und CD44 (Zarbock *et al.*, 2011). PSGL-1 ist hauptsäch-

1 Einleitung

lich für die initiale Adhäsion verantwortlich, während ESL-1 und CD44 die Geschwindigkeit des Rollens beeinflussen (Hidalgo *et al.*, 2007; Zarbock *et al.*, 2011). Die Bindung von PSGL-1 an CD62L führt zusätzlich zu einer intrazellulären Signalkaskade, durch die das Integrin lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) aktiviert wird (Stadtman *et al.*, 2013). Integrine leiten durch Ausbilden stärkerer Bindungen den nächsten Schritt der transendothelialen Migration, den Arrest, ein. Die Bindung von LFA-1 an seine endothelialen Bindungspartner interzelluläres Zelladhäsionsmolekül (ICAM)-1 und ICAM-2 vermittelt das langsame Rollen und den Arrest der Leukozyten, während macrophage-1 antigen (MAC-1) für das Kriechen verantwortlich ist (Phillipson *et al.*, 2006). Das Kriechen ermöglicht es den Leukozyten an einen Ort zu gelangen, an dem die Diapedese möglich ist, was meistens eine Zell-Zell-Verbindung zwischen Endothelzellen ist (Vestweber, 2015). Der letzte Schritt der transendothelialen Migration ist die Diapedese, welche ebenfalls über Integrine, aber auch andere Adhäsionsmoleküle gesteuert wird. Die Bindung des Integrins very late antigen-4 (VLA-4) an endotheliales vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 führt beispielsweise zur Dissoziation von vascular endothelial-cadherin (VE-Cadherin), was die endotheliale Barriere deutlich schwächt (Nottebaum *et al.*, 2008; Broermann *et al.*, 2011). Proinflammatorische Zytokine regulieren zudem die Expression von junction adhesion molecule (JAM)-A hoch, was wiederum heterophile Bindungen zu Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten oder Thrombozyten eingeht und dadurch die Diapedese erleichtert (Babinska *et al.*, 2002; Weber *et al.*, 2007).

1.2.4 Die Rolle der Thrombozyten in der Leukozytenmigration

Die Immunantwort auf Pathogene und hämostatische Reaktionen teilen gemeinsame Merkmale. Sowohl eine Infektion als auch die Schädigung der vaskulären Barriere führen zur Exposition von DAMPs und PAMPs, was eine Aktivierung von Immunzellen mit Degranulation und Freisetzung von Zytokinen zur Folge hat (Hotchkiss *et al.*, 2016; Silvis *et al.*, 2020). Zusätzlich ist bekannt, dass Neutrophile und Thrombozyten viele gleiche Oberflächenrezeptoren exprimieren (Prince *et al.*, 2011; LP und Schattner, 2017; Burn *et al.*, 2021). Dies lässt vermuten, dass die Interaktion zwischen Neutrophilen und Thrombozyten eine zentrale Rolle sowohl in der Hämostase als auch in der Inflammation spielt.

Zirkulierende Neutrophile suchen im Blut ständig nach aktivierten Thrombozyten, um mit diesen eine Bindung einzugehen und eine Immunantwort auslösen zu können (Sreeramakumar *et al.*, 2014). Für die erste Bindung sind vor allem CD62P und CD40L auf Thrombozyten zuständig, die durch Degranulation nach Aktivierung auf der Oberfläche exprimiert werden und an PSGL-1 und CD40 auf Neutrophilen binden, die dort konstitutiv exprimiert

1 Einleitung

sind (Moore *et al.*, 1995; Lievens *et al.*, 2010; Sreeramkumar *et al.*, 2014). Die Bindung von CD62P an PSGL-1 führt zur Aktivierung der Integrine MAC-1 und LFA-1 auf Neutrophilen (Evangelista *et al.*, 2007). Das aktivierte MAC-1 bindet anschließend an Glykoprotein (GP)Iba und ICAM-2 auf Thrombozyten und stabilisiert damit die Interaktion, wodurch es zur Bildung der festen Thrombozyten-Neutrophilen-Komplex (PNCs) kommt (Santoso *et al.*, 2002; Morgan *et al.*, 2019). (Visuelle Darstellung der Bindungen zwischen Neutrophilen und Thrombozyten siehe Abbildung 1.2).

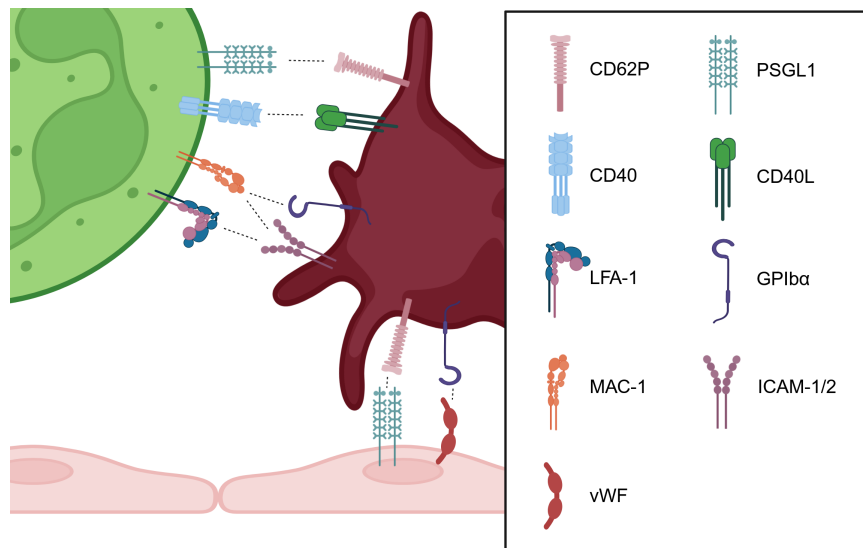


Abbildung 1.2: **Schematische Darstellung der Bindungen von Thrombozyten mit Neutrophilen und Endothelzellen.** Thrombozytäres CD62P und CD40L bindet an PSGL-1 und CD40 auf Neutrophilen. MAC-1 der Neutrophilen ist Bindungspartner von Glykoprotein (GP)Iba und ICAM-1/2 auf Thrombozyten. ICAM-1/2 bindet zusätzlich LFA-1 auf Neutrophilen. Die Bindung von Thrombozyten ans Endothel erfolgt über CD62P und GPIIb/IIIa mit endotheliale PSGL-1 und von-Willebrand-Faktor (vWF). Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com. <https://BioRender.com/v95z972>.

Die Bildung von PNCs spielt eine zentrale Rolle für Aktivierung, Rekrutierung und Transmigration der Neutrophilen ins entzündete Gewebe und wird über mehrere Faktoren reguliert (Page und Pitchford, 2013; Granja *et al.*, 2016). Einerseits haben die direkten Bindungen zwischen Neutrophilen und Thrombozyten einen regulierenden Effekt. Die Bindung von CD62P an PSGL-1 beispielsweise unterstützt die Freisetzung der Neutrophilenelastase und trägt so zur Netose bei (Gardiner *et al.*, 2001). Eine Aktivierung der Thrombozyten und die vermehrte Expression von MAC-1 wird hingegen über die Bindung von CD40 an CD40L vermittelt (Vanichakarn *et al.*, 2008; Rahman *et al.*, 2009). Andererseits können auch von Neutrophilen und Thrombozyten freigesetzte Moleküle den Komplex beeinflussen. So fördert die von Neutrophilen ausgeschüttete Neutrophilenelastase zusammen mit reaktive Sauerstoffspezies (ROS) die Aktivierung der Thrombozyten (Renesto und Chignard, 1993). Das C-C Motif Chemokin Ligand (CCL)5/regulated and normal t-cell expressed and

secreted (RANTES), sezerniert von Thrombozyten, begünstigt die Extravasation der Neutrophilen und ausgeschüttetes high mobility group box-1 (HMGB-1) verstärkt die Neutrophilenrekrutierung (Grommes *et al.*, 2012; Stark *et al.*, 2016). Auch die Phagozytose-Kapazität der PNCs ist gegenüber den Neutrophilen erhöht (Lisman, 2018).

Die Interaktion der PNCs mit dem Endothel ist ebenfalls ein wichtiger Regulator für die Migration und wird über diverse Bindungen gesteuert. So bindet beispielsweise das CD62P an PSGL-1 auf Endothelzellen und thrombozytäres GPIIb/IIIa an endotheliales von-Willebrand-Faktor (vWF) (Abbildung 1.2) (Frenette *et al.*, 1995; Page und Pitchford, 2013).

1.3 A Disintegrin And Metalloproteinasen

Die akute pulmonale Inflammation wird durch diverse endogene Botenstoffe vermittelt und kontrolliert, die im Rahmen der Inflammation proteolytisch gespalten und damit vom Transmembranprotein in die lösliche Form umgewandelt werden. Zu diesen Botenstoffen gehören einige der oben genannten Zytokine, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle (Lambrecht *et al.*, 2018). Für die proteolytische Spaltung dieser Moleküle ist vornehmlich eine Untergruppe der Matrixmetalloproteinasen, die a disintegrin and metalloproteinases (ADAMs), verantwortlich. Die Gruppe der ADAMs besteht aus 34 Mitgliedern, von denen 22 im Menschen vorkommen (Seals und Courtneidge, 2003; Andreini *et al.*, 2005). 13 der im Menschen vorkommenden ADAMs besitzen eine proteolytisch aktive Domäne und teilen einen ähnlichen strukturellen Aufbau (Edwards *et al.*, 2008).

1.3.1 Struktur und Funktion von ADAM-Proteasen

Die ADAMs sind Transmembranproteine, bestehend aus einer NH₂-terminalen Prodomäne anhängend an der Metalloproteinase-Domäne, gefolgt von der Disintegrin-Domäne, der epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-ähnlichen Domäne, einer Cystein-reichen Domäne, einer Transmembrandomäne und zuletzt der zytoplasmatischen Domäne (Abbildung 1.3) (Giebeler und Zigrino, 2016). Es gibt zwei Ausnahmen in der Struktur, ADAM10 und ADAM17, denen die EGF-ähnliche Domäne fehlt und deren membranproximale Domäne daher als *stalk region*, frei übersetzt Stielbereich, bezeichnet wird (Giebeler und Zigrino, 2016; Lambrecht *et al.*, 2018).

An der Prodomäne befindet sich ein Signalpeptid, welches für die Ausübung der Funktion der ADAMs wichtig ist (Zhong und Khalil, 2019). Die Prodomäne selbst dient der korrek-

1 Einleitung

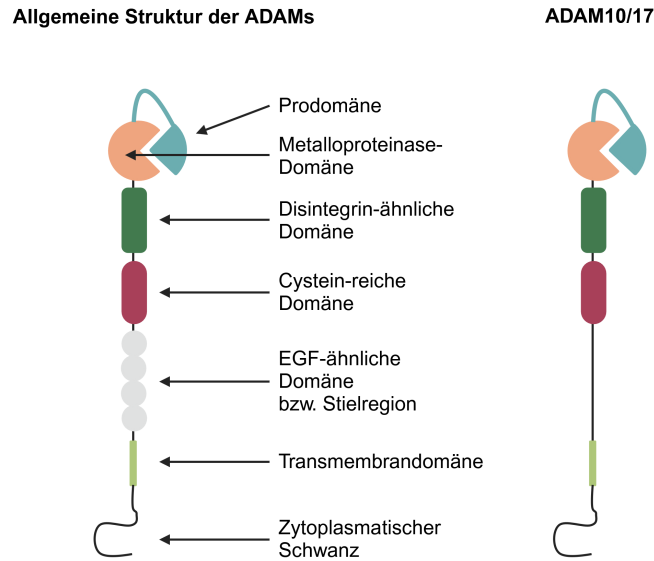


Abbildung 1.3: **Schematische Darstellung der allgemeinen und der ADAM10/17-spezifischen Struktur der ADAMs.** ADAMs bestehen in der folgenden Reihenfolge aus einer Prodomäne, der Metalloproteinase-Domäne, der Disintegrin-ähnlichen Domäne, einer Cystein-reichen Domäne, einer epidermalen Wachstumsfaktor (EGF)-ähnlichen Domäne, der Transmembrandomäne und dem zytoplasmatischen Schwanz. ADAM10 und ADAM17 besitzen statt der EGF-ähnlichen Domäne eine sogenannte Stielregion. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com. <https://BioRender.com/t77n844>.

ten Proteinfaltung, sowie der Stabilisierung der ADAMs und der Aufrechterhaltung der Enzymfunktion (Zhang *et al.*, 2016). Die Metalloproteinase-Domäne übt die Hauptfunktion der ADAMs aus, die proteolytische Spaltung diverser Substrate auf der eigenen Zelloberfläche oder auf eng benachbarten Zellen (Edwards *et al.*, 2008). Die zweitwichtigste funktionale Domäne ist die Disintegrin-Domäne, die auf der Zelloberfläche präsentiert wird und an Integrine bindet (Blobel und White, 1992). Diese Domäne wurde durch ihre starke Ähnlichkeit in der Aminosäureabfolge zu den Disintegrinen, isoliert aus Schlangengift, so genannt. Ihre Bindungssequenz unterscheidet sich jedoch von Disintegrinen und sollte daher richtigerweise Disintegrin-ähnliche Domäne genannt werden (Blobel, 1997). Die Cystein-reiche Domäne unterstützt die zelladhäsive Funktion der ADAMs. ADAM10 und ADAM17 haben, verglichen mit den anderen ADAMs, eine andere Sequenz und Struktur in der EGF-ähnlichen Domäne, was teilweise mit ihrer großen Relevanz in vielen Krankheitsbildern zu tun haben könnte (Takeda *et al.*, 2006). Die EGF-ähnliche Domäne, die Transmembrandomäne und die zytoplasmatische Domäne sind ebenso wichtig für die ADAMs. Sie verbinden die extrazellulären und intrazellulären Komponenten und vermitteln Signale zur Regulation der Proteolyse (Stone *et al.*, 1999).

Die proteolytische Spaltung transmembraner Substrate nahe an der Zelloberfläche durch die ADAMs wird auch als *Ectodomainshedding* bezeichnet und resultiert in der Freisetzung

1 Einleitung

der Ektodomänen der Proteine in löslicher Form (Aljohmani und Yildiz, 2020). Die gelösten Ektodomänen können je nach Substrat sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen erzielen (Dreymueller *et al.*, 2012b, 2015). Die Aktivität der ADAMs und damit der Sheddingprozess wird über verschiedene Regulationsmechanismen streng kontrolliert. Zu diesen Regulationsmechanismen gehören unter anderem das Zurückhalten der ADAM-Proteine im endoplasmatischen Retikulum, Konformationsänderungen an der Zelloberfläche, sowie die Phosphorylierung und Dimerisierung der ADAMs (Marcello *et al.*, 2010; Cissé *et al.*, 2011; Sommer *et al.*, 2016).

1.3.2 ADAM17

ADAM17 war zuerst bekannt unter dem Namen Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE), nachdem 1997 in Studien herausgefunden wurde, dass diese Metalloproteinase TNF α spaltet (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997). Im Menschen ist ADAM17 überlebenswichtig und bisher ist weltweit nur ein Fall einer Funktionsverlustmutation bekannt. Dieser Patient zeigte wiederholt schwere entzündliche Erkrankungen (Barnes, 2003). Auch ADAM17-defiziente Mäuse sind nicht lebensfähig (Chalaris *et al.*, 2010).

Aktuell sind für ADAM17 77 Substrate bekannt, unter denen Wachstumsfaktoren der EGF-Familie, Zytokine, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle sind (Scheller *et al.*, 2011). Die Spaltung der Wachstumsfaktoren führt zur Regulation von Proliferation und Differenzierung und ist unverzichtbar für die Entwicklung, spielt aber auch eine Rolle bei der Tumorentwicklung und Inflammation (Vallath *et al.*, 2014). Zusammen mit der Tatsache, dass alle Zellen in der Lunge ADAM17 exprimieren, deutet es darauf hin, dass ADAM17 in der akuten pulmonalen Inflammation eine zentrale Rolle spielt (Ermert *et al.*, 2003).

Je nachdem auf welcher Zellart die ADAMs exprimiert sind und welche Substrate dort zur Spaltung zur Verfügung stehen, können sie zellspezifische Wirkungen ausüben. Leukozytäres ADAM17 reguliert die Freisetzung von Zytokinen und die Rekrutierung der Immunzellen vornehmlich über die Spaltung von TNF, L-Selektin und IL-6R (Dreymueller *et al.*, 2015). Endotheliales ADAM17 ist zuständig für die vaskuläre Antwort in der akuten pulmonalen Inflammation. Hier spaltet es beispielsweise CX3CL1, VCAM-1, ICAM-1 und JAM-A, was zu einer geringeren Adhäsion der Leukozyten an das Endothel führt, aber auch die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Endothelzellen schwächt und dadurch die Ödembildung fördert und die Migration der Leukozyten erleichtert (Hundhausen *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2010). Thrombozytäres ADAM17 spaltet unter anderem JAM-A und GPV, ist aber noch

nicht vollständig untersucht (Bender *et al.*, 2010). Man geht davon aus, dass es für die Thrombozytenaktivierung, PNC-Bildung und -Migration eine Rolle spielt.

1.3.3 ADAM10

Wie ADAM17 ist auch ADAM10 für Menschen und Mäuse überlebenswichtig. Knockout-Mäuse sterben im frühen embryonalen Stadium (Hartmann *et al.*, 2002). ADAM10 spaltet nach aktuellem Stand fast 100 Substrate und ist damit ebenfalls ein wichtiger Regulator sowohl physiologischer als auch pathophysiologischer Prozesse (Dreymueller *et al.*, 2015). Das wichtigste Substrat von ADAM10 ist Notch, womit in der Entwicklung das sogenannte Zellschicksal kontrolliert wird, was aber auch im erwachsenen Organismus eine Rolle spielt, beispielsweise für regenerative Prozesse (Weber *et al.*, 2011; Saftig und Lichtenthaler, 2015).

Leukozytäres ADAM10 reguliert die chemotaktische Migration von Neutrophilen durch das Endothel durch Modulation der Aktivierung, Aktinpolymerisierung und Adhäsion der Leukozyten. Allerdings ist nicht genau bekannt, welche Substrate hierfür verantwortlich sind (Pruessmeyer *et al.*, 2014). Thrombozytäres ADAM10 spaltet unter anderem CD44, JAM-A, GPV und zu einem sehr geringen Anteil CD40L, womit es die Bildung und Migration von PNCs beeinflusst (Nagano *et al.*, 2004; Gardiner *et al.*, 2007; Yacoub *et al.*, 2013). Endotheliales ADAM10 spaltet CX3CL1, JAM-A, und zusätzlich VE-Cadherin womit es sehr wichtig für die Regulation der mikrovaskulären Permeabilität ist (Hundhausen *et al.*, 2003; Schulz *et al.*, 2008; Koenen *et al.*, 2009).

Die bisher genannten Substrate der beiden ADAMs sind nur einige Beispiele. Eine erweiterte, nicht vollständige Liste bekannter inflammationsmodulatorischer Substrate für ADAM10 und ADAM17 ist in Tabelle 1.2 aufgeführt. Des Weiteren folgt eine ausführliche Einleitung in einige der Substrate, die in der pulmonalen Inflammation von Bedeutung sind und in der vorliegenden Arbeit daher Gegenstand der Untersuchungen waren.

Tabelle 1.2: Übersicht inflammatorischer Substrate von ADAM10 und ADAM17

Protein	Gespalten	
	von ADAM	Funktion
Notch	10, 17	Hämatopoese
TNF α	17, (10)	Löslicher Agonist
TNFR	17	Löslicher TNF α Antagonist, reduzierter TNF Signalweg
IL-6R	10, 17	Löslicher Agonist des Trans-Signalweges

Protein	Gespalten von ADAM	Funktion
L-Selektin	17	Reduzierte Rollgeschwindigkeit und Transmigration der Neutrophilen
CX3CL1	10, 17	Lösliches, chemoattraktives Protein, geringere endotheliale Adhäsion, De-Adhäsion gebundener Leukozyten
JAM-A	10, 17	Löslicher JAM-A und LFA-1 Antagonist, reduzierte Transmigration
VE-Cadherin	10	Erhöhte endotheliale Permeabilität
CD44	10	Reduzierte Transmigration
CD40L	17	Aktivierung der Thrombozytenaggregation
GPI α	17	Thrombozytenhämostase
GPV	17	Thrombozytenhämostase

1.4 Substrate von ADAM10 und ADAM17 und ihre Bedeutung in der Inflammation

1.4.1 TNF α und TNFR

TNF α ist ein Zytokin, welches als Transmembranprotein vor allem von Makrophagen, aber auch von vielen anderen Zellarten, unter anderem von Neutrophilen, gebildet und sezerniert wird (Yang *et al.*, 2013). Das Molekül als Transmembranprotein ist eine Vorläufer-Form und wird von ADAM10 und ADAM17 proteolytisch gespalten (Black *et al.*, 1997). In der löslichen Form ist es biologisch aktiv und die meisten der proinflammatorischen Effekte werden lediglich über das lösliche Protein ausgelöst (Moss *et al.*, 2001). Um den Signalweg zu aktivieren, bindet TNF α an einen seiner beiden Rezeptoren Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)1 oder TNFR2. Während der TNFR1, welcher von allen humanen Zellen exprimiert wird, mit gebundenem und löslichem TNF α interagiert, hat der TNFR2, exprimiert auf Immunzellen, eine deutlich höhere Affinität für membrangebundenes TNF α (Grell *et al.*, 1995; Morita *et al.*, 2001). Die proinflammatorische Aktivität von TNF α wird hauptsächlich über den TNFR1 vermittelt. Durch dessen Aktivierung wird die Bildung eines Signalkomplexes aus TNFR1-associated death domain protein (TRADD), TNFR-assoziiierter Faktor (TRAF)2 und receptor-interacting protein-1 (RIP1) angestoßen, woraus unter anderem die Aktivierung von nuclear factor "kappa-light chain-enhancer" of activated B-cells (NF κ B) und

1 Einleitung

cAMP response element-binding protein (CREB) resultiert. Das funktionelle Ergebnis ist die Induktion der Inflammation, Zellüberleben und -proliferation, aber auch Apoptose und Nekroptose (Wang *et al.*, 2008; Brenner *et al.*, 2015; Holbrook *et al.*, 2019). Bindet TNF α an den TNFR2 wird ein Komplex aus TRAF1/2/3 gebildet und daraus folgend wiederum NF κ B aktiviert. Hieraus ergeben sich hämostatische, regenerative und proliferative Funktionen sowie die Aktivierung und Migration von Immunzellen (Probert, 2015; Jang *et al.*, 2021).

Beide TNFR werden von ADAM17 gespalten (Solomon *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2000). Lösliche TNFR agieren als Antagonisten, die lösliches TNF α binden und dadurch die Interaktion mit membrangebundenem TNF α unterbinden, wodurch sie die zelluläre Reaktionsfähigkeit herunterregulieren (Porteu und Nathan, 1990).

1.4.2 CD62L

Selektine sind eine Familie von transmembranen Glykoproteinen. Man unterscheidet drei Arten von Selektinen, die jeweils charakteristisch für ihr Vorkommen auf einer Zellart sind: E-Selektin auf Endothelzellen, L-Selektin auf Leukozyten und P-Selektin auf Thrombozyten. L-Selektin, auch CD62L genannt, beeinflusst die ersten Schritte der Leukozytenmigration, die Adhäsion und das Rollen durch Bindung an seinen Liganden PSGL-1 (Sperandio *et al.*, 2003). Die Bindung der beiden führt zusätzlich zur Aktivierung des Integrins LFA-1 (Stadtman *et al.*, 2013).

Die Proteinexpression von CD62L auf zirkulierenden Leukozyten ist konstitutiv und wird bei Aktivierung der Leukozyten schnell von der Zelloberfläche entfernt (Smalley und Ley, 2005). Verschiedene synthetische oder physiologische Agonisten der Zellaktivierung fördern unterschiedliche Spaltprozesse des CD62L, von denen die proteolytische Spaltung durch ADAM17 den Großteil ausmacht (Fan und Derynck, 1999; Smalley und Ley, 2005; Li *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2011). Bei Beeinträchtigung der ADAM17-vermittelten Spaltung von CD62L wird die Rollgeschwindigkeit der Leukozyten reduziert und die Akkumulation der Neutrophilen am Endothel verstärkt (Hafezi-Moghadam *et al.*, 2001). Während die Spaltung die initiale Phase der Neutrophilenrekrutierung hemmt, spielt es in späteren Phasen eine wichtige Rolle für die effiziente Transmigration, wobei die genauen Prozesse hierfür noch nicht detailliert untersucht sind (Pruessmeyer und Ludwig, 2009).

1.4.3 CD44

CD44 ist ein transmembranes Glykoprotein, welches in zehn verschiedenen Splice-Varianten vorkommt und auf der Oberfläche vieler Zellarten, unter anderem Leukozyten, Endothelzellen und Epithelzellen exprimiert wird (Sherman *et al.*, 1994). Als Rezeptor für Hyaluronsäure reguliert CD44 das Rollen, die Extravasation und die Proliferation von Lymphozyten in Reaktion auf proinflammatorische Zytokine (Naor *et al.*, 1997; Mohamadzadeh *et al.*, 1998). Welche Rolle CD44 bei der Migration von Neutrophilen genau spielt, ist kaum untersucht. Das Fehlen von CD44 verstärkt jedoch die Neutrophilenmigration und Schädigung der Lunge im Rahmen einer Inflammation mit *Escherichia coli*, nicht jedoch bei *Streptococcus pneumoniae*-induzierter Pneumonie (Wang *et al.*, 2002). Die proteolytische Spaltung von CD44 wurde bisher hauptsächlich im Zusammenhang mit malignen Erkrankungen untersucht, wo ADAM10 CD44 konstitutiv spaltet und erhöhte Konzentrationen von löslichem CD44 mit einer erhöhten Tumorlast und vermehrtem Metastasierungspotenzial korrelieren (Nagano und Saya, 2004; Anderegge *et al.*, 2009).

1.4.4 JAM-A

JAM-A ist ebenfalls ein transmembranes Glykoprotein, Mitglied der Familie der JAM der Zell-Zell-Adhäsionsrezeptoren und wird auf vielen verschiedenen Zellarten, unter anderem auf Neutrophilen, Endothelzellen und Epithelzellen exprimiert (Martín-Padura *et al.*, 1998; Ebnet, 2017). Je nach Zellart auf der JAM-A exprimiert wird, reguliert es eine Vielzahl an physiologischen Prozessen, wie beispielsweise die epitheliale Barrierefunktion, die Regulation von Inflammation, Hämostase und Homöostase, aber auch Angiogenese (Khandoga *et al.*, 2005; Cooke *et al.*, 2006; Cera *et al.*, 2009; Naik *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2015). In Endothelzellen bildet es einen Teil der Tight Junctions, wodurch die endotheliale Barriere aufgebaut wird und die Leukozytenmigration gesteuert wird (Weber *et al.*, 2007). Die proteolytische Spaltung der Ektodomäne von JAM-A erfolgt über ADAM10 und ADAM17 (Ostermann *et al.*, 2005; Koenen *et al.*, 2009). Lösliches JAM-A wird von endothelialen Zellen konstitutiv freigesetzt, was jedoch durch die Aktivierung des Endothels mit proinflammatorischen Zytokinen und während der Migration von Leukozyten weiter verstärkt wird (Koenen *et al.*, 2009). Lösliches JAM-A hemmt die transendotheliale Migration von Leukozyten, vermutlich durch die Bindung an LFA-1, welches dadurch nicht mehr an membrangebundenes JAM-A auf Endothelzellen binden kann und der Arrest der Leukozyten gehemmt wird (Ostermann *et al.*, 2002; Koenen *et al.*, 2009).

1.4.5 CD40L

CD40L ist ein Transmembranprotein, welches zu der TNF-Superfamilie gehört, und auf sämtlichen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen, unter anderem B- und T-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen und Endothelzellen, aber auch auf aktivierten Thrombozyten exprimiert wird (Cognasse *et al.*, 2022). Thrombozytäres CD40L aktiviert Endothelzellen im Rahmen einer Inflammation und beeinflusst zusätzlich die Rekrutierung von Neutrophilen und T-Zellen (Henn *et al.*, 1998; Aloui *et al.*, 2014). Die proteolytische Spaltung von CD40L erfolgt durch ADAM10 und ADAM17, aber auch durch andere Enzyme und ist je nach Zellart, auf der es exprimiert wird, unterschiedlich. Auf T-Zellen wird es beispielsweise von den beiden ADAMs gespalten, auf Thrombozyten jedoch hauptsächlich durch die Matrixmetalloproteinase (MMP)2 und MMP9 (Furman *et al.*, 2004; Matthies *et al.*, 2006; Menchén *et al.*, 2009; Wenzel *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2012; Yacoub *et al.*, 2013).

1.4.6 GPV

GPV ist eine Untereinheit des GPIb-V-IX Komplexes auf der Oberfläche von Thrombozyten, welcher als Rezeptor für den endothelialen vWF dient und die Adhäsion der Thrombozyten an beschädigtes oder entzündetes Endothel vermittelt (Roth, 1991). Durch die Bindung werden intrazelluläre Signalkaskaden aktiviert, was die Degranulierung und die Inside-Out Aktivierung des Integrins $\alpha IIb\beta 3$ initiiert, wodurch die Plättchen enger an das Endothel binden und aggregieren (Andrews *et al.*, 1997; Berndt *et al.*, 2001). Außerdem interagiert GPIb-V-IX mit MAC-1 auf Neutrophilen, was die Bildung von PNCs fördert (Berndt *et al.*, 2001). ADAM17 ist hauptsächlich verantwortlich für die proteolytische Spaltung von GPV, wobei es Hinweise darauf gibt, dass es auch Substrat von ADAM10 ist (Gardiner *et al.*, 2007; Bender *et al.*, 2010). Auswirkungen, die die Spaltung von GPV auf inflammatorische Prozesse haben kann, sind bisher kaum untersucht, es kann aber davon ausgegangen werden, dass die Thrombozytenaktivierung, PNC-Bildung und die Migration beeinflusst werden, da GPV dabei eine Rolle spielt.

1.4.7 VE-Cadherin

Cadherine sind eine der größten Familien der Adhäsionsmoleküle und funktionieren über homophile, Ca^{2+} -abhängige Interaktionen (Vestweber, 2008). VE-Cadherin wird in Endothelzellen exprimiert und bildet dort *Adherens Junctions*. Es ist zuständig für die Regulation der endothelialen Permeabilität, der vaskulären Integrität und der Leukozytentransmi-

gration (Dejana *et al.*, 2001). Proteolytisch gespalten wird VE-Cadherin nur von ADAM10 nach Stimulation der Endothelzellen über inflammatorische Signale, was in der Auflösung der *Adherens Junctions* resultiert (Carden *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2008). In vaskulären Krankheiten wie der systemischen Vaskulitis und der koronaren Arteriosklerose ist die Konzentration von löslichem VE-Cadherin im Serum erhöht (Soeki *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2014). Dies legt die Vermutung nahe, dass die Spaltung von VE-Cadherin im entzündeten Endothel verstärkt wird und dadurch zu einer verringerten Funktion und Integrität des Endothels führt (Ponnuchamy und Khalil, 2008; Dejana *et al.*, 2008).

1.5 ADAM-Proteasen als Therapieansatz gegen Inflammation

Die Forschung an ADAM10 und ADAM17 im Rahmen des ARDS zeigt zunehmend Hinweise darauf, dass eine Behandlung mit synthetischen Inhibitoren für die beiden Proteasen die Hauptmerkmale der pulmonalen Inflammation eindämmen können (Trifilieff *et al.*, 2002; Shimizu *et al.*, 2009; Dreymueller *et al.*, 2012a; Choi *et al.*, 2013). Allerdings bestehen noch diverse Hindernisse, die detailliert untersucht und überwunden werden müssen, bis ein in der Klinik anwendbarer Therapieansatz daraus hervorgehen kann.

Werden beispielsweise Breitband-Inhibitoren systemisch verabreicht, entfalten sie ihre Wirkung durch die Inhibition verschiedener Metalloproteinasen auf verschiedenen Zellarten. Dies ist zu unspezifisch und kann ungewünschte Wirkungen verursachen. Beispielsweise hat endotheliales ADAM17 proinflammatorische Eigenschaften, wohingegen neutrophiles ADAM17 die Migration der Neutrophilen durch die Spaltung von L-Selektin hemmt und so antiinflammatorisch wirkt (Dreymueller *et al.*, 2012a; Pruessmeyer *et al.*, 2014). Daher ist es unabdingbar, dass Protease-spezifische Inhibitoren angewandt werden. Verschiedene spezifische synthetische Inhibitoren und Antikörper wurden bereits getestet und zeigten gute Ergebnisse (Li *et al.*, 2009b, 2009a; Kwok *et al.*, 2014). Aber auch der Zeitpunkt und die Darreichungsform der Inhibitoren ist ein nicht zu vernachlässigender Faktor, da die Proteasen sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Substrate spalten und damit in der akuten Phase, aber auch in der späteren Phase der Resolution eine Rolle spielen. Eine Inhibition ist daher voraussichtlich nicht zu jedem Zeitpunkt des Inflammationsgeschehens sinnvoll.

Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass die Inhibition von ADAM10 und ADAM17 großes Potenzial für die Anwendung als Therapieansatz gegen das ARDS hat und daher die Forschung an diesem Ansatz sehr wichtig ist, um die noch bestehenden Hindernisse und Unbekanntheiten auszuräumen und zu überwinden.

1.6 Fragestellung

Das ARDS ist weltweit ein sehr häufig auftretendes Krankheitsbild, welches trotz intensiver Forschung und moderner Medizin bis heute mit einer hohen Letalität einhergeht. Die Behandlungsmöglichkeiten beschränken sich weiterhin lediglich auf präventive und supportive Maßnahmen. Die Schädigung des Parenchyms ist maßgeblich auf die unkontrollierte und überschießende Immunantwort mit Zytokinsturm und vermehrter Einwanderung von Neutrophilen zurückzuführen. Eine adäquate antiinflammatorische Therapie ergänzend zu den bisherigen Therapieoptionen wäre daher ein vielversprechender Schritt zur Verbesserung des Outcomes der Patienten.

Je nach Entzündungsphase nehmen Neutrophile, Mediatoren (z.B. Zytokine) und Moleküle (z.B. Adhäsionsmoleküle) unterschiedliche Funktionen ein und können neben den destruirenden, proinflammatorischen Eigenschaften auch regenerationsfördernde Wirkungen erzielen. Daher ist eine generelle Inhibition der Inflammation nicht zwingend notwendig und vorteilhaft, sondern vielmehr die Modulation von Aktivität, Rekrutierung und die Expression von Adhäsionsmolekülen. ADAM10 und ADAM17 beeinflussen durch ihre große Anzahl von Substraten, welche in inflammatorischen Prozessen beteiligt sind, viele Prozesse und spielen dadurch eine bedeutende, aber gleichzeitig auch sehr komplexe Rolle im inflammatorischen Geschehen. Die detaillierte Kenntnis der Wirkung der beiden ADAMs, spezifisch auf Neutrophilen und Thrombozyten auf Kernpunkte der Migration von Neutrophilen und PNCs, ist Grundlage für die weitere Forschung an den ADAMs als mögliche Zielstruktur für eine inflammationsmodulierende Therapieoption für das ARDS und Gegenstand dieser Arbeit. Genauer widmet sich die vorliegende Arbeit der Themenstellung:

Die Rolle von neutrophilem und thrombozytärem ADAM10 und ADAM17 auf die Aktivierung, Rekrutierung und Migration von Neutrophilen und Thrombozyten-Neutrophilen-Komplexen im Rahmen der akuten pulmonalen Inflammation.

Und bearbeitet hierfür folgende Fragen:

- Wie beeinflusst die systemische Inhibition von ADAM10 und ADAM17 die Aktivierung, Adhäsion und Migration von Neutrophilen und PNCs *in vivo* und *in vitro*?
- Welchen zellspezifischen Effekt haben neutrophiles und thrombozytäres ADAM10 und ADAM17 auf die Migration von Neutrophilen und PNCs?
- Wie werden die Aktivierung und Rekrutierung der Neutrophilen und Thrombozyten durch die beiden Proteasen beeinflusst?

1 Einleitung

- Welche Rolle spielen neutrophiles und thrombozytäres ADAM10 und ADAM17 für die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen, PNCs und Endothelzellen?
- Wie wirken die beiden ADAMs auf die Signalwege über TNFR1 und TNFR2?
- Sind die Daten zur Migration der Neutrophilen bei systemischer Inhibition und konditionalen Knockouts der ADAMs auch auf ein klinisch relevanteres murines Modell der Ventilator-induzierten akuten Lungenschädigung übertragbar?

2 Materialliste

2.1 Antikörper

2.1.1 FACS-Antikörper

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
PerCP anti-mouse CD45 (rat IgG2b, Klon 30-F11) 1	03131 B	iolegend, San Diego (USA)
PE/Cy7 anti-mouse Ly6G (rat IgG2a, Klon 1A8) 1	27618 B	iolegend, San Diego (USA)
APC/Cy7 anti-mouse CD41 (rat IgG1, Klon MWReg30) 1	33928 B	iolegend, San Diego (USA)
APC/Cy7 anti-mouse Ly6C (rat IgG2c, Klon HK1.4) 1	28026 B	iolegend, San Diego (USA)
PE/Cy7 anti-mouse/human CD11b (rat IgG2b, Klon M1/70)	101216	Biolegend, San Diego (USA)
APC anti-mouse LFA-1 (rat IgG1, Klon H155-78)	141010	Biolegend, San Diego (USA)
FITC anti-mouse/human CD44 (rat IgG2b, Klon IM7)	103006	Biolegend, San Diego (USA)
PE anti-mouse CD162 (rat IgG1, Klon 2PH1)	555306	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Pacific Blue anti-mouse CD62L (rat IgG2a, Klon MEL-14)	104424	Biolegend, San Diego (USA)
APC anti-mouse ADAM10 (rat IgG2a, Klon 139712)	FAB946A	R&D Systems, Wiesbaden (DE)
PE anti-mouse ADAM17 (rabbit polyclonal IgG)	bs-4236R-PE	Bioss, Woburn (USA)

2 Materialliste

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Pacific Blue anti-mouse/human CD11b (rat IgG2b, Klon M1/70)	101224	Biolegend, San Diego (USA)
PE/Cy7 anti-mouse CD62P (mouse IgG2a, Klon RMP-1)	148310	Biolegend, San Diego (USA)
Alexa Fluor 647 anti-mouse CD102 (rat IgG2a, Klon 2C4)	105612	Biolegend, San Diego (USA)
FITC anti-mouse CD31 (rat IgG2a, Klon 390)	102406	Biolegend, San Diego (USA)
Pacific Blue anti-mouse CD54 (rat IgG2b, Klon YN1/1.7.4)	116116	Biolegend, San Diego (USA)
APC anti-mouse Ly6G (rat IgG2a, Klon 1A8)	127614	Biolegend, San Diego (USA)
APC anti-mouse Ly6C (rat IgG2c, Klon HK1.4)	128016	Biolegend, San Diego (USA)
Pacific Blue anti-mouse CD41 (rat IgG1, Klon MWReg30)	133932	Biolegend, San Diego (USA)

2.1.2 Histologie-Antikörper

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Ly6G/C Antikörper (rat IgG2b, Klon RB6-8C5)	ab 25377	Abcam, Cambridge (UK)
CD41 Antikörper (rabbit polyclonal IgG)	ab 63983	Abcam, Cambridge (UK)
Goat anti-rabbit IgG biotinyliert	BA-1000	Vector Labs, Peterborough (UK)
Rabbit anti-rat IgG biotinyliert	BA-4000	Vector Labs, Peterborough (UK)
mVE-Cadherin (goat polyclonal IgG)	AF-1002	R&D Systems, Wiesbaden (DE)
JAM-A Antikörper (rabbit polyclonal IgG)	sc-25629	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
mCD40L (rabbit polyclonal IgG)	bs-1286R	Bioss, Woburn (USA)

2 Materialliste

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
CD42d Polyclonal Antibody (GPV) (sheep polyclonal IgG)	PA5-47889	Invitrogen, Waltham (USA)
CD62L Monoclonal Antibody (rat igG2a, Klon MEL-14)	MA1-10262	Invitrogen, Waltham (USA)
CD45 Antikörper (rabbit polyclonal IgG)	sc-25590	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Anti-human CD62L (mouse IgG1k, Klon DREG-56 (RUO))	555541	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Alexa Fluor 647 (donkey anti-sheep polyclonal)	A21448	Invitrogen, Waltham (USA)
Alexa Fluor 488 (donkey anti-rabbit polyclonal)	A32790	Invitrogen, Waltham (USA)
Alexa Fluor 647 (chicken anti-rat 647 polyclonal)	A21472	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Alexa Fluor 546 (donkey anti-rabbit polyclonal)	A10040	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Alexa Fluor 488 (donkey anti-mouse polyclonal)	A21202	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Alexa Fluor 594 (goat anti-rabbit polyclonal)	A11012	Invitrogen, Waltham (USA)
Alexa Fluor 546 (goat anti-rat 546 polyclonal)	A11081	Life Technologies, Carlsbad (USA)
Alexa Fluor 647 (goat anti-rabbit polyclonal)	A21244	Life Technologies, Carlsbad (USA)

2.2 Chemikalien und Reagenzien

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
2-Propanol	BCBN7386V	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
ABTS	A1888-2G	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	3J002532	AppliChem, Darmstadt (DE)

2 Materialliste

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
BCA Reagent A	23225	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
BCA Reagent B	23227	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Biotin Blocking Solution	SP-2001	Vector Labs, Peterborough (UK)
Bovines Serum Albumin	A3294	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Chloroform	C2432	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Chlorwasserstoffsäure (HCl)	A3452	AppliChem, Darmstadt (DE)
DAB Chromogen	S3000	Dako, Hamburg (DE)
Disodium EDTA	ED4S	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
DMSO	D5879	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethanol absolut	A3678	AppliChem, Darmstadt (DE)
Eukitt	03989	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
FACS Clean	340345	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
FACS Flow	342003	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
FACS Lysing Solution	349202	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
FACS Rinse	340346	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
FACS Shutdown	334224	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Formalin (4%)	100496	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Hematoxylin QS Counterstain	H-3404	Vector Labs, Peterborough (UK)
iScript™ cDNA Synthesis Kit	1708891	Bio-Rad, München (DE)
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	1725124	Bio-Rad, München (DE)
jetPRIME® vielseitiges DNA/siRNA Transfektionsreaganz	101000027	Polyplus, Illkirch (FR)
Kaliumchlorid (KCl)	31248	Riedel-de Haën, Seelze (DE)
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	30404	Riedel-de Haën, Seelze (DE)
Methanol	106009	Merck, Darmstadt (DE)

2 Materialliste

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Natriumacid (NaN_3)	S8032	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Natriumchlorid (NaCl)	21385311	B.Braun, Melsungen (DE)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	K10720529	Merck, Darmstadt (DE)
Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	S5011	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Nuklease-freies Wasser	A7398	AppliChem, Darmstadt (DE)
Paraffin Ritoplast	6642.5	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (DE)
Paraffinöl	8904.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (DE)
Phire Animal Tissue Direct PCR Kit	F170S	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Phosphat-gepufferte Saline D8537 Reagent Diluent	DY995	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA) R&D Systems, Wiesbaden (DE)
RNase Away	7002	Molecular BioProducts Inc., San Diego (USA)
Salzsäure (HCl)	K025.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (DE)
Schwefelsäure (H_2SO_4)	9316.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (DE)
Streptavidin-HRP	893975	R&D Systems, Wiesbaden (DE)
Substrate Reagent	DY999	R&D Systems, Wiesbaden (DE)
TNF-R1 siRNA (h)	Sc-29507	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
TNF-R2 siRNA (h)	Sc-36689	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
TRIzol™ Reagent	15596026	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Tween20	A4974	AppliChem, Darmstadt (DE)
Türk'sche Lösung	93770	Merck, Darmstadt (DE)

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Unmasking Solution	H-3300	Vector Labs, Peterborough (UK)
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	108597	Merck, Darmstadt (DE)
Xylol	131769	AppliChem, Darmstadt (DE)

2.3 Enzyme

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Collagenase	C7667	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
DNAse	D4527	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Hyaluronidase	H3506	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)

2.4 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Aqua dest. Anlage	Urelab flex 2	Veolia Water Technologies, Paris (FR)
Beatmungsschlauch		Siemens-Elma, Stockholm (SE)
Beatmungsgerät	Servo Ventilator 900C	Siemens-Elma, Stockholm (SE)
Chemilumineszenz Reader	Fusion SL4	Vilber Lourmat, Eberhardszell (DE)
Einbettautomat	EG1150H	Leica, Wetzlar (DE)
Eismaschine	AF-103	Scotsman, Sprockhövel (DE)
ELISA Washer	Hydro flex	Tecan, Männedorf (DE)
Heizplatte	HI1220	Leica, Wetzlar (DE)
Histologisches Karussell	TP1020	Leica, Wetzlar (DE)
Homogenisator	Precellys 24	Bertin technologies, Montigny-le-Bretonneux (FR)

2 Materialliste

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Inhalationskammer		Medizinische Werkstatt Uniklinikum Tübingen, Tübingen (DE)
Inkubationsschüttler	Infors HT Ecotron	Infors AG, Einsbach (DE)
Inkubator	Heraeus Oven	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Kamera	Axiocam MRc	Zeiss, Oberkochen (DE)
Mehrkanalpipette	Research plus	Eppendorf, Hamburg (DE)
100 µl		
Mehrkanalpipette	Research plus	Eppendorf, Hamburg (DE)
300 µl		
Micoplate Reader	Infinite M200 pro	Tecan, Männedorf (DE)
Mikroskop Leica	30301	Leica, Wetzlar (DE)
DMIL		
Mikroskop Leica	55853	Leica, Wetzlar (DE)
DM-IRB		
Mikroskop Leica	Stellaris 5	Leica, Wetzlar (DE)
Mikrowelle	Cookmate	Daewoo, Butzbach (DE)
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf, Hamburg (DE)
Pinzetten	BD312R, BD311R	Aesculap, Tuttlingen (DE)
PipetBoy	Pipetboy acu	Integra Biosciences, Wallisellen (CH)
Pipetten	Reference, Research plus	Eppendorf, Hamburg (DE)
Rotationsmikrotom	RM 2235	Leica Biosystems, Nussloch (DE)
Spektrophotometer	Nanodrop 2000	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg (DE)
Thermocycler	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad, München (DE)
Thermocycler	C1000, CFX96	Bio-Rad, München (DE)
Thermocycler	CFX Connect	Bio-Rad, München (DE)
Tischmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York (USA)
Tischzentrifuge	Mini-Zentrifuge ROTILABO®	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (DE)
Vaporisator	Micro-A-I-R U22	OMRON Healthcare, Kyoto (JP)
Waage	Mettler PK4800	Mettler, Gießen (DE)
Waage	HR-120-EC	A&D Instruments, Ahrensburg (DE)
Wasserbad	HI1210	Leica, Wetzlar (DE)

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Wippschüttler	ST5	Bioblock Scientific, Schwerte (DE)
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)

2.5 Inhibitoren

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
GI254023X	HY-19956	MedChemExpress, Monmouth Junction (USA)
GW280264X	7030/10	Bio-Techne, Minneapolis (USA)
TAPI-1	S7434	Selleckchem.com, Köln (DE)

2.6 Lösungen und Puffer

2.6.1 ELISA PBS

Produktbezeichnung	Menge
Aqua dest.	1 l
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
NaCl	8,0 g
Na ₂ HPO ₄	1,4 g

2.6.2 ELISA Stopp Lösung

Produktbezeichnung	Menge
Aqua dest.	68 ml
H ₂ SO ₄ (18 M)	4 ml

2.6.3 Erythrozyten Lysepuffer

Produktbezeichnung	Menge
Aqua dest.	1 l
NH ₄ Cl	8,024 g
NaHCO ₃	0,84 g
Disodium-EDTA	0,372 g

2.6.4 ACD-Puffer

Produktbezeichnung	Menge
Aqua dest.	100 ml
Natriumcitrat	25,0 g
Citronensäure	15,0 g
Dextrose	20,0 g
pH	4,5

2.7 Medikamente

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Heparin-Natrium 5000 IE/ml	059872	Leo Pharma GmbH, Neu-Isenburg (DE)
Ketamin 100 mg/ml	03760898	Hameln Pharma Plus GmbH, Hameln (DE)
NaCl 0,9 %	B. Braun	Melsungen (DE)
Rompun (Xylazin) 2 %	KPOE65K	Bayer, Leverkusen (DE)

2.8 RT-qPCR Primer

Produktbezeichnung	Sequenz	Hersteller, Ort
18S forward	5'-gta acc cgt tga acc ccaa tt-3'	Biomers.net,Ulm (DE)
18S reverse	5'-cca tcc aat cgg tag tag cg-3'	Biomers.net,Ulm (DE)
hCREB forward	5'-caa cca gca cag ctt caa ac-3'	Biomers.net,Ulm (DE)
hCREB reverse	5'-cag gca cct gtc cct gtg-3'	Biomers.net,Ulm (DE)
hNFkB forward	5'-tga agt gtg ggg ctg atg tc-3'	Biomers.net,Ulm (DE)
hNFkB reverse	5'-agt cat cat agg gca gct cg-3'	Biomers.net,Ulm (DE)
hTRADD forward	5'-cgg cca gga ggt gag atg-3'	Biomers.net,Ulm (DE)
hTRADD reverse	5'-gcg gcc gat tca cta cag g-3'	Biomers.net,Ulm (DE)
hTRAF1 forward	5'-gtc cca ggc aag ata ggg tc-3'	Biomers.net,Ulm (DE)
hTRAF1 reverse	5'-aga ctg tgg gct tcc ctt ga-3'	Biomers.net,Ulm (DE)
mNFkB forward	5'-gcc aag tgc acg agt c-3' Biome	rs.net,Ulm (DE)
mNFkB reverse	5'-gaa gga cga gac gag c-3' Biome	rs.net,Ulm (DE)
mTRAF2 forward	5'-gct act gct cct tct gcc tg-3' B	iomers.net,Ulm (DE)
mTRAF2 reverse	5'-gca ggt tct cag tct cca cc-3' B	iomers.net,Ulm (DE)

2.9 Software

Produktbezeichnung	Versionsnummer	Hersteller, Ort
AxioVision	4.8.2.0	Zeiss, Oberkochen (DE)
BioRender		BioRender, Toronto (CA)
CFX Manager	3.1	Bio-Rad, München (DE)
Excel	2016	Microsoft, Redmond (USA)
FACSDiva Software	9	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
FlowJo	7.2.5	FlowJo LCC, Ashland (USA)
GraphPad Prism	10	GraphPad Software Inc., San Diego (USA)
ImageJ	1.54f	Wayne Rasband (NIH), Bethesda (SUA)
LAS X	5.0.3.24880	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar (DE)

Produktbezeichnung	Versionsnummer	Hersteller, Ort
Magellan	7.2	Tecan, Männedorf (CH)
Nanodrop 2000	1.6	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
PowerPoint	2016	Microsoft, Redmond (USA)
Word	2016	Microsoft, Redmond (USA)
Zettlr	3.2.0	Hendrik Erz (Sweden)

2.10 Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
6.5mm Transwell®, 3.0µm Pore Polyester Membrane Insert	3472	Corning Inc, Corning (USA)
Combitips advanced 10 ml	0030089464	Eppendorf, Hamburg (DE)
Combitips advanced 5 ml	0030089456	Eppendorf, Hamburg (DE)
Costar® TC-behandelte Multiwellplatte, 12 Well	3512	Corning Inc, Corning (USA)
Costar® 24-Well Clear Flat Bottom Ultra-Low Attachment Multiple Well Plates	3473	Corning Inc, Corning (USA)
Deckgläser	01-2460	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen (DE)
Einbettkassetten ROTILABO®	K113.1	Carl Roh GmbH, Karlsruhe (DE)
FACS-Falcon 5 ml	352052	Corning Inc, Corning (USA)
Falcon 15 ml	188271	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Falcon 50 ml	352070	Corning Inc, Corning (USA)
Färbeeinsatz	11-0002	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen (DE)
Färbeküvette	11-0001	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen (DE)
Filterpapier (10 cm)	CA20.1	Carl Roh GmbH, Karlsruhe (DE)

2 Materialliste

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Filterspitzen 10µl kurz	07-602-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen (DE)
Filterspitzen 10µl lang	07-612-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen (DE)
Filterspitzen 100 µl	07-642-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen (DE)
Filterspitzen 1000 µl	07-693-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen (DE)
Filterspitzen 20 µl	07-622-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen (DE)
Filterspitzen 200 µl	07-662-8300	Nerbe plus GmbH, Winsen (DE)
Gazin Mullkompressen	18500	Lohmann&Rauscher GmbH, Rengsdorf (DE)
Handschuhe Dermaclean	PFC 4303971	Ansell, München (DE)
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	H-4000	Vector Labs, Peterborough (UK)
Kanüle Microlance 20 G	301300	Becton Dickinson, Heidelberg (DE)
Kanüle Microlance 24 G	304100	Becton Dickinson, Heidelberg (DE)
Kanüle Microlance 27 G	302200	Becton Dickinson, Heidelberg (DE)
Kanüle Stercan 20 G	4657519	B. Braun, Melsungen (DE)
Kryoröhrchen 1,8 ml	10674511	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Medical Examination Gloves	290418	Abena, Aabenraa (DK)
Microtiter plates Mikroplate	655101	Bio-Rad, München (DE)
Microtiter plates Nunc Maxisorp	442404	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Mikrotomklinge A35	0207500005	Feather, Osaka (JPN)
Multiplate PCR Plates 96-Well, clear	650101	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Multi-Safe Seal Tubes	7083.1	Carl Roh GmbH, Karlsruhe (DE)

2 Materialliste

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Nähgarn Mercifil No 50	M3541	Amann und Söhne, Mannheim (DE)
Objektträger	03-0004	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen (DE)
Objektträger SuperForst Plus	03-0060	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen (DE)
Paraplast Plus	X881.1	Leica, Wetzlar (DE)
Pasteurpipetten Einweg	EA70.1	Carl Roh GmbH, Karlsruhe (DE)
Petrischalen Cellstar	E2193G5	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Pipettenspitzen 10 µl	701130600	Sarstedt, Nürnberg (DE)
Pipettenspitzen 1000 µl	701181	Sarstedt, Nürnberg (DE)
Pipettenspitzen 20 µl	701116	Sarstedt, Nürnberg (DE)
Pipettenspitzen 200 µl	70760002	Sarstedt, Nürnberg (DE)
Precellys Keramikkügelchen 1,4 mm	91-PCS-CK14	Peqlab, Erlangen (DE)
Reaktionsgefäß 0,2 ml (RNase-frei)	XT87.1	Carl Roh GmbH, Karlsruhe (DE)
Reaktionsgefäß 0,5 ml	30121023	Eppendorf, Hamburg (DE)
Reaktionsgefäß 1,5 ml	616201	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Reaktionsgefäß 1,5 ml (RNase-frei)	EA84.1	Carl Roh GmbH, Karlsruhe (DE)
Spitzen ELISA epT.I.P.S® 2-200 µl	0030000870	Eppendorf, Hamburg (DE)
Spritze 1 ml	9166017V	B. Braun, Melsungen (DE)
Spritze 2 ml	4606027V	B. Braun, Melsungen (DE)
Spritze 5 ml	4606051V	B. Braun, Melsungen (DE)
Stripette 10 ml	10608261	Corning Inc, Corning (USA)
Stripette 25 ml	10024420	Corning Inc, Corning (USA)
Stripette 5 ml	10156420	Corning Inc, Corning (USA)
Venenkatheter Insyte 22G	381223	Beckton & Dickinson, Heidelberg (DE)
Verschlussfolie	EN76.1	Carl Roh GmbH, Karlsruhe (DE)
Zählkammer C-Chip	DHC-N01	Digital Bio, Seoul (ROK)

2 Materialliste

Produktbezeichnung	Artikel-Nr.	Hersteller, Ort
Zellkultur Multiwellplatte, 6 Well, PS	657160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Zellkulturflasche T75	90076	TPP, Trasadingen (CH)
Zellsieb 100 µm	5402000	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)
Zellsieb 70 µm	542070	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen (DE)

3 Methoden

3.1 Tiere

Alle Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Genehmigungsnummer A03/18G). Für die Versuche wurden 8 bis 12 Wochen alte Mäuse weiblichen und männlichen Geschlechtes verwendet. Die C57BL/6J Wildtyp (WT)-Tiere wurden von Charles River Laboratories bezogen. Des Weiteren wurden vier gentechnisch veränderte Mauslinien für diese Arbeit verwendet, die aus eigener Zucht stammten. Die Tiere werden in einem spezifisch pathogenfreien Bereich gehalten. Die Zucht erfolgte nach dem Rekombinationssystem Cre/loxP, welches ein gezieltes Entfernen spezifischer Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenzen im lebenden Organismus ermöglicht (Abbildung 3.1). Dafür wurden ADAM10 bzw. ADAM17 gefloxt Mäuse von Jackson Laboratories verwendet, bei denen vor und hinter dem DNA-Lokus für das ADAM10- oder ADAM17-Gen eine loxP-Sequenz eingefügt wurde. Zusätzlich wurden zwei verschiedene Cre-Linien verwendet: lymphocyte antigen 6 complex locus (Ly6)G Catchup-Cre (bereitgestellt durch Prof. Dr. Matthias Gunzer, Universität Duisburg-Essen) und Plättchenfaktor 4 (PF4)-Cre (bereitgestellt durch Prof. Dr. Peter Rosenberger, Universitätsklinik Tübingen) (Tiedt *et al.*, 2007; Hasenberg *et al.*, 2015). Bei Verpaarung der gefloxten Tiere mit den Cre-Tieren katalysiert die Cre-Rekombinase die Spaltung und Neuverknüpfung der DNA zwischen den beiden loxP-Erkennungssequenzen. So konnten Nachkommen gezüchtet werden, in denen ADAM10 und ADAM17 jeweils spezifisch auf Neutrophilen oder Thrombozyten ausgeknockt waren. Im Detail wurden so die folgenden Mauslinien gezüchtet:

B6.129P2-ADAM10tm1.1Zhu-Ly6G-icretm1.Gun/J (im Verlauf ADAM10^{CUP} genannt)
B6.129P2-ADAM17tm1.2Bbl- Ly6G-icretm1.Gun/J (im Verlauf ADAM17^{CUP} genannt)
B6.129P2-ADAM10tm1.1Zhu-PF4-icreQ3Rsko/J (im Verlauf ADAM10^{PF4} genannt)
B6.129P2-ADAM17tm1.2Bbl-PF4-icreQ3Rsko/J (im Verlauf ADAM17^{PF4} genannt).

Die bei der Zucht entstandenen Wurfgeschwister (engl. littermates) ohne die entsprechende Cre-Rekombinase wurden zum unnötigen Verlust von Tieren als Kontrolltiere verwendet. Alle Tiere wurden genotypisiert, bevor sie für die Versuche verwendet wurden.

3 Methoden

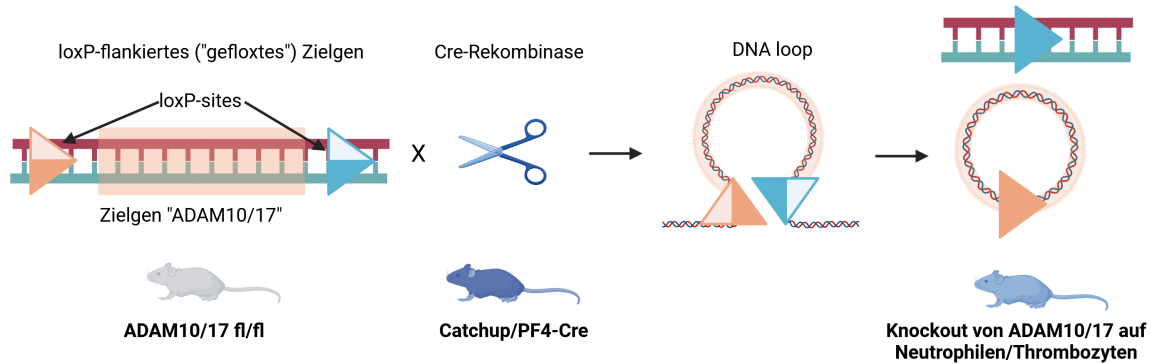


Abbildung 3.1: **Prinzip des Cre/loxP-Rekombinationssystems.** Schematische Darstellung der Zucht einer konditionalen Knockout-Mauslinie. Verpaart werden hierzu eine mit dem Zielgen (in dieser Arbeit ADAM10, bzw. 17) gefloxt Maus mit loxP-Signalstellen innerhalb des Zielgens und eine Maus, mit einer Cre-Rekombinase an entsprechender Stelle (hier am lymphocyte antigen 6 complex locus (Ly6)G- bzw. Plättchenfaktor 4 (PF4)-Genlokus). Das Cre-Enzym erkennt die loxP-Stellen, bildet einen Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Loop und schneidet die DNA des Zielgens heraus. Es entsteht eine ringförmige DNA, die folgend abgebaut wird und die restliche funktionale DNA wird zusammengeführt. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com. <https://BioRender.com/e00t390>.

3.2 Genotypisierung

Als Probenmaterial für die Genotypisierung diente ein kleines Stück Ohr der Mäuse, welches von den Tierpflegern mithilfe einer Stanze gewonnen wurde. Aus dem Gewebe wurde zunächst mit dem Phire Animal Tissue Direct Polymerase-Kettenreaktion (PCR) Kit die DNA extrahiert. Hierfür wurden pro Probe 19,5 µl des Dilution Buffers mit 0,5 µl DNA-Release gemischt und zu dem Gewebe pipettiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben in einem Thermocycler 2 Minuten bei 98°C verdaut.

Im Anschluss erfolgte eine PCR zur Amplifikation des zu genotypisierenden Gens, um genügend Ausgangsmaterial für die anschließende Kapillarelektrophorese zu gewinnen. Hierfür wurde zunächst ein PCR-Mix, bestehend aus 4 µl 5x Puffer, 0,4 µl desoxyNukleotidtriphosphate (dNTP), 1 µl Primer-Mix für das gesuchte Gen, 0,4 µl Polymerase und 12,7 µl Nuklease-freies Wasser (NFW) pro Probe hergestellt. In PCR-Reaktionsgefäßen wurde zunächst 18,5 µl PCR-Mix vorgelegt und anschließend 1,5 µl der Probe hinzugefügt. Die PCR erfolgte in einem Thermocycler nach folgendem Schema: zuerst wird die DNA bei 95°C denaturiert, anschließend erfolgt die Anlagerung des Primers bei 56°C für ADAM10 bzw. bei 60°C für ADAM17 und PF4 an die einzelsträngige DNA und im dritten Schritt die Synthese des neuen Strangs bei 72°C. Dieser Zyklus wird 40 Mal wiederholt und die erhaltene DNA dann auf 12°C heruntergekühlt.

Den letzten Schritt der Genotypisierung bildet die Kapillarelektrophorese, eine analytische Trennmethode, bei der die geladenen Teilchen entlang eines elektrischen Feldes wandern.

3 Methoden

Die Geschwindigkeit der Teilchen, in dem Fall der synthetisierten DNA, hängt von deren Ladung, Form und Größe ab. Die Größe der DNA-Sequenzen in Basenpaaren (bp) und die damit zu erwartende Bandenhöhe ist der folgenden Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Tabelle 3.1: Länge der DNA für Wildtyp (WT) und Mutant der genetischen Targets für die konditionalen Knockouts.

Gen	WT-Bande	Mutanten-Bande
ADAM10f/f	300 bp	400 bp
ADAM17f/f	537 bp	650 bp
Catchup Cre	585 bp	373 bp
PF4 Cre	324 bp	420 bp

3.3 LPS-induziertes pulmonales Inflammationsmodell

Zur Induktion des murinen Modells der akuten pulmonalen Inflammation wurden den Mäusen vernebelte LPS des Bakterienstammes *Salmonella enteridis* inhalativ verabreicht. Dieses Inflammationsmodell ist standardisiert und wird seit Jahren in der Arbeitsgruppe zur Induktion einer pulmonalen Inflammation angewandt (Konrad *et al.*, 2016). LPS sind in der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthalten. Sie führen zu einer vorübergehenden erhöhten Migration von Neutrophilen, einem Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität und zu einer Abnahme der Oxygenierung und pulmonalen Compliance. Unter einem Abzug wurden je vier bis sechs Mäuse in eine zylindrische Plastikröhre gesetzt, die an jeder Seite einen Anschluss besaß (Abbildung 3.2). Um in der Röhre einen kontinuierlichen Sog herzustellen, war an einer Seite eine Wasserstrahlpumpe angebracht. Auf der gegenüberliegenden Seite wurde ein Vernebler angeschlossen, mithilfe dessen die Mäuse 30 Minuten lang das in 7,5 ml 0,9-prozentigem NaCl gelöste LPS mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml inhaliert haben. Die Kontrolltiere inhalierten 30 Minuten lang die Trägerlösung NaCl ohne Stimulanz.

3.4 *In vivo* Migrationsversuch

In früheren Versuchen der Arbeitsgruppe wurde getestet, zu welchem Zeitpunkt verschiedene Inflammationsprozesse von Interesse ihren Höhepunkt erreichen (Reutershan *et al.*, 2005). Dabei konnte beobachtet werden, dass die Freisetzung der Chemokine drei bis

3 Methoden

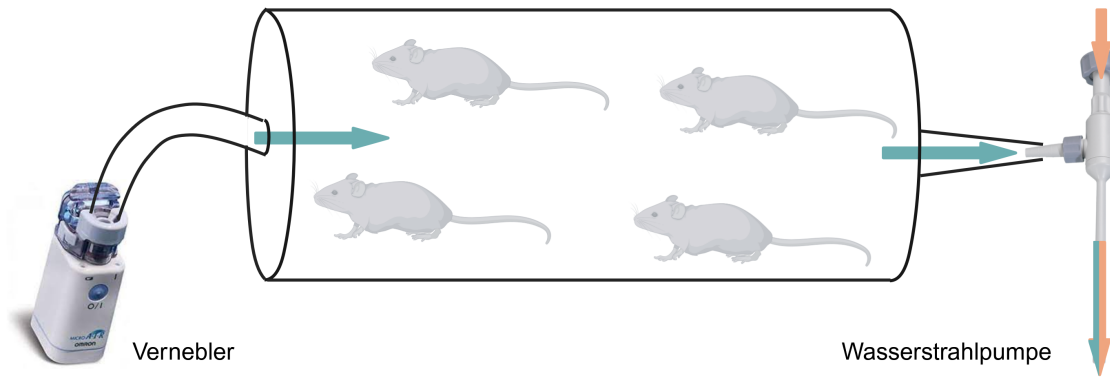


Abbildung 3.2: **Versuchsaufbau für die LPS-Inhalation.** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für die Lipopolysaccharide (LPS)-Inhalation. Links ist der Vernebler an die Inhalationskammer angeschlossen, in der die Mäuse sitzen. Rechts wurde eine Wasserstrahlpumpe angebracht, die einen kontinuierlichen Sog aufrechterhielt. Die grünen Pfeile stellen die Flussrichtung des LPS dar, die orangenen Pfeile die Richtung des Wasserstrahls. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com. <https://BioRender.com/u33w929>.

vier Stunden nach Exposition mit LPS ihren Höhepunkt erreicht, während die Neutrophilen-Migration 24 Stunden nach LPS-Inhalation am stärksten ist. Der *in vivo*-Migrationsversuch wurde aufgrund dieser Datenlage zu zwei Zeitpunkten durchgeführt. Für durchflusszytometrische Analysen zur Neutrophilen-Migration wurden die Proben 24 Stunden nach LPS-Inhalation entnommen. Für Untersuchungen wie enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) oder PCR vier Stunden nach Inflammationsbeginn.

Für die durchflusszytometrische Analyse 24 Stunden nach Inflammationsbeginn wurde der Versuch in zwei weitere Versionen unterteilt. Zum einen, den Migrationsversuch mit Fokus auf die Quantifizierung der Neutrophilen in den vier Kompartimenten Blut, Endothel, Interstitium und BAL. Zum anderen, die Untersuchung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) diverser Oberflächenproteine auf Neutrophilen und Thrombozyten in Blut, Lunge und BAL, sowie auf Endothelzellen in der Lunge. Beim Migrationsversuch wurde zur Unterscheidung der am Endothel adhärenenten Neutrophilen von den sich im Interstitium befindlichen Neutrophilen innerhalb der Lungenproben vor Operationsbeginn ein Fluoreszenz-markierter Antikörper in die Schwanzvene appliziert. Dieser wurde im Verhältnis 1:25 in NaCl 0,9 % verdünnt und mit einem Gesamtvolumen von 250 µl verabreicht. Dieser markierte spezifisch alle intravasalen, sprich am Endothel adhärenenten Neutrophilen. Für die WT- und PF4-Tiere wurde der Allophycocyanin (APC)-markierte anti-mouse Ly6G Antikörper verwendet und für die Catchup-Tiere ein APC-markierter Ly6C Antikörper, da bei diesen das Ly6G im Zuge des Knockouts verändert wurde und so nicht mehr für eine spezifische Markierung der Neutrophilen verwendet werden konnte. Die Tiere im MFI-Versuch erhielten keinen Antikörper intravenös (i.v.) und wurden für die Organentnahme direkt narkotisiert.

3 Methoden

Für die Probenentnahme wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion von 10µl/g Körpergewicht einer Narkoselösung (Tabelle 3.2) narkotisiert.

Tabelle 3.2: Narkoselösung (Zusammensetzung für 10 ml).

Substanz	Menge
Ketamin 100 mg/ml	1,2 ml
Xylazin 20 mg/ml	0,4 ml
NaCl 0,9 %	8,4 ml

Nach Einsetzen des Anästhesiestadiums der chirurgischen Toleranz, das mittels Ausbleibens des Zwischenzehenreflexes überprüft wurde, wurde die Maus in Rückenlage auf einem Operationstisch aus Kork an Pfoten und Kopf fixiert, sodass der Hals überstreckt war. Es folgte das vollständige Benetzen des Fells mit Paraffinöl und die stumpfe Abpräparation der Haut. Anschließend wurde das Peritoneum unterhalb des Xyphoids eröffnet und durch Inzision des Diaphragmas ein Pneumothorax induziert, woraus ein Kollaps beider Lungenflügel resultierte. Die Eröffnung des Thorax erfolgte mittels Durchtrennung der Rippen beidseits des Sternums nach kranial. Anschließend wurde das Brustschild hochgeklappt und mit einer Kanüle fixiert. Mit einer 1 ml Spritze, welche im Voraus mit Heparin-Natrium benetzt worden ist, wurden nun ca. 800 µl Blut aus dem rechten Ventrikel abgenommen und bis zur Weiterverarbeitung in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube im Wasserbad bei 37°C gelagert. Nach abdominaler Durchtrennung von Vena cava inferior und Aorta wurde der Blutkreislauf mit 3 ml Phosphat-gepufferter Saline (PBS)⁻ ebenfalls über den rechten Ventrikel des noch schlagenden Herzens gespült. Ziel des Spülens war es, die zirkulierenden Neutrophilen aus dem Lungengefäßsystem zu entfernen. Gleichzeitig führt es zum Ausbluten und damit zur Euthanasie des Tieres. Anschließend wurde die Trachea stumpf freipräpariert und ein Tubus in Form eines Venenverweilkatheters eingeführt, welcher mit Nähgarn fixiert wurde. Zur Gewinnung der BAL wurde der Intraalveolarraum über den Tubus mit PBS⁻ gespült, sodass 2 ml bronchoalveoläre Flüssigkeit gesammelt werden konnten. Diese wurde bis zur Weiterverwendung auf Eis gelagert. Zuletzt wurde das Herz-Lungen-Paket entnommen und die Lungenlappen einzeln bronchiennah abpräpariert. Rechter Ober- und Unterlappen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

3.5 Verarbeitung der Proben

Im Blut wurde die Gesamtzellzahl bestimmt. Hierfür wurden je 10 µl Probe zu 90 µl Türk'scher Lösung pipettiert, geschüttelt und 10 µl davon in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Das verbleibende Blut wurde bis zum Beginn der Färbung für die Durchflusszytometrie bei 37°C beiseitegestellt.

Der linke Lungenflügel zusammen mit dem rechten Mittellappen wurden in einer Petrischale mechanisch zerkleinert und in 2,5 ml einer vorbereiteten Enzymlösung (Tabelle 3.3) in einem 50 ml Falcon bei 37°C und 70 rpm im Dunkeln in einem Thermoschüttler zum enzymatischen Verdau inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte und Inkubationen mit den Lungenproben des Migrationsversuches fanden aufgrund der intravenösen Applikation des Fluoreszenz-markierten Antikörpers zu Beginn der Organentnahme im Dunkeln statt. Die Lungenproben wurden nach erfolgter Inkubation in der Enzymlösung mithilfe des Konus einer 5 ml Spritze durch ein Zellsieb mit 70 µm bzw. 100 µm Porendurchmesser (70 µm im Migrationsversuch, 100 µm im MFI-Versuch, damit die größeren Endothelzellen mit durchgespült werden) in ein neues 50 ml Falcon gedrückt und das Sieb mit 20 ml PBS⁻ gespült. Diese Zellsuspension wurde anschließend 10 Minuten bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet zur Lyse der Erythrozyten mit 2,5 ml Lysepuffer (Tabelle 3.4) resuspendiert. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurde die Lyse durch die Zugabe von 10 ml Färbepuffer (FP) (Tabelle 3.5) gestoppt und die Suspension erneut unter den selben Bedingungen zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml FP für Proben ohne LPS und 2 ml für Proben mit LPS resuspendiert. Die Bestimmung der Gesamtzellzahl erfolgte analog zur Zellzählung des Blutes.

Die BAL wurde zunächst ebenfalls 10 Minuten bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand für weitere Versuche abgenommen und bei -80°C gelagert. Das Zellpellet wurde in 330 µl FP bei Proben ohne LPS und 500 µl bei Proben mit LPS resuspendiert. Anschließend erfolgte ebenfalls die Bestimmung der Gesamtzellzahl analog zu den Blut- und Lungenproben.

Tabelle 3.3: Enzymlösung (Zusammensetzung für eine Probe).

Substanz	Menge
Collagenase	2,5 µl
DNase	2,5 µl
Hyaluronidase	2,5 µl
PBS ⁻	2,5 ml

3 Methoden

Tabelle 3.4: Lysepuffer (Zusammensetzung für 250 ml).

Substanz	Menge
NH ₄ CL	2,006 g
NaHCO ₃	0,21 g
Disodium EDTA	0,093 g
Aqua dest.	250 ml

Tabelle 3.5: Färbepuffer (Zusammensetzung für 500 ml).

Substanz	Menge
PBS ⁻	1 Tablette
Bovines Serum Albumin (BSA)	5 g
NaN ₃ -Lösung 20 %	2,5 ml
Aqua dest.	500 ml

3.6 Inflammationsmodell der Ventilator-induzierten Lungenschädigung

Für die Ventilation der Tiere wurden diese zunächst, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, narkotisiert und nach Einsetzen der chirurgischen Toleranz in Rückenlage an Pfoten und Kopf fixiert, sodass der Hals überstreckt war. Anschließend wurde das Fell mit Paraffinöl benetzt, die Haut stumpf ab präpariert und die Trachea freigelegt, sodass ein Venenverweilkatheter als Tubus eingesetzt und mittels Nähgarns fixiert werden konnte. Es folgte eine Druckkontrollierte mechanische Ventilation bei einem inspiratorischen Drucklevel von 15 mbar als Normaldruck, bzw. 45 mbar als Überdruck mit 100% Sauerstoff über einen Zeitraum von sechs Stunden. Für die anschließende histologische Verarbeitung der Lungen, wurden die Tiere nach Ablauf der sechs Stunden wie in Abschnitt 3.8.4.1 detailliert beschrieben ausgeblutet, die Lungen fixiert, entnommen und weiterverarbeitet.

3.7 Durchflusszytometrie

3.7.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie, auch fluorescence activated cell scanning (FACS), ist ein Analyseverfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von Zellen über deren Größe und Granularität. Zudem können durch die Verwendung von Fluoreszenz-markierten Antikörpern spezifisch Proteine innerhalb der Zellen und auf deren Oberfläche markiert werden.

Für die Analyse wird die zu messende Zellsuspension über eine Nadel in einer zellfreien Trägerlösung eingesaugt (Abbildung 3.3 A). Der Probenstrom wird von einem Hüllstrom aus Trägerlösung umflossen, der den Probenstrom verdünnt und zentriert, jedoch nicht mit ihm vermischt. Zusammen mit der Verjüngung der Messküvette führt dies zur Beschleunigung des Probenstroms und zu einer Abstandsvergrößerung zwischen den Zellen. So wird gewährleistet, dass am Analysepunkt in der Messküvette einzelne Zellen den Laserstrahl passieren, der dort auf den Flüssigkeitsstrom trifft. Die Messung erfolgt mittels Detektorlinsen. Ein Detektor misst das Vorwärtsstreulicht (FSC), einen sehr geringen Winkel, der von der Zelle gestreut wird und durch die Lichtbeugung des auf die Zelle treffenden Lichtes entsteht und ein relatives Maß für die Größe der Zelle darstellt. Ein weiterer Detektor misst das im 90°-Winkel abgelenkte Licht, welches durch Lichtbrechung entsteht und Seitwärtsstreulicht (SSC) genannt wird. Dieses gibt Hinweise auf die intrazelluläre Granularität der gemessenen Zelle. Durch das gegenseitige Auftragen von FSC und SSC lassen sich einzelne Zellpopulationen voneinander abgrenzen (Abbildung 3.3 B). So sind Lymphozyten beispielsweise klein und wenig granulär, während Monozyten bei ähnlicher Granularität deutlich größer sind und Granulozyten vor allem durch eine hohe Granularität abgrenzbar sind.

Zusätzlich zu den Streulichteigenschaften können in der Durchflusszytometrie Fluoreszenzsignale detektiert und quantifiziert werden, wenn die gemessenen Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gefärbt wurden. Fluoreszenz ist die Eigenschaft eines Stoffes, Licht einer gewissen Wellenlänge zu absorbieren und nach einem Abfall auf ein energetisch niedrigeres Niveau langwelligere Lichtsignale zu emittieren. Diese Lichtsignale werden von speziellen Detektoren gemessen. Die MFI ist dabei proportional zur Anzahl gebundener Fluorochrom-Moleküle auf den Zellen. Da die Absorptions- und Emissionsspektren je nach Fluorochrom in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen liegen (Abbildung 3.4), wurde beim Erstellen der Antikörpermixe darauf geachtet, dass sich die Emissionsspektren der verwendeten Fluorochrome möglichst wenig überschneiden. Werden, wie in dieser Arbeit pro Antikörpermix bis zu sieben Antikörper verwendet,

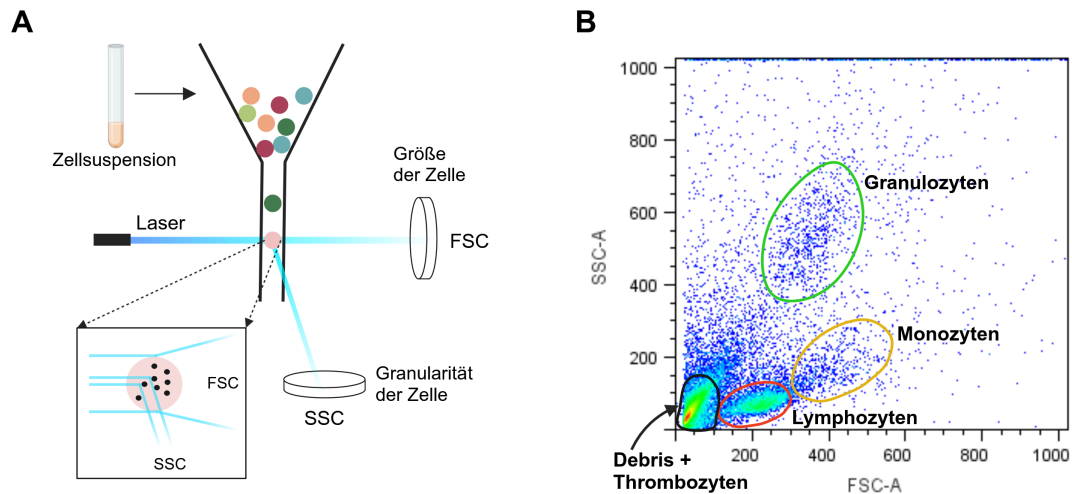


Abbildung 3.3: **Prinzip der Durchflusszytometrie.** A) Schematische Darstellung der Messkammer eines Durchflusszytometers mit Laser und Detektoren. Die Zellen passieren einzeln den Laserstrahl, das Vorwärtstreulicht (FSC) gibt die Größe der Zelle an und das Seitwärtstreulicht (SSC) ist ein Maß für die Granularität der Zelle. B) Punktdiagramm der durchflusszytometrischen Analyse einer Lungenprobe mit Angabe wo verschiedene Zellpopulationen, gemessen an Größe und Granularität, zu erwarten sind. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com. <https://BioRender.com/f26s049>.

lässt sich eine spektrale Überlappung beispielsweise durch APC-Einstrahlungen in den Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP)-Kanal kaum vermeiden. Um die Analyse dadurch nicht zu beeinträchtigen, wurde eine Kompensation durchgeführt.

3.7.2 Kompensation

Bei der Verwendung mehrerer Fluoreszenzsignale, kann es zu spektralen Überschneidungen kommen. Dabei wird die Fluoreszenz von mehr als einem Fluorochrom detektiert. Zur Korrektur dieser Überschneidungen wird eine Kompensation durchgeführt (McKinnon, 2018; Cossarizza *et al.*, 2019). Dies stellt sicher, dass die durch einen bestimmten Detektor aufgenommene Fluoreszenz nur von dem gesuchten Fluorochrom stammt.

Die Kompensation erfolgte rechnerisch durch die Subtraktion der Emission zweier sich spektral überlappender Fluorochrome. Für die Berechnung wurden Einzelfärbungen für jedes verwendete Fluorochrom angefertigt und am Durchflusszytometer gemessen. Anschließend wurde mit der Auswertungssoftware FlowJo7 für jede Einzelfärbung die negative (keine messbare Emission) und die positive Population (messbare Emission) bestimmt. Aus den erhaltenen Werten generierte die Software eine Matrix, anhand der die Kompensation

3 Methoden

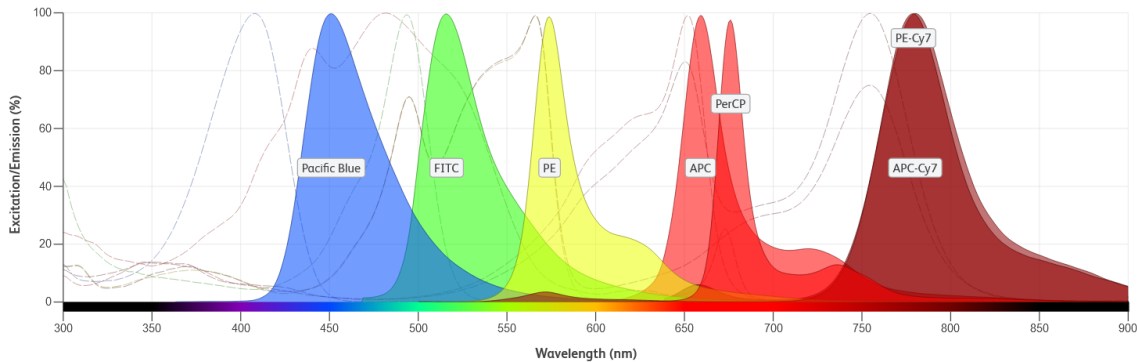


Abbildung 3.4: **Absorptions- und Emissionsspektren der FACS-Fluorochrome.** Darstellung der Absorptions- und Emissionsspektren der in der *fluorescence activated cell scanning* (FACS)-Analyse verwendeten Farben Pacific Blue, Fluorescein Isothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC), Peridinin-Chlorophyll-Protein (PerCP), APC/Cyanin 7 (Cy7) und PE/Cy7. Darstellung erstellt mit dem *Spectrum Viewer* von BD (<https://www.bdbiosciences.com/en-us/resources/bd-spectrum-viewer>).

berechnet wurde. Die Kompensationsmatrix wurde vor jeder Auswertung auf alle Proben angewandt, um eine Analyse mit höchstmöglicher Sensitivität zu gewährleisten.

3.7.3 Probenvorbereitung

3.7.3.1 Färbung für die Migrationsanalyse

Wie bereits in Abschnitt 3.4 beschrieben, wurde den Tieren für den Migrationsversuch vor Beginn der Organentnahme i.v. ein APC-konjugierter Ly6G Antikörper, bzw. bei den Catchup-Tieren ein APC-konjugierter Ly6C Antikörper injiziert. Dies diente der Unterscheidung zwischen den Neutrophilen, die am Endothel adhären (Ly6G/Ly6C-APC⁺) und den im Interstitium befindlichen Neutrophilen (Ly6G/Ly6C-APC⁻). Aufgrund dessen wurden alle folgenden Arbeitsschritte mit diesen Proben im Dunkeln vorgenommen.

Für die Färbung wurde zunächst 50 µl des Antikörpermixes (Tabelle 3.6), bzw. (Tabelle 3.7) in FACS-Röhrchen vorgelegt. Anschließend wurden 25 µl Vollblut oder 100 µl der in Abschnitt 3.5 hergestellten Zellsuspensionen aus den Lungenproben oder der BAL hinzu pipettiert. Dies wurde geschüttelt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Zusätzlich wurde den Blutproben bereits nach 20 Minuten 1 ml Erythrozyten-Lyse zugegeben und diese 10 Minuten inkubiert. Zum Entfernen der überschüssigen ungebundenen Antikörper, sowie des Lysepuffers in den Blutproben wurde in allen FACS-Röhrchen FP hinzugefügt, sodass in allen Proben ein Gesamtvolumen von 2 ml vorhanden war. Anschließend wurde für 10 Minuten bei 1300 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach zwei weiteren Waschschritten mit jeweils 1 ml FP wurden die Proben mit 400 µl Cellfix, bestehend aus FP

3 Methoden

und Paraformaldehyd 4% im Verhältnis 1:1, fixiert. Bis zur Analyse konnten die Proben so bei 4°C im Dunkeln bis zu 24 Stunden aufbewahrt werden.

Tabelle 3.6: Antikörpermix für den Migrationsversuch (Zusammensetzung für ein Probenröhrchen).

Antikörper	Fluorochrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl
Ly6G	PE/Cy7	1 µl
CD41	APC/Cy7	1 µl
Färbepuffer (FP)		47 µl

Tabelle 3.7: Antikörpermix für den Migrationsversuch in Catchup-Tieren (Zusammensetzung für ein Probenröhrchen).

Antikörper	Fluorochrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl
Ly6C	APC/Cy7	1 µl
CD11b	PE/Cy7	1 µl
FP		47 µl

3.7.3.2 Färbung zur Quantifizierung der Adhäsionsmoleküle

Für den *in vivo* Migrationsversuch zur Quantifizierung der Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen, Thrombozyten und Endothelzellen musste aufgrund der hohen Anzahl an verwendeten Antikörpern auf eine Unterscheidung zwischen am Endothel adhären und sich im Interstitium befindlichen Neutrophilen verzichtet werden.

Der Färbeprozess verlief analog zur Färbung der Proben im Migrationsversuch beschrieben in Abschnitt 3.7.3.1. Allerdings wurde hierfür jede Probe aus Blut und BAL mit drei verschiedenen Antikörpermixen gefärbt und die Lungenproben mit fünf Antikörpermixen. In Blut und BAL wurden Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen und Thrombozyten untersucht, auf den Lungenproben zusätzlich auf Endothelzellen. Außerdem mussten für die Untersuchung der Adhäsionsmoleküle auf den Neutrophilen der Catchup-Tiere andere Antikörpermixe verwendet werden, da das Ly6G, wie bereits beschrieben, auf den Neutrophilen dieser Tiere gentechnisch verändert wurde und dadurch als spezifischen Marker ausscheidet. Die genutzten Antikörpermixe werden in Tabellen 3.8, 3.9, 3.10, 3.11 aufgeführt.

3 Methoden

Tabelle 3.8: Antikörpermix 1 (links) und 2 (rechts) zur Untersuchung der Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen in Blut, Lunge und bronchoalveolärer Lavage (BAL) der WT- und PF4-Tiere (Zusammensetzung für ein Probenröhrchen).

Antikörper	Fluorochrom	Menge	Antikörper	Fluorochrom	Menge
LFA-1	APC	1 µl	ADAM10	APC	1 µl
CD44	FITC	1 µl	ADAM17	PE	0,5 µl
CD162	PE	1 µl	Ly6G	PE/Cy7	1 µl
Ly6G	PE/Cy7	1 µl	CD45	PerCP	1 µl
CD45	PerCP	1 µl	CD11b	Pacific Blue	1 µl
CD62L	Pacific Blue	1 µl	FP		45,5 µl
FP		44 µl			

Tabelle 3.9: Antikörpermix 1 (links) und 2 (rechts) zur Untersuchung der Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen in Blut, Lunge und BAL der Catchup-Tiere (Zusammensetzung für ein Probenröhrchen).

Antikörper	Fluorochrom	Menge	Antikörper	Fluorochrom	Menge
LFA-1	APC	1 µl	ADAM10	APC	1 µl
Ly6C	APC/Cy7	1 µl	Ly6C	APC/Cy7	1 µl
CD44	FITC	1 µl	ADAM17	PE	0,5 µl
CD162	PE	1 µl	CD11b	PE/Cy7	1 µl
CD11b	PE/Cy7	1 µl	CD45	PerCP	1 µl
CD45	PerCP	1 µl	FP		44,5 µl
CD62L	Pacific Blue	1 µl			
FP		43 µl			

Tabelle 3.10: Antikörpermix 3 zur Untersuchung der Adhäsionsmoleküle auf Thrombozyten in Blut, Lunge und BAL (Zusammensetzung für ein Probenröhrchen).

Antikörper	Fluorochrom	Menge
ADAM10	APC	1 µl
CD41	APC/Cy7	1 µl
CD44	FITC	1 µl
ADAM17	PE	0,5 µl
CD62P	PE/Cy7	1 µl
CD45	PerCP	1 µl
FP		44,5 µl

3 Methoden

Tabelle 3.11: Antikörpermix 4 (links) und 5 (rechts) zur Untersuchung der Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen in der Lunge (Zusammensetzung für ein Probenröhrchen).

Antikörper	Fluorochrom	Menge	Antikörper	Fluorochrom	Menge
CD102	APC	1 µl	ADAM10	APC	1 µl
CD31	FITC	1 µl	CD31	FITC	1 µl
CD162	PE	1 µl	ADAM17	PE	0,5 µl
CD45	PerCP	1 µl	CD45	PerCP	1 µl
			CD54	Pacific Blue	1 µl
FP		44 µl	FP		45,5 µl

3.7.4 Messung

Die Messung erfolgte am FACSCanto™ II Flow Cytometer von BD Bioscience mit der zugehörigen Software FACSDiva. Die Optik dieses Gerätes besteht aus einem violetten (405 nm, 30 mW solid state), einem blauen (488 nm, 29 mW solid state) und einem roten (633 nm, 17 mW HeNe) Laser deren Lichtstreuung und Fluoreszenzsignal nach Durchschreiten der Messküvette durch die spektralen Filter zu den Detektoren geleitet wurden. Um sicherstellen zu können, dass die Messung seitens des Gerätes und der Laser standardisiert ablief, wurde vor jeder Messung ein Cytometer Setup mit Hilfe von Cytometer Setup and Tracking Beads durchgeführt. Damit fand eine geräteinterne Baseline-Laserkalibrierung statt.

Abbildung 3.3 B zeigt das bei einer Messung entstehende Bild eines Punktdiagrammes. Ein Punkt entspricht einer einzelnen gemessenen Zelle und wird als *Event* bezeichnet. Für die Messung wurde ein Gate gesetzt, um den *Debris* auszuschließen. Es wurde definiert, dass jede Probe so lange gemessen werden soll, bis innerhalb des Gates 10.000 Events gezählt worden sind. Die Flussrate wurde während der Messung auf *Medium* eingestellt und sichergestellt, dass ein maximaler Threshold von 1000 Events pro Sekunde nicht überschritten wurde, um Messungenauigkeiten zu vermeiden.

3.7.5 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo-Software. In Abbildung 3.5 A+B wird die Gatingstrategie zur Auswertung der Neutrophilen anhand einer Lungenprobe exemplarisch veranschaulicht. Zunächst wurden aus den gemessenen Zellen anhand der Größe und Granularität im FSC/SSC-Plot die Leukozytenpopulation gated und daraus die CD45⁺ Zellen

identifiziert. Für die WT- und PF4-Tiere wurden aus dieser Population heraus anschließend die Ly6G⁺ Neutrophilen zur weiteren Analyse determiniert. Für die Catchup-Tiere wurde ein an die von Hasenberg *et al.* beschriebene Gatingstrategie angelehntes Gating verwendet (Hasenberg *et al.*, 2015). Zunächst wurden die Ly6C^{med} Zellen aus der Analyse ausgeschlossen und aus den übrigen die CD11b⁺ Zellen als Neutrophile identifiziert. Für die Unterscheidung von am Endothel adhärenenten Neutrophilen und solchen, die bereits ins Interstitium eingewandert sind, wurde des weiteren in den Lungenproben zwischen Ly6G^{+/+} (am Endothel) und Ly6G^{+/-} (Interstitium) unterschieden, bzw. in den Catchup-Tieren zwischen Ly6C^{+/+} und Ly6C^{+/-}.

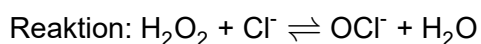
Aufgrund der limitierten Anzahl an Antikörpern, die pro Färbeansatz verwendet werden können, wurde für die Identifikation von PNCs eine Änderung am Gating der Neutrophilen vorgenommen und verglichen (Abbildung 3.5 C). Dazu wurden zunächst im SSC/CD45 Plot CD45⁺ Zellen mit der entsprechenden Granularität als Neutrophile identifiziert und daraus anschließend die CD41⁺ Zellen als PNCs determiniert. Die vereinfachte Strategie für die PNCs lieferte annähernd gute Werte, wie das für Neutrophilen verwendete Gating.

Für die Thrombozyten wurde zunächst ebenfalls der FSC/SSC-Plot genutzt und daraus die CD45⁻ Bestandteile identifiziert. Innerhalb dieser Population wurden die CD41⁺ Thrombozyten zur Analyse der Adhäsionsmoleküle determiniert (Abbildung 3.5 D). Die Endothelzellen wurden direkt aus der gemessenen Gesamtpopulation als CD45⁻/CD31⁺ Zellen heraus identifiziert und auf diesen die Adhäsionsmoleküle untersucht.

3.8 Proteinanalysen

3.8.1 MPO

Das Enzym Myeloperoxidase (MPO) kommt charakteristisch im Lumen des Phagosoms von Neutrophilen vor. Sie katalysiert während des oxidativen Bursts die chemische Reaktion der Bildung von Hypochloritionen und Wasser aus Wasserstoffperoxid und Chlorid.



Hypochloritionen gehören zu den ROS, oxidieren diverse Biomoleküle und spielen dadurch eine Rolle bei der Aufnahme apoptotischen Materials der Neutrophilen und wirken mikrobizid (Hampton *et al.*, 1998; Akong-Moore *et al.*, 2012).

3 Methoden

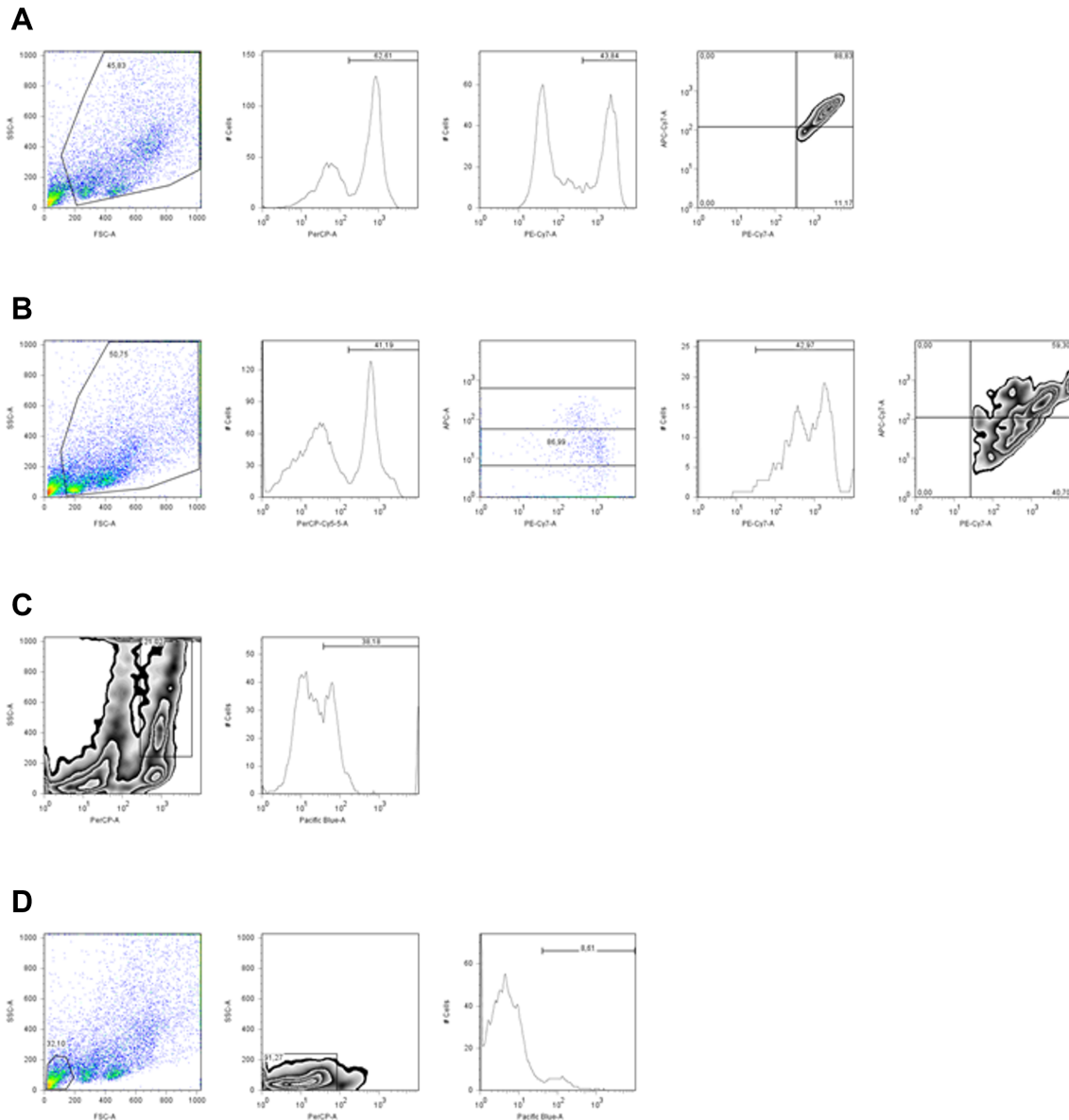


Abbildung 3.5: **Gatingstrategie für Neutrophile, Thrombozyten und PNCs.** (A) Gating der Neutrophilen von WT- und PF4-Tieren am Beispiel einer Lungenprobe. Zunächst werden die Leukozyten anhand der Größe und Granularität gefiltert, anschließend daraus die CD45⁺-Zellen identifiziert. Aus dieser Population wurden Ly6G⁺ Neutrophile identifiziert und nach endothelial adhären und interstitiell aufgeteilt. (B) Neutrophilen-Gating der Catchup-Tiere zunächst anhand der Größe und Granularität, sowie CD45. Anschließend wurden Ly6G^{med} Zellen aus der Analyse ausgeschlossen und aus den verbleibenden die CD11b⁺ Neutrophilen identifiziert. Ebenfalls Trennung nach endothelial adhären und interstitiell. (C) Gating der Thrombozyten-Neutrophilen-Komplexe (PNCs) durch Identifikation der Neutrophilen über Granularität und CD45. CD41⁺ Events in dieser Population wurden als PNC identifiziert. (D) Gating der Thrombozyten begonnen über Größe und Granularität. Folgend wurden die Thrombozyten als CD45⁺ und CD41⁺ identifiziert.

3 Methoden

Der Nachweis der MPO-Freisetzung wurde in den Überständen der BAL durchgeführt, dient dem indirekten Nachweis der Aktivität von Neutrophilen und wurde mit Hilfe des MPO-Substrates 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) erbracht. Nach der enzymatischen Reaktion entsteht das grünliche ABTS-Kation, dessen Farbintensität proportional zur Menge an vorhandenem Enzym steht. Für die Messung wurden 50 µl Probe mit 50 µl Citratpuffer und 100 µl ABTS, gelöst in Citratpuffer und Aqua destilliert (dest.), in die Wells einer 96-Wellplatte pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen. Nach der Inkubation wurde mit dem TECAN Microplate Reader die Farbintensität bei 405 nm photometrisch gemessen.

3.8.2 BCA

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration im Überstand der BAL erfolgte mit Hilfe des Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit von Thermo Scientific. In alkalischer Umgebung reduzieren Proteine Cu^{2+} zu Cu^{+} . Die entstehenden Kupferkationen bilden daraufhin einen Komplex mit BCA, der eine violette Farbe hat. Die Farbintensität ist proportional zur in der Probe vorhandenen Menge an Protein und kann bei 562 nm photometrisch nachgewiesen werden.

Vor der photometrischen Messung wurden 25 µl Probe mit 200 µl BCA-Lösung, welche nach Herstellerangaben aus zwei Lösungen gemischt wurde, in die Wells einer 96-Wellplatte pipettiert und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde eine Albumin Standardreihe verwendet, die im Kit mitgeliefert wurde. Standard und Proben wurden als Duplikate pipettiert und gemessen. Die photometrische Messung fand mit dem TECAN Microplate Reader statt.

3.8.3 ELISA

3.8.3.1 Prinzip

Der ELISA ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren für Proteine, basierend auf einer enzymatischen Farbreaktion. In dieser Arbeit wurde für den Nachweis von Zytokinen, Chemokinen und HMGB-1 das Assaysystem des Sandwich-ELISA genutzt, bei welchem das Zielantigen mit zwei spezifischen Antikörpern nachgewiesen wird, die an unterschiedliche

3 Methoden

Epitope des Antigens binden. Abbildung 3.6 zeigt den Aufbau eines solchen Sandwich-ELISAs. Der Capture-Antikörper wird mit seinem Fc-Abschnitt an eine feste Phase gebunden, sodass er über den Fab-Abschnitt spezifisch das nachzuweisende Antigen an diese feste Phase bindet. Der über eine Streptavidin-Biotin-Bindung mit einem Enzym (hier Meerrettichperoxidase (HRP)) markierten Detektor-Antikörper bindet wiederum an das Antigen. Durch Zugabe eines Substrates wird durch das Enzym eine Farbreaktion katalysiert, die proportional zum gebundenen Antikörper und damit zur Menge an Antigen in der Probe ist. Mittels einer Standardkurve mit bekannter Antigenkonzentration als Kalibrierung werden quantitative Messungen erzielt.

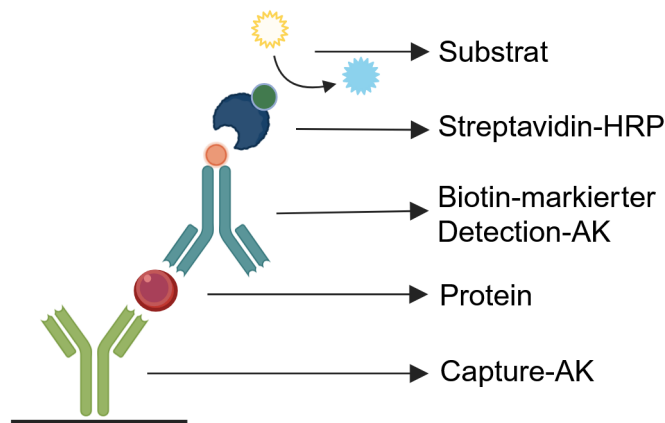


Abbildung 3.6: **Prinzip des Sandwich-ELISA.** Schematische Darstellung des Antikörper-Antigen-Komplexes im Sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Der Capture-Antikörper, angeheftet an das Reaktionsgefäß, bindet das gesuchte Protein. Der Biotin-markierte Detektionsantikörper bindet anschließend ebenfalls an das gesuchte Protein. Das an Streptavidin gebundene Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) setzt das Substrat um, was zu einem Farbumschlag von transparent zu blau führt. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com. <https://BioRender.com/q29w742>.

3.8.3.2 Durchführung

Für die in dieser Arbeit vorgenommenen ELISAs wurden Antikörper Kits von R&D Systems verwendet und die Durchführung erfolgte laut Herstellerangaben. Zunächst wurde eine 96-Wellplatte gecoatet, wofür der Capture-Antikörper in PBS⁻ gelöst wurde, 100 µl pro Well pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde die Platte drei Mal mit je 300 µl Waschpuffer (0,05 % Tween in PBS⁻) gewaschen. Anschließend erfolgte das Blocken freier unspezifischer Bindungsstellen mit 150 µl Reagent Diluent (1%-iges bovines Serumalbumin (BSA)) für eine Stunde. Danach wurden, analog zum ersten Waschen, die Well vom Reagent Diluent gesäubert und 100 µl der im Kit enthaltenen

3 Methoden

und zuvor hergestellten Standardreihe oder der Probe in die Wells pipettiert. Sowohl Standard als auch die Proben wurden als Duplikate aufgetragen. Als Proben dienten die bei -80°C gelagerten Überstände der BAL. Nach zweistündiger Inkubation wurde wieder gewaschen und pro Well 100 μl des Biotin-gekoppelten Detektor-Antikörpers aufgetragen. Dieser wurde wiederum zwei Stunden inkubiert und die Platte daraufhin gewaschen. Die Katalyse der Farbreaktion erfolgte mittels Streptavidin-konjugierter HRP. 100 μl der Enzymlösung wurden pro Well pipettiert und für die Bindung zwischen Biotin und Streptavidin 20 Minuten lang im Dunkeln inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift erfolgte die Zugabe von 100 μl Substratlösung bestehend aus Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:1, welches weitere 20 Minuten inkubiert wurde. In dieser Zeit erfolgte der Farbumschlag durch die enzymatische Reaktion nach türkisblau. Das hinzu pipettieren von 50 μl Stopplösung, bestehend aus Schwefelsäure, nach der Inkubation stoppte die Farbreaktion durch Hemmen der HRP und führte zu einem Farbumschlag von blau nach gelb.

3.8.3.3 Messung und Auswertung

Die Messung erfolgte mit einem TECAN Microplate Reader bei den Wellenlängen 450 nm und 540 nm. Die Daten wurden direkt am Gerät ausgewertet, wobei die Referenzdaten bei 540 nm von den Messdaten bei 450 nm zunächst subtrahiert wurden, um optische Unvollkommenheiten der Platte zu korrigieren. Anschließend wurde eine Leerwertreduktion vorgenommen, um etwaige optische Einflüsse der Trägerlösung herauszurechnen. Mit diesen Werten wurde mit Hilfe der Standardreihe eine Regressionsanalyse durchgeführt und zuletzt der Mittelwert aus den Duplikaten berechnet.

3.8.4 Immunhistochemie

3.8.4.1 Probengewinnung

Die Narkose, die Eröffnung des Thorax, das Spülen des Blutkreislaufes und die Intubation erfolgte analog zum operativen Vorgehen des *in vivo* Migrationsversuches (Abschnitt 3.4). Über den Tubus wurden die Lungen zum Fixieren der Lungenarchitektur für 10 Minuten mit Formalin 4% mit einem Druck von 30 cmH_2O gefüllt und von außen ebenfalls mit Formalin 4% beträufelt. Anschließend wurde das Herz-Lungen-Paket entnommen und die beiden Lungenflügel getrennt voneinander in Einbettkassetten überführt. Die vollständige Gewebefixierung durch leichte Denaturierung und Vernetzung der Proteine erfolgte beim Einlegen der Lungen in Formalin 4% über Nacht (Lüllmann-Rauch und Paulsen, 2012).

Für die immunhistologischen Präparate des Transmigrationsassays wurden nach Beenden des Versuchs die Inserts über Nacht in Formalin 4% fixiert und anschließend die Netze vom restlichen Insert entfernt und in Einbettkassetten überführt.

3.8.4.2 Histologische Aufarbeitung

Nach der Fixierung wurden die Präparate in einem Einbettkarussell für 18 Stunden in einer Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration (50-100%) und schließlich in Xylol entwässert. Dieser Entwässerungsprozess ist notwendig, da Paraffin, in welchem die Präparate eingebettet werden, nicht wasserlöslich ist. Wäre noch Wasser im Gewebe vorhanden, könnte dort kein Paraffin eindringen und das Gewebe würde beim Schneiden zerstört werden. Die Paraffin-durchtränkten Präparate wurden in Paraffinblöcke eingebettet und im Anschluss mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms 3 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger überführt und für mehrere Stunden auf einer Wärmeplatte getrocknet.

3.8.4.3 Immunhistochemische Färbung der Neutrophilen und PNCs

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Präparate zunächst in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Ethanolreihe und schließlich Aqua dest. rehydriert (Tabelle 3.12). Mit einer Lösung aus 200 ml Methanol und 3 µl Wasserstoffperoxid 30 % wurde im Anschluss für 30 Minuten die endogene Peroxidase geblockt. Anschließend wurden die Schnitte, wie im Folgenden nach jedem Arbeitsschritt für 10 Minuten in PBS⁻ gespült. Die Demaskierung der Antigene für eine erfolgreiche Bindung der Antikörper erfolgte durch das Aufkochen der Präparate in einer Demaskierungslösung für 10 Minuten und einer anschließenden Abkühlung der Proben in der Lösung auf Raumtemperatur für eine Stunde. Im Folgenden wurden die Präparate für eine Stunde in einer Avidin-Blocking-Lösung inkubiert, um endogenes Avidin zu blockieren und so eine unspezifische Färbung zu verhindern. Über Nacht wurde der Primärantikörper Ly6G/C (rat-anti-mouse; 1:500), mit einer Biotin-Blocking-Lösung in BSA 1 % gelöst, bei 4°C auf den Schnitten inkubiert. Zusätzlich wurde bei jedem Färbedurchgang eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper und eine IgG-Kontrolle mit einem normal rat IgG Antikörper mitgeführt. Die IgG-Kontrolle wird benötigt, da als vollständig vorliegende Antikörper die Primärantikörper an Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche von Leukozyten binden und dadurch Ursache für Hintergrundsignale sein können. Die IgG-Kontrolle bildet diesen Hintergrund ab und dient damit als Negativkontrolle.

3 Methoden

Als sekundärer Antikörper diente ein biotinylierter rabbit anti-rat IgG Antikörper (1:500) aus dem ABC-Kit von Vectastain und wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur auf den Präparaten inkubiert. Außerdem in dem Kit enthalten waren zwei Lösungen, die im Verhältnis 1:1 gemischt wurden und einen Avidin-Biotin-Komplex bildeten, welcher an HRP konjugiert ist. Diese Lösung wurde für 30 Minuten lichtgeschützt auf den Schnitten inkubiert, währenddessen der Avidin-Biotin-Komplex an den Sekundärantikörper binden konnte. Als Substrat für die HRP diente 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) aus dem Vectastain Peroxidase Substrat Kit und wurde für 3 Minuten inkubiert. Durch die Oxidation des DAB entstand ein wasserunlöslicher, bräunlicher Farbstoff, der über Ly6G/C spezifisch Neutrophile anfärbte.

Für die Färbung von PNCs wurden die Schnitte erneut eine Stunde mit der Avidin-Blocking-Lösung inkubiert und ein zweiter Primärantikörper gegen CD41 (rabbit anti-mouse; 1:500) als Marker für Thrombozyten aufgetragen. Nach zwei Stunden Inkubation bei Raumtemperatur folgte der biotinylierte Sekundärantikörper goat-anti-rabbit IgG (1:500) und nach einer einstündigen Inkubation wurde der HRP-konjugierte Avidin-Biotin-Komplex aufgetragen. Nach 30 Minuten wurde zum Anfärben der Thrombozyten Histogreen als HRP-Substrat verwendet. Die Färbezeit betrug vier Minuten gefolgt von einem Waschvorgang in PBS⁻ und zwei weiteren Waschschritten in Aqua dest..

Anschließend wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit filtriertem Mayer's Hämalaun für 10 Sekunden vorgenommen und die Präparate daraufhin in aufsteigender Ethanolreihe (Tabelle 3.12) dehydriert. Zur Konservierung wurden die gefärbten Lungenschnitte zuletzt in Eukitt eingedeckt und mindestens 24 Stunden getrocknet.

Die Bildgebung erfolgte mit einem Inversmikroskop und der Software Axiovision SE64 REL 4.9. Verwendet wurde ein 40x Objektiv mit Öl und 1,6x Zoomfaktor.

Tabelle 3.12: Ethanolreihe

Substanz	Zeit
Xylol	3x 7 Minuten
100 % Ethanol	2x 5 Minuten
96 % Ethanol	2x 5 Minuten
70 % Ethanol	2x 5 Minuten
Aqua dest.	10 Minuten

3.8.5 Immunfluoreszenz

Um die Präparate anfärben zu können, wurde zunächst die in Tabelle 3.12 beschriebene Ethanolreihe zur Rehydrierung der Präparate durchgeführt. Anschließend folgte die Demaskierung der Antigene durch Kochen der Präparate in einer Demaskierungslösung für 10 Minuten und einer Stunde Abkühlen. Nach jedem folgenden Arbeitsschritt wurden die Schnitte 10 Minuten in PBS⁻ gespült. Die nächsten Schritte waren die Fixierung der Zellen für 10 Minuten in Methanol, Permeabilisieren der Zellwand für 3 Minuten in 0,1% Triton-X und Blocken mit 5%-igem BSA in PBS⁻ für eine Stunde. Über Nacht erfolgte die Inkubation der ersten Primärantikörper bei 4°C. In Tabelle 3.13 sind die jeweiligen Färbepanels mit Primärantikörpern, Sekundärantikörpern und den Farbkonjugaten aufgeführt.

Tabelle 3.13: Färbepanels für die Immunfluoreszenzaufnahmen muriner Lungenschnitte und des *in vitro* Transwell-Migrationsassays.

Färbung Nr	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Konjugat
1	JAM-A rabbit anti-human/mouse	donkey anti-rabbit	Alexa 546
	CD62L mouse anti-human	donkey anti-mouse	Alexa 488
	CD45 mouse anti-human	goat anti-mouse	Alexa 594
	CD41 rabbit anti-human/mouse	goat anti-rabbit	Alexa 647
2	JAM-A rabbit anti-human/mouse	donkey anti-rabbit	Alexa 488
	CD62L rat anti-mouse	chicken anti-rat	Alexa 647
	Ly6G/C rat anti-human/mouse	goat anti-rat	Alexa 546
	CD41 rabbit anti-human/mouse	goat anti-rabbit	Alexa 594
3	GPV sheep anti-mouse	donkey anti-sheep	Alexa 647
	CD40L rabbit anti-mouse	donkey anti-rabbit	Alexa 488
	Ly6G/C rat anti-human/mouse	goat anti-rat	Alexa 546
	CD41 rabbit anti-human/mouse	goat anti-rabbit	Alexa 594
4	JAM-A rabbit anti-human/mouse	donkey anti-rabbit	Alexa 546
	VE-Cadherin goat anti-mouse	donkey anti-goat	Alexa 488
	basic Cytokeratin mouse	rabbit anti-mouse	Alexa 633
	anti-mouse		

Am nächsten Tag wurden die Präparate mit den Sekundärantikörpern, verdünnt in 1% BSA, für eine Stunde inkubiert, und anschließend eine Stunde lang in 5% BSA geblockt. Es folgte ein weiterer Färbedurchlauf mit zwei Stunden Inkubation der zweiten Primärantikörper und eine Stunde mit den zweiten Sekundärantikörpern. Danach wurden die Präparate drei Mal fünf Minuten lang in PBS⁻ gewaschen und anschließend eingedeckt. Dies wurde mit Roti®-Mount FluorCare 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) durchgeführt, welches gleichzeitig eine Kernfärbung mittels des Farbstoffes DAPI war. Zum Aushärten des Eindeckmittels wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C im Dunkeln gelagert.

Die Bildgebung erfolgte an dem konfokalen Mikroskop Stellaris 5 und der dazugehörigen Software LAS X. Die Bilder wurden mit dem 63x-Ölobjektiv aufgenommen und für die Darstellung der Neutrophilen und PNCs wurde zusätzlich ein Zoomfaktor von 3,0 verwendet.

3.9 Genexpression

Zur Quantifizierung der Genexpression in den bei -80°C gelagerten Lungenproben mittels quantitativer Echtzeit-PCR (RT-qPCR) musste zunächst die Ribonukleinsäure (RNA) aus dem Gewebe isoliert werden, wo sie intrazellulär und mit Proteinen im Komplex vorliegt. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration in jeder Probe wurde eine definierte Menge dieser im nächsten Schritt in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Mit dieser konnte anschließend die RT-qPCR für diverse Gene vorgenommen werden.

3.9.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA aus dem Gewebe erfolgte mit Hilfe von TRIzol™, ein Reagenz bestehend aus Guanidiniumthiocyanat und Phenol. TRIzol erhält die RNA durch hocheffektive Hemmung der RNase, während Zellen und deren Kompartimente bei der Homogenisierung zerstört werden (Chomczynski und Sacchi, 1987). Für die Homogenisierung der Lungenproben wurden Reaktionsgefäße mit Keramik-Kugeln und je 1 ml TRIzol vorbereitet. Die bei Raumtemperatur aufgetauten Proben wurden in die vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt und im Homogenisator bei 5500 rpm für 15 Sekunden homogenisiert. Anschließend erfolgte eine Inkubationszeit von 5 Minuten bei Raumtemperatur zur Dissoziation der Nukleotidkomplexe. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform und 15 Sekunden kräftigem Schütteln wurde erneut 10 Minuten inkubiert. Zum Erreichen einer Phasentrennung wurden die Proben bei 12000x g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Dadurch entstanden drei Phasen: die untere pinke Phenol-Phase und die weiße Interphase, in welchen sich

DNA und Proteine befanden, sowie die obere wässrige Phase, welche die zu extrahierende RNA enthielt.

Nach Überführen der wässrigen Phase in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß, wurden 500 µl gekühltes Isopropanol zugegeben, gemischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Durch die Zentrifugation bei 12000x g und 4°C für 10 Minuten entstand ein weißes RNA-Pellet, welches durch Abpipettieren des Isopropanols und zweimaligem Waschen mit Ethanol (75%) gereinigt wurde. Nach dem letzten Waschen wurde der Überstand vorsichtig und sorgfältig abpipettiert und das Pellet kurz an der Raumluft getrocknet.

Gelöst wurde die RNA zuletzt in 40 µl NFW durch schwaches Schütteln auf einem Thermoblock bei 58°C für 10 Minuten. Bevor mit der isolierten RNA weitergearbeitet werden konnte, wurde sie mindestens über Nacht bei -20°C eingefroren.

3.9.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration wurde mit dem NanoDrop 2000 Spectrophotometer vorgenommen. Für die Kalibrierung wurden zunächst 2 µl NFW auf den Messsensor pipettiert und gemessen, dies wurde als Leerwert verwendet. Anschließend wurden je 2 µl Probe auf den Messsensor pipettiert und die Proben photometrisch gemessen. Zusätzlich zur Konzentration wurde die Reinheit der Proben aus der Absorption bei 260 nm und bei 280 nm bestimmt. RNA absorbiert Licht bei 260 nm, Proteine bei 280 nm. Aus diesen Werten wird der 260/280-Quotient bestimmt, welcher bei einer reinen RNA-Probe bei 2,0 liegt. Nach jeder Messung wurde der Sensor mit einem staubfreien Tuch gesäubert. Die mittlere RNA-Konzentration jeder Probe wurde als Triplikat ermittelt. Für den Umschrieb in cDNA wurden die Proben im Falle einer zu hohen Konzentration so verdünnt, dass die Konzentration zwischen 300 und 600 ng/µl lag.

3.9.3 Umschrieb der RNA in cDNA

Der Umschrieb der RNA in cDNA erfolgte mithilfe des iScript™ cDNA Synthesis Kit der Firma Bio-Rad. Zunächst wurde ein Mix aus dem 5x iScript Reaction Mix und der iScript Reverse Transkriptase im Verhältnis 4:1 vorbereitet. Für den Umschrieb wurde dann in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß zunächst NFW vorgelegt und anschließend die RNA-Suspension hinzupipettiert. Das Volumen errechnete sich anhand der gemessenen RNA-Konzentration. Eingesetzt wurde genau 1 µg der isolierten RNA und mit NFW auf ein Volumen von 15

3 Methoden

µl gebracht. Anschließend wurden pro Probe 5 µl des vorbereiteten iScript Mixes zugegeben.

Für den Umschrieb werden zwei Transkriptasen benötigt: eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die die zunächst vorhandene RNA als Vorlage für den DNA-Leitstrang nutzt und diese nach erfolgter Transkription mittels Ribonuklease-Aktivität abbaut, und eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, die anschließend den Folgestrang synthetisiert. Der beschriebene Vorgang findet in einem Thermocycler bei folgendem Programm statt: Priming für 5 Minuten bei 25°C, reverse Transkription für 20 Minuten bei 46°C und Inaktivieren der reversen Transkriptase bei 95°C für 1 Minute. Bis zur Entnahme der Proben aus dem Cycler werden die Proben auf 4°C gekühlt.

Nach dem vollendeten Umschrieb wird in jede Probe 140 µl NFW pipettiert, somit befindet sich 1 µg cDNA in 160 µl NFW. Diese wird bis zur Verwendung für die PCR bei -80°C gelagert.

3.9.4 Polymerase Kettenreaktion

3.9.4.1 Prinzip

Die Polymerase Kettenreaktion wurde 1983 von Kary Mullis beschrieben und ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren (Patent US4683202A: Process for amplifying nucleic acid sequences.). Die Amplifikation setzt sich aus drei Schritten zusammen, welche einen Zyklus bilden (Abbildung 3.7). Dieser wird mehrfach wiederholt, wobei die Menge an Nukleinsäure exponentiell wächst. Der erste Schritt eines Zyklus ist die Denaturierung des DNA-Doppelstranges bei 95°C, gefolgt von der Hybridisierung eines spezifischen Primer-Paars als zweiten Schritt. Ein Primer ist eine kurze Nukleinsäuresequenz, die an den Beginn des zu amplifizierenden Gens bindet. Abhängig vom verwendeten Primer liegt die Temperatur der Hybridisierung bei 56-67°C. Der dritte Schritt ist die Polymerisation bei 72°C, bei der eine thermostabile DNA-Polymerase den komplementären Strang synthetisiert.

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Hierfür wurde der iTaq Universal SYBR Green Supermix von Bio-Rad genutzt, welcher einen Fluoreszenzfarbstoff beinhaltet, der ungebunden nicht fluoresziert. Bei Bindung an die DNA während der Polymerisation, ändert sich jedoch seine Struktur, wodurch blaues Licht der Wellenlänge 497 nm absorbiert und grünes Licht der Wellenlänge 520 nm emittiert wird. Die Quantifizierung erfolgt über die Messung der Fluoreszenzintensität.

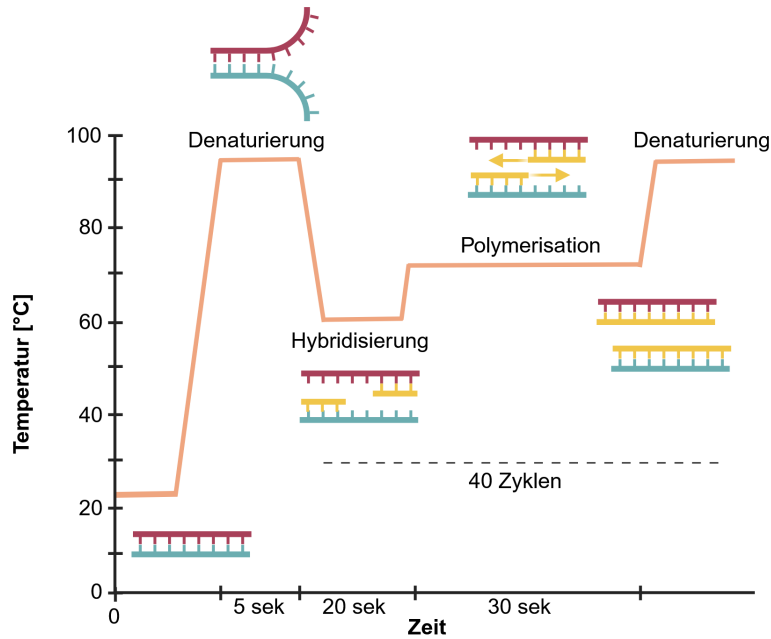


Abbildung 3.7: **Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion.** Verlaufsdigramm einer dreischrittigen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA bei 95°C zu Einzelsträngen denaturiert. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der Primer an die Einzelstränge bei 56-67°C, abhängig vom verwendeten Primer. Bei 72°C findet die Polymerisation der komplementären Stränge statt. Dieser Zyklus wird 40 Mal wiederholt und bei einer quantitativen Echtzeit-PCR (RTqPCR) wird nach jedem Zyklus die Fluoreszenzintensität zur Quantifizierung der gesuchten DNA gemessen. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com. <https://BioRender.com/o66f817>.

3.9.4.2 Durchführung

Für die RT-qPCR wurden zunächst Primer-Mixe für die verwendeten Primer-Paare und das Housekeeping-Gen 18S hergestellt. Hierfür wurden 160 µl NFW mit je 20 µl forward Primer und reverse Primer gemischt. Anschließend wurde ein PCR-Mix aus 5 µl NFW, 10 µl SYBR Green und 1 µl des Primer-Mixes pro Probe vorbereitet. Zudem wurde eine Standardreihe aus einer Probe 4 Stunden nach LPS-Inhalation mit den Verdünnungen 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 hergestellt.

Für jede Probe wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zunächst wurden 4 µl Probe, Standard oder NFW als Negativkontrolle in die Wells pipettiert und anschließend pro Well 16 µl PCR-Mix. Zuletzt wurde die Platte mit einer Folie versiegelt und abzentrifugiert.

3.9.4.3 Messung und Auswertung

Die Amplifikation und Messung der Fluoreszenzsignale fand in einem Thermocycler statt. Es wurden 40 Zyklen nach oben beschriebenem Schema durchgeführt, die Temperaturen für die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.14 einzusehen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CFX Manager Version 3.1 von Bio-Rad, wobei die Messwerte nach der $\Delta\Delta C_q$ -Methode normalisiert wurden. Die 18S-Werte dienten als Referenz, da diese effekt-unabhängig exprimiert werden.

Tabelle 3.14: Primertemperaturen

Primer	Temperatur [°C]
hCREB	58.6
hNFκB	61
hTRADD	66.5
hTRAF1	61
mNFκB	61
mTRAF2	66

3.10 *In vitro* Inflammationsmodell

3.10.1 Adhäsionsassay

Der Adhäsionsassay ist eine Methode zur Darstellung und Quantifizierung von Neutrophilen, die nach Behandlung und Stimulation an einem Monolayer aus Endothelzellen adhären. Hierfür wurden zunächst 5×10^6 human microvascular endothelial cells-1 (HMEC-1)-Zellen pro Well einer 96-Well Zellkulturplatte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Am Versuchstag wurden Neutrophile aus dem frischen Vollblut eines gesunden Probanden isoliert. Die Probanden wurden im Vorhinein aufgeklärt und die Entnahme war durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen (483/2021BO2) genehmigt. Die Blutentnahme erfolgte durch einen Arzt mithilfe einer Butterfly-Kanüle in eine Citrat-Monovette. Während das Blut auf Raumtemperatur abkühlte, wurde der zur Isolation der Neutrophilen genutzte Dichtegradient hergestellt. Dazu wurden 4 ml 72% Percoll in 15 ml Röhrchen mit

3 Methoden

rundem Boden vorgelegt und vorsichtig mit 4 ml 63% Percoll überschichtet. Zuletzt wurden 4 ml Vollblut auf das Percoll überschichtet. Nach Zentrifugation bei 1700 rpm für 30 Minuten bei Raumtemperatur und ohne Bremse sind zwei deutlich sichtbare Banden zu erkennen. Die obere Bande enthält Lymphozyten und Monozyten und in der unteren sind die gewünschten Neutrophilen. Die obere Bande wurde zusammen mit dem Überstand verworfen und die untere Bande in ein auf Eis stehendes 50 ml Falcon überführt. Zur Lyse der bei den Neutrophilen verbliebenen Erythrozyten wurden anschließend 30 ml Lysepuffer zur Zellsuspension gegeben und zehn Minuten inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 1300 rpm für zehn Minuten und 4°C, Waschen der Neutrophilen in 45 ml PBS⁻ und eine weitere Zentrifugation. Das Pellet wurde in PBS⁻ resuspendiert und die Anzahl der Zellen mithilfe Türk'scher Lösung und Neubauerzählkammer ermittelt.

Bei Behandlung der Neutrophilen mit den ADAM-Inhibitoren wurde die Zellsuspension aufgeteilt und nochmals zentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl hanks' balanced salt solution (HBSS)⁺ pro Well, beziehungsweise 5 µM GI254023X, 20 µM TAPI-1 oder 10 µM GW280264X in je 200 µl HBSS⁺ pro Well resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 290x g für zehn Minuten bei 4°C wurde der Überstand verworfen und die Zellen 30 Minuten mit CellTracker Red (10 µM) angefärbt. Anschließend folgten vier Stunden Stimulation mit LPS (100ng/ml). Nach einer weiteren Zentrifugation wurde die Zellzahl auf 3×10^5 Neutrophile pro 200 µl Neutrophilen-Medium pro Well (Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640, phenolrotfrei mit 10% fetalem Kälberserum (FCS)) eingestellt.

Bei Behandlung des Monolayers wurde das Medium zunächst abgesaugt, die Wells einmal mit HBSS⁺ gewaschen und pro Well 200 µl HBSS⁺ oder 200 µl der Inhibitoren in der oben genannten Konzentration in die Wells pipettiert, 30 Minuten inkubiert und zweimal mit HBSS⁺ gewaschen. Es folgte die Stimulation der Zellen in LPS (100 ng/ml) für vier Stunden. In diesem Fall wurden die Neutrophilen lediglich mit CellTracker Red angefärbt.

Die Endothelzellen wurden nochmals zweimal mit HBSS⁺ gewaschen und daraufhin die Neutrophilen 30 Minuten bei 37°C auf dem Monolayer inkubiert. Nach weiterem zweimaligem Waschen wurden pro Well 200 µl des Neutrophilen-Mediums hinein pipettiert.

Die Bildgebung erfolgte mit dem Mikroskop DM-IRB von Leica und der Software Zen. Die Bilder wurden mit einem 10x Objektiv aufgenommen und die Auszählung der Zellzahl wurde mit Hilfe von ImageJ vorgenommen.

3.10.2 Transmigrationsassay

In Abbildung 3.8 wird der Aufbau des genutzten Assayformats für den *in vitro* Transmigrationsassay gezeigt. Im Insert wurden Endothelzellen kultiviert und an der Unterseite des Inserts Epithelzellen. Diese Anordnung stellt die Polarisierung der Zellen im Organismus möglichst genau nach. Bei einer Konfluenz von 80% wurden Neutrophile in das Insert gegeben und unten im Well ein Stimulanz zugefügt, um einen Gradienten zu erzeugen, an dem entlang die Neutrophilen durch die Endothelzellen und Epithelzellen hindurch migrieren.

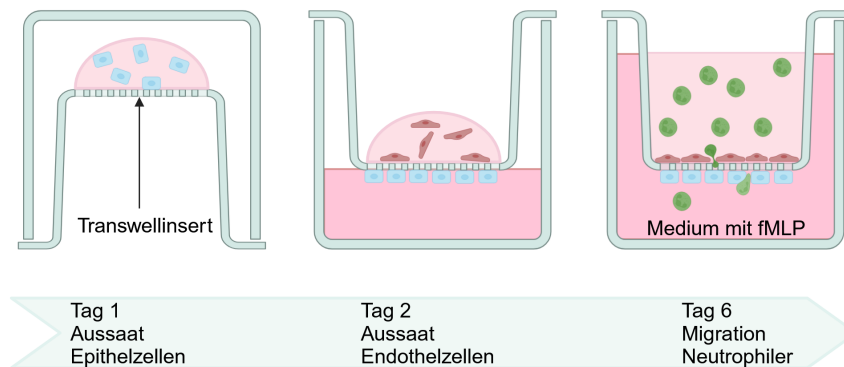


Abbildung 3.8: **Versuchsaufbau des *in vitro* Transmigrationsassays.** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus für den *in vitro* Transmigrationsassay. An Tag 1 werden die Epithelzellen (H441) auf der Unterseite des Transwellinserts ausgesät. An Tag 2 erfolgt die Aussaat der Endothelzellen (HMEC-1) auf der Innenseite des Transwellinserts. Die Zellen werden bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert und an Tag 6 werden frisch isolierte humane polymorphkernige Neutrophile in das Insert gegeben und in die Wells Medium mit Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), welches die Neutrophilen zur Migration stimuliert. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com. <https://BioRender.com/v19d188>.

Für den Assay wurden zunächst 5×10^4 H441-Zellen (Epithel) in 100 μ l Medium pro Insert auf der Außenseite des Inserts ausgesät und über Nacht zur Adhäsion bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am folgenden Tag wurden 4×10^4 HMEC-1-Zellen (Endothel) in 100 μ l Medium in das Insert pipettiert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel und am dritten bis vierten Tag war in beiden Monolayern eine Konfluenz von 80% erreicht.

Für die Migration wurden die Neutrophilen am Versuchstag, wie in Abschnitt 3.10.1 beschrieben, entnommen und isoliert. Nach dem Waschen der Neutrophilen wurden diese in 10 ml PBS⁻ resuspendiert und ausgezählt. Anschließend wurde eine Zellzahl von 1×10^6 Neutrophile pro Well für jede Behandlung in 50 ml Falcons verteilt und bei 1300 rpm und 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml HBSS⁺ oder Inhibitorlösung (5 μ M GI254023X, 20 μ M TAPI-1 oder 10 μ M GW280264X) pro 1×10^6 Neutrophile resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen zweimal in HBSS⁺ gewaschen und in einem Endvolumen von 100 μ l HBSS⁺ pro 1×10^6 Neutrophile resuspendiert.

3 Methoden

Wurde in dem Versuch die Migration von PNCs evaluiert, wurde zusätzliches Citratblut vom gleichen Probanden entnommen und neben der Neutrophilen-Isolation eine Isolation der Thrombozyten durchgeführt. Hierfür wurde das entnommene Blut in der Monovette bei 900 rpm für 15 Minuten auf Raumtemperatur und ohne Bremse zentrifugiert und die dabei entstandene oberste Schicht, das Thrombozyten-reiche Plasma, abgenommen. Zum Plasma wurde ein Zehntel des Plasmavolumens Acid-Citrate-Dextrose (ACD)-Puffer hinzugegeben. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 1500 rpm für zehn Minuten auf Raumtemperatur mit Bremse. Nach Resuspension des Pellets in HBSS⁻ wurden die Thrombozyten bis zur Verwendung bei 37°C gelagert. Die Anzahl der Thrombozyten wurde anhand der gezählten Neutrophilen berechnet, wobei davon ausgegangen wurde, dass auf einen Neutrophil 50 Thrombozyten kommen. Anschließend wurden Neutrophile und Thrombozyten in einem Verhältnis von 1:5 zusammengegeben und 30 Minuten auf Eis präaktiviert, sodass sich PNCs bildeten. Anschließend erfolgte die Inhibition, das Waschen und die Resuspension der PNCs in 100 µl HBSS⁺ pro 1×10^6 Neutrophile, wie oben beschrieben.

Waren die Neutrophile, bzw. PNCs bereit, wurden die Inserts aus der Wellplatte entnommen, das Medium entfernt und in warmem HBSS⁺ gewaschen. Daraufhin wurden sie in die Well einer *ultra low attachment* Platte gestellt, in die bereits 900 µl Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) mit einer Konzentration von 10 ng/ml vorgelegt worden sind. Die Neutrophilen, bzw. PNCs wurden in die Inserts hinein pipettiert und eine Stunde auf Eis auf einem Orbitalschüttler bei 40 rpm inkubiert.

Die migrierten Zellen wurden aus dem Well entnommen und bei 1300 rpm und 4°C für zehn Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl FACS-FP resuspendiert und 50 µl des in Tabelle 3.15 beschriebenen Antikörpermixes hinzu pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur und zweimaligem Waschen mit 1 ml FP wurden die Neutrophilen, bzw. PNCs in Cellfix fixiert und innerhalb 24 Stunden durchflusszytometrisch analysiert.

Tabelle 3.15: Antikörpermix zur Untersuchung der Adhäsionsmoleküle auf migrierten Neutrophilen des *in vitro* Transwell-Migrationsassays.

Antikörper	Fluorochrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl
CD41	APC/Cy7	1 µl
CD62L	APC	1 µl
JAM-A	FITC	1 µl
FP		46 µl

3.10.3 siRNA Transfektion

Für die Untersuchung des TNF α -Signalweges, wurde in humanen Neutrophilen die Expression der beiden Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 durch den Einsatz von small interfering RNA (siRNA) abgeschaltet. siRNA sind kurze, etwa 20-25 Basenpaar lange RNA-Moleküle, welche kein Protein codieren. Stattdessen binden sie an einzelsträngige RNA-Moleküle, bilden dann mit verschiedenen Proteinen den sogenannten RNA-induced silencing complex (RISC) und verhindern damit die Translation des Proteins (Abbildung 3.9).

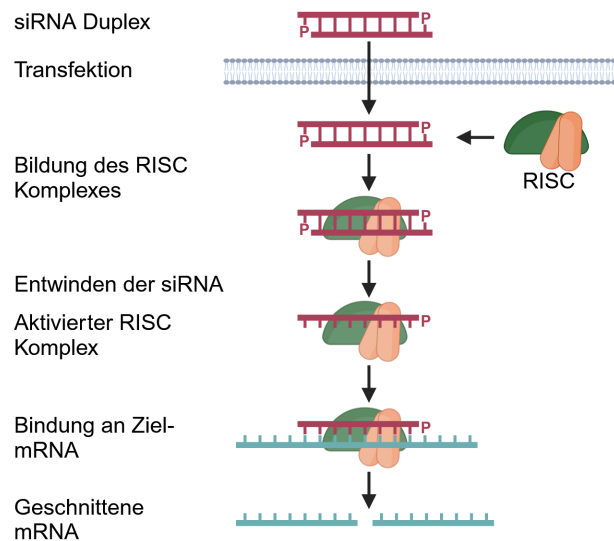


Abbildung 3.9: **Prinzip der siRNA-Transfektion.** Schematische Darstellung des Gen-Silencings mittels small interfering Ribonukleinsäure (siRNA)-Transfektion. Spezifische siRNA wird als Duplex mithilfe eines Transfektionsreagenz in die Zelle eingebracht und bildet dort mit speziellen Proteinen einen RNA-induced silencing complex (RISC) Komplex in dem die RNA entwunden wird, wodurch der Komplex aktiviert wird. Es folgt die Bindung an die Ziel-messenger RNA, die durch den Komplex zerschnitten wird und damit nicht mehr translatiert werden kann. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com. <https://BioRender.com/h43w682>.

Für die siRNA-Transfektion wurden Neutrophile, wie in Abschnitt 3.10.1 beschrieben, einem gesunden Probanden entnommen und isoliert. Nach dem Waschen der Neutrophilen wurden diese in 10 ml Neutrophilen-Medium, bestehend aus RPMI 1640 mit 10% fetalem FCS, resuspendiert und ausgezählt. Anschließend wurde die gewünschte Zellzahl für 1×10^7 Neutrophile in 2 ml Medium pro Well einer 6-Well Platte eingestellt und die Neutrophilen ausgesät. Die Transfektion erfolgte mittels jetPRIME® Transfektionsreagenz, wobei pro Ansatz 5,5 μ l (55 pmol) siRNA in 200 μ l jetPRIME-Puffer angesetzt wurden und 4 μ l jetPRIME Reagenz hinzugefügt wurden. Nach 15-minütiger Inkubation wurde der Transfektionsmix tropfenweise zu den Zellen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Vier Stunden nach Beginn der Transfektion wurde pro Well 1 ml Neutrophilen-Medium mit 20% FCS zugegeben. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Zellen in ein

Falcon überführt und bei 1500 rpm für 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen je nach Behandlungsgruppe für eine Stunde mit 5 μ M GI254023X, 20 μ M TAPI-1, 10 μ M GW280264X oder Neutrophilen-Medium inkubiert. Anschließend erfolgte eine weitere Zentrifugation und Resuspension des Zellpellets in LPS (100ng/ml) mit 10% FCS zur Stimulation für vier Stunden in frischen 6-Well-Platten. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die Pellets in 500 μ l Trifast resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C eingefroren. Die RNA-Isolation, der cDNA-Umschrieb und die PCR erfolgten, wie in Abschnitt 3.9 beschrieben.

3.11 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software GraphPad Prism Version 9.5. Zunächst wurden alle Versuche mithilfe der kombinierten Methode robust regression and outlier removal (ROUT) auf Ausreißer getestet und aus der folgenden Auswertung ausgeschlossen. Der Koeffizient Q, welcher die Falsch-Entdeckungs-Rate angibt, wurde auf 5% festgelegt. Anschließend wurden die Daten auf Normalverteilung getestet. Für kleine Datenmengen ($n < 6$) wurde hierfür der Shapiro-Wilk Test angewandt und größere Datensätze ($n > 6$) wurden mithilfe des D'Agostino-Pearson Tests auf die Verteilung hin geprüft. Die statistische Analyse für normalverteilte Daten erfolgte mittels univariater Varianzanalyse (ANOVA) und dem Bonferroni post hoc Test. Nicht normalverteilte Daten wurden mit dem nichtparametrischen Kruskal-Wallis Test ausgewertet. Für die Berechnung der p -Werte wurde ein Signifikanzniveau α von 5 % vorausgesetzt. Die graphische Darstellung der Messwerte in den Diagrammen zeigt, wenn nicht anders angegeben, den Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD). Signifikanzen werden als Asteriske dargestellt und folgende Signifikanzniveaus unterschieden: $*p \leq 0,05$, $**p \leq 0,01$, $***p \leq 0,001$, $****p \leq 0,0001$.

4 Ergebnisse

4.1 Migration von Neutrophilen und PNCs mit systemischer Inhibition von ADAM10 und ADAM17

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass die Proteasen ADAM10 und ADAM17 in unterschiedlichen Prozessen der Entzündungsreaktion eine wichtige Rolle spielen. Allerdings ist bislang unklar, welchen spezifischen Einfluss diese Proteasen auf die akute Lungenentzündung haben und wie ihre Hemmung die Migration von Immunzellen in entzündetes Gewebe beeinflusst. Im ersten Schritt untersuchten wir daher, wie eine systemische Inhibition von ADAM10 und ADAM17 die Transmigration von Neutrophilen und PNCs in das entzündete Lungengewebe beeinflusst. Dies erfolgte in einem murinen Modell der akuten pulmonalen Inflammation, induziert durch LPS. Sie wirken als Antigen und nach Zerfall der Bakterien werden Teile davon frei, die als Endotoxine fungieren. Die Inhalation von LPS ist ein in der Grundlagenforschung häufig eingesetztes, standardisiertes Inflamationsmodell, welches eine transiente Inflammation hervorruft. Die Mäuse erhielten 60 Minuten vor der Applikation von LPS mittels Inhalation spezifische Inhibitoren: GI254023X zur Hemmung von ADAM10, TAPI-1 zur Hemmung von ADAM17 sowie GW280264X zur kombinierten Hemmung beider Proteasen. Anschließend wurden 24 Stunden nach der LPS-Inhalation mittels Durchflusszytometrie die Zellzahlen in verschiedenen Lungenkompartimenten analysiert.

Die Graphen A-D stellen die Anzahl der Neutrophilen im Blut (A), anhaftend am Endothel (B), im Interstitium (C) und im Alveolarraum (D) dar (Abbildung 4.1). Die Migration der PNCs wird in den Graphen E-G dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass die systemische Hemmung von ADAM10 und ADAM17 einen signifikanten Einfluss auf die Rekrutierung von Neutrophilen und PNCs in die entzündeten Lungenstrukturen hat. Insbesondere konnte eine geringere Akkumulation von Neutrophilen am Endothel, im Interstitium und im Alveolarraum beobachtet werden, was auf eine verminderte Migration der Neutrophilen ins entzündete Gewebe hinweist. Die kombinierte Hemmung beider Proteasen verstärkte diesen Effekt im Vergleich zur Hemmung der einzelnen ADAMs, was auf einen additiven Effekt

4 Ergebnisse

hindeutet. Auf die PNC-Migration konnte die Inhibition von ADAM17 jedoch keine Wirkung erzielen.

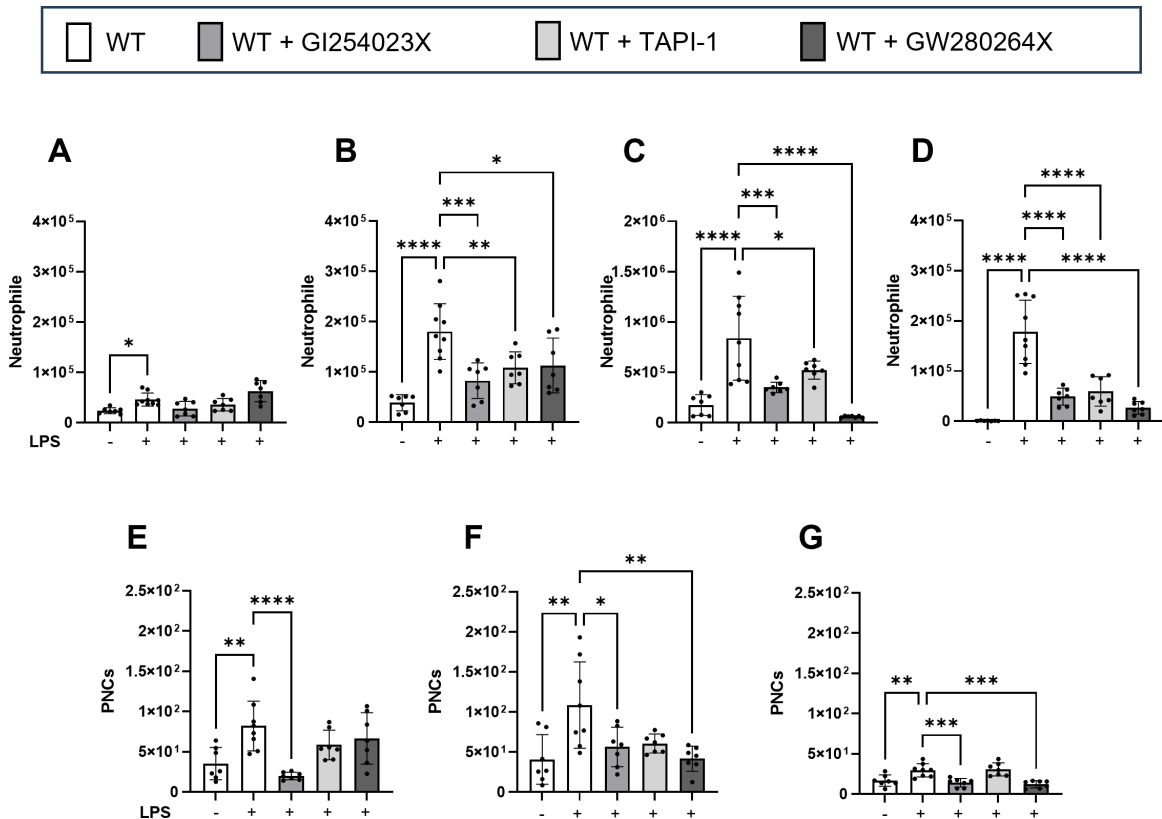


Abbildung 4.1: **In vivo Migration von Neutrophilen und PNCs nach systemischer Inhibition von ADAM10 und ADAM17.** (A) Durchflusszytometrische Analyse der Akkumulation Neutrophiler im Blut, (B) am Endothel adhären, (C) im Interstitium und (D) in der BAL von WT-Tieren, sowie von PNCs (E) im Blut, (F) in der Lunge und (G) in der BAL von WT-Tieren. Verglichen wurde zwischen den Kontrollgruppen ohne LPS und 24 Stunden nach LPS-Inhalation, sowie zwischen der Kontrollgruppe mit LPS und jeweils einer der Behandlungsgruppen mit den ADAM-Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 und GW280264X. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A-D: $n=7/9/7/7/7$, E-G: $n=7/8/7/7/7$.

Zusammengefasst deuten diese Befunde darauf hin, dass ADAM10 und ADAM17 wichtige Regulatoren der Neutrophilen-Migration bei der akuten Lungenentzündung sind und dass eine gezielte Hemmung dieser Proteasen die Entzündungsreaktion im Lungengewebe modulieren könnte. Diese Erkenntnisse könnten einen Ansatz für therapeutische Interventionen bei pulmonalen Erkrankungen bieten, die mit einer übermäßigen Migration von Neutrophilen assoziiert sind.

4.2 Adhäsion humaner Neutrophiler *in vitro*

Im murinen Migrationsmodell wiesen die Daten auf eine Regulation der Neutrophilen-Migration durch Modulation der Proteasen ADAM10 und ADAM17 hin. Trotz einer relativ hohen Ähnlichkeit pathologischer Prozesse in den Organismen Maus und Mensch, konnten immer wieder deutliche Unterschiede in einzelnen Ereignissen festgestellt werden. Zur Verifikation der murinen Daten hinsichtlich des Einflusses der ADAM-Inhibition auf die Migration von Neutrophilen und PNCs wurden daher humane *in vitro*-Inflammationsmodelle genutzt. In einem Adhäsionsassay wurden gefärbte Neutrophile, bzw. PNCs auf einem Monolayer von humanen Endothelzellen inkubiert und anschließend die Anzahl Zellen, bzw. Komplexe quantifiziert, die nach LPS-Stimulation und vorheriger Behandlung mit den ADAM-Inhibitoren an den Endothelzellen adhärten.

Die Ergebnisse wiesen eine signifikante Wirkung der Inhibition beider Proteasen auf die Adhäsion humaner Neutrophiler an Endothelzellen auf (Abbildung 4.2). Gegensätzlich zu den murinen Daten zur Adhäsion der Neutrophilen am Endothel (Abbildung 4.1 B) wurde jedoch eine vermehrte Akkumulation der humanen Neutrophilen (Abbildung 4.2 A), sowie auch der PNCs (Abbildung 4.2 B) am Endothelzell-Layer festgestellt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden ADAMs neben der Neutrophilen-Migration im murinen Modell grundsätzlich auch das Adhäsionsverhalten humaner Neutrophiler im inflammatorischen Setting regulieren. Allerdings konnte ein, zu den murinen Daten zunächst gegensätzlicher, Effekt der vermehrten Adhäsion im humanen Adhäsionsassay nachgewiesen werden.

4.3 Migration und Aktivierung von Neutrophilen im *in vitro* Transwell-Migrationsassay

Eine erhöhte Adhäsion, die in den humanen Neutrophilen beobachtet werden konnte, ist nicht zwingend gleichbedeutend mit einer erhöhten Migration. Deshalb wurde in einem Transwell-Migrationsassay *in vitro* untersucht, ob die in den vorherigen Studien erzielten murinen Migrationsdaten in einem humanen Modell unterstützt werden können. Hierzu wurden Endothelzellen und Epithelzellen an einem Transwell adhärent kultiviert und anschließend humane Neutrophile anhand eines Gradienten mittels fMLP zur Migration durch die Zellschicht hindurch stimuliert. Die Neutrophilen wurden vor der Transmigration ebenfalls mit den oben beschriebenen Inhibitoren behandelt. Um auf zellulärer Ebene herauszufinden, woher eventuelle Unterschiede im Transmigrationsverhalten rühren, wurde im Überstand

4 Ergebnisse

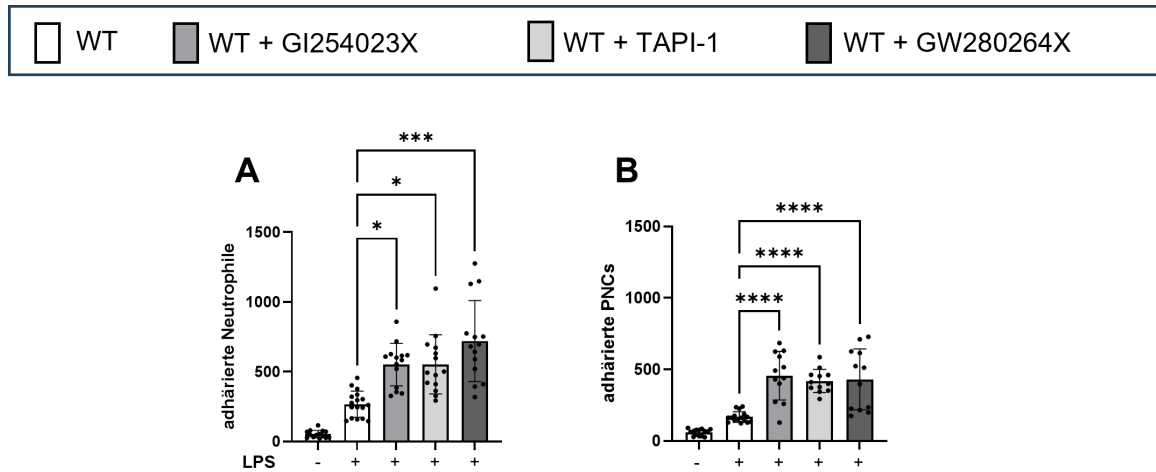


Abbildung 4.2: **Einfluss der ADAM-Inhibition auf die Adhäsion von Neutrophilen und PNCs *in vitro*.** (A) Statistische Auswertung der Anzahl adhärenter humaner Neutrophiler pro Sichtfeld nach vier Stunden Stimulation mit LPS an einem Monolayer von Endothelzellen. Im Vergleich standen Neutrophile ohne und mit Stimulation durch LPS, sowie die Neutrophile mit LPS verglichen mit jeweils den Zahlen der Gruppen mit 30-minütiger ADAM-Inhibition vor der Stimulation durch GI254023X, TAPI-1 und GW280264X. (B) Statistische Auswertung der Auszählung humaner PNCs pro Sichtfeld mit denselben Konditionen wie in (A) beschrieben. Alle Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A: $n=14/17/14/14/14$, B: $n=14/16/12/12/12$.

des Assays die MPO-Freisetzung, sowie die Konzentration von CD62L gemessen und zusätzlich durchflusszytometrisch die Oberflächenexpression von CD62L und JAM-A quantifiziert.

Die Transmigration der Neutrophilen und PNCs wurde durch den inflammatorischen Stimulus durch fMLP signifikant verstärkt und konnte durch die Inhibition mit den spezifischen Inhibitoren wiederum signifikant verringert werden (Abbildung 4.3 A+C). Lediglich die Hemmung von ADAM17 erzielte keinen Effekt bei der Transmigration der PNCs. Die Messung der MPO-Freisetzung zeigte zudem, dass die Neutrophilen und PNCs durch fMLP aktiviert wurden, diese Aktivierung jedoch durch alle ADAM-Inhibitoren signifikant vermindert wurde (B+D). CD62L (L-Selektin) wird auf Neutrophilen exprimiert und ist für das lockere Anhaften und Rollen der Neutrophilen am Endothel als erste Schritte der Migration verantwortlich. Die Expression von CD62L auf der Oberfläche von Neutrophilen (E) und PNCs (H) stieg nach Stimulation mit fMLP signifikant an und wurde durch die Inhibition der ADAMs nicht beeinflusst. Die Konzentration von löslichem CD62L im Überstand stieg durch die Stimulation mit fMLP ebenfalls sowohl bei den Neutrophilen (F) als auch bei den PNCs (I) signifikant an und wurde zusätzlich durch die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 signifikant verringert. JAM-A wird hauptsächlich auf Endothelzellen und Epithelzellen als Bestandteil der Tight Junctions exprimiert, kommt aber auch auf Leukozyten vor und spielt bei der Migration eine bedeutende Rolle. Die Expression auf den migrierten Neutrophilen und PNCs stieg

4 Ergebnisse

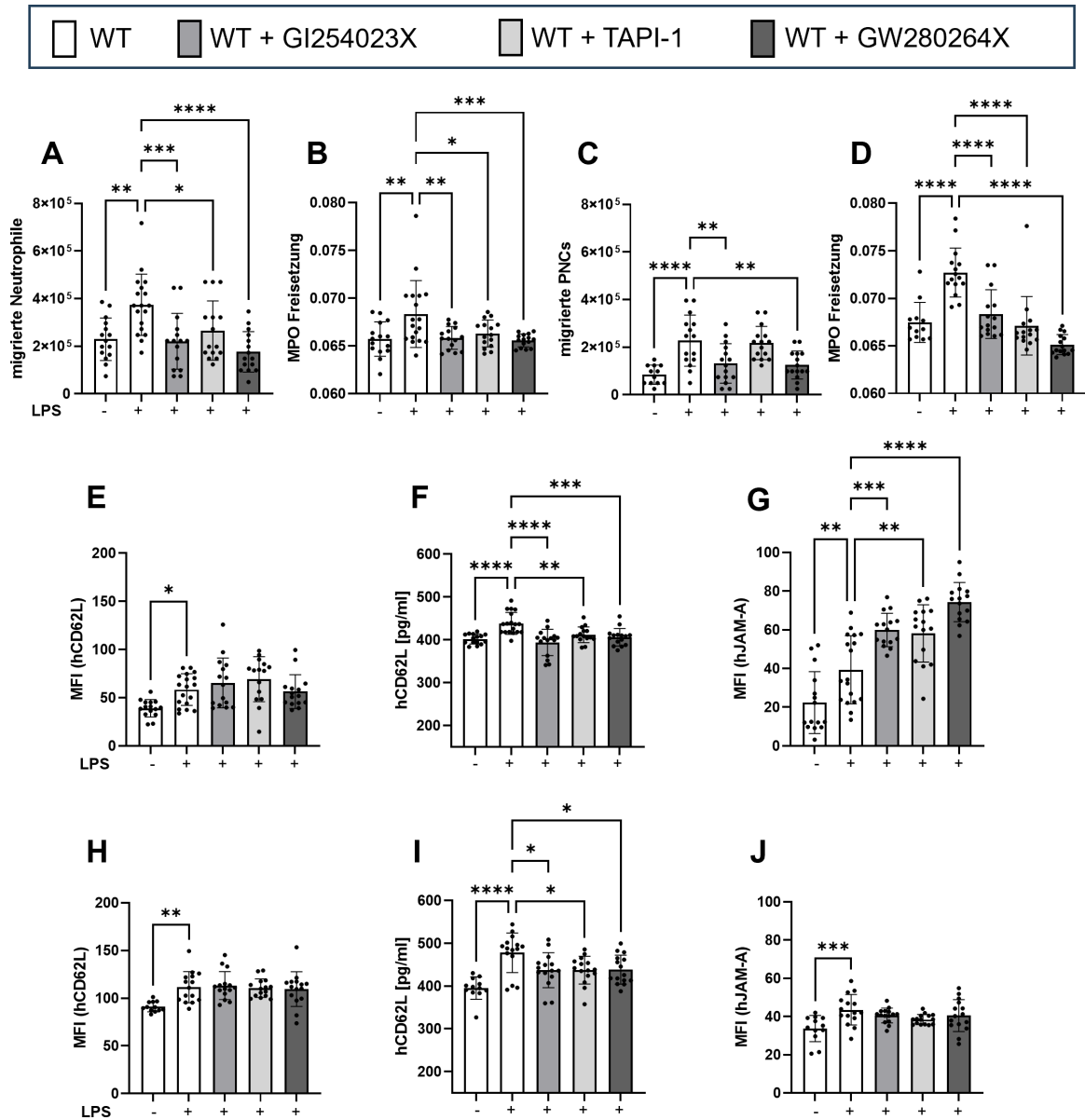


Abbildung 4.3: **In vitro Migration von Neutrophilen und PNCs mit Quantifizierung von CD62L und JAM-A nach Inhibition von ADAM10 und ADAM17.** (A) Statistische Auswertung der Anzahl migrierter Neutrophiler im *in vitro* Transwell-Migrationsassay. In allen Graphen (A-J) wurden die Kontrollgruppen ohne und mit einstündiger Stimulation durch fMLP verglichen, sowie die Kontrollgruppe mit fMLP jeweils mit den Behandlungsgruppen mit 30-minütiger Inhibition von ADAM10 und ADAM17 vor der Stimulation. (B) Semiquantitative Analyse der Freisetzung von Myeloperoxidase (MPO) durch Neutrophile im Überstand. (C) Anzahl migrierter humaner PNCs im *in vitro* Transwell-Migrationsassay. (D) Statistische Analyse der MPO-Freisetzung der aktivierten PNCs im Überstand. (E) Durchflusszytometrische Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von CD62L auf Neutrophilen. (F) CD62L-Konzentration im Überstand mittels ELISA. (G) Oberflächenexpression von JAM-A auf Neutrophilen mittels Durchflusszytometrie. (H) MFI zur Quantifizierung von CD62L auf PNCs. (I) Konzentration von CD62L im Überstand mittels ELISA. (J) Durchflusszytometrische Quantifizierung von JAM-A auf der Oberfläche der PNCs. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A, B, E-G: $n=15/18/15/15/15$, C, D, H-J: $n=12/15/15/15/15$

durch die Stimulation mit fMLP signifikant an, während die Hemmung der beiden Proteasen lediglich auf der Oberfläche der Neutrophilen zu einer signifikanten Verstärkung dieses Effektes führte (G+J).

Insgesamt deuten die Befunde der humanen Untersuchungen in dieselbe Richtung wie die murinen Daten: ADAM10 und ADAM17 scheinen wichtige Regulatoren der Neutrophilen- und PNC-Migration im akuten Entzündungsgeschehen zu sein und eine gezielte Hemmung dieser Proteasen könnte Ansatz für therapeutische Interventionen sein, um eine pulmonale Entzündungsreaktion zu modulieren. Nur die Hemmung von ADAM17 zeigte bisher keine Wirkung auf die Migration der PNCs.

4.4 Visualisierung des Aufbaus des *in vitro* Transwell-Migrationsassays

Zur visuellen Unterstützung der durchflusszytometrisch erhobenen Daten des Transwell-Migrationsassays wurden nach Beenden des Migrationsvorgangs die Inserts der Transwells ab präpariert und histologisch aufgearbeitet (Abbildung 4.4). Zur Orientierung im Schnitt wurden die Zellkerne mittels DAPI (cyan) angefärbt. Die großen, rundlichen Zellkerne sind die der Epithelzellen, die kleinen flachen die der Endothelzellen. Die Neutrophilen wurden mittels Ly6G/C (rot), Thrombozyten mit CD41 (lila) identifiziert. Zusätzlich wurden CD62L (grün) und JAM-A (gelb) angefärbt. Eine statistische Auswertung war aufgrund der geringen Anzahl an Neutrophilen, die dargestellt werden konnten, nicht möglich. Jedoch war zu erkennen, dass CD62L auf Neutrophilen und PNCs ohne Stimulation geringer exprimiert war als auf den Schnitten mit fMLP-Stimulation. Unterschiede zwischen den Behandlungen konnten nicht ausgemacht werden. Die Färbung von JAM-A war auch nach wiederholten Versuchen mit Einsetzen höherer Konzentrationen des verwendeten Antikörpers so gering, dass keine Unterschiede zwischen den Behandlungen festgestellt werden konnten.

4.5 Nachweis des Knockouts von ADAM10 und ADAM17 in den konditionalen Knockout-Mauslinien

Die Daten aus den murinen *in vivo* und humanen *in vitro* Versuchen mit systemischer Inhibition von ADAM10 und ADAM17 zeigten einen signifikanten Einfluss der Proteasen hin-

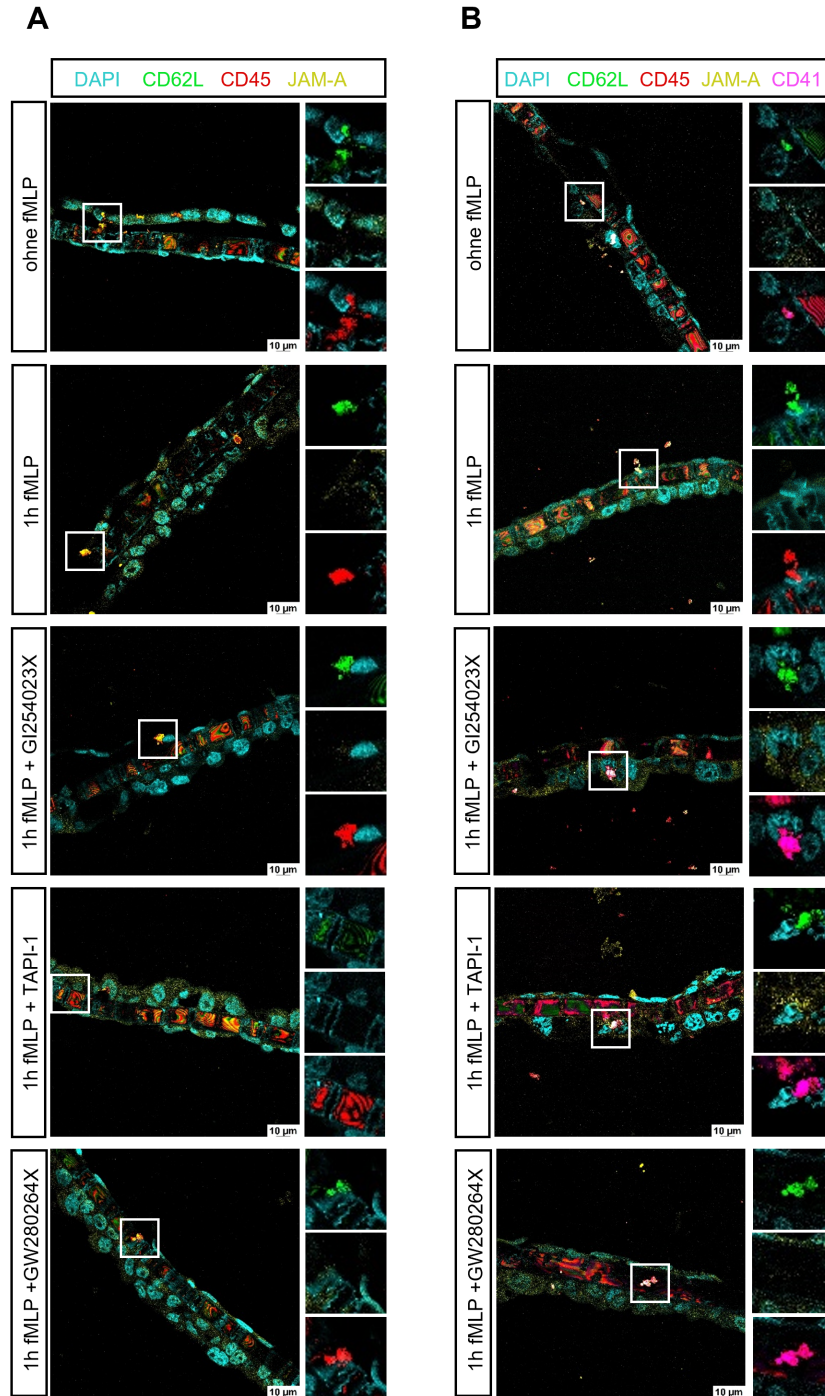


Abbildung 4.4: **Immunfluoreszenzaufnahmen der Zellen am Transwellinsert mit Färbung von CD62L und JAM-A.** Immunfluoreszenzfärbung der Zellkerne mittels 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (cyan). Zellkerne der Epithelzellen sind groß und rundlich, Kerne der Endothelzellen sehr flach. (A) Färbung der Neutrophilen mit Ly6G/C (rot), und zusätzlich Färbung von CD62L (grün) und JAM-A (gelb). Dargestellt wird je ein repräsentativer Querschnitt ohne und mit fMLP, sowie mit GI254023X, TAPI-1 und GW280264X. (B) Färbung der PNCs mit Ly6G/C (Neutrophile, rot) und CD41 (Thrombozyten, lila), sowie CD62L (grün) und JAM-A (gelb). Dargestellt werden repräsentative Aufnahmen derselben Konditionen wie in (A) beschrieben. Alle Aufnahmen in 63x Vergrößerung, n=4-6.

4 Ergebnisse

sichtlich der Neutrophilen- und PNC-Migration, die auf eine potenziell antiinflammatorische Wirkung der ADAM-Inhibition hinweisen. Um detaillierter untersuchen zu können, wo die ADAMs welche Funktionen ausüben und wie sich ihr Fehlen auf einzelnen Zellarten auswirkt, wurden folgend vier Mauslinien mit konditionalen Knockouts generiert und mit WT-Tieren verglichen. In den verschiedenen Linien wurde entweder ADAM10 oder ADAM17 jeweils spezifisch auf Neutrophilen oder auf Thrombozyten (und Megakaryozyten) ausgeknockt.

Der Nachweis über die erfolgreichen Knockouts erfolgte durchflusszytometrisch. Die Expression wurde über die Messung der MFI von ADAM10 und ADAM17 jeweils auf Neutrophilen und Thrombozyten im Blut und zusätzlich auf Endothelzellen im Lungengewebe quantifiziert (Abbildung 4.5). Die Expression von ADAM10 auf Neutrophilen war in unbehandelten Tieren der ADAM10^{CUP}-Linie signifikant geringer als in WT-Tieren und während ADAM10 im WT durch LPS signifikant anstieg, war bei der Knockoutlinie keine vermehrte Expression zu verzeichnen (A). Die anderen Knockoutlinien zeigten keine veränderte ADAM10 Expression auf Neutrophilen. ADAM17 war auf den Neutrophilen insgesamt in sehr geringem Maß vorhanden und ohne Stimulation konnten keine Unterschiede zwischen den Mauslinien ausgemacht werden (B). Nach LPS-Stimulation stieg die Expression von ADAM17 auf den Neutrophilen der WT-Tiere signifikant an, aber nicht in der ADAM17^{CUP}-Knockoutlinie und damit war nach Inflammation signifikant weniger ADAM17 als im WT vorhanden. In den anderen Mauslinien wurde keine Veränderung von ADAM17 auf Neutrophilen beobachtet.

Der Knockout von ADAM10 auf Thrombozyten in den ADAM10^{PF4}-Tieren war ebenfalls erfolgreich. Sowohl im gesunden Tier als auch unter inflammatorischen Bedingungen wurde signifikant weniger ADAM10 auf den Thrombozyten verglichen mit WT-Tieren exprimiert und nach Inflammation im Gegensatz zu den WT-Tieren kein signifikanter Anstieg der ADAM10-Expression zu verzeichnet (C). ADAM17^{PF4} zeigte eine signifikant geringere Expression der Protease sowohl in gesunden als auch in kranken Tieren (D). Beide konditionalen Knockouts auf Thrombozyten hatten keinen Effekt auf die anderen Mauslinien im Vergleich zu den WT-Tieren.

ADAM10 und ADAM17 werden auch auf Endothelzellen in der Lunge exprimiert, weshalb zusätzlich untersucht wurde, ob die konditionalen Knockouts eventuell kompensatorische Effekte auf die Oberflächenexpression beider Proteasen auf Endothelzellen haben. Die Expression von ADAM10 blieb in allen Knockoutlinien unverändert im Vergleich zum WT (E). ADAM17 konnte jedoch in der ADAM10^{PF4}-Mauslinie signifikant verstärkt auf der Oberfläche von Endothelzellen vorgefunden werden (F).

4 Ergebnisse

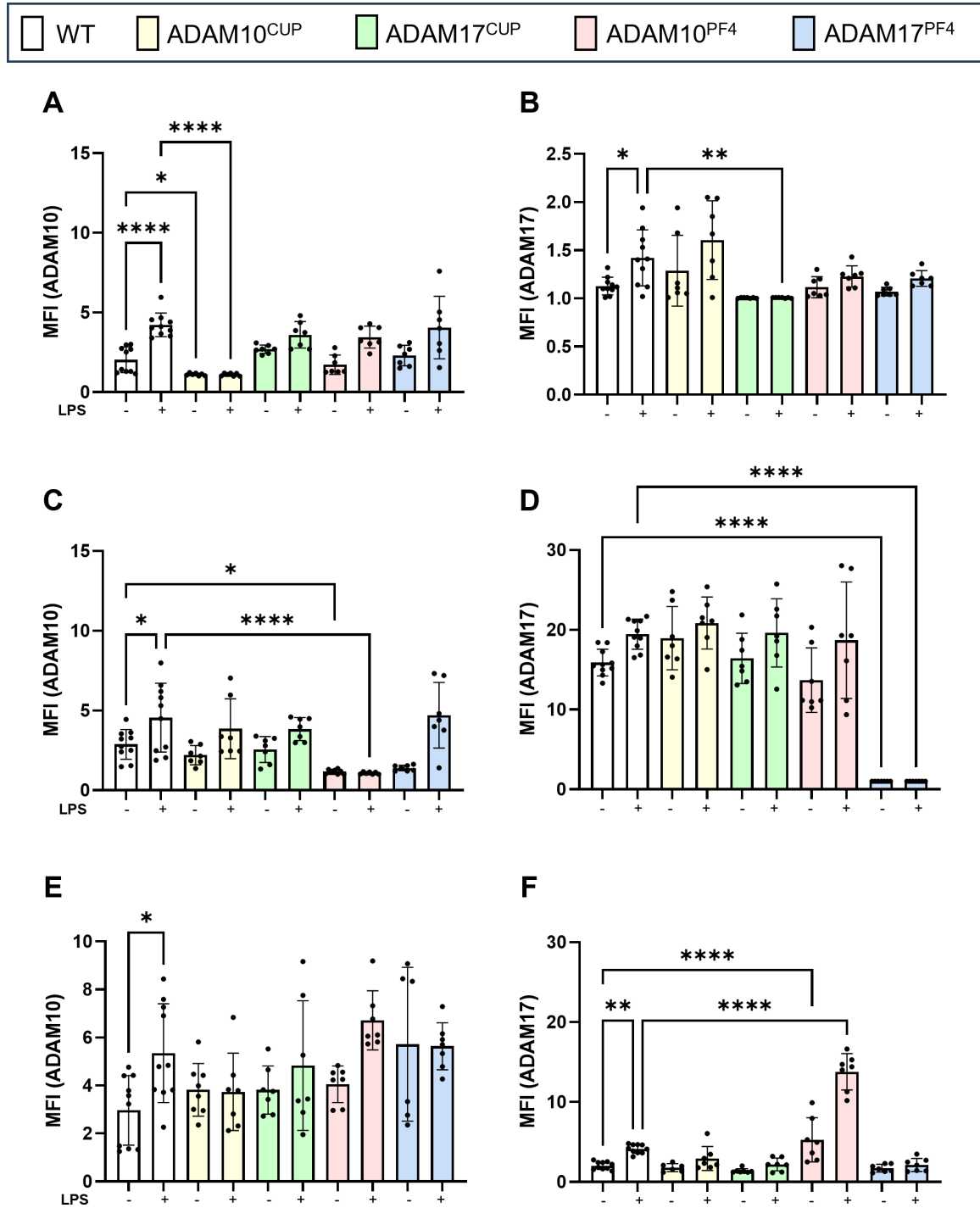


Abbildung 4.5: **Nachweis der konditionalen Knockouts von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen oder Thrombozyten unter Einbeziehung der Endothelzellen.** Durchflusszytometrische Quantifizierung der Expression von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen und Thrombozyten im Blut, sowie auf Endothelzellen in den Lungenproben. Im Vergleich standen die Kontrollgruppen der WT-Tiere ohne LPS und 24 Stunden nach der Inhalation. Außerdem wurden die Knockout-Linien jeweils ohne LPS mit der Kontrollgruppe ohne LPS verglichen und die Knockout-Linien mit LPS jeweils mit der WT-Kontrolle mit LPS. (A) MFI von ADAM10 auf Neutrophilen. (B) Expression von ADAM17 auf den Neutrophilen. (C) Expression von ADAM10 auf Thrombozyten. (D) MFI von ADAM17 auf Thrombozyten. (E) Expression von ADAM10 auf pulmonalen Endothelzellen. (F) ADAM17-Expression auf Endothelzellen. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A-F: $n=10/10/7/7/7/7/7/7/7/7$.

Zusammenfassend konnte in allen vier Mauslinien erfolgreich festgestellt werden, dass das Zielgen auf den jeweiligen entsprechenden Zellen in deutlich geringerem Maße exprimiert wurde.

4.6 *In vivo* Neutrophilen-Migration in den Knockout-Mauslinien

Die systemische Hemmung von ADAM10 und ADAM17 modulierte die Migration der Neutrophilen. In einem pulmonalen Entzündungsgeschehen laufen jedoch diverse Prozesse ab, die wiederum durch verschiedene Faktoren unterschiedlich beeinflusst werden können. Durch die große Anzahl an Substraten der beiden ADAMs können diese auf verschiedenen Zellarten, wo sie mit unterschiedlichen Transmembranproteinen in Kontakt kommen, divergente Effekte erzielen. Daher wurde zur detaillierten Untersuchung des Einflusses von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen und Thrombozyten hinsichtlich der Migration diese ebenfalls im murinen Modell der LPS-bedingten pulmonalen Inflammation analysiert und durchflusszytometrisch quantifiziert. Zur Unterstützung dieser Daten wurden zusätzlich histologische Färbungen muriner Lungenschnitte ebenfalls 24 Stunden nach LPS-Inhalation durchgeführt. Neutrophile wurden braun angefärbt und das Gewebe mittels Mayer's Hämalan violett gegengefärbt.

Die Graphen A-D in Abbildung 4.6 stellen die Anzahl der Neutrophilen im Blut (A), anhaftend am Endothel (B), im Interstitium (C) und im Alveolarraum (D) dar. Die Ergebnisse zeigen, dass das Fehlen von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen einen signifikanten Einfluss auf die Rekrutierung der Neutrophilen in die entzündeten Lungenstrukturen hat, während der Knockout der beiden Proteasen auf Thrombozyten zu keiner wesentlich geringeren Akkumulation der Neutrophilen im Alveolarraum führte. Im Blut wurden keine Unterschiede in der Anzahl der Neutrophilen zwischen WT-Tieren und den Knockout-Mauslinien nach LPS-Stimulation festgestellt, lediglich der Nachweis der erhöhten Akkumulation durch die LPS-Inhalation war, wie in allen Kompartimenten, signifikant. Durch den Knockout von ADAM10 auf Neutrophilen wurde vor allem die Adhäsion der Neutrophilen ans Endothel und die transepitheliale Migration gehemmt, wodurch weniger Neutrophile in den Alveolarraum einwandern konnten. Der Knockout von ADAM17 auf Neutrophilen führte potenziell zu einer geringeren Adhäsion und einer stark gehemmten transepithelialen Migration, wodurch viele Neutrophile im Interstitium hängen blieben und wenige in den Alveolarraum gelangen konnten. Die Mauslinie ADAM10^{PF4} konnte keinerlei Veränderung hinsichtlich der Neutrophilen-Migration im Vergleich zum WT aufweisen. ADAM17^{PF4} wies eine verstärkte Adhäsion und

4 Ergebnisse

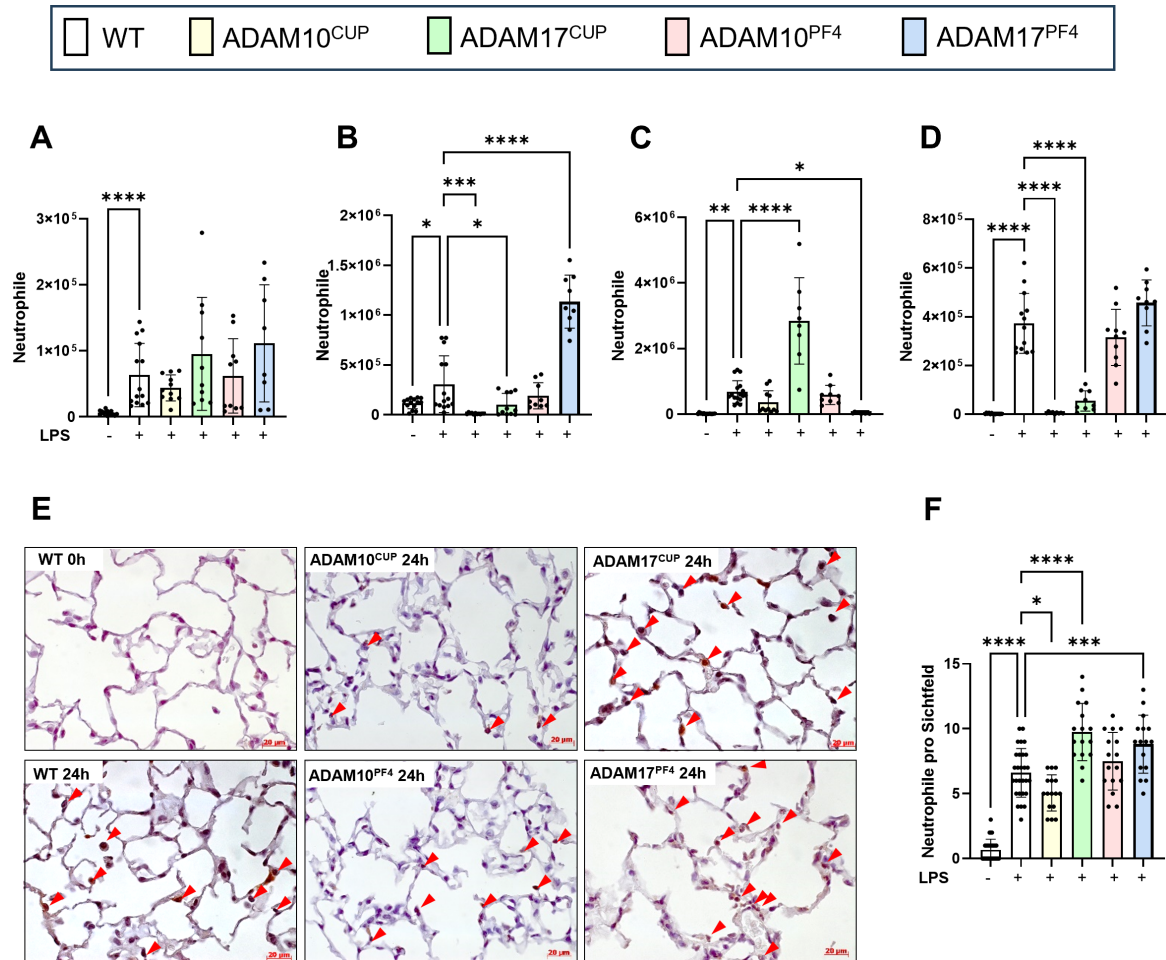


Abbildung 4.6: *In vivo* Neutrophilen-Migration im murinen LPS-bedingten Modell der akuten pulmonalen Inflammation. Akkumulation der Neutrophilen (A) im Blut, (B) adhären am Endothel, (C) im Interstitium und (D) im Alveolarraum mittels Durchflusszytometrie. Verglichen wurde die Anzahl Neutrophiler zwischen den Kontrollgruppen der WT-Tiere ohne und mit LPS, sowie der vier Knockout-Mauslinien 24 Stunden nach LPS jeweils mit der WT-Kontrolle mit LPS. (E) Repräsentative Aufnahmen immunhistologischer Färbungen der Neutrophilen (braun, markiert mit roten Pfeilen) im Lungengewebe mit Gegenfärbung des Gewebes (lila) von Lungenschnitten ohne und mit LPS in WT-Tieren, sowie der vier Knockout-Linien jeweils mit LPS in 64x Vergrößerung. (F) Statistische Auswertung der Anzahl von Neutrophilen pro Sichtfeld. Verglichen wurden die Gruppen gleich wie in A-D. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A-D: $n=14/13-17/9-11/8-11/9/9$, F: $n=28/28/16/16/16/16$.

transendotheliale Migration auf, zeigte jedoch keinen Effekt in der BAL. (E) zeigt repräsentative Aufnahmen aus WT-Tieren ohne und mit LPS, sowie den vier Knockoutlinien jeweils mit LPS. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die Neutrophilen zusätzlich mit roten Pfeilen markiert. Die Anzahl der Neutrophilen pro Sichtfeld wurde für alle Bedingungen ausgezählt und statistisch ausgewertet (F). Die dabei erhobenen Daten bestätigten die oben beschriebenen Ergebnisse und zeigten einen signifikanten Anstieg der Neutrophilen-Akkumulation im Lungengewebe der WT-Tiere nach LPS-Inhalation. Zusätzlich wurden signifikant weniger Neutrophile in den Lungen der ADAM10^{CUP}-Mauslinie gezählt, sowie signifikant mehr Neutrophile in den Linien ADAM17^{CUP} und ADAM17^{PF4}. ADAM10^{PF4} wies keine Veränderung im Vergleich zum WT auf.

Es kann zusammenfassend gesagt werden, dass neutrophiles ADAM10 und ADAM17 einen regulatorischen Einfluss auf die Neutrophilen-Migration hat und das Fehlen der beiden Proteasen auf den Zellen zu einer verringerten Migration führt. Der Knockout der ADAMs auf Thrombozyten erzielte keine Wirkung auf die Akkumulation im entzündeten Gewebe, jedoch hatte das Fehlen von ADAM17 auf den Thrombozyten, im Gegensatz zum Knockout von ADAM10, trotzdem einen signifikanten Effekt auf das migratorische Verhalten der Neutrophilen. Zu welchem Zeitpunkt, bzw. an welcher Stelle der Migration das Fehlen der Proteasen einen besonders starken Effekt hat, variiert in allen Mauslinien.

4.7 *In vivo* PNC-Migration in den konditionalen Knockout-Mauslinien

Die systemische Inhibition von ADAM10 und die kombinierte Hemmung von ADAM10 und ADAM17 hemmte neben der Neutrophilen-Migration auch die Akkumulation der PNCs im entzündeten Lungengewebe, während die Hemmung von ADAM17 hierbei keine Wirkung erzielte. Zusätzlich konnte der Knockout der beiden Proteasen auf Thrombozyten keinen Effekt auf die Neutrophilen-Migration bewirken. Nun stellte sich die Frage, ob die konditionalen Knockouts die Migration der PNCs modulieren. Dazu wurde neben der Akkumulation der Neutrophilen in den vier Kompartimenten, ebenfalls durchflusszytometrisch die Anzahl an PNCs quantifiziert (Abbildung 4.7). Diese Daten wurden wiederum immunhistologisch in Lungenschnitten verifiziert.

Im Blut der WT-Tiere konnte durch die Inflammation keine Veränderung der Anzahl an PNCs beobachtet werden, ADAM10^{CUP} und ADAM17^{PF4} verbuchten eine signifikant erhöhte Akkumulation von PNCs (A). Der Knockout von ADAM10 auf Neutrophilen führte

4 Ergebnisse

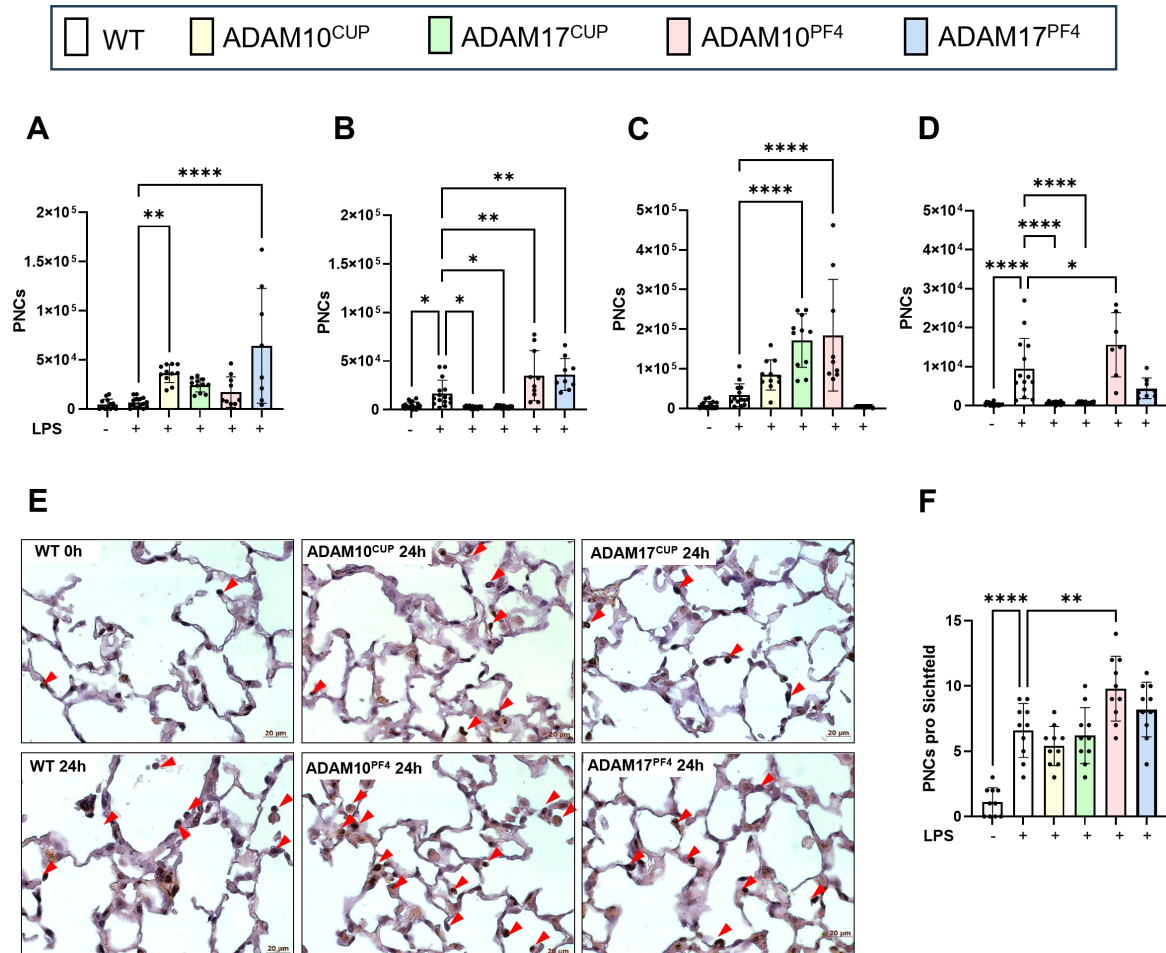


Abbildung 4.7: **Migration der PNCs *in vivo* in der LPS-bedingten akuten pulmonalen Inflammation.** Durchflusszytometrie zur Quantifizierung der PNC-Akkumulation in (A) Blut, (B) am Endothel adhärierend, (C) im Interstitium und (D) im Alveolarraum 24 Stunden nach LPS-Inhalation. Verglichen wurden die beiden WT-Kontrollgruppen ohne und mit LPS, sowie die vier Knockouts mit LPS jeweils mit der Kontrollgruppe mit LPS. (E) Repräsentative Aufnahmen der immunhistologischen Färbung von PNCs (schwarz, markiert mit roten Pfeilen) in murinen Lungenschnitten (Gewebe lila) von WT-Tieren ohne und mit LPS, sowie der vier Knockout-Linien jeweils mit LPS in 64x Vergrößerung. (F) Statistische Auswertung der gezählten PNCs pro Sichtfeld. Es wurden die gleichen Gruppen wie in A-D verglichen. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A-D: $n=13-16/14/11/11/7-9/8$, F: $n=10/10/10/10/10/10$.

potenziell zu einer geringeren Adhäsion der PNCs an das Endothel (B) und einer stark gehemmten transepithelialen Migration, wodurch signifikant weniger PNCs in den Alveolarraum einwanderten (D). ADAM17^{CUP} hemmte ebenfalls die Adhäsion (B), da sich aber viele PNCs im Interstitium ansammelten, kann man davon ausgehen, dass die transepitheliale Migration gehemmt war, was auch die geringe Akkumulation in den Alveolarraum erklärt (C+D). ADAM10^{PF4} verstärkte die Adhäsion der PNCs ans Endothel (B), sowie die transendotheliale und transepitheliale Migration und verzeichnete dadurch eine signifikant höhere Anzahl an PNCs im Alveolarraum, verglichen mit den WT-Tieren (D). Der Knockout von ADAM17 auf Thrombozyten erhöhte ebenfalls die Adhäsion (B), hatte jedoch keinen Effekt auf die beiden Migrationsschritte und damit auch nicht auf die Anzahl der PNCs im Alveolarraum (C+D). In der histologischen Färbung wurden Neutrophile braun gefärbt und Thrombozyten grün, wodurch die PNCs schwarz erscheinen (E). Zur einfacheren Sichtbarkeit wurden die PNCs zusätzlich mit roten Pfeilen markiert. Die statistische Auswertung stützte die durchflusszytometrischen Daten, da die Inflammation zu einer deutlich stärkeren Akkumulation der PNCs im Lungengewebe führte (F). Der Knockout beider ADAMs auf Neutrophilen zeigte keine wesentliche Veränderung der PNC-Akkumulation in der Lunge. In ADAM10^{PF4}-Tieren erhöhte sich die Anzahl an PNCs in der Lunge signifikant, wohingegen ADAM17^{PF4}-Tiere wiederum keinen Unterschied im Vergleich zu WT-Tieren zeigten.

Das Fehlen von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen hatte also einen signifikant hemmenden Einfluss auf die Migration von PNCs, während das Fehlen von ADAM10 auf Thrombozyten die Rekrutierung der PNCs in das entzündete Gewebe signifikant erhöhte. Der Knockout von ADAM17 auf Thrombozyten hatte keinerlei Effekt auf die Akkumulation der PNCs am Entzündungsgeschehen.

4.8 Aktivierung von Neutrophilen und Thrombozyten und Zytokinfreisetzung

Drei der vier untersuchten Knockout-Mauslinien wiesen einen Einfluss auf die Migration von Neutrophilen und PNCs auf. ADAM10^{CUP} und ADAM17^{CUP} hemmten die Einwanderung von Neutrophilen und PNCs in den Alveolarraum. ADAM10^{PF4} konnte die Migration von Neutrophilen nicht beeinflussen, führte aber zu einer vermehrten Einwanderung von PNCs in den Alveolarraum. Es stellte sich folgend die Frage, welche inflammatorischen Prozesse durch den Knockout von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen oder Thrombozyten wie beeinflusst wurden, um die Migration derart zu modulieren. Daher wurde im

4 Ergebnisse

nächsten Schritt untersucht, wie die Aktivierung der Neutrophilen und Thrombozyten, sowie die Rekrutierung durch die vier konditionalen Knockouts im Rahmen der pulmonalen Inflammation modifiziert wurden. Dies erfolgte über die Messung der MPO-Freisetzung in die BAL, sowie über die Quantifizierung von Aktivierungsmarkern und Zytokinen mittels ELISA.

Aktivierte Neutrophile bilden im inflammatorischen Gewebe nach ihrer Aktivierung so genannte neutrophil extracellular traps (NETs). NETs sind Netze aus extrazellulärer DNA, die dem Einfangen von Pathogenen dienen und in denen sich unter anderem granuläre Proteine, wie MPO und Neutrophilenelastase (ELA2) befinden. Die Konzentration dieser zwei Proteine wurde im Überstand der BAL vier Stunden nach LPS-Inhalation gemessen (Abbildung 4.8). Die Freisetzung von MPO, wie auch die Konzentration der ELA2 wurden nach Inflammation in den WT-Tieren signifikant erhöht, durch den Knockout von ADAM17 auf Neutrophilen nochmals signifikant verstärkt und durch das Fehlen von ADAM17 auf Thrombozyten deutlich herunterreguliert (A+B).

Aktivierte Thrombozyten setzen das DAMP HMGB-1 frei, welches den Prozess der NET-Bildung erleichtert. Die Quantifizierung des löslichen HMGB-1 in der BAL ergab eine signifikant höhere Konzentration nach Inflammation in den WT-Tieren (C). Weiterhin war die Konzentration in den ADAM17^{CUP}-Tieren nochmals signifikant höher, während ADAM17^{PF4} eine signifikant geringere Konzentration von HMGB-1 vorwies.

Neben der Aktivierung der Neutrophilen und Thrombozyten spielt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, entlang deren Gradienten die Neutrophilen und PNCs in das inflammatorische Gewebe rekrutiert werden, eine bedeutende Rolle für die Modulation der Migration. Gemessen wurde die Konzentration von TNF α (D), IL-6 (E), CXCL1 (F) und CXCL2/3 (G) in der BAL vier Stunden nach LPS-Inhalation. Alle Zytokine wurden durch die Inflammation signifikant vermehrt freigesetzt. TNF α wurde durch den Knockout von ADAM10 auf Neutrophilen und Thrombozyten erheblich gesteigert. Die beiden Knockouts von ADAM17 führten zu einer deutlich niedrigeren TNF α -Konzentration in der BAL. Für die Freisetzung von IL-6 hatte keiner der konditionalen Knockouts einen Effekt. Die Konzentration von CXCL1 wurde lediglich in den ADAM10^{CUP}-Tieren deutlich reduziert, für die anderen Mauslinien konnten keine Effekte beobachtet werden. CXCL2/3 wurde durch alle vier Knockouts in deutlich geringerem Maß ausgeschüttet.

Zusammenfassend könnte die verringerte Migration in den ADAM10^{CUP}-Tieren zunächst am ehesten durch die geringere Ausschüttung der Chemokine CXCL1 und CXCL2/3 erklärt werden, da die Aktivierung unverändert war und die Freisetzung von TNF α sogar erhöht

4 Ergebnisse

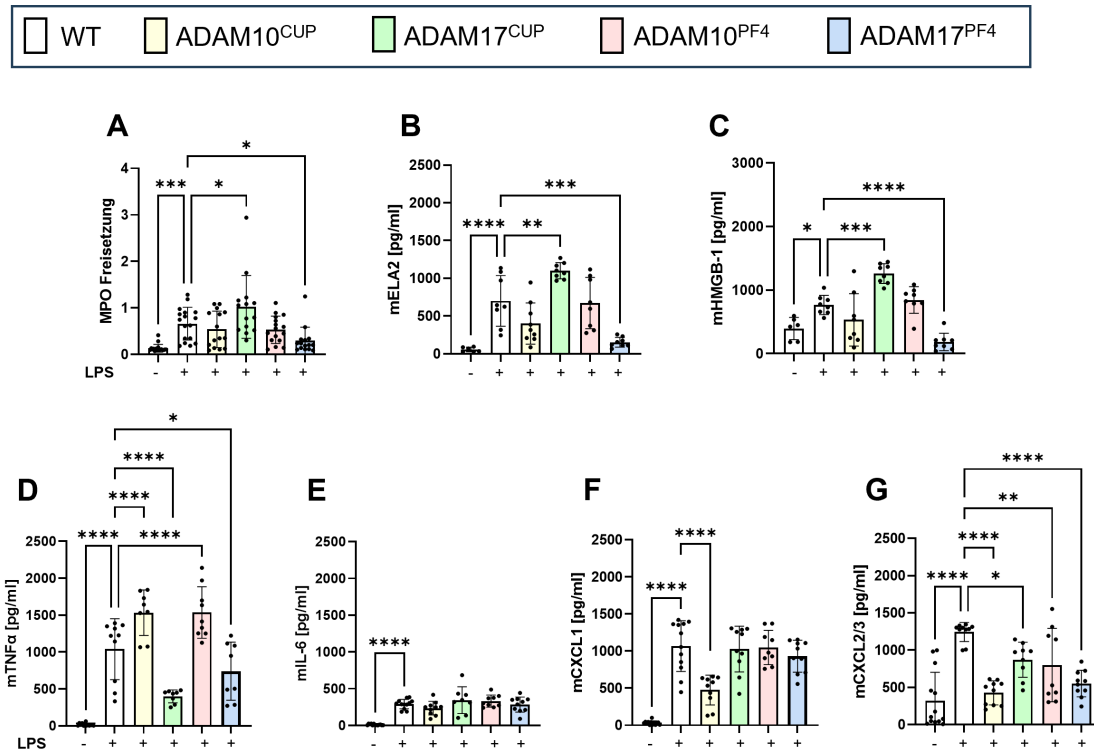


Abbildung 4.8: **Einfluss der konditionalen Knockouts auf die Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen, Thrombozyten und PNCs.** Aktivierung der Neutrophilen 24 Stunden nach LPS-bedingter Inflammation durch (A) Freisetzung von MPO und (B) Konzentration von Neutrophilenelastase (ELA2) mittels ELISA in der BAL. Verglichen wurden in allen Graphen der Abbildung die WT-Tiere ohne und mit LPS, sowie die Knockout-Tiere mit LPS jeweils mit der WT-Kontrolle mit LPS. (C) Messung der Thrombozyten-Aktivierung durch Quantifizierung von high mobility group box-1 (HMGB-1) mittels ELISA. Messung der Konzentration der Zytokine (D) Tumornekrosefaktor (TNF) α und (E) Interleukin (IL)-6, sowie der Chemokine (F) C-X-C Motif Chemokin Ligand (CXCL)1 und (G) CXCL2/3 in der BAL vier Stunden nach LPS-Inhalation. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A: $n=18/18/15/15/15/15$, B+C: $n=6/8/8/8/8/8$, D-G: $n=13/10-12/8-10/8-10/9/8-10$

war. Für die verminderte Akkumulation von Neutrophilen und PNCs im entzündeten Gewebe in den ADAM17^{CUP}-Tieren ist vermutlich die geringere Ausschüttung von TNF α und CXCL2/3 mitverantwortlich, hier waren die in der BAL vorhandenen Zellen jedoch noch stärker aktiviert als im WT. In den ADAM10^{PF4} könnte die signifikant erhöhte Konzentration von TNF α Aufschluss über die vermehrte Akkumulation von PNCs geben. Aber auch trotz des unveränderten Migrationsverhaltens in den ADAM17^{PF4}-Tieren ergaben sich für diese Mauslinie Veränderungen in der Aktivierung und Ausschüttung der Zytokine.

4.9 Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen

Die Aktivierung und Rekrutierung ist ein Teil, der die beobachteten Unterschiede in der Migration durch die konditionalen Knockouts erklären kann. Die Ergebnisse können jedoch nur bedingt aufeinander übertragen werden. Dies führte zur Untersuchung von an der Migration beteiligten Adhäsionsmolekülen, als zweiten Teil, der die Migration beeinflussen kann. Adhäsionsmoleküle sind Membranproteine auf der Oberfläche von Zellen, die die Interaktion von Zellen untereinander oder mit der extrazellulären Matrix vermitteln. Einige an der Migration von Neutrophilen beteiligten Adhäsionsmoleküle sind Substrate einer oder beider zur Untersuchung stehenden ADAMs. Durchflusszytometrisch wurden vier Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen analysiert, die in direkter oder indirekter Verbindung zu den ADAMs stehen und bekannt dafür sind, im Rahmen der akuten pulmonalen Inflammation eine Rolle zu spielen. Gemessen wurde die Oberflächenexpression der Proteine über die MFI 24 Stunden nach LPS-Inhalation in Blut, Lunge und BAL (Abbildung 4.9).

CD44 ist ein Rezeptor für Hyaluronsäure, der unter anderem auf Neutrophilen und Thrombozyten vorkommt. Er ist verantwortlich für Zell-Zell- und Zell-Matrix Kontakte und Substrat beider ADAMs. Im Blut aller Knockout-Mauslinien wurde, verglichen mit den WT-Tieren, signifikant mehr CD44 auf den Neutrophilen vorgefunden (A). In der Lunge wurde CD44 durch den Knockout von ADAM10 auf Neutrophilen signifikant vermehrt exprimiert, die anderen Knockouts wiesen keine Effekte auf (B). In der BAL führten die Catchup-Knockouts zu einer wesentlich geringeren Oberflächenexpression von CD44, in den PF4-Linien zeigte sich kein Effekt (C).

Die Oberflächenexpression von CD62L wurde ebenfalls quantifiziert. Sie war im Blut der ADAM17^{CUP}-Tiere signifikant erhöht gegenüber den WT-Tieren (D). Dasselbe Bild wurde in der Lunge (E) und der BAL (F) beobachtet. Auch hier war die Expression von CD62L

4 Ergebnisse

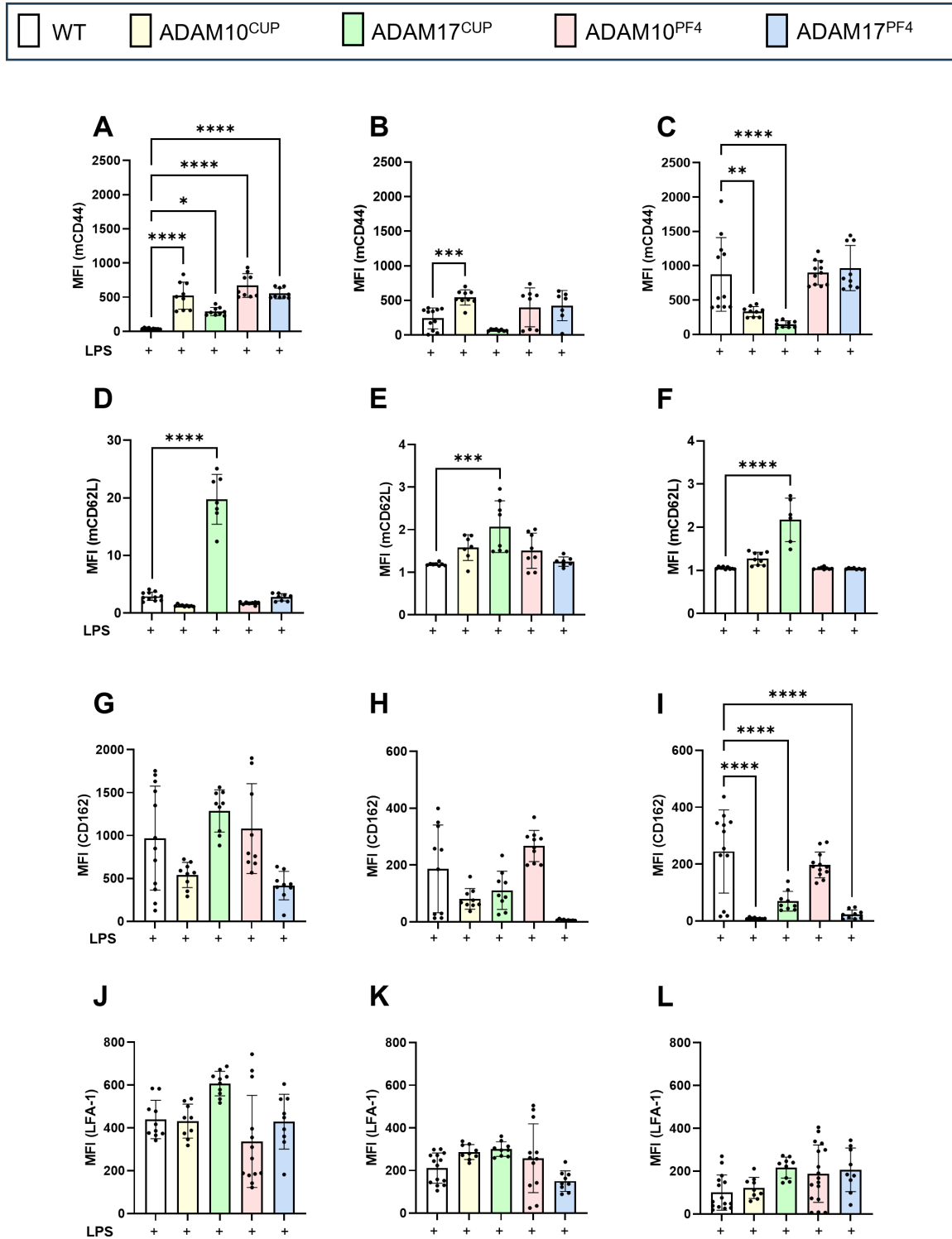


Abbildung 4.9: **Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen nach Inflammation in WT- und Knockout-Tieren.** Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen mittels Durchflusszytometrie. In den drei Kompartimenten Blut, Lunge und BAL (in dieser Reihenfolge für jedes Molekül von links nach rechts dargestellt) wurde jeweils die WT-Kontrollgruppe mit den vier Knockout-Gruppen 24 Stunden nach LPS-Inhalation verglichen. Untersucht wurde CD44 (A-C), CD62L (D-F), CD162 (PSGL-1) (G-I) und LFA-1 (J-L). Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A-L: n=11-15/9-11/7-9/8-12/7-9

4 Ergebnisse

bei Fehlen von ADAM17 auf den Neutrophilen signifikant erhöht. Die anderen Knockout-Mauslinien zeigten gegenüber den WT-Tieren keine wesentlichen Unterschiede.

PSGL-1 (CD162) bindet hauptsächlich an P-Selektin auf Thrombozyten, wodurch die Bildung von PNCs und NETs ausgelöst wird, aber auch die Migration wird durch PSGL-1 beeinflusst. In Blut (G) und Lunge (H) konnten keine wesentlichen Unterschiede in der Oberflächenexpression von PSGL-1 durch die konditionalen Knockouts ausgemacht werden (G). In der BAL zeigten die ADAM10^{CUP}-, ADAM17^{CUP}- und die ADAM17^{PF4}-Tiere gegenüber dem WT eine signifikant geringere Expression von PSGL-1 (I).

LFA-1 ist ein Integrin, welches durch Bindung an JAM-A und ICAM-1, beides Substrate von ADAM10 und ADAM17, den festen Arrest der Leukozyten vermittelt und dadurch eine wichtige Rolle bei deren Migration spielt. Die Oberflächenexpression von LFA-1 war in allen drei Kompartimenten (J-L) in allen Mauslinien konstant und es konnten keine wesentlichen Unterschiede in den Knockout-Linien im Vergleich mit den WT-Tieren festgestellt werden.

CD44 ist Substrat von ADAM10 und spielt vor allem bei der Adhäsion an das Endothel und Epithel eine bedeutende Rolle. Vor allem die Ergebnisse der ADAM10^{CUP}-Mauslinie unterstützen deren Migrationsdaten, da das Fehlen von ADAM10 auf den Neutrophilen die Oberflächenexpression hier erhöht, was wiederum Hinweise auf die vermehrte Akkumulation der Neutrophilen am Endothel und im Interstitium gibt. CD62L wird hingegen nur von ADAM17 gespalten und auch hier zeigt sich, dass der Knockout von ADAM17 zu einer signifikant vermehrten Oberflächenexpression führt. PSGL-1 und LFA-1 sind keine Substrate der beiden ADAMs und werden kaum beeinflusst.

4.10 Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen in murinem Lungengewebe

Da die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der Adhäsionsmoleküle weitere Rückschlüsse auf die Regulation der Rekrutierung von Neutrophilen im Zusammenhang mit den Proteasen ADAM10 und ADAM17 ergeben haben, wurden zur Verifizierung und Erweiterung der Daten Immunfluoreszenzaufnahmen von Neutrophilen in Lungenschnitten angefertigt (Abbildung 4.10). Zur Übersicht wurden die Zellkerne mit DAPI (cyan) angefärbt, Neutrophile wurden mit Ly6G/C (gelb) und Thrombozyten mit CD41 (lila) markiert. CD62L (rot) wurde zur Bestätigung der bereits erhobenen Daten und zum Nachweis der Vergleichbarkeit der Methoden untersucht und zusätzlich JAM-A (grün) angefärbt. Dargestellt werden repräsentative Aufnahmen der Lungenschnitte von WT-Tieren ohne und mit

4 Ergebnisse

LPS, sowie aller vier Knockout-Mauslinien mit LPS (C). Die Quantifizierung und statistische Auswertung erfolgte über die Messung der MFI von CD62L (A) und JAM-A (B).

Die Expression von CD62L auf den Neutrophilen in der Lunge stieg nach Inflammation signifikant an. In Übereinstimmung mit den durchflusszytometrischen Daten, zeigte sich auch hier der Knockout von ADAM17 auf Neutrophilen als wesentlicher Effektor, da die Expression auf den Neutrophilen dieser Mauslinie signifikant mehr CD62L exprimierten, während die anderen Knockouts keine Wirkung erzielten (A).

JAM-A wurde durch die LPS-Inhalation ebenfalls signifikant hochreguliert. ADAM17^{CUP} führte zu einer weiteren signifikanten Erhöhung der Expression. Die beiden PF4-Knockouts, sowie ADAM10^{CUP} zeigten keine wesentlichen Unterschiede in der JAM-A-Expression im Vergleich mit den WT-Tieren.

Die durchflusszytometrischen Ergebnisse zu CD62L konnten hiermit unterstützt werden. JAM-A ist Substrat beider ADAMs, jedoch konnte nur das Fehlen von ADAM17 auf Neutrophilen eine erhöhte Expression von JAM-A auf den Neutrophilen im Lungengewebe erzielen und könnte ein Hinweis auf die signifikant verstärkte Akkumulation von Neutrophilen im Interstitium sein, die durchflusszytometrisch und immunhistologisch beobachtet werden konnte.

4.11 Oberflächenexpression von CD44 und CD62P auf Thrombozyten und PNCs

In der konditionalen Knockout-Mauslinie ADAM10^{PF4} wurde, im Gegensatz zu den anderen Mauslinien, ein Unterschied zwischen der Migration von Neutrophilen und der PNCs festgestellt. Während die Akkumulation von Neutrophilen unverändert zum WT war, war die Rekrutierung der PNCs ins entzündete Lungengewebe signifikant erhöht. Dies konnte weder durch eine vermehrte Aktivierung der Neutrophilen oder Thrombozyten, noch durch die Ausschüttung von Zytokinen erklärt werden, da zwar vermehrt TNF α freigesetzt wurde, CXCL1 jedoch in geringerem Maß. Daher wurden zusätzlich die Adhäsionsmoleküle CD44 und CD62P auf Thrombozyten und auf den PNCs jeweils in Blut, Lunge und BAL mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 4.11). Die Graphen A-C zeigen die Oberflächenexpression von CD44 auf Thrombozyten, die Graphen D-F auf PNCs. G-I stellt die Expression von CD62P auf Thrombozyten dar und J-L auf PNCs.

Der Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 wurde im Vergleich zu den WT-Tieren im Blut der ADAM10^{CUP}- und der ADAM17^{PF4}-Tiere herunterreguliert, während ADAM10^{PF4} eine

4 Ergebnisse

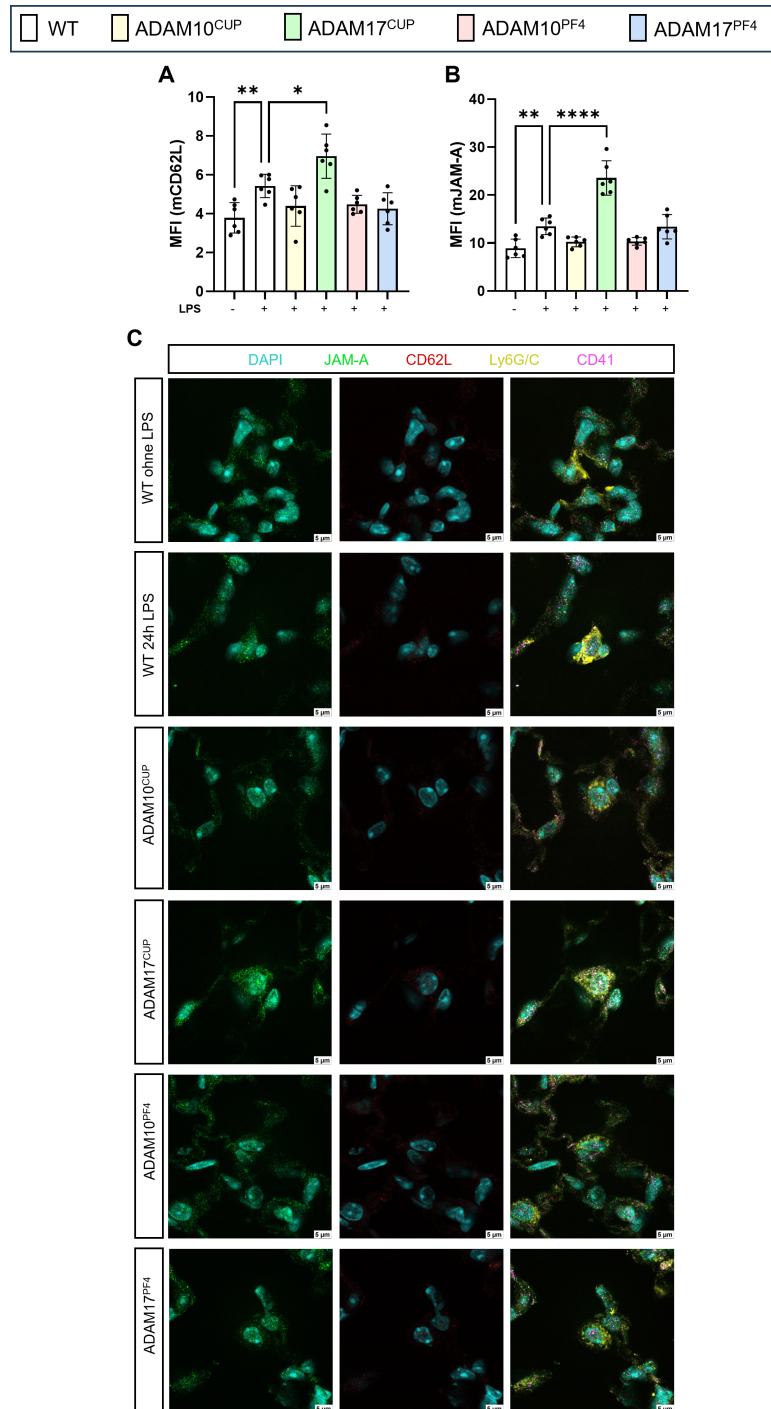


Abbildung 4.10: **CD62L und JAM-A auf Neutrophilen in murinen Lungenschnitten.** MFI der Immunfluoreszenzfärbung von (A) CD62L und (B) JAM-A auf Neutrophilen im Lungengewebe. Verglichen wurde die Proteinexpression von WT-Tieren ohne und mit LPS und die Expression in den vier Knockout-Linien mit LPS jeweils mit der WT-Kontrolle mit Inflammation. (C) Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung der WT-Tiere ohne und mit LPS, sowie der Knockout-Tiere jeweils 24 Stunden nach LPS-Inhalation in 120x Vergrößerung. Die Zellkerne wurden mit DAPI (cyan) angefärbt. Zusätzlich wurde JAM-A (grün, linke Spalte), CD62L (rot, mittlere Spalte) und Ly6G/C (gelb) als Neutrophilen-Marker, sowie CD41 (lila) als Thrombozyten-Marker gefärbt. Die rechte Spalte ist eine Overlay-Aufnahme. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A+B: n=6/6/6/6/6.

4 Ergebnisse

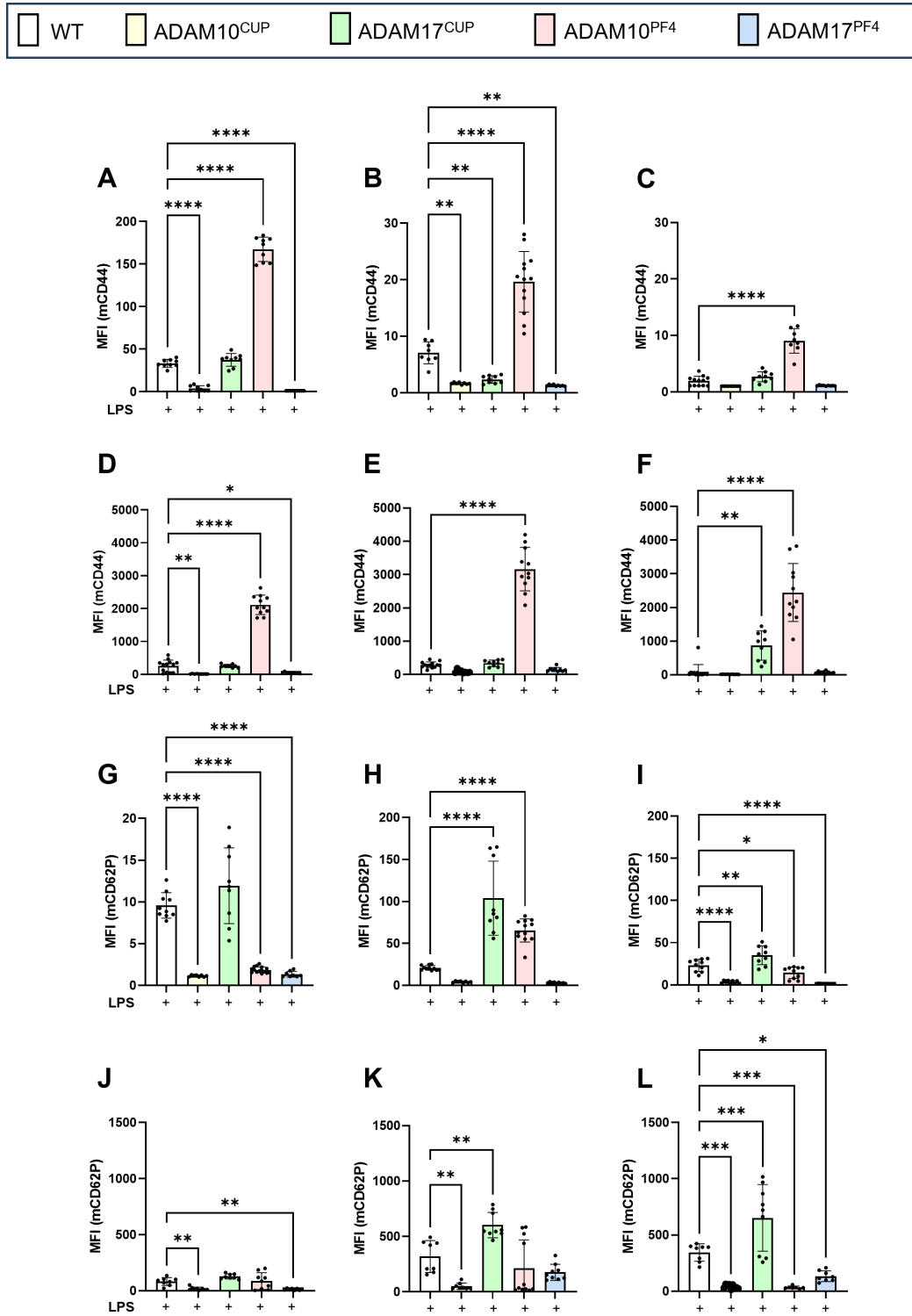


Abbildung 4.11: **CD44 und CD62P auf Thrombozyten und PNCs.** Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf PNCs und Thrombozyten mittels Durchflusszytometrie in Blut, Lunge und BAL (in dieser Reihenfolge von links nach rechts dargestellt). Verglichen wurde die WT-Kontrollgruppe 24 Stunden nach LPS jeweils mit den vier Knockout-Gruppen nach LPS-Inhalation. Untersucht wurde (A-C) CD44 auf Thrombozyten und (D-F) auf PNCs, sowie CD62P auf (G-I) Thrombozyten und (J-L) auf PNCs. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A-L: n=9-12/9/8-9/8-9/7-9.

4 Ergebnisse

signifikant höhere Expression zur Folge hatte (A). In der Lunge war CD44 bei Fehlen von ADAM10 auf Thrombozyten wiederum stark erhöht exprimiert und die anderen Knockout-Linien zeigten eine wesentlich geringere Oberflächenexpression als im WT (B). Die signifikant höhere CD44-Expression bei ADAM10^{PF4} war auch in der BAL zu beobachten, während die anderen hier keine wesentlichen Unterschiede zu den WT-Tieren aufwiesen (C).

Auf den PNCs konnten für CD44 ähnliche Effekte, wie auf den Thrombozyten beobachtet werden, die sich von den Daten der Expression von CD44 auf Neutrophilen teils deutlich unterschieden (Abbildung 4.9). Im Blut zeigten die Knockouts von ADAM10 auf Neutrophilen und von ADAM17 auf Thrombozyten eine wesentlich niedrigere Expression von CD44 verglichen zu WT-Tieren. ADAM10^{PF4} führte zu einer signifikant höheren Expression (D). In der Lunge war lediglich die stark signifikante Hochregulierung von CD44 in den ADAM10^{PF4}-Tieren zu beobachten (E). Die in den Alveolarraum migrierten PNCs der Linien ADAM17^{CUP} und ADAM10^{PF4} wiesen deutlich höhere Werte von CD44 auf ihrer Oberfläche auf als die der WT-Tiere (F).

CD62P war im Blut der ADAM10^{CUP}-Tiere, sowie den beiden PF4-Mauslinien in deutlich geringerem Maß auf der Oberfläche vertreten (G). In der Lunge wurde es jedoch in den Linien ADAM17^{CUP} und ADAM10^{PF4} signifikant mehr auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert (H). Die BAL spiegelte das Bild im Blut wieder, da CD62P bei ADAM10^{CUP} und den PF4-Tieren signifikant weniger auf der Oberfläche vorzufinden war und ADAM17^{CUP} die Expression hochregulierte (I).

Die Expression von CD62P auf PNCs wies ein ähnliches Muster auf, wie die Expression auf den Thrombozyten. Im Blut der ADAM10^{CUP}- und der ADAM17^{PF4}-Tiere war CD62P auf den PNCs signifikant weniger vorzufinden als auf den PNCs der WT-Tiere (J). In der Lunge präsentierten die PNCs der ADAM10^{CUP}-Mauslinie signifikant weniger CD62P auf ihrer Oberfläche als die der WT-Tiere, und die PNCs der ADAM17^{CUP}-Tiere exprimierten deutlich mehr CD62P (K). In der BAL war auf den PNCs von ADAM10^{CUP} und der beiden PF4-Knockouts signifikant weniger CD62P vorgefunden worden und durch den Knockout von ADAM17 auf Neutrophilen erhöhte sich die Expression signifikant (L).

Zusammenfassend folgte die Expression von CD44 und CD62P auf PNCs in den verschiedenen Mauslinien tendenziell dem Expressionsmuster auf den Thrombozyten. Auffallend war, dass CD44 vor allem durch den Knockout von ADAM10 auf Thrombozyten stark hochreguliert wurde, was die Daten zur Migration stützt und auf eine potenziell bedeutsame Rolle des CD44 auf die Rekrutierung der PNCs in der akuten Lungenentzündung hinweist.

CD62P ist kein bekanntes Substrat der beiden ADAMs, wurde jedoch, durch bisher unbekannte Faktoren, durch den Knockout von ADAM17 auf Neutrophilen hochreguliert und durch den Knockout von ADAM17 auf Thrombozyten herunterreguliert.

4.12 Expression von CD40L und GPV in murinen Lungenschnitten

Aufgrund mangelnder technischer Kapazitäten für die Nutzung weiterer Antikörper bei der durchflusszytometrischen Analyse, wurde die Expression von CD40L und GPV auf den PNCs mittels Immunfluoreszenzfärbung dargestellt und quantifiziert (Abbildung 4.12).

CD40L ist Substrat von ADAM10 und ADAM17, wird auf Thrombozyten exprimiert und aktiviert unter anderem Neutrophile durch Bindung an deren CD40. Die Quantifizierung und statistische Auswertung der MFI ergab, dass die Expression von CD40L auf den PNCs in der Lunge der WT-Tiere durch die LPS-bedingte Inflammation nicht modifiziert wurde (A). Ebenfalls zeigte keine der vier Knockout-Mauslinien eine wesentliche Veränderung der Oberflächenexpression von CD40L auf PNCs im Vergleich zu den WT-Tieren.

GPV wird von ADAM17 gespalten. Auf Thrombozyten bildet es zusammen mit GPIIb und GPIX den GPIIb-IX-V-Komplex, welcher durch Bindung an vWF auf beschädigtem Endothel die Adhäsion der Thrombozyten vermittelt. GPV konnte durch die Inflammation in deutlich größerem Maß auf der Oberfläche der PNCs vorgefunden werden (B). Verglichen mit den WT-Tieren verstärkte sich die Expression von GPV auf PNCs durch das Fehlen von ADAM10 auf Neutrophilen und von ADAM17 auf Thrombozyten signifikant. Geringer exprimiert wurde es in den Mauslinien mit Knockout von ADAM17 auf Neutrophilen und von ADAM10 auf Thrombozyten. Repräsentative Aufnahmen zu den quantifizierten Daten der Expression von CD40L und GPV auf PNCs von WT-Tieren ohne und nach LPS, sowie der vier Knockout-Mauslinien jeweils nach LPS werden in Abbildung 4.12 C dargestellt.

Als Resümee für die Adhäsionsmoleküle kann man sagen, dass diese, wie die Aktivierung und Chemotaxis, teilweise Antwort auf das migratorische Verhalten der Neutrophilen und PNCs geben können. Insbesondere CD44, CD62L und GPV konnten hierbei herausstechen. GPV wird hauptsächlich von ADAM17 gespalten und dient der Adhäsion von Thrombozyten an entzündetes Endothel. Die signifikant erhöhte Oberflächenexpression durch den Knockout von ADAM17 auf Thrombozyten könnte daher eine Erklärung für die beobachtete vermehrte Adhäsion von PNCs am Endothel sein.

4 Ergebnisse

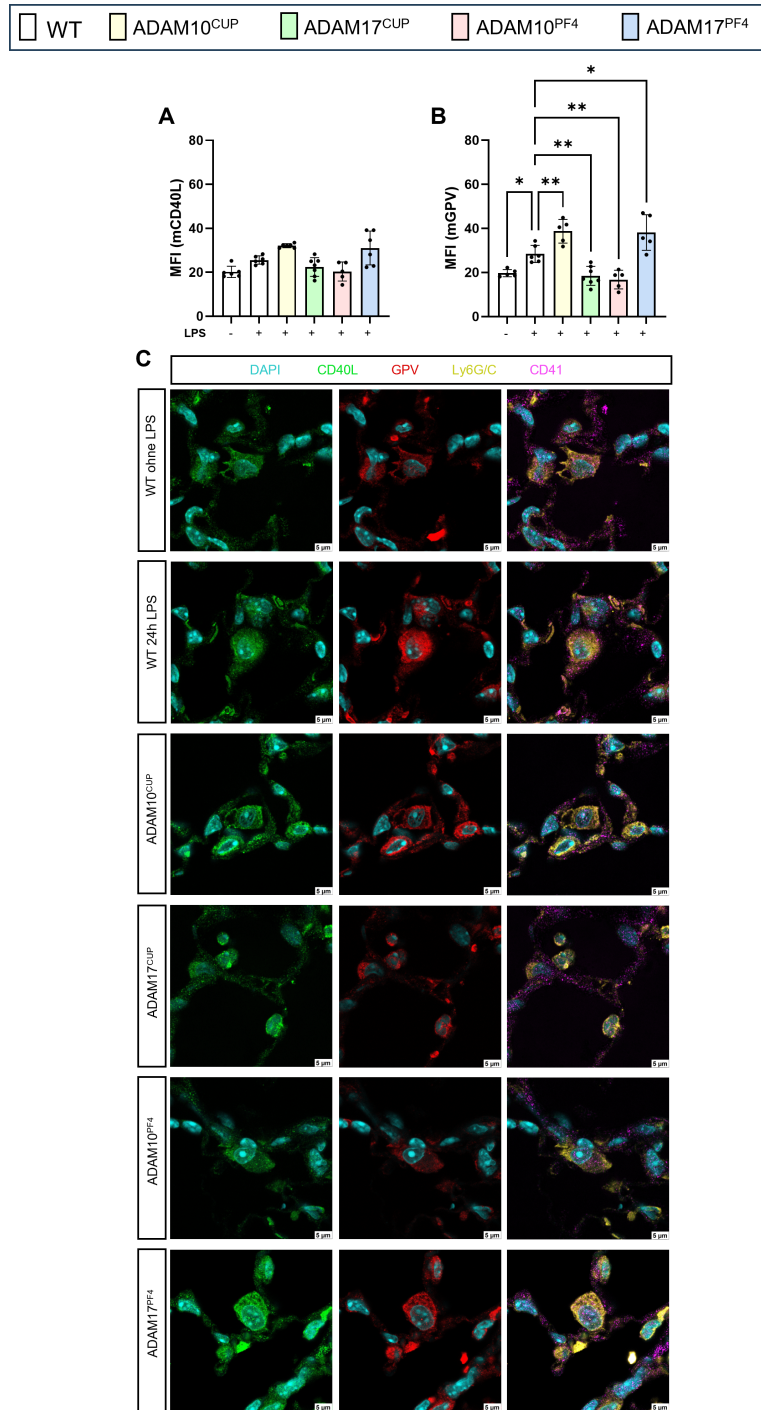


Abbildung 4.12: **CD40L und GPV auf PNCs in murinen Lungenschnitten.** Oberflächenexpression von (A) CD40L und (B) GPV auf PNCs in Lungenschnitten mittels Immunfluoreszenzfärbung. Verglichen wurden WT-Tiere ohne LPS mit WT-Tieren 24 Stunden nach LPS-Inhalation, sowie die WT-Kontrolle mit LPS jeweils mit den Knockout-Tieren mit Inflammation. (C) Repräsentative Aufnahmen der Färbung von PNCs in den Lungen von WT-Tieren ohne und mit LPS, sowie von Tieren der vier Knockout-Mauslinien. Gefärbt wurde CD40L (grün, linke Spalte), GPV (rot, mittlere Spalte), sowie Ly6G/C (gelb) und CD41 (lila). Die rechte Spalte zeigt eine Overlay-Aufnahme. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A+B: $n=6/6/6/6/6$.

4.13 Mikrovaskuläre Permeabilität und endotheliale Adhäsionsmoleküle

Die bis hier erhobenen Daten zum Einfluss von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen und Thrombozyten zeigten, dass das Fehlen beider ADAMs auf den Neutrophilen hinsichtlich der Neutrophilen- und PNC-Migration antiinflammatorische Effekte aufwies. Der Knock-out der Proteasen auf Thrombozyten hatte keinen Effekt auf die Anzahl der Neutrophilen im Alveolarraum. Aufgrund der großen Vielfalt an Substraten, die von ADAM10 und ADAM17 gespalten werden, können diverse an der Inflammation beteiligte Prozesse von den beiden Proteasen beeinflusst werden. Bereits betrachtet wurde die Aktivierung der Neutrophilen und Thrombozyten. Ebenso die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, die teilweise selbst oder deren Rezeptoren Substrate der Proteasen sind und entlang deren Gradient die Migration der Neutrophilen und PNCs erfolgt. Außerdem wurden einige Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen, Thrombozyten und PNCs analysiert, die selbst Substrate der ADAMs sind, oder Bindungspartner solcher. Neben der überschüssigen Einwanderung der Neutrophilen gilt die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität als zweites Hauptmerkmal der akuten pulmonalen Inflammation. Diese führt einerseits dazu, dass die Immunzellen leichter durch das Gewebe hindurchmigrieren können und andererseits zur Bildung eines proteinreichen Lungenödems. Die Neutrophilen und Thrombozyten gehen während der Adhäsion und Transmigration eine enge Bindung mit Endothelzellen ein. Folgend wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch diese engen Zell-Zell-Interaktionen, die auf Neutrophilen und Thrombozyten befindlichen ADAMs die Möglichkeit haben, Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen zu spalten. Zur Klärung der Hypothese wurde die Permeabilität mittels Darstellung der Lungenarchitektur und Messung der Gesamtproteinkonzentration in der BAL untersucht. Desweiteren wurde die Oberflächenexpression endothelialer Adhäsionsmoleküle durchflusszytometrisch und mittels Immunfluoreszenzfärbung begutachtet.

Die Lungenarchitektur wurde histologisch durch Färbung der Schnitte mit Mayer's Hämalan untersucht. Es werden repräsentative Aufnahmen muriner Lungen von WT-Tieren ohne und 24 Stunden nach LPS dargestellt, sowie Aufnahmen der vier Knockout-Mauslinien jeweils 24 Stunden nach LPS (Abbildung 4.13 A). Die statistische Auswertung des Durchmessers der Alveolarsepten zeigte, dass LPS zu einer destruierten Lungenarchitektur mit signifikant aufgeschwemmten Septen führte (B). Das Fehlen der beiden ADAMs auf Neutrophilen oder Thrombozyten durch Knockout hatte keinen wesentlichen Effekt auf die Beschädigung der Alveolarsepten, was ein erster Hinweis darauf war, dass die mikrovaskuläre Permeabilität nicht von neutrophilem oder thrombozytärem ADAM10 und ADAM17 beeinflusst wird.

4 Ergebnisse

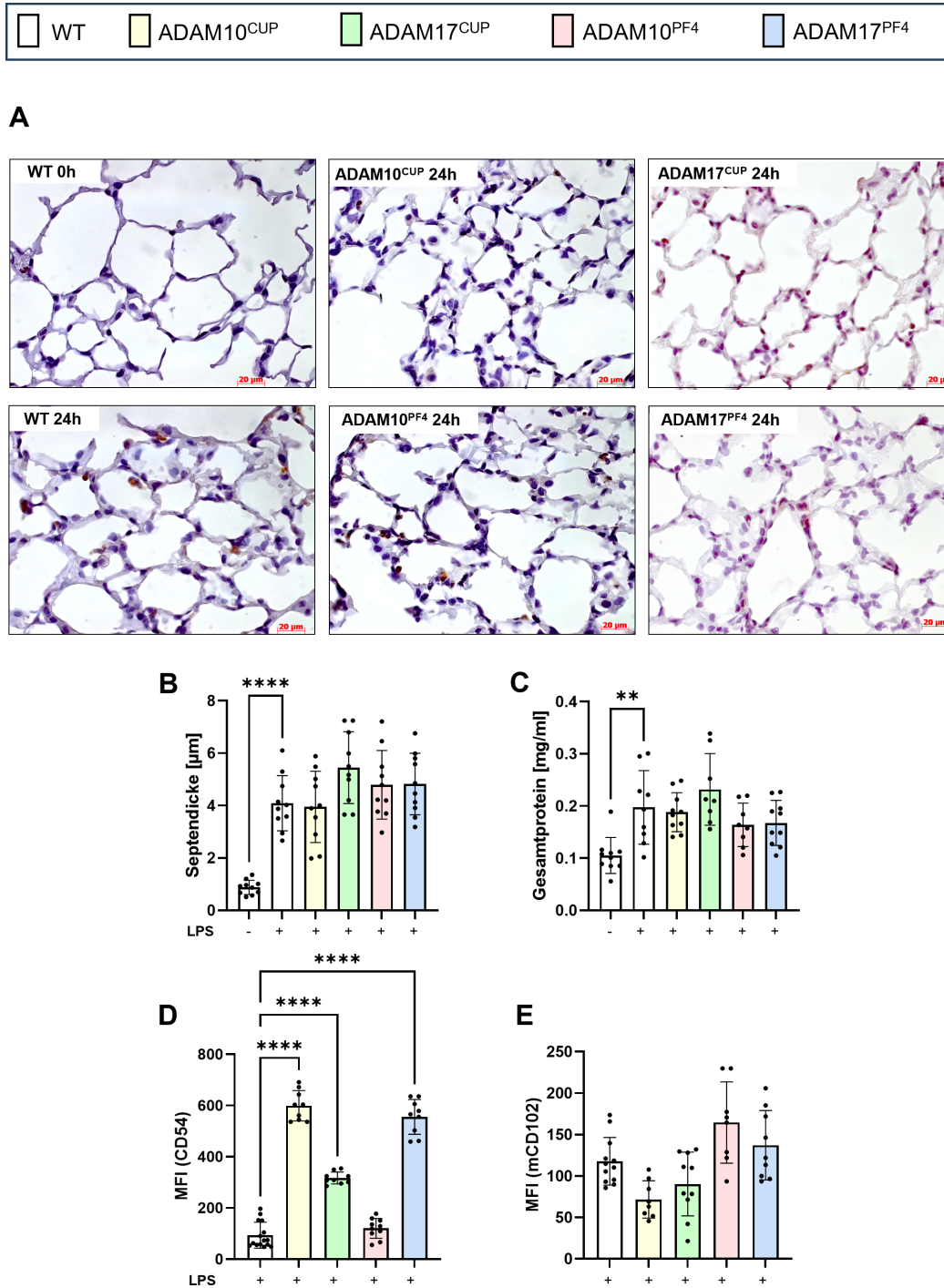


Abbildung 4.13: **Mikrovaskuläre Permeabilität und endotheliale Adhäsionsmoleküle.** (A) Repräsentative Aufnahmen immunhistologischer Färbungen von Lungenschnitten zur Darstellung der Lungenarchitektur mittels Färbung des Gewebes mit Mayer's Hämalaun. Gezeigt wird Lungengewebe der WT-Tiere ohne und 24 Stunden nach LPS, sowie der vier Knockout-Mauslinien ebenfalls nach LPS-Inhalation. (B) Statistische Auswertung der Septendicke mittels ImageJ. Verglichen wurden hier, wie in den folgenden Graphen der Abbildung, die beiden WT-Kontrollgruppen, sowie die WT-Kontrolle mit LPS jeweils mit den Tieren der Knockout-Gruppen mit LPS. (C) Gesamtproteinkonzentration in der BAL 4 Stunden nach LPS-Inhalation. (D) MFI von CD54 (ICAM-1), und (E) CD102 (ICAM-2). Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A: $n=10/10/10/10/10/10$, B: $n=10/10/9/8/8/9$, D: $n=15/9/9/9/9/9$, E: $n=12/8/9/8/9$.

4 Ergebnisse

Die Konzentration an Gesamtprotein korreliert mit der mikrovaskulären Permeabilität. Je permeabler die endotheliale Barriere, desto mehr proteinreiche Flüssigkeit kann in das Interstitium und den Alveolarraum eintreten. Daher wurde die Gesamtproteinkonzentration in der BAL 4 Stunden nach LPS-Inhalation gemessen (C). Diese Ergebnisse stützten die Daten der Septendicke, da die Menge an Gesamtprotein in den WT-Tieren nach Inflammation signifikant anstieg, die Knockout-Mauslinien jedoch keine wesentlichen Unterschiede zum WT aufwiesen.

Trotz der unveränderten mikrovaskulären Permeabilität wurden mehrere Adhäsionsmoleküle 24 Stunden nach LPS auf Endothelzellen durchflusszytometrisch untersucht, die in Interaktion mit Neutrophilen und Thrombozyten treten und damit potenziell deren Migration beeinflussen können. CD54 (ICAM-1) bindet an LFA-1 und MAC-1 der Neutrophilen und spielt damit eine Rolle beim festen Arrest der Immunzellen an das Endothel. Die Knockouts von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen, sowie von ADAM17 auf Thrombozyten erhöhten die Oberflächenexpression von CD54 auf Endothelzellen signifikant, während ADAM10^{PF4} keinen wesentlichen Unterschied ausmachte (D). CD102 (ICAM-2) bindet ebenfalls an LFA-1 und MAC-1, ist jedoch kein bekanntes Substrat der beiden ADAM-Proteasen. Im Vergleich zwischen WT- und Knockout-Tieren konnte kein Unterschied in der Expression von CD102 festgestellt werden (E).

Abbildung 4.14 zeigt des Weiteren die statistische Auswertung der Adhäsionsmoleküle JAM-A (A) und VE-Cadherin (B) mit den jeweils dazugehörigen repräsentativen Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen (C und D), aus denen heraus die Quantifizierung der Proteinexpression stattfand. JAM-A ist Bestandteil der Tight Junctions und Substrat von ADAM10 und ADAM17. Das Induzieren einer Inflammation hatte keinen Effekt auf die Proteinexpression von JAM-A auf Endothelzellen in der Lunge und lediglich der Knockout von ADAM10 auf Neutrophilen führte zu einer vermehrten Expression. VE-Cadherin ist ein Adhäsionsmolekül und Substrat von ADAM10, welches für den Zell-Zell-Kontakt zwischen den Endothelzellen wichtig ist und damit die Funktionalität der endothelialen Barriere aufrechterhält. Die LPS-bedingte Inflammation führte zu einer signifikant geringeren Expression von VE-Cadherin auf den Endothelzellen in der Lunge. Das Fehlen von ADAM10 auf Neutrophilen revidierte diesen Effekt und führte zu einer deutlich höheren Expression von VE-Cadherin.

Zusammenfassend wurde die mikrovaskuläre Permeabilität durch die konditionalen Knockouts von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen und Thrombozyten in der akuten pulmonalen Inflammation nicht wesentlich beeinflusst. Allerdings war die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle CD54, JAM-A und VE-Cadherin durch die Knockouts teilweise ver-

4 Ergebnisse

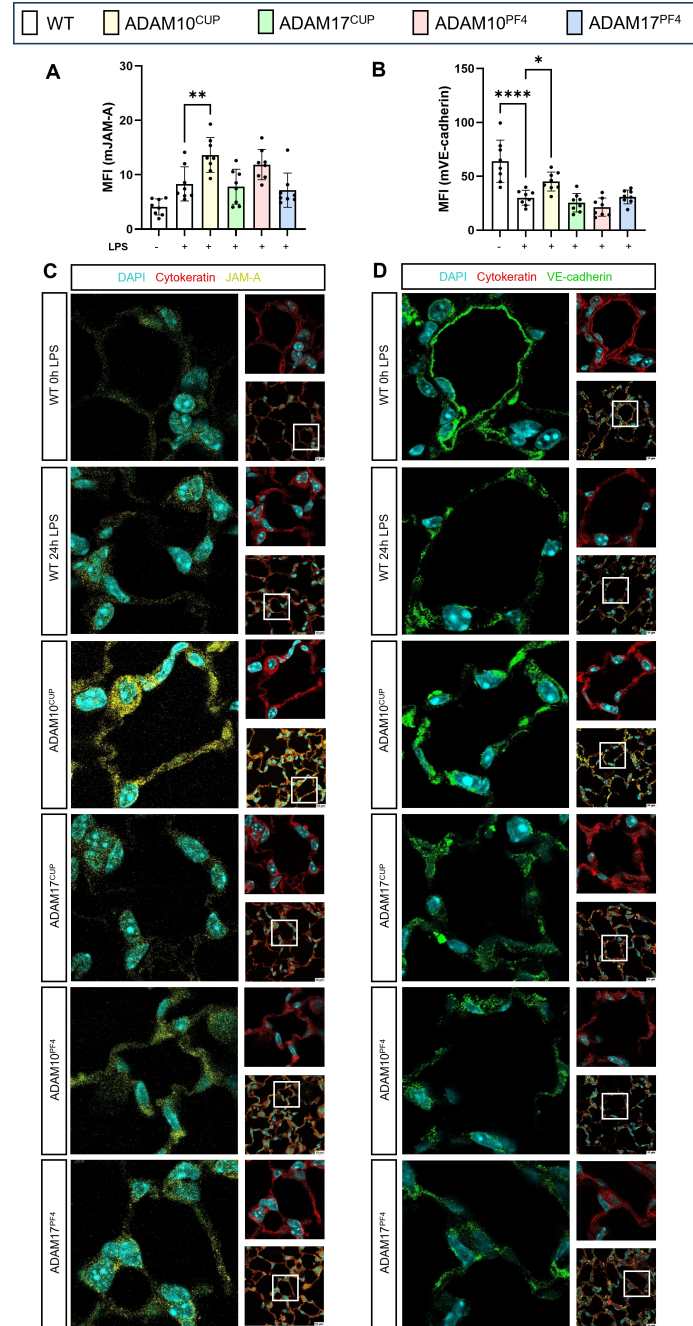


Abbildung 4.14: **JAM-A und VE-Cadherin auf Endothelzellen visualisiert mittels Immunfluoreszenzfärbung.** Oberflächenexpression von (A) JAM-A und (B) VE-Cadherin in murinem Lungengewebe mittels Immunfluoreszenzfärbung. Verglichen wurden WT-Tiere ohne LPS mit WT-Tieren 24 Stunden nach LPS-Inhalation, sowie die WT-Kontrolle mit LPS jeweils mit den Knockout-Tieren mit Inflammation. (C) Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung des Lungengewebes von WT-Tieren ohne und mit LPS, sowie von Tieren der vier Knockout-Mauslinien. Gefärbt wurde JAM-A (gelb, großes Bild) und Cytokeratin als Gewebemarker (rot, kleines Bild oben), das linke untere Bild ist eine Übersichts-Overlay-Aufnahme. (D) Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von VE-Cadherin in murinem Lungengewebe. Es werden die gleichen Versuchsgruppen dargestellt, wie in (C). Gefärbt wurde VE-Cadherin (grün, großes Bild) und Cytokeratin (rot, kleines Bild oben), links unten wird eine Übersichts-Overlay-Aufnahme gezeigt. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A+B: $n=8/8/8/8/8$.

ändert. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Proteasen nicht nur Transmembranproteine auf derselben Zelle, sondern auch auf der Oberfläche anderer Zellen, die eng aneinandergelagert sind, spalten können. Die stärksten Effekte erzielte hierbei das Fehlen von neutrophilem ADAM10.

4.14 TNF-Signalweg als potenzieller Schlüsselspieler der Wirkung von ADAM10 und ADAM17

Bisher konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass neutrophiles und thrombozytäres ADAM10 und ADAM17 auf zellulärer Ebene verschiedene Effekte auf diverse inflammatorische Prozesse haben. Viele dieser Wirkungen können in Zusammenhang mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF α gebracht werden. So veränderte sich in allen Knockout-Mauslinien in der BAL die Freisetzung von TNF α selbst. Zudem konnte ein Einfluss auf die Migration der Neutrophilen und deren Netose-Aktivität durch die Knockouts beobachtet werden. Beide Prozesse werden unter anderem über den TNF α -Signalweg reguliert. Ebenso veränderte sich die Oberflächenexpression von ICAM-1 und die Ausschüttung von CXCL1 und CXCL2/3, deren Transkription ebenfalls durch den TNF α -Signalweg gesteuert werden. Um untersuchen zu können, ob die Hypothese aus den Daten der zellulären Ebene, dass die Wirkung der ADAMs über TNF α läuft, auf transkriptionaler Ebene bestätigt werden können, wurde zunächst mittels RT-qPCR die Genexpression zweier Signalmoleküle aus dem TNF α -Signalweg im murinen Lungengewebe quantifiziert.

Die systemische Inhibition der ADAMs im murinen Lungengewebe führte zu signifikanten Änderungen der Genexpression von TRAF2 und NF κ B, die jeweils Signalmoleküle beider TNF-Rezeptoren sind. Die Expression beider Gene wurde durch die LPS-bedingte pulmonale Inflammation nicht verändert, durch TAPI-1 und GW280264X wurde jedoch sowohl die Genexpression von TRAF2, als auch NF κ B signifikant hochreguliert (Abbildung 4.15 A+B).

TNF α ist Substrat beider ADAMs und dessen Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 werden von ADAM17 gespalten. Dabei haben die intrazellulären Signalwege der beiden TNF-Rezeptoren sehr unterschiedliche Auswirkungen. Die Aktivierung des TNFR1 führt zur Transkription proinflammatorischer Zytokine und Proteine, die die Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten fördern. Die Aktivierung des TNFR2 fördert die Zelladhäsion und Vaskularisierung, führt aber auch zur Degradierung der DNA. (C) zeigt ein vereinfachtes Schema der intrazellulären Signalkaskaden für die beiden TNF-Rezeptoren. TNF α bindet

4 Ergebnisse

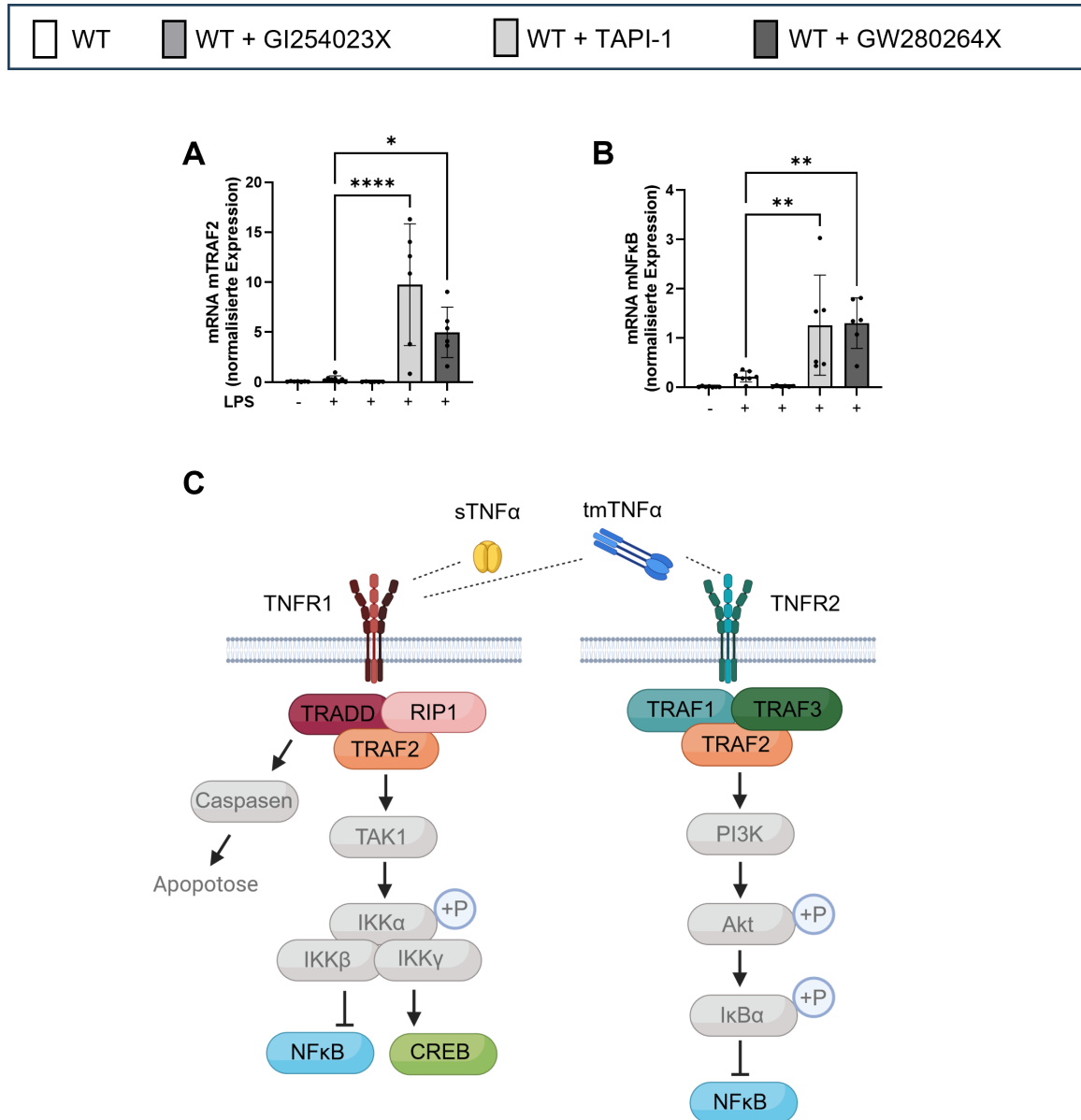


Abbildung 4.15: **Voruntersuchung und schematische Darstellung der TNFR-Signalwege.** (A) Genexpressionsanalyse des Signalmoleküls TNFR-assoziiierter Faktor (TRAF)2 und (B) nuclear factor 'kappa-light chain-enhancer' of activated B-cells (NFκB) in murinem Lungengewebe vier Stunden nach LPS-Inhalation mittels RTqPCR. Verglichen wurde zwischen den Kontrollgruppen ohne LPS und vier Stunden nach LPS-Inhalation, sowie zwischen der Kontrollgruppe mit LPS und jeweils einer der Behandlungsgruppen mit GI254023X, TAPI-1 und GW280264X. (C) Schematische Darstellung der TNFα-Signalwege über den Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR)1 und TNFR2. TNFα bindet an den TNFR1, aktiviert einen Komplex aus TNFR1-associated death domain protein (TRADD), receptor-interacting protein-1 (RIP1) und TRAF2. TRADD aktiviert Caspasen und induziert Apoptose. TRAF2 aktiviert Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1), phosphoryliert den Komplex aus den IκB Kinasen (IKK)α, β und γ, inhibiert damit NFκB und aktiviert cAMP response element-binding protein (CREB). TNFα bindet an den TNFR2, aktiviert den Komplex aus TRAF1, 2 und 3, und dadurch den Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Signalweg. Akt und IκB werden phosphoryliert und inhibieren NFκB. s = löslich (soluble), tm = transmembran-gebunden. Eigene Darstellung, erstellt mit Bio-render.com. <https://BioRender.com/q18q149>. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert ± SD. **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. A+B: n=7/8/6/6/6.

an die Rezeptoren. Beim TNFR1 bildet sich daraufhin ein Komplex aus TRADD, RIP1 und TRAF2. TRADD aktiviert Caspasen und fördert die Apoptose, während TRAF2 über Transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK 1) und die Phosphorylierung des Komplexes aus I κ B Kinase (IKK) α , IKK β und IKK γ die beiden Proteine NF κ B und CREB aktiviert. Bindet TNF α hingegen an den TNFR2 bildet sich ein Komplex aus TRAF1, 2 und 3, welcher wiederum über den Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K)-Signalweg Akt und I κ B α phosphoryliert und darüber NF κ B aktiviert.

Vor allem die Hemmung von ADAM17, aber auch die kombinierte Hemmung beider ADAMs zeigte im murinen Lungengewebe deutliche Hinweise auf das Zusammenspiel zwischen den Proteasen und den TNF α -Signalwegen und bildet somit die Grundlage für weitere Untersuchungen des TNF α -Signallings.

4.15 Untersuchung der TNF α -Signalwege über TNFR1 und TNFR2

Im Verlauf dieser Arbeit wurden auf zellulärer Ebene bereits diverse Zusammenhänge zwischen der Modulation, bzw. dem konditionalen Knockout von ADAM10 und ADAM17 und dem proinflammatorischen Zytokin TNF α festgestellt. Im murinen Lungengewebe konnten ebenfalls erste Hinweise auf ein Zusammenspiel der Proteasen mit dem TNF α auf transkriptioneller Ebene gesammelt werden. Folgend stellte sich die Frage, inwiefern das TNF α -Signalling durch die Modulation der ADAMs verändert wird und genauer, ob Unterschiede zwischen den Signalwegen über TNFR1 und TNFR2 festgestellt werden können. Hierzu wurde in weiteren *in vitro*-Versuchen mit Hilfe von siRNA-Transfektion die Translation des TNFR1-, bzw. des TNFR2-Rezeptors in humanen Neutrophilen unterbunden, wodurch eine Proteinexpression verhindert wurde. Anschließend wurden die Neutrophilen mit GI254023X, TAPI-1 oder GW280264X behandelt und mit LPS stimuliert. Es folgte die Analyse der Genexpression der Moleküle TRADD und CREB spezifisch für den TNFR1-Signalweg, sowie TRAF1 für den TNFR2-Signalweg und NF κ B als Signalmolekül beider Rezeptoren mittels RT-qPCR (Abbildung 4.16).

Die Stimulation mit LPS führte zu einer vermehrten Genexpression von TRADD und nach dem Gen-Silencing des TNFR1 war die Expression signifikant verringert. Die Inhibition der ADAMs zeigte keinen wesentlichen Effekt (A). Auch der Knockout des TNFR2 hemmte die TRADD-Genexpression signifikant und während GI254023X keine Wirkung zeigte, erhöh-

4 Ergebnisse

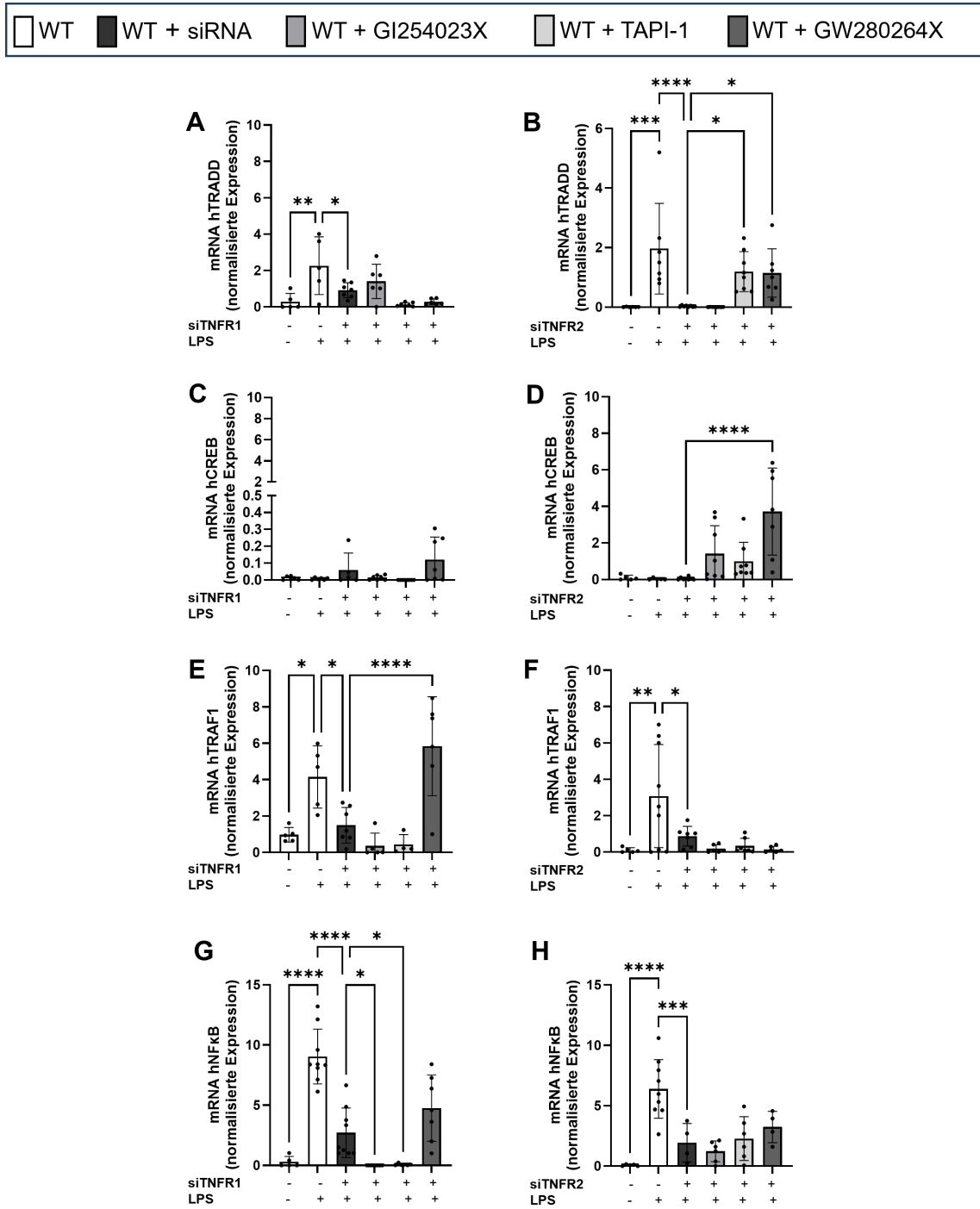


Abbildung 4.16: **Genexpression verschiedener Signalmoleküle der TNFR1- und TNFR2-Signalwege.** (A) Genexpression des Signalmoleküls TRADD nach Knockout des TNFR1. Verglichen wurde hier, wie in allen Graphen dieser Abbildung, zwischen den Kontrollgruppen ohne Knockout ohne und mit LPS-Stimulation, sowie den Kontrollgruppen mit LPS ohne und mit Knockout und die Gruppe mit Knockout und Stimulation jeweils mit den drei ADAM-Inhibitoren. (B) Genexpression von TRADD nach Knockout des TNFR2. (C) Genexpression von CREB bei Knockout des TNFR1 und (D) bei Knockout des TNFR2. (E) Genexpression von TRAF1 nach Knockout des TNFR1 und (F) des TNFR2. (G) Expression von NFkB nach Knockout des TNFR1 und (H) des TNFR2. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. A-H: n=6/6-8/6-8/6-8/6-8/6-8

ten TAPI-1 und GW280264X die Expression von TRADD signifikant gegenüber der Kontrollgruppe mit Blockade des TNFR2 (B).

CREB wurde in seiner Genexpression weder durch LPS noch durch die Blockade des TNFR1 und der zusätzlichen Inhibition der ADAMs wesentlich verändert (C). Die Blockade des TNFR2 mit zusätzlicher Inhibition beider ADAMs in Kombination regulierte die Genexpression von CREB jedoch signifikant hoch (D).

Die Expression von TRAF1 wurde durch die LPS-Stimulation signifikant erhöht und durch Blockade des TNFR1 wiederum signifikant gehemmt (E). Die zusätzliche Inhibition von ADAM10 und ADAM17 getrennt erzielte keine Wirkung, die kombinierte Inhibition beider ADAMs führte aber zu einer signifikanten Hochregulation der Genexpression von TRAF1. Auch das Gen-Silencing des TNFR2 regulierte die Expression von TRAF1 herunter, die Inhibition der ADAMs erzielte keinen weiteren Effekt (F).

NFκB wurde durch die Stimulation ebenfalls signifikant vermehrt exprimiert und der Knock-out des TNFR1 senkte die Genexpression deutlich (G). Die zusätzliche Inhibition von ADAM10 und ADAM17 einzeln hemmte die Genexpression von NFκB signifikant, während bei der kombinierten Inhibition kein wesentlicher Unterschied zu beobachten war. Der Knockout des TNFR2 führte ebenfalls zu einer erheblich geringeren NFκB-Genexpression, die zusätzliche Behandlung mit den Inhibitoren hatte keinen Effekt (H).

Zusammenfassend blieb die Genexpression der Signalproteine des TNFR1-Signalwegs durch die Inhibition von ADAM10 unverändert und wurde durch ADAM17 und die kombinierte Inhibition hochreguliert, wodurch von einer Agonisierung des Signalweges über ADAM17 ausgegangen werden kann. Die Genexpression der Moleküle des TNFR2-Signalweges wurde durch die einzelne Inhibition der ADAMs antagonisiert, durch die kombinierte Inhibition jedoch hochreguliert und der Signalweg damit ebenfalls agonisiert.

4.16 Neutrophilen-Migration im murinen Modell der Ventilator-induzierten Lungenschädigung

Das ARDS, hat, wie bereits beschrieben, diverse Ursachen, welche jedoch in dieselben pathophysiologischen Prozesse münden. Diese sind die überschüssige Einwanderung der Neutrophilen in das entzündete Gewebe und die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität. Die bis zu diesem Punkt der Arbeit erhobenen Daten gehen aus dem Modell der LPS-bedingten pulmonalen Inflammation hervor. LPS sind Bestandteile gramnegativer Bakterien und stellt

4 Ergebnisse

die akute pulmonale Inflammation durch Bakterien in standardisierter Form nach. Ein weiteres murines Modell, welches in der Grundlagenforschung häufig Anwendung findet, ist das beatmungsinduzierte Modell der Ventilator-induzierten Lungenschädigung (VILI). Hierbei wird durch Überdruckbeatmung eine Schädigung der Lunge hervorgerufen, was zur pulmonalen Inflammation führt. Die klinische Relevanz dieses Modells wird durch Studien belegt, die ein erhöhtes Risiko für die Bildung eines ARDS bei beatmeten Patienten auf Intensivstationen aufweisen konnten.

Als Ausblick und Vorarbeit für Folgeprojekte mit dem Ansatz, ADAM10 und ADAM17 als Target für Therapiemöglichkeiten im Rahmen des ARDS einzusetzen, wurden WT- und Knockout-Tiere über sechs Stunden an ein Beatmungsgerät angeschlossen und mit Normaldruck oder Überdruck beatmet. Anschließend erfolgte die immunhistologische Verarbeitung der Mauslungen. Abbildung 4.17 zeigt die Färbung der Neutrophilen (braun, markiert mit roten Pfeilen) im mit Mayer's Hämalaun gegengefärbten Lungengewebe (lila). Dargestellt werden repräsentative Aufnahmen der Lungen von WT-Tieren mit Normalbeatmung (15mbar) und Überdruckbeatmung (45mbar) ohne Behandlung als Kontrollgruppen und jeweils mit der Inhibition von ADAM10, ADAM17 oder der kombinierten Inhibition beider ADAMs (A). Die Beatmung mit Überdruck führte zu einer erheblich vermehrten Akkumulation von Neutrophilen im Lungengewebe in den WT-Tieren. Sowohl die Inhibition von ADAM10 als auch von ADAM17 und deren kombinierte Hemmung revidierten diesen Effekt der Neutrophilen-Akkumulation in der Lunge signifikant (C). Zusätzlich wurden Tiere der vier Knockout-Mauslinien ventiliert und die Lungen histologisch verarbeitet und gefärbt (B). Verglichen mit der Neutrophilen-Anzahl in der Lunge der WT-Tiere, zeigten alle vier Knockout-Mauslinien eine wesentlich geringere Einwanderung von Neutrophilen ins Lungengewebe (D).

Sowohl die systemische Inhibition beider ADAMs, als auch alle vier konditionalen Knockout-Mauslinien hemmten die Migration von Neutrophilen ins entzündete Lungengewebe. Diese ersten Ergebnisse aus dem VILI-Modell zusammen mit den Ergebnissen aus den Versuchen mit LPS-induzierter Inflammation, bilden eine vielversprechende Grundlage für nachfolgende Projekte, in denen die Auswirkung der systemischen Hemmung und der konditionalen Knockouts von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen und Thrombozyten im klinisch hochrelevanten VILI-Modell untersucht werden können.

4 Ergebnisse

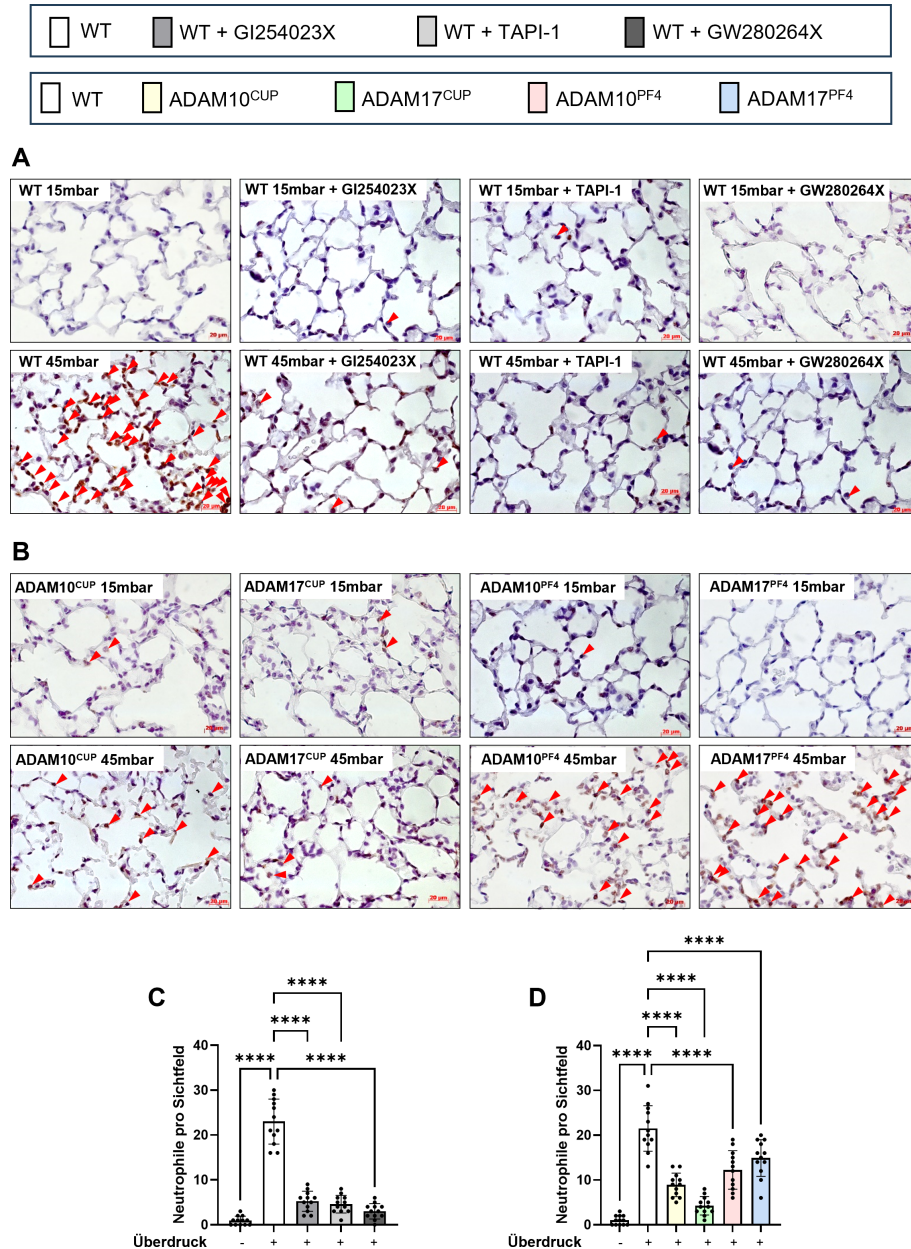


Abbildung 4.17: **Neutrophilen-Akkumulation in murinen Lungen nach Ventilator-induzierter Lungenschädigung mit systemischer Inhibition und konditionalem Knockout von ADAM10 und ADAM17 mittels immunhistologischer Färbung.** (A) Repräsentative Aufnahmen der immunhistologischen Färbung Neutrophiler (braun, markiert mit roten Pfeilen) im Lungengewebe mit Gegenfärbung des Gewebes (lila). Gezeigt werden Aufnahmen von Lungenschnitten von WT-Tieren nach 6 Stunden Beatmung mit Normaldruck und mit Überdruck jeweils ohne und mit Behandlung durch die ADAM-Inhibitoren. (B) Repräsentative Aufnahmen der immunhistologischen Färbung von Neutrophilen in Lungenschnitten der vier Knockout-Mauslinien jeweils nach Beatmung mit Normaldruck und Überdruck. (C) Statistische Auswertung der Anzahl Neutrophiler pro Sichtfeld in WT-Tieren. Verglichen wurde die Normalbeatmung mit der Überdruckbeatmung, sowie die Überdruckbeatmung jeweils mit den Behandlungsgruppen mit ADAM-Inhibitoren. (D) Statistische Auswertung der Neutrophilen-Anzahl pro Sichtfeld. Verglichen wurde Normalbeatmung mit der Überdruckbeatmung in WT-Tieren, sowie die Überdruckbeatmung der WT-Tiere mit den vier Knockout-Mauslinien. Die Daten werden dargestellt als Mittelwert $\pm$ SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. C: $n=12/12/12/12/12$, D: $n=12/12/12/12/12/12$.

4.17 Zusammenfassung der Ergebnisse

Um einen Überblick für die Diskussion der Ergebnisse zu geben, werden die erhobenen Daten im Folgenden nochmals in Kürze zusammengefasst. Die systemische Inhibition der beiden ADAMs über GI254023X, TAPI-1 und GW280264X hemmte die Neutrophilen-Migration im murinen LPS-bedingten Inflammationsmodell und führte zwar zu einer vermehrten Adhäsion, aber ebenfalls verringerten Transmigration im humanen *in vitro* Inflammationsmodell. Die Migration der PNCs wurde sowohl im murinen als auch humanen Modell nur durch GI254023X und GW280264X verringert. Damit konnte nachgewiesen werden, dass ADAM10 und ADAM17 wichtige Regulatoren im Rahmen der akuten Lungenentzündung sind und eine gezielte Hemmung die Entzündungsreaktion moduliert.

Nach erfolgreichem Nachweis, dass die konditionalen Knockouts in den vier Mauslinien erfolgreich waren, wurde die Migration von Neutrophilen und PNCs in diesen untersucht. ADAM10^{CUP} und ADAM17^{CUP} verringerten die Einwanderung von Neutrophilen und PNCs ins entzündete Gewebe. ADAM10^{PF4} hatte keinen Einfluss auf die Rekrutierung der Neutrophilen, führte aber zu einer gesteigerten Migration von PNCs in den Alveolarraum. ADAM17^{PF4} änderte zwar das migratorische Verhalten der Neutrophilen, führte aber weder bei Neutrophilen, noch bei den PNCs zu einer verringerten Rekrutierung in den Alveolarraum. Die Untersuchung von Aktivierungsmarkern, chemotaktischen Molekülen und Adhäsionsmolekülen sollte im Folgenden Aufschluss über die Wirkweise der ADAMs auf die Migration auf zellulärer Ebene geben. Eine verringerte Ausschüttung der Chemokine CXCL1 und CXCL2/3 gab Hinweise auf die gehemmte Rekrutierung der Neutrophilen und PNCs in den ADAM10^{CUP}-Tieren. Zusätzlich könnte die erhöhte Oberflächenexpression von CD44 in dieser Mauslinie die verstärkte Adhäsion der Neutrophilen am Endothel erklären. Die verringerte Migration in der ADAM17^{CUP}-Mauslinie kann durch die reduzierte Freisetzung von TNF α und CXCL2/3 erklärt werden. Spannend war hierbei, dass die migrierten Neutrophilen und Thrombozyten stark aktiviert waren. Eine verstärkte Ausschüttung von TNF α und die vermehrte Oberflächenexpression von CD44 auf PNCs gaben Hinweise auf die gesteigerte Rekrutierung der PNCs ins entzündete Lungengewebe der ADAM10^{PF4}-Tiere. In der ADAM17^{PF4}-Mauslinie wurde das migratorische Verhalten verändert, ohne einen wesentlichen Effekt in der Akkumulation der Neutrophilen im Alveolarraum zu bewirken. Diese Veränderung konnten durch Änderungen in der Aktivierung und Ausschüttung von chemotaktischen Molekülen, aber auch die erhöhte Oberflächenexpression von GPV auf PNCs erklärt werden, wodurch diese am Endothel haften bleiben.

Neben der Neutrophilen-Migration gilt die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität als zwei-

4 Ergebnisse

tes Hauptmerkmal der akuten Lungenentzündung, weshalb diese nachfolgend untersucht worden ist. Diese wurde jedoch von den Knockouts der Proteasen auf Neutrophilen oder Thrombozyten nicht wesentlich beeinflusst. Trotzdem konnte vor allem in der Mauslinie ADAM10^{CUP} eine Änderung der Oberflächenexpression der endothelialen Adhäsionsmoleküle CD54, JAM-A und VE-Cadherin beobachtet werden.

Da die Freisetzung von TNF α in allen Knockoutlinien im Vergleich zum WT verändert war und einige Effekte der systemischen Inhibition und der Knockouts auf das TNF α -Signalling zurückgeführt werden konnten, wurde weiterhin in einem *in vitro* Modell untersucht, wie Signalmoleküle der Signalwege über TNFR1 und TNFR2 durch die ADAM-Inhibition reguliert werden. Hierbei ergab sich, dass der TNFR1-Signalweg durch die Inhibition von ADAM17 und die kombinierte Hemmung beider Proteasen hochreguliert wurde und der TNFR2-Signalweg durch die spezifische Inhibition der jeweiligen ADAMs herunter- und durch die kombinierte Inhibition hochreguliert wurde.

Als Ausblick auf weitere Projekte wurde histologisch die Akkumulation von Neutrophilen im Lungengewebe in einem VILI-Modell untersucht. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die systemische Inhibition, als auch alle konditionalen Knockouts zu einer geringeren Einwanderung von Neutrophilen in das Lungengewebe führten.

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Ergebnisse mit bestehender Literatur

5.1.1 Einfluss der systemischen Inhibition von ADAM10 oder ADAM17 auf die Adhäsion und Migration von Neutrophilen und PNCs

Das ARDS hat zwei Hauptmerkmale - die überschießende Neutrophilen-Migration und die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität (Huppert *et al.*, 2019). Diese Prozesse werden durch körpereigene Botenstoffe reguliert, die unter physiologischen Bedingungen häufig als Transmembranproteine vorliegen und im Rahmen der Inflammation proteolytisch gespalten werden. Die Spaltung findet hauptsächlich über ADAM-Proteasen statt, von denen ADAM10 und ADAM17 mit einer immensen Anzahl von Substraten die wichtigsten Vertreter sind (Pruessmeyer und Ludwig, 2009; Saftig und Reiss, 2011; Rose-John, 2013). Diverse Studien konnten bereits nachweisen, dass ADAM10 vor allem für die Migration von Leukozyten und die Rekrutierung der Alveolarleukozyten verantwortlich ist (Schulz *et al.*, 2008; Pruessmeyer *et al.*, 2014). ADAM17 fördert hauptsächlich die transendotheliale Migration von Leukozyten, die Produktion und Freisetzung inflammatorischer Botenstoffe und hat Einfluss auf die mikrovaskuläre Permeabilität (Dreymueller *et al.*, 2012a).

Als Vorarbeit zum vorliegenden Projekt wurde in einem murinen Modell der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation untersucht, wie sich die systemische Inhibition von ADAM10, ADAM17 und die kombinierte Inhibition beider Proteasen auf das migratorische Verhalten der Neutrophilen und PNCs auswirkt. Es konnte eine stark verringerte Migration sowohl der Neutrophilen als auch der PNCs in den Alveolarraum durch alle drei Inhibitoren gezeigt werden. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zur ADAM10-Inhibition steht die Studie von Klapproth *et al.*, die in einem murinen Modell zum Myokardinfarkt die Migration von Neutrophilen in die Infarktzone untersuchten (Klapproth *et al.*, 2022). In dieser konnte durch GI254023X eine deutlich verringerte Migration festgestellt werden. Der Einfluss pharmakologischer Inhibition von ADAM17 auf die Migration wurde hauptsächlich in murinen Peritonitismodellen untersucht. Tang *et al.* zeigten in Thioglykolsäure-induzierter

5 Diskussion

Peritonitis, dass der unspezifische MMP/ADAM-Inhibitor GM6001 zu einer beschleunigten Neutrophilenmigration in die Peritonealhöhle führt (Tang *et al.*, 2011). Ähnliche Ergebnisse lieferten Mishra *et al.*, die nach Inhibition von ADAM17 mit BMS566394 bereits vier Stunden nach Initiieren einer Peritonitis mittels LPS eine signifikant erhöhte Infiltration von Neutrophilen in die Peritonealhöhle nachgewiesen haben (Mishra *et al.*, 2015). Diese Studien zeigen mit der erhöhten Migration konträre Daten zu der in der vorgelegten Arbeit geringeren Migration. Allerdings beschreiben die beiden Arbeiten eine Beschleunigung des Migrationsprozesses mit Höchstwerten nach vier bis acht Stunden. Dies könnte die Erklärung für den in diesem Projekt beobachteten geringeren Influx von Neutrophilen in den Alveolarraum 24 Stunden nach Inflammationsbeginn sein. Die überschießende Immunreaktion setzt durch die ADAM17-Inhibition rascher ein und nach 24 Stunden ist bereits ein potenziell proinflammatorischer Effekt zu erkennen, indem signifikant weniger Neutrophile im beschädigten Gewebe vorhanden sind. Die Vergleichbarkeit zu den beiden Studien zu ADAM17 ist allerdings beschränkt, da zum einen ein anderes Inflamationsmodell untersucht wurde, und zum anderen unspezifischere Inhibitoren verwendet wurden. Die in dieser Arbeit beobachtete verringerte Einwanderung von Neutrophilen in den Alveolarraum durch GW280264X wird durch eine Studie von Dreymueller *et al.* gestützt, die 24 Stunden nach Verabreichen von LPS ebenfalls eine Reduzierung der Rekrutierung von Neutrophilen um 50% feststellen konnten (Dreymueller *et al.*, 2012a).

Weitere Studien zeigen, dass humane Neutrophile durch die Inhibition der ADAM-Proteasen *in vitro* verstärkt adhären, die Migration jedoch gehemmt wird. Morsing *et al.* wiesen in einem *in vitro* Transmigrationsassay mit Perfusion eine erhöhte Adhäsion der Neutrophilen nach Behandlung mit GI254023X nach (Morsing *et al.*, 2021). Hundhausen *et al.* stellten in einem *in vitro* Adhäsionsassay fest, dass die monozytische Zelllinie Tohoku Hospital Pediatrics-1 (THP-1) nach Behandlung mit GI254023X und GW280264X bereits ohne Stimulation vermehrt an CX3CL1-exprimierenden Endothelzellen adhärten, während nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) nur noch GW280264X in einer vermehrten Adhäsion resultierte (Hundhausen *et al.*, 2003). Um die Daten dieser Studien nachzuvollziehen und mit der ADAM17-Inhibition zu erweitern, wurde ein *in vitro* Adhäsionsassay etabliert und alle drei Inhibitoren führten zu einer vermehrten Adhäsion. Trotz des sehr unterschiedlichen Versuchsaufbaus zwischen den genannten Studien und dem vorliegenden Adhäsionsassay, bestärken die vorliegenden Daten die Ergebnisse der genannten Studien zu ADAM10 und weiten diese auf die Inhibition von ADAM17 aus, die den selben Effekt der vermehrten Adhäsion zur Folge hatte.

Morsing *et al.* haben neben der Adhäsion auch die Transmigration der Neutrophilen mit GI254023X untersucht und nach 5 Minuten eine tendenziell geringere Migration festge-

stellt, aber bereits nach 20 Minuten keinen Effekt mehr beobachtet (Morsing *et al.*, 2021). Pruessmeyer *et al.* hingegen wiesen eine reduzierte CCL2-induzierte Chemotaxis durch die Behandlung von THP-1 Zellen, einer immortalisierten Zelllinie, mit GI254023X nach und zeigten zusätzlich eine Hemmung der Chemotaxis mit TAPI-1 in hohen Konzentrationen (30 und 100 μM) (Pruessmeyer *et al.*, 2014). Die Migration der Neutrophilen in dieser Arbeit war durch alle drei Inhibitoren verringert und die PNC-Migration konnte lediglich durch GI254023X und GW280264X gehemmt werden, was die bereits erzielten Migrationsergebnisse im murinen Modell stützt. Zudem kräftigen die erzielten Daten die Aussage von Pruessmeyer *et al.* und erweitern diese auf primäre Zellen, da im *in vitro* Transmigrationsassay durch die Behandlung mit GI254023X, TAPI-1 und GW280264X jeweils eine verringerte Migration festzustellen war. Pruessmeyer *et al.* erklärten den Effekt von TAPI-1 mit der Tatsache, dass dies in hohen Konzentrationen auch ADAM10 hemmt. In dieser Arbeit war die Migration jedoch schon bei einer TAPI-1 Konzentration von 20 μM beeinträchtigt. Zusätzlich untersuchten wir die MPO-Aktivität der Neutrophilen, die durch die Stimulation mit fMLP erhöht wurde und durch alle drei Inhibitoren wieder verringert war. Die Wirkung der ADAM-Inhibitoren auf die MPO-Aktivität wurden bisher *in vitro* nicht untersucht, jedoch bestätigt die Studie von Monteseirín *et al.* den beobachteten Anstieg der Aktivität nach Stimulation mit fMLP (Monteseirín *et al.*, 2001).

Für das veränderte Migrationsverhalten können verschiedene Ursachen Auslöser sein. Unter anderem kann die Modulierung der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen eine Rolle spielen. CD62L (L-Selektin) und JAM-A sind Adhäsionsmoleküle, die für die Migration der Neutrophilen eine bedeutende Rolle spielen. CD62L ist ein bekanntes ADAM17-Substrat und JAM-A wird von beiden ADAMs gespalten (Pruessmeyer und Ludwig, 2009). Einige Studien belegen Zusammenhänge zwischen Vorkommen und Aktivität von ADAM17 und der Oberflächenexpression von CD62L. Li *et al.* zeigten im Vergleich zu WT-Tieren in chimären Mäusen mit ADAM17-defizienten Neutrophilen eine erhöhte Oberflächenexpression von CD62L auf den Neutrophilen (Li *et al.*, 2006). Sopper *et al.* beobachteten im Rahmen der chronisch myelischen Leukämie eine geringere Oberflächenexpression von CD62L auf T-Zellen und Neutrophilen bei gleichzeitig erhöhter ADAM17-Aktivität und ein vermehrtes Vorkommen von löslichem CD62L im Plasma (Sopper *et al.*, 2017). Weitere Studien belegen den Einfluss der ADAM17-vermittelten Spaltung von CD62L auf die Migration und wiesen ein vermindertes Selektin-vermitteltes Rolling und reduzierte Rekrutierung der Neutrophilen durch die Spaltung von CD62L durch ADAM17 nach (Simon *et al.*, 1999; Hafezi-Moghadam *et al.*, 2001). Die von Li *et al.* beschriebene erhöhte Oberflächenexpression von CD62L konnte auf den *in vitro* transmigrierten Neutrophilen dieser Arbeit nicht nachvollzogen werden, da die Inhibition von ADAM10 und ADAM17 keinen Effekt auf die

Expression hatte. Allerdings wurde im Überstand durch die Inhibition beider ADAMs eine geringere Konzentration an löslichem CD62L nachgewiesen, was zu den Beobachtungen von Sopper *et al.* passt. Die geringere Konzentration des löslichen CD62L ist ein Hinweis auf die bereits gezeigte vermehrte Adhäsion und geringere Migration.

JAM-A wird hauptsächlich von Endothelzellen und Epithelzellen exprimiert, kommt aber auch auf Neutrophilen vor. Die Stimulation von pulmonalen human lung microvascular endothelial cells (HMVEC-L) Endothelzellen mittels LPS führt laut Dreymueller *et al.* zu einer stärkeren Freisetzung von JAM-A (Dreymueller *et al.*, 2012a). Koenen *et al.* zeigten ebenfalls eine erhöhte Freisetzung von JAM-A nach der Stimulation murinen Aortengewebes mit IFN γ und TNF α , die jedoch durch Behandlung mit GW280264X reduziert werden konnte (Koenen *et al.*, 2009). Zusätzlich beobachteten sie in der humanen embryonalen Nierenzelllinie human embryonic kidney 293 (HEK293) eine erhöhte Oberflächenexpression durch Behandlung mit GI254023X und GW280264X, sowie eine höhere Konzentration von löslichem JAM-A nach Stimulation mit IFN γ und TNF α und Reduzierung des Effekts durch GI254023X und GW280264X (Koenen *et al.*, 2009). Die Vergleichbarkeit der beiden genannten Studien zu den Daten dieser Arbeit ist begrenzt, da die Studien JAM-A auf Endothelzellen zeigen. Auf Neutrophilen war jedoch derselbe Effekt zu beobachten, den Koenen *et al.* beschrieben haben, dass ein inflammatorischer Stimulus die Oberflächenexpression von JAM-A erhöht und durch ADAM10- und ADAM17-Inhibition nochmals verstärkt wird. Auf den PNCs wurde in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine erhöhte Oberflächenexpression von JAM-A nach fMLP-Stimulation beobachtet, die Inhibition der ADAMs resultierte aber in keinem wesentlichen Effekt. Die JAM-A-Expression auf PNCs wurde bisher in anderen Studien nicht untersucht und dargestellt und kann daher nicht verglichen oder diskutiert werden.

5.1.2 Nachweis der konditionalen Knockouts von ADAM10 oder ADAM17 auf Neutrophilen oder Thrombozyten

Die detaillierte Untersuchung der beiden Proteasen und ihre zellspezifische Wirkung erfolgte in dieser Arbeit mit vier konditionalen Knockout-Mauslinien. Hierzu wurden jeweils ADAM10 oder ADAM17 spezifisch auf Neutrophilen oder auf Thrombozyten ausgeknockt. Der Nachweis über die erfolgreichen Knockouts verlief über die Quantifizierung der Oberflächenexpression der ADAMs auf Neutrophilen, Thrombozyten und Endothelzellen. Zu diesen konditionalen Knockout-Mauslinien gibt es sehr wenig vergleichbare Studien und kaum eine stellt dar, ob der Knockout erfolgreich war. Bender *et al.* nutzten in ihrer Studie zum Ectodomain-Shedding von GPVI durch Thrombozyten-exprimierte Proteinasen

die ADAM10^{PF4}-Mauslinie und wiesen über Westernblot nach, dass in dieser Mauslinie im Lysat der Thrombozyten kein ADAM10 mehr vorzufinden ist (Bender *et al.*, 2010). Casari *et al.* untersuchten mit der Mauslinie ADAM17^{PF4} den Proteinkinase C (PKC)-Signalweg in Thrombozyten der von-Willebrand-Krankheit, stellten jedoch keinen Nachweis für den erfolgreichen Knockout auf (Casari *et al.*, 2018). Zu den Mauslinien ADAM10^{CUP} und ADAM17^{CUP} wurden keine Studien in der Literatur gefunden, da die meisten bisherigen Studien Vav-Cre Mäuse verwendet haben, welche hämatopoietische Zellen anspricht, oder LysM-Cre Mäuse, welche die myeloische Zelllinie betrifft. Für diese Arbeit wurden jedoch Catchup-Cre Tiere gewählt, in welchen der Genloкус für Ly6G genutzt wird, um eine Cre Rekombinase einzusetzen (Hasenberg *et al.*, 2015). Ly6G wird selektiv auf murinen Neutrophilen exprimiert und ist somit sehr spezifisch für diese Population (Wang *et al.*, 2012; Becher *et al.*, 2014). Der Hauptgrund, warum die meisten Studien die unspezifischeren Linien Vav-Cre und LysM-Cre verwendet haben, ist vermutlich, dass die Catchup-Cre Mauslinie erstmals 2015 vorgestellt wurde und daher zum Zeitpunkt der Studiendurchführung noch nicht zur Verfügung stand.

5.1.3 Migration von Neutrophilen und PNCs nach konditionalen Knockouts von ADAM10 oder ADAM17

Auf Basis bestehender Literatur, in der modulatorische Effekte der ADAM-Proteasen hinsichtlich der Migration von Neutrophilen im Rahmen der Inflammation beschrieben wurden, wurde diese mit konditionalen Knockout-Mauslinien in der LPS-bedingten pulmonalen Inflammation untersucht. Pruessmeyer *et al.* ermittelten die Migration von Neutrophilen in ADAM10 Vav-Cre und ADAM17 Vav-Cre Tieren 24 Stunden nach intranasaler Verabreichung von LPS und kamen zu dem Ergebnis, dass nur das Fehlen von ADAM10 einen hemmenden Effekt auf die Migration hat (Pruessmeyer *et al.*, 2014). Sie stützten diese Ergebnisse mit der Mauslinie ADAM10 LysM-Cre, die dieselben Ergebnisse lieferte. Zusätzlich zeigten sie über die histologische Färbung von Lungenschnitten, dass die Neutrophilen beider Knockout-Linien im Lungengewebe hängenbleiben, da eine deutlich stärkere Akkumulation im Vergleich zu WT-Tieren beobachtet wurde. Im Gegensatz dazu wiesen Arndt *et al.* zwei Stunden nach der Verabreichung von vernebeltem LPS in ADAM17 Vav-Cre Mäusen eine erhöhte Anzahl von Neutrophilen in der BAL nach und nach acht Stunden eine signifikant niedrigere Anzahl (Arndt *et al.*, 2011). Mishra *et al.* konnten in einem murinen Peritonitismodell vier Stunden nach intraperitonealer Verabreichung von LPS in ADAM17 Vav-Cre Mäusen ebenfalls einen Anstieg der Migration von Neutrophilen in die Peritonealhöhle beobachten (Mishra *et al.*, 2015). In den vergleichbaren Catchup-Tieren dieser Arbeit

wurde 24 Stunden nach LPS-Inhalation sowohl durch den Knockout von ADAM10 als auch von ADAM17 eine Reduktion der Neutrophilen in der BAL festgestellt. Für ADAM10 passen die Ergebnisse zu den Daten von Pruessmeyer *et al.*.

ADAM17 zeigte in unseren Versuchen jedoch ebenfalls einen hemmenden Effekt, während Pruessmeyer *et al.* hier keine Wirkung feststellen konnten. Mishra *et al.* und Arndt *et al.* beobachteten zu frühen Zeitpunkten der Inflammation einen Anstieg der Neutrophilenmigration, die aber im weiteren Verlauf zu einer Senkung der Neutrophilenzahl führte, was mit den vorgelegten Ergebnissen zum Zeitpunkt 24 Stunden nach LPS-Inhalation übereinstimmt. Ein Faktor für den nicht vorhandenen Effekt des konditionalen Knockouts von ADAM17 bei Pruessmeyer *et al.* nach 24 Stunden könnte die direkte intranasale Verabreichung von LPS sein, die eventuell eine Verschiebung der Zeitpunkte gegenüber der Inhalation von LPS, die von Arndt *et al.* und in diesem Projekt genutzt wurde, zur Folge hat. Arndt *et al.* und Mishra *et al.* untersuchten jeweils nur ADAM17 und trafen daher keine Aussage zu ADAM10, was die Vergleichbarkeit zwischen den Studien erschwert. Die Knockouts der Proteasen auf Thrombozyten hatten keine wesentlichen Effekte auf die Neutrophilen-Migration und auch in der aktuellen Literatur ist dazu nichts beschrieben.

Die von Pruessmeyer *et al.* histologisch beschriebene erhöhte Akkumulation von Neutrophilen in der Lunge beim Knockout der ADAMs konnte in der vorliegenden Arbeit nur teilweise bestätigt werden. Die Mauslinie ADAM10^{CUP} zeigte bereits eine geringere Adhäsion am Endothel, aber auch die transendotheliale und transepitheliale Migration waren gehemmt. Histologisch konnte keine erhöhte Akkumulation in der Lunge festgestellt werden. ADAM17^{CUP} zeigte histologisch einen vergleichbaren Anstieg der Neutrophilen-Anzahl im Lungengewebe, der durchflusszytometrisch genauer im Interstitium verortet werden konnte. Erklärung für die leicht unterschiedlichen Ergebnisse könnte die abweichende Darreichungsform und dadurch andere Konzentration des LPS sein, sowie die Nutzung verschiedener Cre-Mauslinien.

Auch die Anzahl der in den Alveolarraum migrierten PNCs war bei Knockout beider Proteasen auf den Neutrophilen mittels Catchup-Cre verringert. Ngamsri *et al.* wiesen nach, dass das Fehlen von CX3CR1 und damit die Blockade der CX3CR1/CX3CL1-Achse im Rahmen einer Peritonitis die Bildung von PNCs und deren Migration ins Peritonealgewebe steigert (Ngamsri *et al.*, 2021). CX3CR1 ist der Rezeptor für das Chemokin CX3CL1, welches von ADAM10 und ADAM17 geschnitten wird. Werden die Proteasen ausgeknockt, ist mehr membrangebundenes CX3CL1 vorhanden und die CX3CR1/CX3CL1-Achse wird gestärkt (Hundhausen *et al.*, 2003). Mit den Daten der zwei genannten Studien könnte die Hypothese aufgestellt werden, dass der Knockout von ADAM10 oder ADAM17 zu einer

5 Diskussion

geringeren Spaltung von CX3CL1 führt und dadurch die Migration und PNC-Bildung gehemmt wird. Durch das Fehlen der beiden Proteasen auf Neutrophilen war die Migration der PNCs zwar gehemmt, jedoch konnten im Blut der ADAM10^{CUP}-Tiere sogar mehr PNCs gezählt werden. Beim Knockout von ADAM10 auf Thrombozyten war die PNC-Migration erhöht und in den ADAM17^{PF4}-Tieren die PNC-Bildung im Blut. Dies stützt die aufgestellte Hypothese zunächst nicht, jedoch ist es schwer zu vergleichen, da der Hypothese ein systemischer Knockout von CX3CR1 zugrunde liegt und auf der anderen Seite konditionale Knockouts von ADAM10 und ADAM17 auf einzelnen Zellarten getestet wurden. Dadurch kann die CX3CR1/CX3CL1-Achse auf den beteiligten Zellarten unterschiedlich modifiziert werden und macht eine konkrete Aussage zur Wirkung der ADAMs sehr schwer.

Das Fehlen von ADAM10 und ADAM17 auf Thrombozyten hatte in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Migration der Neutrophilen und die Migration der PNCs wurde nur durch das Fehlen von ADAM10 verstärkt. Dass die Migration der Neutrophilen nicht beeinflusst wird, kann damit erklärt werden, dass die Substrate von ADAM10 und ADAM17 auf Thrombozyten eher für die Interaktion mit und Aktivierung von Endothelzellen, sowie die Bildung von PNCs verantwortlich sind, und die Migration von Neutrophilen nur indirekt betreffen. Proteine, die auf Thrombozyten von einem der ADAMs oder von beiden geschnitten werden, sind beispielsweise CD40L, CD44, GPI α , GPV und GPVI (Black *et al.*, 1997, 2003; Kieseier *et al.*, 2003, 2003; Nagano *et al.*, 2004; Ludwig *et al.*, 2005; Moss *et al.*, 2008; Anderegg *et al.*, 2009; Bender *et al.*, 2010). Fehlt GPVI auf den Thrombozyten, resultiert dies laut Bender *et al.* in weniger stabilen Verbindungen mit Neutrophilen und dadurch reduzierter PNC-Bildung, sowie geringerer Aktivierung der Neutrophilen (Burkard *et al.*, 2023). Dies könnte im Umkehrschluss eine Erklärung für die in diesem Projekt beobachteten, erhöhten PNC-Werte im Blut und am Endothel der Tiere ohne ADAM17 auf Thrombozyten sein. Durch das Fehlen der Protease wird mehr GPVI auf der Oberfläche der Thrombozyten exprimiert, was zu einer vermehrten Bildung von PNCs und stärkerer Aktivierung und damit Adhäsion der Neutrophilen führen kann. Auch GPI α ist ein Substrat von ADAM17, das nach lockerer Bindung an Neutrophile Integrine aktiviert, was zu einer festen Bindung führt (Morgan *et al.*, 2019). So resultiert das Fehlen von ADAM17 auf Thrombozyten auch im Zusammenhang mit GPI α in einer vermehrten Bildung von PNCs, da weniger GPI α gespalten wird und dadurch vermehrt mit Neutrophilen interagieren kann. Auch dies bestärkt Beobachtungen dieses Projektes zur *in vivo* PNC-Bildung in den konditionalen Knockout-Mauslinien ADAM10/17^{PF4}.

5.1.4 Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen und Thrombozyten

Zusammenfassend weisen sowohl vorherige Studien als auch die Ergebnisse des vorliegenden Projektes einen Einfluss von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen auf die Migration der Neutrophilen und PNCs nach, während die Proteasen auf Thrombozyten in der Hinsicht noch weitestgehend unbeleuchtet sind. Die Migration kann über verschiedene Angriffspunkte beeinflusst werden, und dadurch auf vielfältige Weise moduliert werden, was potenziell gegensätzliche Auswirkungen auf die verschiedenen Migrationsschritte haben kann. In diesem Projekt wurde die Aktivität der Neutrophilen und Thrombozyten, sowie die Chemokinausschüttung und die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen, die an der Migration beteiligt sind, als wichtige Modulatoren für die Migration untersucht.

Die Aktivierung von Neutrophilen verläuft in zwei Schritten – dem Priming und der vollständigen Aktivierung (Miralda *et al.*, 2017; Vogt *et al.*, 2018). Das Priming läuft über Chemokine und Adhäsionsmoleküle, wie beispielsweise TNF α und IL-15 (Mastroianni *et al.*, 2000; Bouaouina *et al.*, 2004; Hazeldine *et al.*, 2014). Die vollständige Aktivierung erfolgt über den Kontakt zu DAMPs oder PAMPs, zu denen beispielsweise LPS und HMGB-1 gehören (Hayashi *et al.*, 2003; Hazeldine *et al.*, 2014). Die Aktivierung der Thrombozyten wird durch gebundene, von Thrombozyten sekretierte Produkte stimuliert und die beiden Hauptaktivierungswege verlaufen über die Rezeptoren GPIb-IX-V und C-type lectin-like receptor 2 (CLEC-2), aber auch über GPVI (Ozaki *et al.*, 2013; Herter *et al.*, 2014). Zusätzlich aktivieren sich Neutrophile und Thrombozyten gegenseitig. Die Aktivierung führt bei Neutrophilen zur Rekrutierung, Extravasation, Netose-Aktivität und Degranulierung und bei Thrombozyten ebenfalls zur Degranulierung, PNC-Bildung und Thrombusbildung (Brinkmann *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007; Rossaint *et al.*, 2016; Stark *et al.*, 2016; Meijden und Heemskerk, 2019).

In dieser Arbeit wurde die Freisetzung von MPO und Neutrophilenelastase zur Messung der Aktivität der Neutrophilen gemessen und zusätzlich die Freisetzung von HMGB-1, als Aktivierungsmarker für Thrombozyten. Die Freisetzung aller drei Proteine war durch das Fehlen von ADAM17 auf Neutrophilen gegenüber WT-Tieren erhöht. Direkt vergleichbare Studien gibt es dazu nicht, jedoch könnte die gesteigerte Aktivierung der Neutrophilen in der ADAM17^{CUP} Mauslinie damit erklärt werden, dass durch das Fehlen von ADAM17 die beiden TNF-Rezeptoren auf Neutrophilen nicht mehr geschnitten werden und so erstens nicht in löslicher Form TNF α antagonisieren und zweitens vermehrt als membrangebundene Rezeptoren für lösliches und membrangebundenes TNF α vorliegen. Die Bindung an den Rezeptor führt Studien zufolge zur Aktivierung und damit zur Degranulierung und Netose-Aktivität der Neutrophilen (Neuenfeldt *et al.*, 2022). Zusätzlich aktivieren Neuro-

phile im aktiven Zustand wiederum Thrombozyten, was zu einer gesteigerten Freisetzung von HMGB-1 führt (Stark *et al.*, 2016). Das Fehlen von ADAM17 auf Thrombozyten führt dementsprechend zu einer verringerten Aktivierung der Thrombozyten und Neutrophilen, bezogen auf die Ausschüttung von HMGB-1, MPO und Neutrophilenelastase. Dies ist ein bis dato unbekannter inhibitorischer Effekt, der durch bisherige Studien und auch durch die in diesem Projekt erhobenen Daten nicht erklärt werden kann. Zusammenfassend spiegeln die Ergebnisse der Aktivierung von Neutrophilen und Thrombozyten das veränderte Migrationsverhalten nicht wieder, weshalb anschließend die Rekrutierung über Zytokine untersucht wurde.

Auch die Rekrutierung der Neutrophilen ist ein bedeutender Angriffspunkt für die Modulation der Migration. Diese wird unter anderem über die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen gesteuert. Untersucht wurden in diesem Projekt die proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6. TNF α wird hauptsächlich von Makrophagen am Entzündungsherd ausgeschüttet und IL-6 ebenfalls von Makrophagen, aber auch von Monozyten, T-Zellen und inflammatorisch aktivierten Endothelzellen (Yang *et al.*, 2013; Choy und Rose-John, 2017). Zusätzlich wurde die Freisetzung der Chemokine CXCL1 und CXCL2/3 betrachtet, welches murine funktionale Homologe zu humanem IL-8 sind, das von Monozyten, Endothelzellen und Epithelzellen ausgeschüttet wird und bekannt dafür ist, stark chemotaktisch auf Neutrophile zu wirken (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992; Miura *et al.*, 2001; Belperio *et al.*, 2005).

Pruessmeyer *et al.* beschrieben, dass 24 Stunden nach nasaler Applikation von LPS die Freisetzung von TNF und CXCL1 gesteigert war. Tiere der Linie ADAM10 Vav-Cre zeigten eine reduzierte Ausschüttung von CXCL1, während bei ADAM17 Vav-Cre kein wesentlicher Effekt auftrat (Pruessmeyer *et al.*, 2014). Zusätzlich beobachteten sie keine Unterschiede in der Freisetzung von TNF in beiden Knockout-Linien. Im Gegensatz dazu beschrieben Arndt *et al.* zwei und acht Stunden nach LPS-Inhalation in der BAL deutlich geringere Konzentrationen von TNF α in ADAM17 Vav-Cre Tieren verglichen mit WT-Tieren und zusätzlich nach acht Stunden eine Reduktion der CXCL1-Ausschüttung, jedoch keinen Effekt für CXCL2 (Arndt *et al.*, 2011). In einem Peritonitis-Modell beschrieben Long *et al.* vier Stunden nach Induzieren der Inflammation ebenfalls eine geringere Konzentration von TNF α in der Peritoneallavage der ADAM17 Vav-Cre Tiere (Long *et al.*, 2010). Wie von Pruessmeyer *et al.* beschrieben, wurde in dieser Arbeit ebenfalls eine vermehrte Freisetzung von TNF α und CXCL1, zusätzlich aber auch von IL-6 und CXCL2 durch die LPS-Inhalation beobachtet. Auch passend sind die Ergebnisse zu CXCL1, welches sowohl in den ADAM10 Vav-Cre Tieren bei Pruessmeyer *et al.* als auch in den ADAM10^{CUP} Tieren in diesem Projekt reduziert war. Die Daten für TNF α stimmen nicht überein, da wir im Gegensatz zu Pruess-

meyer *et al.* einen hemmenden Effekt feststellen konnten. Ursache für die unterschiedlichen Beobachtungen könnte die deutlich voneinander entfernt liegenden Zeitpunkte der Messung sein. Pruessmeyer *et al.* untersuchten die Freisetzung der Zytokine 24 Stunden nach LPS-Applikation, während die Messung in der vorliegenden Arbeit vier Stunden nach LPS-Inhalation stattfand. Unterstützt wird diese Vermutung durch die Studien von Arndt *et al.* und Long *et al.*, die zwei, vier und acht Stunden nach Verabreichen von LPS jeweils geringere Konzentrationen von TNF α in den Knockout-Tieren nachgewiesen haben. Arndt *et al.* beobachteten nach acht Stunden zusätzlich eine geringere CXCL1-Konzentration in der BAL, aber noch nicht nach zwei Stunden. In der vorliegenden Arbeit konnte nach vier Stunden kein Effekt in den Knockoutlinien gezeigt werden, was daran liegen könnte, dass der Zeitpunkt noch zu früh war und der Effekt erst später eintritt. Gegensätzlich zu den Ergebnissen von Arndt *et al.*, die für CXCL2 keinen Unterschied in den Knockout-Tieren beobachten konnten, waren die Konzentrationen in dieser Arbeit in allen vier konditionalen Knockout-Linien signifikant verringert. Long *et al.* beschrieben für TNF α und IL-6 im Plasma eine deutlich geringere Konzentration in den Knockout-Tieren, in der Peritoneallavage zeigten sie den Effekt jedoch nur noch für TNF α , weshalb davon ausgegangen werden kann, dass sie hierbei für IL-6 keine Wirkung feststellen konnten. Dies zeigt sich auch in den Daten der vorliegenden Arbeit, in denen vier Stunden nach LPS-Inhalation keine Unterschiede zwischen WT- und Knockout-Tieren für IL-6 festgestellt werden konnte.

TNF α hemmt in Neutrophilen p38-mitogen-activated protein kinase (MAPK), was als Stoppsignal fungiert und die Retention der Neutrophilen fördert (Lokuta und Huttenlocher, 2005). Die vermehrte Freisetzung von TNF α zusammen mit der geringeren Ausschüttung von CXCL1 und CXCL2 bietet eine Erklärung für die geringere Migration der Neutrophilen in den ADAM10^{CUP}-Tieren, jedoch nicht für die anderen Knockouts.

5.1.5 Adhäsionsmolekülexpression auf Neutrophilen, Thrombozyten und PNCs

Der dritte wichtige Angriffspunkt für die Modulation der Migration von Neutrophilen ist nach Aktivierung und Rekrutierung die Veränderung der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen im pathologischen Geschehen. Diese Adhäsionsmoleküle sind entscheidend für die Adhäsion, das Rollen, den Arrest und die Migration der Neutrophilen und können diese an verschiedenen Schritten hemmen oder beschleunigen.

Der Hyaluronsäure-Rezeptor CD44 wird unter anderem auf Leukozyten exprimiert und dessen Bindung an Hyaluronsäure der extrazellulären Matrix ist am Vorgang des Rollens von

Leukozyten beteiligt (Wang *et al.*, 2002). Proteolytisch gespaltenes CD44 agiert als Signalmolekül und aktiviert die Transkription verschiedener Gene, die potenziell die Aktivierung von Leukozyten in der Inflammation beeinflussen (Okamoto *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2002). Nagano *et al.* beschrieben in ihrer Studie über die Regulation der Interaktion von CD44 mit der Zell-Matrix, dass der Knockout von ADAM10 in der Glioblastom-Zelllinie U251MG die Spaltung von CD44 signifikant gehemmt hat, während der Knockout von ADAM17 zu keinem Effekt führte (Nagano *et al.*, 2004). Ähnlich beobachteten Tang *et al.* in einem murinen Modell der Thioglykolsäure-induzierten Peritonitis mit chimären Mäusen sowohl auf zirkulierenden Neutrophilen als auch auf denen in der Peritonealhöhle ebenfalls keine Veränderung der CD44-Expression durch das Fehlen von ADAM17 (Tang *et al.*, 2011). Gegenätzlich berichteten Shi *et al.* in einem *in vitro* Versuch mit murinen Fibroblasten, dass der Hydroxamsäure-basierte ADAM17-Inhibitor IC3 die IM7-induzierte Spaltung von CD44 hemmt. Die in dem vorliegenden Projekt erhobenen Daten zeigen im Blut eine erhöhte Expression von neutrophilem CD44 durch die Knockouts von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen und stimmt somit für ADAM17 nicht mit den Ergebnissen von Tang *et al.* überein, passt aber zu der Aussage von Shi *et al.*. In der Lunge jedoch wurde lediglich beim Knockout von ADAM10 auf Neutrophilen vermehrt CD44 vorgefunden, was die Studie von Tang *et al.* bekräftigt. In der BAL war durch die Knockouts sogar weniger CD44 auf der Oberfläche der Neutrophilen.

Selektine bilden lockere Bindungen zwischen Neutrophilen und Endothel und sind wichtig für das Rollen der Neutrophilen. CD62L ist das von Leukozyten exprimierte Selektin und Substrat von ADAM17 (Pruessmeyer *et al.*, 2014). Tang *et al.* beschrieben im murinen Peritonitis-Modell vier Stunden nach Beginn der Inflammation in chimären Mäusen ohne Expression von ADAM17 auf hämatopoetischen Zellen eine signifikant höhere Oberflächenexpression von CD62L auf Neutrophilen verglichen mit WT-Neutrophilen. Dies galt sowohl für Neutrophile in der Zirkulation als auch für die, die ins Peritonealgewebe migriert waren (Tang *et al.*, 2011). Auch Li *et al.* zeigten diesen Effekt ebenfalls in einem Peritonitis-Modell, jedoch stimuliert durch PMA (Li *et al.*, 2006). In einem Modell der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation bestätigten Arndt *et al.* diese Ergebnisse, indem sie ebenfalls eine signifikante Steigerung der Oberflächenexpression von CD62L in der konditionalen Knockoutlinie ADAM17 Vav-Cre beobachteten (Arndt *et al.*, 2011). Sie unterstützen ihre Aussage zusätzlich durch Messung der Expression von MAC-1, die sich nicht verändert hat und sagen damit aus, dass es durch den Knockout nicht zu einer globalen Hochregulierung von Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen kommt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erhärten die Aussagen der vorherigen Studien und zeigen zusätzlich, dass der konditionale Knockout von ADAM10 auf Neutrophilen und die Knockouts von ADAM10 und ADAM17

5 Diskussion

auf Thrombozyten keinen wesentlichen Effekt auf die Oberflächenexpression von CD62L haben. Zusätzlich liefern die Ergebnisse zu CD62L eine mögliche Erklärung für die verringerte Migration der Neutrophilen in den ADAM17^{CUP}-Tieren da die nicht mehr stattfindende proteolytische Spaltung des CD62L zwar die initiale Phase der Neutrophilenrekrutierung fördert, die effiziente Transmigration dadurch aber gestört wird (Pruessmeyer und Ludwig, 2009).

CD162, auch PSGL-1, ist Bindungspartner für E-, L- und P-Selektin, wobei es für P-Selektin die mit Abstand höchste Affinität besitzt. Es wird für das Rollen von Leukozyten am Endothel und für die Bildung von PNCs benötigt. Weder für ADAM10 noch für ADAM17 ist bekannt, dass sie PSGL-1 proteolytisch spalten. Allerdings konnten Drexhage *et al.* in ihrer Studie zur Apoptose-vermittelten Aktivierung von ADAM10 nachweisen, dass die Inhibition von ADAM10 über GI254023X den Verlust von PSGL-1 auf apoptotischen Zellen der akuten T-lymphozytisch leukämischen Zelllinie CEM und auf CD4⁺ T-Zellen reduziert (Drexhage *et al.*, 2024). Die Inhibition von ADAM17 mittels GM6001 und die kombinierte Inhibition von ADAM10 und ADAM17 durch GW280264X hielten PSGL-1 auf apoptotischen CEM-Zellen aufrecht. In den erhobenen Daten des vorliegenden Projektes zur Oberflächenexpression von PSGL-1 auf Neutrophilen in Blut und Lunge konnte kein Effekt durch das Fehlen der Proteasen auf Neutrophilen oder Thrombozyten festgestellt werden. In der BAL jedoch war die Oberflächenexpression von PSGL-1 auf den Neutrophilen der Linien ADAM10^{CUP} und ADAM17^{PF4} signifikant gesenkt. Die im Alveolarraum befindlichen Neutrophilen bekämpfen dort Pathogene unter anderem mittels Phagozytose, was zur Apoptose der Zellen führt (Kobayashi *et al.*, 2003). Dass das Fehlen der Proteasen also in der BAL, wo sich die apoptotischen Neutrophilen befinden, einen Effekt erzielt, stützt die Aussage von Drexhage *et al.*. Diese sprechen jedoch von einem reduzierten Verlust von PSGL-1 durch die Inhibition von ADAM10, wohingegen in dieser Arbeit durch das Fehlen von ADAM10 auf Neutrophilen und das Fehlen von ADAM17 auf Thrombozyten sogar weniger PSGL-1 auf der Oberfläche der Neutrophilen nachgewiesen wurde. Allerdings ist die Vergleichbarkeit der Studien stark beschränkt, da Drexhage *et al.* ihre Daten aus *in vitro* Versuchen mit Krebszellen und T-Zellen beziehen, die sie mit Dexamethason zur Apoptose stimuliert haben, während unsere Ergebnisse aus einem murinen *in vivo* LPS-induzierten Inflammationsmodell stammen und die Expression von PSGL-1 auf Neutrophilen untersuchten. Sowohl durch die beobachtete Zellart, als auch durch das Setting im Organismus, statt eines *in vitro* Systems können die Effekte der ADAMs stark variieren.

JAM-A ist ein Adhäsionsmolekül, welches hauptsächlich von Endothelzellen, Epithelzellen und Leukozyten exprimiert wird. Es ist Substrat von ADAM17 und in deutlich geringerem Maß auch von ADAM10 (Ostermann *et al.*, 2005; Koenen *et al.*, 2009). Koenen *et al.* stimulierten murine Aorten *ex vivo* mit TNF α und Interferon-gamma (IFN γ) und beobachteten

5 Diskussion

daraufhin eine erhöhte Aktivität von ADAM10 und ADAM17, welche mit der verstärkten Freisetzung von JAM-A korrelierte (Koenen *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurde die Oberflächenexpression von JAM-A auf Neutrophilen über Immunfluoreszenzaufnahmen visualisiert und ausgewertet und die Ergebnisse zeigten lediglich eine vermehrte Expression von JAM-A auf Neutrophilen der ADAM17^{CUP}-Tiere, was zu der Aussage von Koenen *et al.* passt, dass zwar beide ADAMs JAM-A schneiden, ADAM10 jedoch in einer sehr geringen Ausprägung, die in diesem Fall zu keinem wesentlichen Effekt führte.

Bindungspartner von JAM-A ist neben der homophilen Bindung, das Integrin LFA-1, welches von Leukozyten exprimiert wird. LFA-1 ist wichtig für den festen Arrest der Neutrophilen und deren Migration. Es ist selbst kein bekanntes Substrat der untersuchten Proteasen ADAM10 und ADAM17, jedoch seine zwei Bindungspartner JAM-A und ICAM-1, wodurch potenziell eine indirekte Regulation stattfinden kann. Koenen *et al.* beobachteten eine reduzierte Leukozytenmigration bei hohen Konzentrationen von löslichem JAM-A und stellten die Hypothese auf, dass Leukozyten das erste Ziel für lösliches JAM-A sind, da endotheliales JAM-A durch die Position in den interzellulären Bindungen vermutlich schlechter zu erreichen ist (Koenen *et al.*, 2009). Weiterhin vermuteten sie, dass die inhibitorische Aktivität des löslichen JAM-A auf Neutrophile durch das Blocken von LFA-1 zustande kommt, welches dann nicht mehr frei für Bindungen mit membrangebundenen JAM-A auf Endothelzellen ist. Die Oberflächenexpression von LFA-1 auf Neutrophilen war durch die konditionalen Knockouts nicht verändert und bestätigt damit den bisher nicht beschriebenen Zusammenhang zwischen den ADAMs und der Oberflächenexpression von LFA-1.

Neben den oben genannten Adhäsionsmolekülen auf Neutrophilen, welche die Migration direkt beeinflussen, wurden in dieser Arbeit des Weiteren Adhäsionsmoleküle auf Thrombozyten und PNCs untersucht, die durch ihren Einfluss auf die Bindung von Thrombozyten und Bildung von PNCs ebenfalls indirekt die Migration der Neutrophilen, bzw. PNCs modulieren können. Konkret wurden untersucht: GPV, CD44, CD62P und CD40L. GPV ist eine Untereinheit des GPIb-IX-V-Rezeptors der nach Bindung an vWF auf Endothelzellen, sowie P-Selektin und MAC-1 auf Neutrophilen, zur Aktivierung der Thrombozyten führt und Substrat von ADAM17 und zu einem geringeren Teil auch von ADAM10 ist. (Rabie *et al.*, 2005; Gardiner *et al.*, 2007; Moss *et al.*, 2008; Bender *et al.*, 2010). Es bindet an Calmodulin und ist damit involviert in das ADAM17-vermittelte Schneiden von CD62L (Rabie *et al.*, 2005). Nach der Aktivierung der Thrombozyten wird GPV von ADAM17 proteolytisch gespalten (Matthews *et al.*, 2017). Direkt vergleichbare Literatur zur Oberflächenexpression von GPV auf PNCs gibt es derzeit nicht, vergleicht man jedoch die Daten der Thrombozytenaktivierung mittels HMGB-1 aus diesem Projekt, passen diese zu der Aussage von Matthews *et al.*, dass eine erhöhte Aktivierung der Thrombozyten in den ADAM17^{CUP}-Tieren zu einem

geringeren Level von GPV auf der Oberfläche der PNCs führt und bei den ADAM10^{CUP}- und ADAM17^{PF4}-Tieren ein umgekehrter Effekt zu sehen war (Matthews *et al.*, 2017).

Der Hyaluronsäurerezeptor CD44 wird auch auf Thrombozyten exprimiert. Passend zu den Ergebnissen von Anderegg *et al.*, die ADAM10 als konstitutive funktionale Protease für CD44 beschrieben haben, führte in dieser Arbeit sowohl auf den Thrombozyten als auch auf PNCs nur das Fehlen von ADAM10, nicht jedoch von ADAM17 zu einer erhöhten Oberflächenexpression von CD44 (Anderegg *et al.*, 2009).

CD62P ist ein Aktivierungsmarker für Thrombozyten, welcher im inaktiven Zustand in den Granula gespeichert wird und durch die Aktivierung über ROS und TNF α an die Oberfläche mobilisiert wird (Hegazy *et al.*, 2021). Es ist nicht bekannt als Substrat von ADAM10 oder ADAM17 und ein Zusammenhang der Oberflächenexpression von CD62P mit den Proteasen wurde bisher kaum untersucht. Lediglich Zhou *et al.* berichten in ihrer Studie zu thrombozytärem ADAM17 als Biomarker für Brustkrebs von einer Verbindung (Zhou *et al.*, 2021). Dort zeigten sie, dass das Gesamtlevel von thrombozytärem ADAM17 in Gesunden und Brustkrebspatienten gleich ist, die Oberflächenexpression auf aktivierten, CD62P⁺ Thrombozyten der Brustkrebspatienten jedoch verringert ist, während sie in den gesunden Probanden gleich blieb. In der vorliegenden Arbeit war die Aktivität der Thrombozyten in den ADAM10^{CUP}- und ADAM17^{PF4}-Tieren verringert und in den ADAM17^{CUP}-Tieren erhöht. Sowohl auf den Thrombozyten allein als auch auf PNCs korrelierte die Oberflächenexpression von CD62P mit der durch HMGB-1-Ausschüttung gemessenen Aktivität der Thrombozyten und bestätigte damit die Ergebnisse des ELISAs. Desweiteren entspricht dies weitestgehend den Ergebnissen von Zhou *et al.* im gesunden Probanden, wo die Expression von ADAM17 mit CD62P korreliert.

CD40L ist ein Protein, welches auf diversen Zellarten, unter anderem T-Zellen, Neutrophilen und aktivierten Thrombozyten, exprimiert wird (Cognasse *et al.*, 2022). Thrombozytäres CD40L bindet an Endothelzellen und aktiviert dort eine inflammatorische Antwort, was zur Freisetzung von ROS, Adhäsionsmolekülen und Chemokinen führt (Henn *et al.*, 1998; Aloui *et al.*, 2014). Prinzipiell wird CD40L von ADAM10 und ADAM17 geschnitten, allerdings nur auf T-Zellen, nicht auf Thrombozyten (Matthies *et al.*, 2006; Yacoub *et al.*, 2013). Für die proteolytische Spaltung des thrombozytären CD40L sind hauptsächlich MMP2 und MMP9 zuständig (Furman *et al.*, 2004; Menchén *et al.*, 2009; Wenzel *et al.*, 2010; Rahman *et al.*, 2012). Übereinstimmend mit diesen Studien, wurde in dieser Arbeit beobachtet, dass die konditionalen Knockouts von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen und Thrombozyten keinen Effekt auf die Oberflächenexpression von CD40L hatten.

5.1.6 Mikrovaskuläre Permeabilität und Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen

Das zweite Hauptmerkmal der akuten pulmonalen Inflammation, die mikrovaskuläre Permeabilität, wird maßgeblich von endotheliale ADAM10 und ADAM17 gesteuert. ADAM10 erhöht diese im Rahmen der Inflammation durch Spaltung von VE-Cadherin, welches Endothelzellen miteinander verbindet (Schulz *et al.*, 2008). ADAM17 löst durch proteolytische Spaltung von ICAM-1, VCAM-1 und JAM-A ebenfalls Zell-Zell-Verbindungen, was hauptsächlich der erleichterten Migration von Leukozyten dient, aber gleichzeitig zu einer erhöhten Permeabilität des Endothels führt (Hundhausen *et al.*, 2007; Schwarz *et al.*, 2010). Pruessmeyer *et al.* untersuchten die Permeabilität im Rahmen der akuten pulmonalen Inflammation in konditionalen Vav-Cre Knockout-Mäusen durch Messung des Gesamtproteingehaltes in der BAL (Pruessmeyer *et al.*, 2014). Dabei konnten sie eine gesteigerte Gesamtproteinkonzentration durch LPS beobachten und während 24 Stunden nach LPS-Applikation ADAM10 Vav-Cre keinen Effekt zeigte, war die Permeabilität in ADAM17 Vav-Cre Tieren sogar erhöht. Nach 72 Stunden konnten sie für ADAM10 Vav-Cre und ADAM10 LysM-Cre einen protektiven Effekt hinsichtlich der Permeabilität und Ödembildung feststellen, während ADAM17 Vav-Cre zu diesem Zeitpunkt keinen wesentlichen Effekt mehr aufwies. In der vorliegenden Arbeit konnte für die beiden mit Pruessmeyer *et al.* vergleichbaren Catchup-Mauslinien keine Wirkung auf die Gesamtproteinmenge in der BAL und die Veränderung der Lungenarchitektur beobachtet werden, was im Einklang mit den Ergebnissen der ADAM10 Vav-Cre Linie ist. Allerdings zeigten Pruessmeyer *et al.* für die ADAM17 Vav-Cre Linie erst zu einem späteren Zeitpunkt keine Wirkung mehr, was zum einen an der nasalen Applikation liegen könnte, durch die der zeitliche Ablauf und die Stärke der Inflammation variieren kann. Zum anderen ist die andere Knockout-Variante Vav-Cre, die hämatopoetische und endotheliale Zellen betrifft und dadurch die Permeabilität durch den Knockout auf vielfältigere Weise beeinflusst wird, als bei dem spezifischen Knockout auf Neutrophilen durch Catchup-Cre bestimmt mitverantwortlich für die sich unterscheidenden Ergebnisse. Der Einfluss des Fehlens von ADAM10 oder ADAM17 auf Thrombozyten auf die mikrovaskuläre Permeabilität wurde in bisherigen Studien nicht untersucht und hatte in der vorliegenden Arbeit, wie auch der Knockout auf Neutrophilen, keinen Effekt. Da Thrombozyten für die Bildung von Zell-Zell-Verbindungen zwischen Endothelzellen und deren Modulation im Rahmen einer Inflammation eine untergeordnete Rolle spielen, war zu erwarten, dass der Knockout von ADAM10 und ADAM17 auf Thrombozyten keine Rolle für die Permeabilität spielt.

Trotz des nicht vorhandenen Einflusses von neutrophilem oder thrombozytärem ADAM10

und ADAM17 auf die mikrovaskuläre Permeabilität, wurden die Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ICAM-2, JAM-A und VE-Cadherin auf der Oberfläche von pulmonalen Endothelzellen analysiert, da durch die enge Bindung von Neutrophilen und PNCs während des Migrationsvorganges potenziell auch endotheliale Adhäsionsmoleküle von den Proteasen auf Neutrophilen und Thrombozyten gespalten werden können. ICAM-1 (CD54) wird von verschiedenen Zellarten, aber vor allem von Endothelzellen exprimiert und ist Substrat beider ADAMs (Tsakadze *et al.*, 2006; Morsing *et al.*, 2021). Tang *et al.* wiesen in einem murinen Peritonitis-Modell mit chimären Mäusen ohne ADAM17 auf Neutrophilen eine verringerte Expression von ICAM-1 auf Neutrophilen nach Stimulation mit Thioglykolsäure nach, die sich nicht von der Expression auf Neutrophilen von WT-Tieren unterschied (Tang *et al.*, 2011). Morsing *et al.* zeigten in einem *in vitro* Modell mit HUVEC-Zellen, dass die Inhibition von ADAM10 die Spaltung von endotheliale ICAM-1 verringerte (Morsing *et al.*, 2021). Sie erklärten dies mit der proteolytischen Spaltung des ICAM-1 an der basolateralen Seite der Endothelzellen, um Neutrophile nach der Migration zu lösen, wobei die Ektodomäne an den Neutrophilen hängen bleibt und weniger ICAM-1 auf den Endothelzellen nachgewiesen werden kann. In der vorliegenden Arbeit war die Expression von ICAM-1 auf Endothelzellen in beiden Catchup-Knockoutlinien und ADAM17^{PF4} höher, verglichen mit den WT-Tieren, was im Zusammenhang mit der geringeren Migration zu der Aussage von Morsing *et al.* passt, da weniger Neutrophile an der basolateralen Seite angelangen und dort die Ektodomäne nach der Spaltung mitnehmen. Trotz Vergleich einer *in vitro* Studie mit *in vivo* Daten weisen die Ergebnisse in eine ähnliche Richtung und die vorgelegte Arbeit stärkt die bisherigen Studien. Die Vergleichbarkeit zur Studie von Tang *et al.* ist schwierig, da hier die Expression von ICAM-1 auf Neutrophilen gemessen wurde auf denen ADAM17 nicht vorhanden war und damit quasi eine autokrine Reaktion beobachtet wurde, während in der vorliegenden Arbeit endotheliales ICAM-1 bei einem Knockout von neutrophilem ADAM17, also im Prinzip eine parakrine Verbindung untersucht wurde.

ICAM-2 ist kein Substrat von ADAM10 oder ADAM17 und auch dessen Bindungspartner LFA-1 und MAC-1 werden nicht von den beiden Proteasen gespalten. Arndt *et al.* wiesen für MAC-1 nach, dass dessen Expression als nicht schneidbares Molekül in ADAM17 Vav-Cre Mäusen gleich bleibt und stellten damit die Hypothese auf, dass es zu keiner generellen Hochregulation von Adhäsionsmolekülen durch das Fehlen von ADAM17 auf Leukozyten kommt (Arndt *et al.*, 2011). Diese Hypothese wird durch unsere Ergebnisse für ICAM-2, dessen Oberflächenexpression sich durch die konditionalen Knockouts, aber das Vorhandensein von ADAM10 und ADAM17 auf Endothelzellen nicht verändert hat, gestärkt.

Die Expression von JAM-A war in dieser Arbeit im Lungengewebe durch das Fehlen von ADAM10 auf Neutrophilen erhöht. Koenen *et al.* beschrieben in humanen embryonalen

Nierenzellen ebenfalls eine erhöhte Oberflächenexpression von JAM-A durch die Behandlung mit GI254023X und GW280264X, was zu den Werten der vorliegenden Arbeit passt (Koenen *et al.*, 2009). Die Vergleichbarkeit ist jedoch nur bedingt vorhanden, da Koenen *et al.* in einem *in vitro* System arbeiteten und die Expression von JAM-A auf den Zellen, auf denen die ADAM-Inhibition stattfand, gemessen wurde. Im Gegensatz dazu sind die Daten der vorliegenden Arbeit aus *in vivo* Experimenten und die ADAMs auf Neutrophilen oder Thrombozyten ausgeknockt, während JAM-A auf Endothelzellen gemessen wurde. Trotz allem zeigen die Daten der beiden Arbeiten in die gleiche Richtung und stützen einander.

VE-Cadherin ist Teil der *Adherens Junctions* zwischen Endothelzellen und wird von ADAM10 proteolytisch gespalten (Carden *et al.*, 1998; Schulz *et al.*, 2008). Schulz *et al.* zeigten im Westernblot, dass GI254023X, TAPI-1 und GW280264X die Freisetzung von löslichem VE-Cadherin von humanen Endothelzellen der Nabelschnur reduzierten (Schulz *et al.*, 2008). Morsing *et al.* bestätigten diese Ergebnisse zur geringeren Freisetzung von löslichem VE-Cadherin durch Inhibition von ADAM10 auf Neutrophilen und zeigten zusätzlich, dass die Expression des ungespaltenen VE-Cadherins auf den Zellen gleichbleibt (Morsing *et al.*, 2021). Dies spiegelt die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit wieder, da auch hier die Expression im Lungengewebe durch die konditionalen Knockouts nicht verändert wurde. Lediglich das Fehlen von ADAM10 auf Neutrophilen führte zu einer erhöhten Expression von VE-Cadherin im Lungengewebe.

5.1.7 TNF-Signalweg als zentraler Regulator der Wirkung von ADAM10 und ADAM17

Der TNFR1 interagiert sowohl mit transmembranem als auch löslichem TNF α (Grell *et al.*, 1998). Durch seine Aktivierung wird eine Signalkaskade über TRADD, TRAF2 und RIP1 ausgelöst und endet in der Aktivierung von NF κ B und CREB, wodurch proinflammatorische Prozesse und die Apoptose angestoßen werden (Hsu *et al.*, 1995; Sedger und McDermott, 2014). Der TNFR2 interagiert hauptsächlich mit transmembranem TNF α , seine Aktivierung führt über TRAF1/2/3 ebenfalls zur Aktivierung von NF κ B und führt regenerative Funktionen aus (Chen *et al.*, 1995; Kanayama *et al.*, 2004; Fitzhugh *et al.*, 2012).

TNF α wird von ADAM10 und ADAM17 proteolytisch gespalten und beide Rezeptoren sind zusätzlich Substrat von ADAM17 (Black *et al.*, 1997; Moss *et al.*, 1997; Solomon *et al.*, 1999; Reddy *et al.*, 2000). Dass alle drei Bindungspartner von mindestens einer ADAM-Protease moduliert werden, weist bereits darauf hin, dass die ADAMs bedeutende Regulatoren des TNF-Signalings sind. Allerdings sind die Zusammenhänge sehr komplex und die Inhibition

5 Diskussion

der ADAMs hat im Hinblick auf das TNF-Signalling keine eindeutigen pro- oder antiinflammatorischen Effekte. Aufgrund der Komplexität der Regulation über die ADAM-Proteasen wird in Tabelle 5.1 zusammenfassend dargestellt, wie sich das Gen-Silencing der beiden TNFR, sowie die zusätzliche Behandlung der Neutrophilen nach der Literatur theoretisch auswirkt. Für die Beurteilung der Auswirkung wurde davon ausgegangen, dass der Knock-out der TNFR zu einer Blockade des jeweiligen Signalweges führt. Weitere Grundlage war, dass durch die Inhibition von ADAM10 TNF α und die beiden TNFR weiter gespalten werden, durch ADAM17-Inhibition TNF α , aber nicht die TNFR weiter gespalten werden und durch die kombinierte ADAM10/17-Inhibition die Spaltung von TNF α und der TNFR gehemmt wird.

Eine zweite Tabelle zeigt die in der vorgelegten Arbeit gemessenen Genexpressionen für Signalmoleküle der beiden TNFR-Signalwege nach Gen-Silencing der Rezeptoren und Inhibition der ADAMs und die daraus geschlossene Wirkung auf die Signalwege (Tabelle 5.2).

Tabelle 5.1: Literaturbasierte Wirkung von Gen-Silencing und ADAM-Inhibition auf das TNF-Signalling.

Blockade/ Inhibition	TNF α	TNFR 1	TNFR 2	TNFR1- Signalweg	TNFR2- Signalweg
TNFR1	ja	ja	ja	blockiert	↓ durch sTNF α , ↓ durch sTNFR
TNFR1/ADAM10	ja	ja	ja	blockiert	↓ durch sTNF α , ↓ durch sTNFR
TNFR1/ADAM17	ja	nein	nein	blockiert	↓ durch sTNF α , ↑ durch tmTNFR
TNFR1/ADAM1017	nein	nein	nein	blockiert	↑ durch tmTNF α , ↑ durch tmTNFR
TNFR2	ja	ja	ja	↑ durch sTNF α , ↓ durch sTNFR	blockiert
TNFR2/ADAM10	ja	ja	ja	↑ durch sTNF α , ↓ durch sTNFR	blockiert
TNFR2/ADAM17	ja	nein	nein	↑ durch sTNF α , ↑ durch tmTNFR	blockiert
TNFR2/ADAM1017	nein	nein	nein	↑ durch tmTNFR	blockiert

Tabelle 5.2: Gemessene Effekte des Gen-Silencing und der ADAM-Inhibitionen und daraus geschlossene Wirkung auf die TNFR-Signalwege.

Blockade/Inhibition	TRADD	CREB	TRAF1	NFκB	TNFR1-Signalweg	TNFR2-Signalweg
TNFR1	↓	=	↓	↓	gehemmt	gehemmt
TNFR1/ADAM10	=	=	=	↓	neutral/gehemmt	neutral/gehemmt
TNFR1/ADAM17	=	=	=	↓	neutral/gehemmt	neutral/gehemmt
TNFR1/ADAM1017	=	=	↑	=	neutral	aktiviert
TNFR2	↓	=	↓	↓	gehemmt	gehemmt
TNFR2/ADAM10	=	=	=	=	neutral	neutral
TNFR2/ADAM17	↑	=	=	=	neutral/aktiviert	neutral
TNFR2/ADAM1017	↑	↑	=	=	aktiviert	neutral

Verglichen wurde die Tabelle mit zusammengesetzten Daten aus bisherigen Studien zur Wirkung der ADAMs auf den TNFR1- und TNFR2-Signalweg und den sich daraus ergebenden Hypothesen zur Agonisierung oder Antagonisierung der Signalwege mit der Tabelle der in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten (Ermert *et al.* (2003); Schumacher und Rose-John (2022); Solomon *et al.* (1999), Trifilieff *et al.* (2002); Sedger und McDermott (2014); Neuenfeldt *et al.* (2022); Horiuchi *et al.* (2010)). Hierbei fällt auf, dass die Daten in allen Behandlungskombinationen in die ähnliche oder gleiche Richtung weisen. Der TNFR1-Signalweg wird vor allem durch ADAM17 moduliert, während der TNFR2-Signalweg durch die kombinierte Inhibition der beiden ADAMs moduliert werden konnte. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zur Wirkung der ADAMs auf die Signalwege der beiden TNFR stützen damit die gängige Literatur, wobei sie je nach Behandlung stark korrelieren, oder bisherige Ergebnisse aus Studien zumindest nicht widerlegen, wenn nur eine leichte Korrelation der Daten besteht.

5.1.8 Ventilations-induzierte akute Lungenschädigung als Ausblick auf klinisch relevante Folgeprojekte

In einem Volumen-kontrollierten VILI-Modell beschrieben Kaynar *et al.* eine Korrelation zwischen dem Tidalvolumen und der gezählten Anzahl von Neutrophilen in der BAL, wobei die Anzahl der Neutrophilen mit höheren Volumina deutlich anstieg (Kaynar *et al.*, 2008). Wu *et al.* konnten in ihrer Studie über den Sphingosin-1-Phosphat Rezeptor 1 (S1PR3)

einen indirekten Zusammenhang zwischen ADAM10 und der Anzahl migrierter Neutrophiler im Rahmen eines VILI-Modells beobachten (Wu *et al.*, 2023). Sie zeigten, dass die Überexpression des S1PR3 die ADAM10-vermittelte Spaltung von VE-Cadherin induziert und beschrieben zusätzlich, dass die Blockade des S1PR3 zu einem geringeren Influx der Neutrophilen ins Lungengewebe führt. Auch für ADAM17 gibt es Hinweise darauf, dass es Einfluss auf die Migration der Neutrophilen im VILI-Modell hat. Su *et al.* untersuchten den Toll-like Rezeptor (TLR)4 in der Efferozytose von Makrophagen in einem VILI-Modell und konnten dabei zeigen, dass heat shock protein 70 (Hsp70) die ADAM17-vermittelte Spaltung von Mer unterdrückt und dadurch die Anzahl Neutrophiler in der BAL verringert (Su *et al.*, 2021).

In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass sowohl die systemische Inhibition der ADAMs als auch alle vier konditionalen Knockoutlinien einen signifikant geringeren Influx von Neutrophilen in das Lungengewebe zur Folge hatten. Dies erhärtet die Ergebnisse aus den vorigen Studien, in denen die beiden ADAMs zwar nicht direkt inhibiert oder deletiert waren, jedoch in ihrer Funktion gehemmt worden sind und dadurch die Migration der Neutrophilen verringert haben.

5.2 Methodische Überlegungen und Limitationen

Das verwendete murine Modell der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation ist ein standardisiertes Modell in der Grundlagenforschung zum akuten Lungenversagen und dem ARDS (Matute-Bello *et al.*, 2008). Es bietet zuverlässige Ergebnisse mit geringen Standardabweichungen, wodurch die Zahl der zu verwendenden Tiere pro Behandlungsgruppe möglichst geringgehalten werden kann. Zudem ist die Vergleichbarkeit mit anderen Studien sehr gut, da viele Arbeitsgruppen ebenfalls ein LPS-Modell für die Datenerhebung nutzen. Die klinische Relevanz ist jedoch im Vergleich zu anderen Modellen geringer, weshalb als Ausblick auf Folgeprojekte in dieser Arbeit bereits die Migration der Neutrophilen histologisch in einem klinisch relevanteren Ventilator-induzierten Modell der akuten Lungenschädigung untersucht worden ist (Kawano *et al.*, 1987; Frank *et al.*, 2002). Dieses Modell, sowie das Induzieren der Inflammation über Bakterien kommt der Ätiologie des ARDS näher, haben in ihren Ergebnissen jedoch deutlich größere Schwankungen, weshalb sie häufig im Anschluss oder zusätzlich zu dem Standard LPS verwendet werden.

Die Nutzung von *in vitro* Versuchen mit humanen Zellen zur Stützung der *in vivo* Daten ist unabdingbar. Die angewandten Modelle mit drei Zellarten im System sind bereits sehr komplex, können die Prozesse im Organismus jedoch nur begrenzt nachstellen. Allein die

Nutzung einzelner Stimulationsreagenzien wird den Bedingungen einer Inflammation im Organismus nicht gerecht. Zusätzlich werden immortalisierte Zelllinien genutzt, die in einem zweidimensionalen System auf einer Kunststoffmembran kultiviert werden, wodurch deren Interaktion miteinander verändert wird. Allerdings bieten die *in vitro* Systeme die Translation der murinen Ergebnisse auf humane Zellen und Systeme und sind dadurch ein wichtiger Zwischenschritt aus der Grundlagenforschung hin zur angewandten Forschung.

5.3 Einfluss auf das Verständnis der Krankheitsmechanismen

Das vorliegende Projekt spielt eine sehr wichtige Rolle als weiteres Puzzleteil zum Verständnis der Pathomechanismen des ARDS. ADAM10 und ADAM17 wirken durch die proteolytische Spaltung einer immensen Anzahl von Substraten auf viele der ablaufenden Prozesse während der Inflammation ein. Diese Arbeit konnte zeigen, dass neutrophiles und thrombozytäres ADAM10 und ADAM17 unterschiedliche Wirkungen auf die Migration von Neutrophilen und PNCs haben und beleuchtet detailliert die verschiedenen zugrundeliegenden Mechanismen der Migration – die Aktivierung und Rekrutierung, sowie die Modulation von an der Migration beteiligten Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen, Thrombozyten und Endothelzellen. Neben der zellulären Ebene wurden zusätzlich auf molekularer Ebene die TNF-Signalwege als zentrale Regulatoren der ADAM10- und ADAM17-vermittelten Prozesse im Rahmen der Inflammation beleuchtet, was essenziell für das weitere Verständnis der Krankheitsmechanismen im ARDS ist.

5.4 Ausblick und zukünftige Forschungsrichtungen

Wie bereits beschrieben, ist das murine Modell der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation das Standardmodell in der Grundlagenforschung zum akuten Lungenversagen. Da die Daten, die in dieser Arbeit erhoben wurden, vielversprechende Ergebnisse liefern, könnten weitere Modelle mit höherer klinischer Relevanz als Folgeprojekte angedacht werden. Hier bietet sich beispielsweise die Inflammation mit gram-negativen und gram-positiven Bakterien *Klebsiella pneumoniae* und *Streptococcus pneumoniae* an, die die klassischen Erreger einer Pneumonie sind, aus der heraus ein ARDS entstehen kann. Ein ebenfalls klinisch relevantes Modell ist das der sterilen, Ventilator-induzierten akuten Lungenschädigung durch Überdruckbeatmung, welches in Mäusen ebenfalls häufig für die Forschung am ARDS genutzt wird. Dieses Modell ahmt die durch maschinelle Beatmung

entstehende mechanische Belastung nach, die bei Patienten mit Lungenentzündung zu einer Ventilator-induzierten Lungenschädigung führt.

Fokus dieses Projektes waren die Proteasen ADAM10 und ADAM17 auf Thrombozyten und Neutrophilen. Auf Basis der aktuellen Literatur und der Daten der vorliegenden Arbeit, wurde in der Arbeitsgruppe bereits ein Folgeprojekt gestartet, in welchem der Fokus auf den beiden Proteasen auf Endothelzellen und dem zweiten Hauptmerkmal des ARDS, der mikrovaskulären Permeabilität liegt.

Auch der Blick auf die ADAMs als Adhäsionsmoleküle über die Disintegrin-ähnliche Domäne ist ein weiterer spannender Aspekt, welcher in folgenden Projekten spezifisch untersucht werden sollte.

In diesem Projekt wurden zudem hauptsächlich Effekte der ADAMs auf zellulärer Ebene untersucht und zusätzlich der TNF-Signalweg auf molekularer Ebene. Allerdings wirken die beiden untersuchten ADAMs potenziell auf viele weitere Signalwege, wie beispielsweise IL-6, Notch und EGF ein, die in weiteren Projekten auf molekularer Ebene genauer untersucht werden könnten und sollten.

5.5 Schlussfolgerung aus der Arbeit

Zusammenfassend hat diese Arbeit die zellspezifische Wirkungsweise der Proteasen ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen und Thrombozyten untersucht und bietet neue, detailliertere Einblicke auf deren Einfluss auf die beiden Hauptmerkmale des ARDS. In einem standardisierten murinen Modell der LPS-bedingten pulmonalen Inflammation wurde gezeigt, dass die systemische Inhibition beider ADAMs die Migration von Neutrophilen und PNCs hemmte. Auch der Knockout von ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen führte zu einer geringeren Migration in den Alveolarrum, während das Fehlen der Proteasen auf Thrombozyten keinen Effekt hatte. Des weiteren wurde die Aktivierung, Rekrutierung und die Expression von Adhäsionsmolekülen untersucht und gezeigt, dass diese durch die konditionalen Knockouts auf unterschiedliche Weise moduliert wurden. Die mikrovaskuläre Permeabilität war nicht von neutrophilem oder thrombozytärem ADAM10 und ADAM17 beeinflusst. Der TNF α Signalweg über den TNFR1 wurde hauptsächlich über ADAM17 moduliert, während das Signalling über TNFR2 nur durch die kombinierte Hemmung beider ADAMs verändert werden konnte.

Zudem wurde ein Grundstein für weitere Projekte gelegt, da beobachtet wurde, dass die Migration der Neutrophilen in einem klinisch relevanteren Modell der Ventilator-induzierten

5 Diskussion

Lungenschädigung durch systemische Inhibition und konditionale Knockouts der beiden ADAMs auf Neutrophilen und Thrombozyten ebenfalls reduziert war. Um die komplexen Mechanismen und inflammatorischen Prozesse, die durch ADAM10 und ADAM17 im Rahmen der akuten pulmonalen Inflammation reguliert werden, vollständig zu verstehen, ist jedoch noch viel Forschung erforderlich. Künftige Forschungsarbeiten sollten sich darauf fokussieren, die Prozesse in klinisch relevanten Modellen zu untersuchen und dabei vor allem auch die Auswirkungen auf molekularer Ebene im Detail beobachten. Außerdem ist für das zweite Hauptmerkmal, die mikrovaskuläre Permeabilität, endotheliales ADAM10 und ADAM17 von großer Bedeutung und sollte ebenfalls im Fokus der weiteren Forschung stehen.

6 Zusammenfassung

Das ARDS ist ein häufiges Krankheitsbild in der Intensivmedizin, das mit einer Letalität von 25 bis 40% einhergeht. Pathophysiologisch liegt dem ARDS eine akute pulmonale Inflammation zugrunde, die das Lungengewebe neben den auslösenden Faktoren schwer schädigt und zu einer deutlichen Funktionseinschränkung führt. Ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Abläufe und der Immunantwort ist entscheidend, um neue therapeutische Ansätze gezielt entwickeln zu können. Inflammatorische Prozesse werden durch die Proteasen ADAM10 und ADAM17 beeinflusst, die viele an einer Inflammation beteiligte Substrate spalten. Da diese Spaltung sowohl pro- als auch antiinflammatorische Auswirkungen haben kann, ist eine systemische Inhibition der ADAMs für die Grundlagenforschung problematisch und kann auch im klinischen Gebrauch mit Schwierigkeiten verbunden sein. Daher ist das Wissen um zellspezifische Effekte der Proteasen wichtig und muss detailliert untersucht werden. Gegenstand dieser Arbeit war daher die Rolle von neutrophilem und thrombozytärem ADAM10 und ADAM17 auf die Aktivierung, Rekrutierung und Migration von Neutrophilen und PNCs im Rahmen der akuten pulmonalen Inflammation.

Die Bearbeitung des Projektes erfolgte vornehmlich in einem murinen Modell der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation. 24 Stunden nach Inflammationsbeginn wurde die Migration von Neutrophilen und PNCs, sowie die Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle durchflusszytometrisch quantifiziert. Weitere Adhäsionsmoleküle wurden immunhistologisch visualisiert und quantifiziert. Vier Stunden nach Inflammationsbeginn wurden die Konzentrationen von Aktivierungsmarkern und Zytokinen in der BAL gemessen, sowie die PCRs mit dem Lungengewebe durchgeführt. Auch die Ermittlung der Permeabilität mittels Gesamtproteingehalt in der BAL fand vier Stunden nach LPS-Inhalation statt. Die systemische Inhibition der ADAMs erfolgte eine Stunde vor der LPS-Inhalation. Die *in vitro* Daten wurden mit frisch isolierten humanen Neutrophilen, sowie den Zelllinien H441 und HMEC-1 durchgeführt.

Beobachtet wurde, dass die systemische Inhibition von ADAM10 und ADAM17 *in vivo* und *in vitro*, sowie der Knockout beider Proteasen auf Neutrophilen *in vivo*, die Migration von Neutrophilen und PNCs in den Alveolarraum verringerten, während das Fehlen der ADAMs

6 Zusammenfassung

auf Thrombozyten keinen Effekt auf die Migration hatte. Die Aktivität der Neutrophilen und Thrombozyten wurde lediglich durch ADAM17 verändert. TNF α wurde durch die Knockouts von ADAM10 vermehrt ausgeschüttet, und durch das Fehlen von ADAM17 weniger freigesetzt. In den ADAM10^{CUP}-Tieren war weniger CXCL1 in die BAL ausgeschüttet, die CXCL2/3-Freisetzung wurde durch alle Knockouts reduziert. Die Adhäsionsmoleküle auf Neutrophilen, Thrombozyten und PNCs waren in den Knockout-Mauslinien unterschiedlich beeinflusst. Auf Neutrophilen stach die Oberflächenexpression von CD44 und CD62L heraus. CD44 war in den ADAM10^{CUP}-Tieren erhöht und CD62L in den ADAM17^{CUP}-Tieren. Auf Thrombozyten und PNCs fiel auf, dass CD44 in den ADAM10^{PF4}-Tieren stark vermehrt auf der Oberfläche exprimiert wurde. Die mikrovaskuläre Permeabilität wurde durch die Knockouts nicht beeinflusst, obwohl die Oberflächenexpression endothelialer Adhäsionsmoleküle durch das Fehlen der ADAMs verändert wurde. Zudem konnte beobachtet werden, dass der TNFR1-Signalweg durch die Inhibition der ADAMs aktiviert wurde, wohingegen der TNFR2-Signalweg gehemmt worden ist. Als Ausblick für weitere Forschungsprojekte wurde die Akkumulation der Neutrophilen in der Lunge in einem Ventilator-induzierten Modell der Lungenschädigung histologisch untersucht. Diese war sowohl nach systemischer Inhibition als auch durch alle vier konditionalen Knockouts verringert.

Diese Arbeit zeigt einen Einblick auf die zellspezifische Wirkung der Proteasen ADAM10 und ADAM17 auf Neutrophilen und Thrombozyten in der akuten pulmonalen Inflammation. Die erhobenen Daten zur Migration, sowie der Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen durch ADAM10 und ADAM17 stützen aktuelle Studien zu den ADAMs in verschiedenen inflammatorischen Krankheitsbildern. Besonders ist die detaillierte Untersuchung des Migrationsweges durch Beobachtung der Akkumulation der Zellen in vier Kompartimenten. Außerdem erweitert diese Arbeit aktuelle Studien vor allem im Hinblick auf die Rolle der Thrombozyten und PNCs, sowie die thrombozytären Proteasen. Auch das weitgehend unerforschte Zusammenspiel von neutrophilem ADAM10 und ADAM17 mit endothelialen Adhäsionsmolekülen, sowie der Einfluss der Inhibition der Proteasen auf die TNF-Signalwege in Neutrophilen wurde in dieser Arbeit beleuchtet.

Zudem ist dieses Projekt Grundstein für weitere bedeutende Folgeprojekte, in denen endotheliales ADAM10 und ADAM17, klinisch relevantere Inflammationsmodelle, wie beispielsweise VILI, und die Wirkungsweise der ADAMs auf molekularer Ebene detaillierter untersucht werden können. Damit bildet es einen wichtigen Beitrag zur Grundlagenforschung im Bezug auf das ARDS und ist ein weiterer Baustein hin zu den dringend benötigten kausalen Therapieansätzen gegen das ARDS.

7 Literatur

Akong-Moore, K., Chow, O.A., Köckritz-Blickwede, M. von, *et al.* (2012) „Influences of chloride and hypochlorite on neutrophil extracellular trap formation“, *PLoS One*, 7(8), S. e42984. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042984>.

Aljohmani, A. und Yildiz, D. (2020) „A Disintegrin and Metalloproteinase-Control Elements in Infectious Diseases“, *Front Cardiovasc Med*, 7, S. 608281. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.608281>.

Aloui, C., Prigent, A., Sut, C., *et al.* (2014) „The signaling role of CD40 ligand in platelet biology and in platelet component transfusion“, *Int J Mol Sci*, 15(12), S. 22342–64. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms151222342>.

Andereg, U., Eichenberg, T., Parthaune, T., *et al.* (2009) „ADAM10 is the constitutive functional sheddase of CD44 in human melanoma cells“, *J Invest Dermatol*, 129(6), S. 1471–82. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/jid.2008.323>.

Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., *et al.* (2005) „Comparative analysis of the ADAM and ADAMTS families“, *J Proteome Res*, 4(3), S. 881–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1021/pr0500096>.

Andrews, R.K., López, J.A. und Berndt, M.C. (1997) „Molecular mechanisms of platelet adhesion and activation“, *Int J Biochem Cell Biol*, 29(1), S. 91–105. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(96\)00122-7](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(96)00122-7).

Arndt, P.G., Strahan, B., Wang, Y., *et al.* (2011) „Leukocyte ADAM17 regulates acute pulmonary inflammation“, *PLoS One*, 6(5), S. e19938. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019938>.

Ashbaugh, D.G., Bigelow, D.B., Petty, T.L., *et al.* (1967) „Acute respiratory distress in adults“, *Lancet*, 2(7511), S. 319–23. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(67\)90168-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(67)90168-7).

Babinska, A., Kedees, M.H., Athar, H., *et al.* (2002) „F11-receptor (F11R/JAM) mediates platelet adhesion to endothelial cells: role in inflammatory thrombosis“, *Thromb Haemost*, 88(5), S. 843–50.

- Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I. (1992) „Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine“, *FEBS Lett*, 307(1), S. 97–101. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80909-z](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80909-z).
- Barnes, P.J. (2003) „Cytokine-directed therapies for the treatment of chronic airway diseases“, *Cytokine Growth Factor Rev*, 14(6), S. 511–22. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(03\)00058-3](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(03)00058-3).
- Becher, B., Schlitzer, A., Chen, J., *et al.* (2014) „High-dimensional analysis of the murine myeloid cell system“, *Nat Immunol*, 15(12), S. 1181–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/ni.3006>.
- Beck-Schimmer, B., Schwendener, R., Pasch, T., *et al.* (2005) „Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury“, *Respir Res*, 6(1), S. 61. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/1465-9921-6-61>.
- Bellani, G., Laffey, J.G., Pham, T., *et al.* (2016) „Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries“, *Jama*, 315(8), S. 788–800. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0291>.
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Burdick, M.D., *et al.* (2005) „CXCR2/CXCR2 ligand biology during lung transplant ischemia-reperfusion injury“, *J Immunol*, 175(10), S. 6931–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.10.6931>.
- Bender, M., Hofmann, S., Stegner, D., *et al.* (2010) „Differentially regulated GPVI ectodomain shedding by multiple platelet-expressed proteinases“, *Blood*, 116(17), S. 3347–55. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-289108>.
- Bernard, G.R., Artigas, A., Brigham, K.L., *et al.* (1994) „The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination“, *Am J Respir Crit Care Med*, 149(3 Pt 1), S. 818–24. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.149.3.7509706>.
- Berndt, M.C., Shen, Y., Dopheide, S.M., *et al.* (2001) „The vascular biology of the glycoprotein Ib-IX-V complex“, *Thromb Haemost*, 86(1), S. 178–88.
- Bhatia, M., Zemans, R.L. und Jeyaseelan, S. (2012) „Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury“, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46(5), S. 566–72. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2011-0392TR>.
- Black, R.A., Doedens, J.R., Mahimkar, R., *et al.* (2003) „Substrate specificity and inducibility of TACE (tumour necrosis factor alpha-converting enzyme) revisited: the Ala-Val preference, and induced intrinsic activity“, *Biochem Soc Symp*, (70), S. 39–52. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1042/bss0700039>.

Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., *et al.* (1997) „A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- α from cells“, *Nature*, 385(6618), S. 729–33. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/385729a0>.

Blobel, C.P. (1997) „Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF α and Notch“, *Cell*, 90(4), S. 589–92. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80519-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80519-x).

Blobel, C.P. und White, J.M. (1992) „Structure, function and evolutionary relationship of proteins containing a disintegrin domain“, *Curr Opin Cell Biol*, 4(5), S. 760–5. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(92\)90098-w](https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90098-w).

Bouaouina, M., Blouin, E., Halbwachs-Mecarelli, L., *et al.* (2004) „TNF-induced β 2 integrin activation involves Src kinases and a redox-regulated activation of p38 MAPK“, *J Immunol*, 173(2), S. 1313–20. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.2.1313>.

Brenner, D., Blaser, H. und Mak, T.W. (2015) „Regulation of tumour necrosis factor signaling: live or let die“, *Nat Rev Immunol*, 15(6), S. 362–74. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nri3834>.

Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., *et al.* (2004) „Neutrophil extracellular traps kill bacteria“, *Science*, 303(5663), S. 1532–5. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1126/science.1092385>.

Broermann, A., Winderlich, M., Block, H., *et al.* (2011) „Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo“, *J Exp Med*, 208(12), S. 2393–401. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.20110525>.

Brower, R.G., Matthay, M.A., Morris, A., *et al.* (2000) „Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome“, *N Engl J Med*, 342(18), S. 1301–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1056/nejm200005043421801>.

Burkard, P., Schonhart, C., Vögtle, T., *et al.* (2023) „A key role for platelet GPVI in neutrophil recruitment, migration, and NETosis in the early stages of acute lung injury“, *Blood*, 142(17), S. 1463–1477. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood.2023019940>.

Burn, G.L., Foti, A., Marsman, G., *et al.* (2021) „The Neutrophil“, *Immunity*, 54(7), S. 1377–1391. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006>.

Carden, D., Xiao, F., Moak, C., *et al.* (1998) „Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins“, *Am J Physiol*, 275(2), S. H385–92. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.2.H385>.

- Casari, C., Paul, D.S., Susen, S., *et al.* (2018) „Protein kinase C signaling dysfunction in von Willebrand disease (p.V1316M) type 2B platelets“, *Blood Adv*, 2(12), S. 1417–1428. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017014290>.
- Cera, M.R., Fabbri, M., Molendini, C., *et al.* (2009) „JAM-A promotes neutrophil chemotaxis by controlling integrin internalization and recycling“, *J Cell Sci*, 122(Pt 2), S. 268–77. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1242/jcs.037127>.
- Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., *et al.* (2010) „Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice“, *J Exp Med*, 207(8), S. 1617–24. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.20092366>.
- Chen, T., Guo, Z.P., Cao, N., *et al.* (2014) „Increased serum levels of soluble vascular endothelial-cadherin in patients with systemic vasculitis“, *Rheumatol Int*, 34(8), S. 1139–43. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00296-014-2949-7>.
- Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V.J., *et al.* (1995) „Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway“, *Genes Dev*, 9(13), S. 1586–97. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1586>.
- Choi, J.Y., Park, H.J., Lee, Y.J., *et al.* (2013) „Upregulation of Mer receptor tyrosine kinase signaling attenuated lipopolysaccharide-induced lung inflammation“, *J Pharmacol Exp Ther*, 344(2), S. 447–58. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1124/jpet.112.199778>.
- Chomczynski, P. und Sacchi, N. (1987) „Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction“, *Anal Biochem*, 162(1), S. 156–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>.
- Choy, E. und Rose-John, S. (2017) „Interleukin-6 as a Multifunctional Regulator: Inflammation, Immune Response, and Fibrosis“, *Journal of Scleroderma and Related Disorders*, 2 (2_suppl), S. 1–5. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.5301/jsrd.5000265>.
- Cissé, M., Duplan, E., Guillot-Sestier, M.V., *et al.* (2011) „The extracellular regulated kinase-1 (ERK1) controls regulated alpha-secretase-mediated processing, promoter transactivation, and mRNA levels of the cellular prion protein“, *J Biol Chem*, 286(33), S. 29192–29206. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.208249>.
- Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., *et al.* (2007) „Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood“, *Nat Med*, 13(4), S. 463–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nm1565>.
- Cognasse, F., Duchez, A.C., Audoux, E., *et al.* (2022) „Platelets as Key Factors in Inflammation: Focus on CD40L/CD40“, *Front Immunol*, 13, S. 825892. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.825892>.

Combes, A., Hajage, D., Capellier, G., *et al.* (2018) „Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Acute Respiratory Distress Syndrome“, *N Engl J Med*, 378(21), S. 1965–1975. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800385>.

Cooke, V.G., Naik, M.U. und Naik, U.P. (2006) „Fibroblast growth factor-2 failed to induce angiogenesis in junctional adhesion molecule-A-deficient mice“, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26(9), S. 2005–11. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1161/01.Atv.0000234923.79173.99>.

Cossarizza, A., Chang, H.D., Radbruch, A., *et al.* (2019) „Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition)“, *Eur J Immunol*, 49(10), S. 1457–1973. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/eji.201970107>.

Dejana, E., Orsenigo, F. und Lampugnani, M.G. (2008) „The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability“, *J Cell Sci*, 121(Pt 13), S. 2115–22. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1242/jcs.017897>.

Dejana, E., Spagnuolo, R. und Bazzoni, G. (2001) „Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration“, *Thromb Haemost*, 86(1), S. 308–15.

Dhanireddy, S., Altemeier, W.A., Matute-Bello, G., *et al.* (2006) „Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia“, *Lab Invest*, 86(8), S. 790–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/labinvest.3700440>.

Ding, X.F., Li, J.B., Liang, H.Y., *et al.* (2019) „Predictive model for acute respiratory distress syndrome events in ICU patients in China using machine learning algorithms: a secondary analysis of a cohort study“, *J Transl Med*, 17(1), S. 326. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-2075-0>.

Downey, G.P., Worthen, G.S., Henson, P.M., *et al.* (1993) „Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum“, *Am Rev Respir Dis*, 147(1), S. 168–76. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/ajrccm/147.1.168>.

Drexhage, L.Z., Zhang, S., Dupont, M., *et al.* (2024) „Apoptosis-mediated ADAM10 activation removes a mucin barrier promoting T cell efferocytosis“, *Nat Commun*, 15(1), S. 541. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44619-8>.

Dreymueller, D., Martin, C., Kogel, T., *et al.* (2012a) „Lung endothelial ADAM17 regulates the acute inflammatory response to lipopolysaccharide“, *EMBO Mol Med*, 4(5), S. 412–23. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/emmm.201200217>.

- Dreymueller, D., Pruessmeyer, J., Groth, E., *et al.* (2012b) „The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology“, *Eur J Cell Biol*, 91(6-7), S. 472–85. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.09.003>.
- Dreymueller, D., Uhlig, S. und Ludwig, A. (2015) „ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets“, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308(4), S. L325–43. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00294.2014>.
- Ebnet, K. (2017) „Junctional Adhesion Molecules (JAMs): Cell Adhesion Receptors With Pleiotropic Functions in Cell Physiology and Development“, *Physiol Rev*, 97(4), S. 1529–1554. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/physrev.00004.2017>.
- Eckmann, L., Kagnoff, M.F. und Fierer, J. (1993) „Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry“, *Infect Immun*, 61(11), S. 4569–74. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1128/iai.61.11.4569-4574.1993>.
- Edwards, D.R., Handsley, M.M. und Pennington, C.J. (2008) „The ADAM metalloproteinases“, *Mol Aspects Med*, 29(5), S. 258–89. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.001>.
- Elias, J.A., Zheng, T., Lee, C.G., *et al.* (2003) „Transgenic modeling of interleukin-13 in the lung“, *Chest*, 123(3 Suppl), S. 339s–45s.
- Ermert, M., Pantazis, C., Duncker, H.R., *et al.* (2003) „In situ localization of TNFalpha/beta, TACE and TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue“, *Cytokine*, 22(3-4), S. 89–100. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s1043-4666\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/s1043-4666(03)00117-0).
- Evangelista, V., Pamuklar, Z., Piccoli, A., *et al.* (2007) „Src family kinases mediate neutrophil adhesion to adherent platelets“, *Blood*, 109(6), S. 2461–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-06-029082>.
- Fan, H. und Derynck, R. (1999) „Ectodomain shedding of TGF-alpha and other transmembrane proteins is induced by receptor tyrosine kinase activation and MAP kinase signaling cascades“, *Embo j*, 18(24), S. 6962–72. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/emboj/18.24.6962>.
- Ferguson, N.D., Fan, E., Camporota, L., *et al.* (2012) „The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material“, *Intensive Care Med*, 38(10), S. 1573–82. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00134-012-2682-1>.
- Festic, E., Kor, D.J. und Gajic, O. (2015) „Prevention of acute respiratory distress syndrome“, *Curr Opin Crit Care*, 21(1), S. 82–90. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/mcc.000000000000174>.

Fitzhugh, C.D., Unno, H., Hathaway, V., *et al.* (2012) „Infusion of hemolyzed red blood cells within peripheral blood stem cell grafts in patients with and without sickle cell disease“, *Blood*, 119(24), S. 5671–3. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-392654>.

Frank, J.A., Gutierrez, J.A., Jones, K.D., *et al.* (2002) „Low tidal volume reduces epithelial and endothelial injury in acid-injured rat lungs“, *Am J Respir Crit Care Med*, 165(2), S. 242–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.165.2.2108087>.

Frank, L., Bucher, J.R. und Roberts, R.J. (1978) „Oxygen toxicity in neonatal and adult animals of various species“, *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol*, 45(5), S. 699–704. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/jappl.1978.45.5.699>.

Frenette, P.S., Johnson, R.C., Hynes, R.O., *et al.* (1995) „Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(16), S. 7450–4. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1073/pnas.92.16.7450>.

Furman, M.I., Krueger, L.A., Linden, M.D., *et al.* (2004) „Release of soluble CD40L from platelets is regulated by glycoprotein IIb/IIIa and actin polymerization“, *J Am Coll Cardiol*, 43(12), S. 2319–25. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2003.12.055>.

Gabay, C. und Kushner, I. (1999) „Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation“, *N Engl J Med*, 340(6), S. 448–54. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1056/nejm199902113400607>.

Gajic, O., Dabbagh, O., Park, P.K., *et al.* (2011) „Early identification of patients at risk of acute lung injury: evaluation of lung injury prediction score in a multicenter cohort study“, *Am J Respir Crit Care Med*, 183(4), S. 462–70. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/rccm.201004-0549OC>.

Gardiner, E.E., De Luca, M., McNally, T., *et al.* (2001) „Regulation of P-selectin binding to the neutrophil P-selectin counter-receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 by neutrophil elastase and cathepsin G“, *Blood*, 98(5), S. 1440–7. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood.v98.5.1440>.

Gardiner, E.E., Karunakaran, D., Shen, Y., *et al.* (2007) „Controlled shedding of platelet glycoprotein (GP)VI and GPIb-IX-V by ADAM family metalloproteinases“, *J Thromb Haemost*, 5(7), S. 1530–7. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2007.02590.x>.

Giebler, N. und Zigrino, P. (2016) „A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM): Historical Overview of Their Functions“, *Toxins (Basel)*, 8(4), S. 122. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/toxins8040122>.

Granja, T.F., Köhler, D., Schad, J., *et al.* (2016) „Adenosine Receptor Adora2b Plays a Mechanistic Role in the Protective Effect of the Volatile Anesthetic Sevoflurane during Liver Ischemia/Reperfusion“, *Anesthesiology*, 125(3), S. 547–60. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/aln.0000000000001234>.

Grasselli, G., Calfee, C.S., Camporota, L., *et al.* (2023) „ESICM guidelines on acute respiratory distress syndrome: definition, phenotyping and respiratory support strategies“, *Intensive Care Med*, 49(7), S. 727–759. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00134-023-07050-7>.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., *et al.* (1995) „The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor“, *Cell*, 83(5), S. 793–802. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90192-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90192-2).

Grell, M., Wajant, H., Zimmermann, G., *et al.* (1998) „The type 1 receptor (CD120a) is the high-affinity receptor for soluble tumor necrosis factor“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(2), S. 570–5. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.2.570>.

Grissom, C.K., Hirshberg, E.L., Dickerson, J.B., *et al.* (2015) „Fluid management with a simplified conservative protocol for the acute respiratory distress syndrome“, *Crit Care Med*, 43(2), S. 288–95. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/ccm.0000000000000715>.

Grommes, J., Alard, J.E., Drechsler, M., *et al.* (2012) „Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury“, *Am J Respir Crit Care Med*, 185(6), S. 628–36. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/rccm.201108-1533OC>.

Guérin, C., Reignier, J., Richard, J.C., *et al.* (2013) „Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome“, *N Engl J Med*, 368(23), S. 2159–68. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1214103>.

Hafezi-Moghadam, A., Thomas, K.L., Prorock, A.J., *et al.* (2001) „L-selectin shedding regulates leukocyte recruitment“, *J Exp Med*, 193(7), S. 863–72. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.193.7.863>.

Hampton, M.B., Kettle, A.J. und Winterbourn, C.C. (1998) „Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing“, *Blood*, 92(9), S. 3007–17.

Hartmann, D., Strooper, B. de, Serneels, L., *et al.* (2002) „The disintegrin/metalloprotease ADAM 10 is essential for Notch signalling but not for alpha-secretase activity in fibroblasts“, *Hum Mol Genet*, 11(21), S. 2615–24. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/hmg/11.21.2615>.

Hasenberg, A., Hasenberg, M., Männ, L., *et al.* (2015) „Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes“, *Nat Methods*, 12(5), S. 445–52. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nmeth.3322>.

- Hayashi, F., Means, T.K. und Luster, A.D. (2003) „Toll-like receptors stimulate human neutrophil function“, *Blood*, 102(7), S. 2660–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2003-04-1078>.
- Hazeldine, J., Harris, P., Chapple, I.L., *et al.* (2014) „Impaired neutrophil extracellular trap formation: a novel defect in the innate immune system of aged individuals“, *Aging Cell*, 13(4), S. 690–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/ace.12222>.
- Hegazy, S., Elsabaawy, M., Eltabakh, M., *et al.* (2021) „CD62P (P-selectin) expression as a platelet activation marker in patients with liver cirrhosis with and without cholestasis“, *Clin Exp Hepatol*, 7(2), S. 231–240. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.5114/ceh.2021.107566>.
- Henn, V., Slupsky, J.R., Gräfe, M., *et al.* (1998) „CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells“, *Nature*, 391(6667), S. 591–4. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/35393>.
- Herter, J.M., Rossaint, J. und Zarbock, A. (2014) „Platelets in inflammation and immunity“, *J Thromb Haemost*, 12(11), S. 1764–75. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/jth.12730>.
- Hidalgo, A., Peired, A.J., Wild, M., *et al.* (2007) „Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44“, *Immunity*, 26(4), S. 477–489. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.03.011>.
- Holbrook, J., Lara-Reyna, S., Jarosz-Griffiths, H., *et al.* (2019) „Tumour necrosis factor signalling in health and disease“, *F1000Res*, 8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.12688/f1000research.17023.1>.
- Horiuchi, T., Mitoma, H., Harashima, S., *et al.* (2010) „Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents“, *Rheumatology (Oxford)*, 49(7), S. 1215–28. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/rheumatology/keq031>.
- Hotchkiss, R.S., Moldawer, L.L., Opal, S.M., *et al.* (2016) „Sepsis and septic shock“, *Nat Rev Dis Primers*, 2, S. 16045. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.45>.
- Hsu, H., Xiong, J. und Goeddel, D.V. (1995) „The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation“, *Cell*, 81(4), S. 495–504. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90070-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90070-5).
- Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T.A., *et al.* (2003) „The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion“, *Blood*, 102(4), S. 1186–95. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2002-12-3775>.

- Hundhausen, C., Schulte, A., Schulz, B., *et al.* (2007) „Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes“, *J Immunol*, 178(12), S. 8064–72. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.178.12.8064>.
- Huppert, L.A., Matthay, M.A. und Ware, L.B. (2019) „Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome“, *Semin Respir Crit Care Med*, 40(1), S. 31–39. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1055/s-0039-1683996>.
- Ikegami, M., Scoville, E.A., Grant, S., *et al.* (2007) „Surfactant protein-D and surfactant inhibit endotoxin-induced pulmonary inflammation“, *Chest*, 132(5), S. 1447–54. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1378/chest.07-0864>.
- Jang, D.I., Lee, A.H., Shin, H.Y., *et al.* (2021) „The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) in Autoimmune Disease and Current TNF- α Inhibitors in Therapeutics“, *Int J Mol Sci*, 22(5). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms22052719>.
- Kanayama, A., Seth, R.B., Sun, L., *et al.* (2004) „TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains“, *Mol Cell*, 15(4), S. 535–48. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.08.008>.
- Kawano, T., Mori, S., Cybulsky, M., *et al.* (1987) „Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung“, *J Appl Physiol* (1985), 62(1), S. 27–33. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/jappl.1987.62.1.27>.
- Kaynar, A.M., Houghton, A.M., Lum, E.H., *et al.* (2008) „Neutrophil elastase is needed for neutrophil emigration into lungs in ventilator-induced lung injury“, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 39(1), S. 53–60. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007-0315OC>.
- Khandoga, A., Kessler, J.S., Meissner, H., *et al.* (2005) „Junctional adhesion molecule-A deficiency increases hepatic ischemia-reperfusion injury despite reduction of neutrophil transendothelial migration“, *Blood*, 106(2), S. 725–33. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2004-11-4416>.
- Kieseier, B.C., Pischel, H., Neuen-Jacob, E., *et al.* (2003) „ADAM-10 and ADAM-17 in the inflamed human CNS“, *Glia*, 42(4), S. 398–405. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/glia.10226>.
- Klapproth, E., Witt, A., Klose, P., *et al.* (2022) „Targeting cardiomyocyte ADAM10 ectodomain shedding promotes survival early after myocardial infarction“, *Nat Commun*, 13(1), S. 7648. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35331-0>.
- Kobayashi, S.D., Braughton, K.R., Whitney, A.R., *et al.* (2003) „Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils“, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(19), S. 10948–53. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1073/pnas.1833375100>.

- Koenen, R.R., Pruessmeyer, J., Soehnlein, O., *et al.* (2009) „Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases“, *Blood*, 113(19), S. 4799–809. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2008-04-152330>.
- Konrad, F.M., Knausberg, U., Höne, R., *et al.* (2016) „Tissue heme oxygenase-1 exerts anti-inflammatory effects on LPS-induced pulmonary inflammation“, *Mucosal Immunol*, 9(1), S. 98–111. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/mi.2015.39>.
- Kwok, H.F., Botkjaer, K.A., Tape, C.J., *et al.* (2014) „Development of a 'mouse and human cross-reactive' affinity-matured exosite inhibitory human antibody specific to TACE (ADAM17) for cancer immunotherapy“, *Protein Eng Des Sel*, 27(6), S. 179–90. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/protein/gzu010>.
- Lambrecht, B.N., Vanderkerken, M. und Hammad, H. (2018) „The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity“, *Nat Rev Immunol*, 18(12), S. 745–758. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0068-5>.
- Li, X., Yan, Y., Huang, W., *et al.* (2009a) „The regulation of TACE catalytic function by its prodomain“, *Mol Biol Rep*, 36(4), S. 641–51. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s11033-008-9224-5>.
- Li, X., Yan, Y., Huang, W., *et al.* (2009b) „The study of the inhibition of the recombinant TACE prodomain to endotoxemia in mice“, *Int J Mol Sci*, 10(12), S. 5442–5454. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms10125442>.
- Li, Y., Brazzell, J., Herrera, A., *et al.* (2006) „ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding“, *Blood*, 108(7), S. 2275–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-02-005827>.
- Lievens, D., Zerneck, A., Seijkens, T., *et al.* (2010) „Platelet CD40L mediates thrombotic and inflammatory processes in atherosclerosis“, *Blood*, 116(20), S. 4317–27. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-261206>.
- Lisman, T. (2018) „Platelet-neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease“, *Cell Tissue Res*, 371(3), S. 567–576. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2727-4>.
- Lokuta, M.A. und Huttenlocher, A. (2005) „TNF-alpha promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway“, *J Leukoc Biol*, 78(1), S. 210–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1189/jlb.0205067>.
- Long, C., Wang, Y., Herrera, A.H., *et al.* (2010) „In vivo role of leukocyte ADAM17 in the inflammatory and host responses during E. coli-mediated peritonitis“, *J Leukoc Biol*, 87(6), S. 1097–101. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1189/jlb.1109763>.

- LP, D.A. und Schattner, M. (2017) „Platelet toll-like receptors in thromboinflammation“, *Front Biosci (Landmark Ed)*, 22(11), S. 1867–1883. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2741/4576>.
- Ludwig, A., Hundhausen, C., Lambert, M.H., *et al.* (2005) „Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules“, *Comb Chem High Throughput Screen*, 8(2), S. 161–71. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2174/1386207053258488>.
- Lüllmann-Rauch, R. und Paulsen, F. (2012) *Taschenlehrbuch Histologie, 4. vollständig überarbeitete Auflage*. Stuttgart, u.a.: Thieme.
- Marcello, E., Gardoni, F., Di Luca, M., *et al.* (2010) „An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum“, *J Biol Chem*, 285(14), S. 10376–84. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.055947>.
- Marshall, R.P., Gohlke, P., Chambers, R.C., *et al.* (2004) „Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury“, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286(1), S. L156–64. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00313.2002>.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., *et al.* (1998) „Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration“, *J Cell Biol*, 142(1), S. 117–27. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1083/jcb.142.1.117>.
- Mastroianni, C.M., d'Ettorre, G., Forcina, G., *et al.* (2000) „Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection“, *Blood*, 96(5), S. 1979–84.
- Matthay, M.A., Arabi, Y., Arroliga, A.C., *et al.* (2024) „A New Global Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome“, *Am J Respir Crit Care Med*, 209(1), S. 37–47. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/rccm.202303-0558WS>.
- Matthay, M.A., Thompson, B.T. und Ware, L.B. (2021) „The Berlin definition of acute respiratory distress syndrome: should patients receiving high-flow nasal oxygen be included?“, *Lancet Respir Med*, 9(8), S. 933–936. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(21\)00105-3](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(21)00105-3).
- Matthay, M.A., Zemans, R.L., Zimmerman, G.A., *et al.* (2019) „Acute respiratory distress syndrome“, *Nat Rev Dis Primers*, 5(1), S. 18. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0069-0>.

- Matthews, A.L., Noy, P.J., Reyat, J.S., *et al.* (2017) „Regulation of A disintegrin and metalloproteinase (ADAM) family sheddases ADAM10 and ADAM17: The emerging role of tetraspanins and rhomboids“, *Platelets*, 28(4), S. 333–341. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1080/09537104.2016.1184751>.
- Matthies, K.M., Newman, J.L., Hodzic, A., *et al.* (2006) „Differential regulation of soluble and membrane CD40L proteins in T cells“, *Cell Immunol*, 241(1), S. 47–58. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2006.08.001>.
- Matute-Bello, G., Frevert, C.W. und Martin, T.R. (2008) „Animal models of acute lung injury“, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295(3), S. L379–99. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00010.2008>.
- McEver, R.P. (2015) „Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall“, *Cardiovasc Res*, 107(3), S. 331–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/cvr/cv154>.
- McKinnon, K.M. (2018) „Flow Cytometry: An Overview“, *Curr Protoc Immunol*, 120, S. 5.1.1–5.1.11. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1002/cpim.40>.
- Meduri, G.U., Headley, S., Kohler, G., *et al.* (1995a) „Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time“, *Chest*, 107(4), S. 1062–73. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1378/chest.107.4.1062>.
- Meduri, G.U., Kohler, G., Headley, S., *et al.* (1995b) „Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome“, *Chest*, 108(5), S. 1303–14. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1378/chest.108.5.1303>.
- Meijden, P.E.J. van der und Heemskerk, J.W.M. (2019) „Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives“, *Nat Rev Cardiol*, 16(3), S. 166–179. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/s41569-018-0110-0>.
- Menchén, L., Marín-Jiménez, I., Arias-Salgado, E.G., *et al.* (2009) „Matrix metalloproteinase 9 is involved in Crohn’s disease-associated platelet hyperactivation through the release of soluble CD40 ligand“, *Gut*, 58(7), S. 920–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1136/gut.2008.150318>.
- Miralda, I., Uriarte, S.M. und McLeish, K.R. (2017) „Multiple Phenotypic Changes Define Neutrophil Priming“, *Front Cell Infect Microbiol*, 7, S. 217. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00217>.
- Mishra, H.K., Long, C., Bahaie, N.S., *et al.* (2015) „Regulation of CXCR2 expression and function by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17)“, *J Leukoc Biol*, 97(3), S. 447–54. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1189/jlb.3HI0714-340R>.

- Mitchell, L.A., Ward, C., Kwon, M., *et al.* (2015) „Junctional adhesion molecule A promotes epithelial tight junction assembly to augment lung barrier function“, *Am J Pathol*, 185(2), S. 372–86. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.10.010>.
- Miura, M., Fu, X., Zhang, Q.W., *et al.* (2001) „Neutralization of Gro alpha and macrophage inflammatory protein-2 attenuates renal ischemia/reperfusion injury“, *Am J Pathol*, 159(6), S. 2137–45. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63065-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63065-9).
- Mohamadzadeh, M., DeGrendele, H., Arizpe, H., *et al.* (1998) „Proinflammatory stimuli regulate endothelial hyaluronan expression and CD44/HA-dependent primary adhesion“, *J Clin Invest*, 101(1), S. 97–108. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/jci1604>.
- Monteseirín, J., Bonilla, I., Camacho, J., *et al.* (2001) „Elevated secretion of myeloperoxidase by neutrophils from asthmatic patients: the effect of immunotherapy“, *J Allergy Clin Immunol*, 107(4), S. 623–6. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1067/mai.2001.113566>.
- Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., *et al.* (1995) „P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin“, *J Cell Biol*, 128(4), S. 661–71. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1083/jcb.128.4.661>.
- Morgan, J., Saleem, M., Ng, R., *et al.* (2019) „Structural basis of the leukocyte integrin Mac-1 I-domain interactions with the platelet glycoprotein Ib“, *Blood Adv*, 3(9), S. 1450–1459. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2018027011>.
- Morita, C., Horiuchi, T., Tsukamoto, H., *et al.* (2001) „Association of tumor necrosis factor receptor type II polymorphism 196R with Systemic lupus erythematosus in the Japanese: molecular and functional analysis“, *Arthritis Rheum*, 44(12), S. 2819–27. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200112\)44:12%3C2819::aid-art469%3E3.0.co;2-2](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200112)44:12%3C2819::aid-art469%3E3.0.co;2-2).
- Morsing, S.K.H., Rademakers, T., Brouns, S.L.N., *et al.* (2021) „ADAM10-Mediated Cleavage of ICAM-1 Is Involved in Neutrophil Transendothelial Migration“, *Cells*, 10(2). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/cells10020232>.
- Mortelliti, M.P. und Manning, H.L. (2002) „Acute respiratory distress syndrome“, *Am Fam Physician*, 65(9), S. 1823–30.
- Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., *et al.* (1997) „Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha“, *Nature*, 385(6618), S. 733–6. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/385733a0>.
- Moss, M.L., Stoeck, A., Yan, W., *et al.* (2008) „ADAM10 as a target for anti-cancer therapy“, *Curr Pharm Biotechnol*, 9(1), S. 2–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.2174/138920108783497613>.

7 Literatur

- Moss, M.L., White, J.M., Lambert, M.H., *et al.* (2001) „TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery“, *Drug Discov Today*, 6(8), S. 417–426. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s1359-6446\(01\)01738-x](https://doi.org/10.1016/s1359-6446(01)01738-x).
- Murray, J.F., Matthay, M.A., Luce, J.M., *et al.* (1988) „An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome“, *Am Rev Respir Dis*, 138(3), S. 720–3. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/ajrccm/138.3.720>.
- Nagano, O., Murakami, D., Hartmann, D., *et al.* (2004) „Cell-matrix interaction via CD44 is independently regulated by different metalloproteinases activated in response to extracellular Ca(2+) influx and PKC activation“, *J Cell Biol*, 165(6), S. 893–902. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1083/jcb.200310024>.
- Nagano, O. und Saya, H. (2004) „Mechanism and biological significance of CD44 cleavage“, *Cancer Sci*, 95(12), S. 930–5. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2004.tb03179.x>.
- Naik, M.U., Caplan, J.L. und Naik, U.P. (2014) „Junctional adhesion molecule-A suppresses platelet integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ signaling by recruiting Csk to the integrin-c-Src complex“, *Blood*, 123(9), S. 1393–402. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-496232>.
- Naor, D., Sionov, R.V. und Ish-Shalom, D. (1997) „CD44: structure, function, and association with the malignant process“, *Adv Cancer Res*, 71, S. 241–319. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60101-3](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60101-3).
- Neuenfeldt, F., Schumacher, J.C., Grieshaber-Bouyer, R., *et al.* (2022) „Inflammation induces pro-NETotic neutrophils via TNFR2 signaling“, *Cell Rep*, 39(3), S. 110710. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110710>.
- Ngamsri, K.C., Böhne, J., Simelitis, M.S., *et al.* (2021) „CX3CR1 Depletion Promotes the Formation of Platelet-Neutrophil Complexes and Aggravates Acute Peritonitis“, *Shock*, 56(2), S. 287–297. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/shk.0000000000001733>.
- Nin, N., Muriel, A., Peñuelas, O., *et al.* (2017) „Severe hypercapnia and outcome of mechanically ventilated patients with moderate or severe acute respiratory distress syndrome“, *Intensive Care Med*, 43(2), S. 200–208. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4611-1>.
- Nottebaum, A.F., Cagna, G., Winderlich, M., *et al.* (2008) „VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF“, *J Exp Med*, 205(12), S. 2929–45. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.20080406>.
- Okamoto, I., Kawano, Y., Murakami, D., *et al.* (2001) „Proteolytic release of CD44 intracellular domain and its role in the CD44 signaling pathway“, *J Cell Biol*, 155(5), S. 755–62. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1083/jcb.200108159>.

- Orme, Jr., J., Romney, J.S., Hopkins, R.O., *et al.* (2003) „Pulmonary function and health-related quality of life in survivors of acute respiratory distress syndrome“, *Am J Respir Crit Care Med*, 167(5), S. 690–4. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/rccm.200206-542OC>.
- Ostermann, G., Fraemohs, L., Baltus, T., *et al.* (2005) „Involvement of JAM-A in mononuclear cell recruitment on inflamed or atherosclerotic endothelium: inhibition by soluble JAM-A“, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(4), S. 729–35. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000157154.14474.3b>.
- Ostermann, G., Weber, K.S., Zerneck, A., *et al.* (2002) „JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes“, *Nat Immunol*, 3(2), S. 151–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/ni755>.
- Ozaki, Y., Suzuki-Inoue, K. und Inoue, O. (2013) „Platelet receptors activated via multimerization: glycoprotein VI, GPIb-IX-V, and CLEC-2“, *J Thromb Haemost*, 11 Suppl 1, S. 330–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/jth.12235>.
- Page, C. und Pitchford, S. (2013) „Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation“, *Int Immunopharmacol*, 17(4), S. 1176–84. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.06.004>.
- Papazian, L., Forel, J.M., Gacouin, A., *et al.* (2010) „Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome“, *N Engl J Med*, 363(12), S. 1107–16. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1005372>.
- Pepe, P.E., Potkin, R.T., Reus, D.H., *et al.* (1982) „Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome“, *Am J Surg*, 144(1), S. 124–30. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0002-9610\(82\)90612-2](https://doi.org/10.1016/0002-9610(82)90612-2).
- Petri, B. und Sanz, M.J. (2018) „Neutrophil chemotaxis“, *Cell Tissue Res*, 371(3), S. 425–436. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00441-017-2776-8>.
- Pfoh, E.R., Wozniak, A.W., Colantuoni, E., *et al.* (2016) „Physical declines occurring after hospital discharge in ARDS survivors: a 5-year longitudinal study“, *Intensive Care Med*, 42(10), S. 1557–1566. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00134-016-4530-1>.
- Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., *et al.* (2006) „Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade“, *J Exp Med*, 203(12), S. 2569–75. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.20060925>.
- Ponnuchamy, B. und Khalil, R.A. (2008) „Role of ADAMs in endothelial cell permeability: cadherin shedding and leukocyte rolling“, *Circ Res*, 102(10), S. 1139–42. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1161/circresaha.108.177394>.

- Porteu, F. und Nathan, C. (1990) „Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils“, *J Exp Med*, 172(2), S. 599–607. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.172.2.599>.
- Prince, L.R., Whyte, M.K., Sabroe, I., *et al.* (2011) „The role of TLRs in neutrophil activation“, *Curr Opin Pharmacol*, 11(4), S. 397–403. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2011.06.007>.
- Probert, L. (2015) „TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects“, *Neuroscience*, 302, S. 2–22. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038>.
- Pruessmeyer, J., Hess, F.M., Alert, H., *et al.* (2014) „Leukocytes require ADAM10 but not ADAM17 for their migration and inflammatory recruitment into the alveolar space“, *Blood*, 123(26), S. 4077–88. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2013-09-511543>.
- Pruessmeyer, J. und Ludwig, A. (2009) „The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer“, *Semin Cell Dev Biol*, 20(2), S. 164–74. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.09.005>.
- Pugin, J., Verghese, G., Widmer, M.C., *et al.* (1999) „The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome“, *Crit Care Med*, 27(2), S. 304–12. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/00003246-199902000-00036>.
- Rabie, T., Strehl, A., Ludwig, A., *et al.* (2005) „Evidence for a role of ADAM17 (TACE) in the regulation of platelet glycoprotein V“, *J Biol Chem*, 280(15), S. 14462–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1074/jbc.M500041200>.
- Rahman, M., Roller, J., Zhang, S., *et al.* (2012) „Metalloproteinases regulate CD40L shedding from platelets and pulmonary recruitment of neutrophils in abdominal sepsis“, *Inflamm Res*, 61(6), S. 571–9. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00011-012-0446-6>.
- Rahman, M., Zhang, S., Chew, M., *et al.* (2009) „Platelet-derived CD40L (CD154) mediates neutrophil upregulation of Mac-1 and recruitment in septic lung injury“, *Ann Surg*, 250(5), S. 783–90. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/SLA.0b013e3181bd95b7>.
- Ranieri, V.M., Rubenfeld, G.D., Thompson, B.T., *et al.* (2012) „Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition“, *Jama*, 307(23), S. 2526–33. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1001/jama.2012.5669>.
- Reddy, P., Slack, J.L., Davis, R., *et al.* (2000) „Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme“, *J Biol Chem*, 275(19), S. 14608–14. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1074/jbc.275.19.14608>.

- Renesto, P. und Chignard, M. (1993) „Enhancement of cathepsin G-induced platelet activation by leukocyte elastase: consequence for the neutrophil-mediated platelet activation“, *Blood*, 82(1), S. 139–44.
- Reutershan, J., Basit, A., Galkina, E.V., *et al.* (2005) „Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury“, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289(5), S. L807–15. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00477.2004>.
- Richardson, J.D., Woods, D., Johanson, Jr., W. G., *et al.* (1979) „Lung bacterial clearance following pulmonary contusion“, *Surgery*, 86(5), S. 730–5.
- Rose-John, S. (2013) „ADAM17, shedding, TACE as therapeutic targets“, *Pharmacol Res*, 71, S. 19–22. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2013.01.012>.
- Rossaint, J., Kühne, K., Skupski, J., *et al.* (2016) „Directed transport of neutrophil-derived extracellular vesicles enables platelet-mediated innate immune response“, *Nat Commun*, 7, S. 13464. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/ncomms13464>.
- Roth, G.J. (1991) „Developing relationships: arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins“, *Blood*, 77(1), S. 5–19.
- Rubenfeld, G.D., Caldwell, E., Peabody, E., *et al.* (2005) „Incidence and outcomes of acute lung injury“, *N Engl J Med*, 353(16), S. 1685–93. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050333>.
- Saftig, P. und Lichtenthaler, S.F. (2015) „The alpha secretase ADAM10: A metalloprotease with multiple functions in the brain“, *Prog Neurobiol*, 135, S. 1–20. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.10.003>.
- Saftig, P. und Reiss, K. (2011) „The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential“, *Eur J Cell Biol*, 90(6-7), S. 527–35. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2010.11.005>.
- Saguil, A. und Fargo, M.V. (2020) „Acute Respiratory Distress Syndrome: Diagnosis and Management“, *Am Fam Physician*, 101(12), S. 730–738.
- Santoso, S., Sachs, U.J., Kroll, H., *et al.* (2002) „The junctional adhesion molecule 3 (JAM-3) on human platelets is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1“, *J Exp Med*, 196(5), S. 679–91. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.20020267>.
- Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., *et al.* (2011) „ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration“, *Trends Immunol*, 32(8), S. 380–7. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.05.005>.

- Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., *et al.* (2008) „ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin“, *Circ Res*, 102(10), S. 1192–201. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1161/circresaha.107.169805>.
- Schumacher, N. und Rose-John, S. (2022) „ADAM17 orchestrates Interleukin-6, TNF α and EGF-R signaling in inflammation and cancer“, *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1869(1), S. 119141. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119141>.
- Schwarz, N., Pruessmeyer, J., Hess, F.M., *et al.* (2010) „Requirements for leukocyte transmigration via the transmembrane chemokine CX3CL1“, *Cell Mol Life Sci*, 67(24), S. 4233–48. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0433-4>.
- Seals, D.F. und Courtneidge, S.A. (2003) „The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions“, *Genes Dev*, 17(1), S. 7–30. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1101/gad.1039703>.
- Sedger, L.M. und McDermott, M.F. (2014) „TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future“, *Cytokine Growth Factor Rev*, 25(4), S. 453–72. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>.
- Sharp, C., Millar, A.B. und Medford, A.R. (2015) „Advances in understanding of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome“, *Respiration*, 89(5), S. 420–34. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1159/000381102>.
- Sherman, L., Sleeman, J., Herrlich, P., *et al.* (1994) „Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression“, *Curr Opin Cell Biol*, 6(5), S. 726–33. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90100-7](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90100-7).
- Sherwood, E.R. und Toliver-Kinsky, T. (2004) „Mechanisms of the inflammatory response“, *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 18(3), S. 385–405. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.bpa.2003.12.002>.
- Shimizu, M., Hasegawa, N., Nishimura, T., *et al.* (2009) „Effects of TNF-alpha-converting enzyme inhibition on acute lung injury induced by endotoxin in the rat“, *Shock*, 32(5), S. 535–40. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3181a2adb7>.
- Siegel, M.D. (2022) „Acute respiratory distress syndrome: Epidemiology, pathophysiology, pathology, and etiology in adults.“, *UpToDate* [Preprint].
- Silvis, M.J.M., Kaffka Genaamd Dengler, S.E., Odille, C.A., *et al.* (2020) „Damage-Associated Molecular Patterns in Myocardial Infarction and Heart Transplantation: The Road to Translational Success“, *Front Immunol*, 11, S. 599511. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599511>.

- Simon, S.I., Cherapanov, V., Nadra, I., *et al.* (1999) „Signaling functions of L-selectin in neutrophils: alterations in the cytoskeleton and colocalization with CD18“, *J Immunol*, 163(5), S. 2891–901.
- Smalley, D.M. und Ley, K. (2005) „L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage“, *J Cell Mol Med*, 9(2), S. 255–66. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00354.x>.
- Soeki, T., Tamura, Y., Shinohara, H., *et al.* (2004) „Elevated concentration of soluble vascular endothelial cadherin is associated with coronary atherosclerosis“, *Circ J*, 68(1), S. 1–5. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1253/circj.68.1>.
- Solomon, K.A., Pesti, N., Wu, G., *et al.* (1999) „Cutting edge: a dominant negative form of TNF-alpha converting enzyme inhibits proTNF and TNFRII secretion“, *J Immunol*, 163(8), S. 4105–8.
- Sommer, A., Kordowski, F., Büch, J., *et al.* (2016) „Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function“, *Nat Commun*, 7, S. 11523. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/ncomms11523>.
- Sopper, S., Mustjoki, S., White, D., *et al.* (2017) „Reduced CD62L Expression on T Cells and Increased Soluble CD62L Levels Predict Molecular Response to Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Early Chronic-Phase Chronic Myelogenous Leukemia“, *J Clin Oncol*, 35(2), S. 175–184. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1200/jco.2016.67.0893>.
- Sperandio, M., Smith, M.L., Forlow, S.B., *et al.* (2003) „P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules“, *J Exp Med*, 197(10), S. 1355–63. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.20021854>.
- Sreeramkumar, V., Adrover, J.M., Ballesteros, I., *et al.* (2014) „Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation“, *Science*, 346(6214), S. 1234–8. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1126/science.1256478>.
- Stadtman, A., Germena, G., Block, H., *et al.* (2013) „The PSGL-1-L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow“, *J Exp Med*, 210(11), S. 2171–80. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.20130664>.
- Stark, K., Philippi, V., Stockhausen, S., *et al.* (2016) „Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice“, *Blood*, 128(20), S. 2435–2449. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2016-04-710632>.
- Steinberg, K.P., Milberg, J.A., Martin, T.R., *et al.* (1994) „Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome“, *Am J Respir Crit Care Med*, 150(1), S. 113–22. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.150.1.8025736>.

- Stone, A.L., Kroeger, M. und Sang, Q.X. (1999) „Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review)“, *J Protein Chem*, 18(4), S. 447–65. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1023/a:1020692710029>.
- Su, K., Bo, L., Jiang, C., *et al.* (2021) „TLR4 is required for macrophage efferocytosis during resolution of ventilator-induced lung injury“, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 321(4), S. L787–l801. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1152/ajplung.00226.2021>.
- Swenson, K.E. und Swenson, E.R. (2021) „Pathophysiology of Acute Respiratory Distress Syndrome and COVID-19 Lung Injury“, *Crit Care Clin*, 37(4), S. 749–776. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2021.05.003>.
- Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., *et al.* (2006) „Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold“, *Embo j*, 25(11), S. 2388–96. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601131>.
- Tang, J., Zarbock, A., Gomez, I., *et al.* (2011) „Adam17-dependent shedding limits early neutrophil influx but does not alter early monocyte recruitment to inflammatory sites“, *Blood*, 118(3), S. 786–94. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2010-11-321406>.
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., *et al.* (2005) „Macrophage receptors and immune recognition“, *Annu Rev Immunol*, 23, S. 901–44. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816>.
- Thille, A.W., Esteban, A., Fernández-Segoviano, P., *et al.* (2013) „Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies“, *Lancet Respir Med*, 1(5), S. 395–401. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(13\)70053-5](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(13)70053-5).
- Tiedt, R., Schomber, T., Hao-Shen, H., *et al.* (2007) „Pf4-Cre transgenic mice allow the generation of lineage-restricted gene knockouts for studying megakaryocyte and platelet function in vivo“, *Blood*, 109(4), S. 1503–6. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2006-04-020362>.
- Tietjen, P.A., Kaner, R.J. und Quinn, C.E. (1994) „Aspiration emergencies“, *Clin Chest Med*, 15(1), S. 117–35.
- Trifilieff, A., Walker, C., Keller, T., *et al.* (2002) „Pharmacological profile of PKF242-484 and PKF241-466, novel dual inhibitors of TNF-alpha converting enzyme and matrix metalloproteinases, in models of airway inflammation“, *Br J Pharmacol*, 135(7), S. 1655–64. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0704616>.
- Tsakadze, N.L., Sithu, S.D., Sen, U., *et al.* (2006) „Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)“, *J Biol Chem*, 281(6), S. 3157–64. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1074/jbc.M510797200>.

- Utgaard, J.O., Jahnsen, F.L., Bakka, A., *et al.* (1998) „Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells“, *J Exp Med*, 188(9), S. 1751–6. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1084/jem.188.9.1751>.
- Vallath, S., Hynds, R.E., Succony, L., *et al.* (2014) „Targeting EGFR signalling in chronic lung disease: therapeutic challenges and opportunities“, *Eur Respir J*, 44(2), S. 513–22. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1183/09031936.00146413>.
- Vanichakarn, P., Blair, P., Wu, C., *et al.* (2008) „Neutrophil CD40 enhances platelet-mediated inflammation“, *Thromb Res*, 122(3), S. 346–58. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2007.12.019>.
- Vassallo, A., Wood, A.J., Subburayalu, J., *et al.* (2019) „The counter-intuitive role of the neutrophil in the acute respiratory distress syndrome“, *Br Med Bull*, 131(1), S. 43–55. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1093/bmb/ldz024>.
- Vestweber, D. (2008) „VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation“, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28(2), S. 223–32. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1161/atvbaha.107.158014>.
- Vestweber, D. (2015) „How leukocytes cross the vascular endothelium“, *Nat Rev Immunol*, 15(11), S. 692–704. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nri3908>.
- Villar, J., Ferrando, C., Martínez, D., *et al.* (2020) „Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome: a multicentre, randomised controlled trial“, *Lancet Respir Med*, 8(3), S. 267–276. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s2213-2600\(19\)30417-5](https://doi.org/10.1016/s2213-2600(19)30417-5).
- Vogt, K.L., Summers, C., Chilvers, E.R., *et al.* (2018) „Priming and de-priming of neutrophil responses in vitro and in vivo“, *Eur J Clin Invest*, 48 Suppl 2, S. e12967. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1111/eci.12967>.
- Wang, J.X., Bair, A.M., King, S.L., *et al.* (2012) „Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a β 2-integrin-dependent mechanism“, *Blood*, 120(7), S. 1489–98. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-404046>.
- Wang, L., Du, F. und Wang, X. (2008) „TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways“, *Cell*, 133(4), S. 693–703. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.036>.
- Wang, Q., Teder, P., Judd, N.P., *et al.* (2002) „CD44 deficiency leads to enhanced neutrophil migration and lung injury in Escherichia coli pneumonia in mice“, *Am J Pathol*, 161(6), S. 2219–28. Verfügbar unter: [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)64498-7](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)64498-7).
- Ware, L.B. (2022) „Go with the Flow: Expanding the Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome to Include High-Flow Nasal Oxygen“, *Am J Respir Crit Care Med*, 205(4), S. 380–382. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/rccm.202112-2727ED>.

- Ware, L.B. und Matthay, M.A. (2001) „Alveolar fluid clearance is impaired in the majority of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome“, *Am J Respir Crit Care Med*, 163(6), S. 1376–83. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1164/ajrccm.163.6.2004035>.
- Weber, C., Fraemohs, L. und Dejana, E. (2007) „The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation“, *Nat Rev Immunol*, 7(6), S. 467–77. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1038/nri2096>.
- Weber, S., Niessen, M.T., Prox, J., *et al.* (2011) „The disintegrin/metalloproteinase Adam10 is essential for epidermal integrity and Notch-mediated signaling“, *Development*, 138(3), S. 495–505. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1242/dev.055210>.
- Wenzel, F., Rox, J., Reinboldt, S., *et al.* (2010) „Release of soluble CD40L by matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)-dependent shedding of platelets and its subsequent accumulation in stem cell products of autologous donors“, *J Stem Cells Regen Med*, 6(2), S. 66–7.
- Wiedemann, H.P., Wheeler, A.P., Bernard, G.R., *et al.* (2006) „Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury“, *N Engl J Med*, 354(24), S. 2564–75. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa062200>.
- Wiener-Kronish, J.P., Albertine, K.H. und Matthay, M.A. (1991) „Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin“, *J Clin Invest*, 88(3), S. 864–75. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1172/jci115388>.
- Wu, J., Liang, Y., Fu, P., *et al.* (2023) „Sphingosine-1-Phosphate Receptor 3 Induces Endothelial Barrier Loss via ADAM10-Mediated Vascular Endothelial-Cadherin Cleavage“, *Int J Mol Sci*, 24(22). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/ijms242216083>.
- Yacoub, D., Benslimane, N., Al-Zoobi, L., *et al.* (2013) „CD154 is released from T-cells by a disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 (ADAM10) and ADAM17 in a CD40 protein-dependent manner“, *J Biol Chem*, 288(50), S. 36083–93. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.506220>.
- Yang, Q., Zheng, F.P., Zhan, Y.S., *et al.* (2013) „Tumor necrosis factor- α mediates JNK activation response to intestinal ischemia-reperfusion injury“, *World J Gastroenterol*, 19(30), S. 4925–34. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i30.4925>.
- Ye, Q., Wang, B. und Mao, J. (2020) „The pathogenesis and treatment of the ‘Cytokine Storm’ in COVID-19“, *J Infect*, 80(6), S. 607–613. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.037>.
- Zarbock, A., Ley, K., McEver, R.P., *et al.* (2011) „Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow“, *Blood*, 118(26), S. 6743–51. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1182/blood-2011-07-343566>.

7 Literatur

Zemans, R.L. und Matthay, M.A. (2017) „What drives neutrophils to the alveoli in ARDS?“, *Thorax*, 72(1), S. 1–3. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2016-209170>.

Zhang, P., Shen, M., Fernandez-Patron, C., *et al.* (2016) „ADAMs family and relatives in cardiovascular physiology and pathology“, *J Mol Cell Cardiol*, 93, S. 186–99. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2015.10.031>.

Zhong, S. und Khalil, R.A. (2019) „A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) and ADAM with thrombospondin motifs (ADAMTS) family in vascular biology and disease“, *Biochem Pharmacol*, 164, S. 188–204. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.03.033>.

Zhou, Y., Heitmann, J.S., Kropp, K.N., *et al.* (2021) „Regulation of Platelet-Derived ADAM17: A Biomarker Approach for Breast Cancer?“, *Diagnostics (Basel)*, 11(7). Verfügbar unter: <https://doi.org/10.3390/diagnostics11071188>.

8 Eigenanteil

Die vorgelegte Arbeit wurde am Institut für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Franziska Konrad und PD Dr. Michael Koeppen durchgeführt. Die Konzeption und Supervision der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Konrad, PD Dr. Michael Koeppen und Dr. Kristian-Christos Ngamsri.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Jutta Gamper-Tsigaras und Dr. Ngamsri von mir eigenständig und in Zusammenarbeit mit Anna Biedritzky durchgeführt. Die *in vivo* Migrationsdaten mit systemischer Inhibition der ADAMs wurden in Zusammenarbeit mit Meike Goerlich für deren medizinische Dissertation angefertigt. Ich habe Frau Goerlich in die Methodik und Auswertung der durchflusszytometrischen Daten eingeführt und in Zusammenarbeit mit ihr die Tierversuche durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls eigenständig durch mich.

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

Anika Fuhr

9 Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an meine Betreuerin Prof. Dr. Franziska Konrad. Ihre Überredungskunst und ihr Vertrauen in mich und meine Arbeit haben entscheidend zum Gelingen dieses Projektes beigetragen. Durch ihre Betreuung und die Herausforderungen, vor die sie mich gestellt hat, bin ich immer wieder über mich hinausgewachsen und konnte mich sowohl fachlich als auch menschlich weiterentwickeln.

Ebenfalls möchte ich mich sehr bei PD Dr. Michael Koeppen bedanken, der mich gegen Ende der Promotion als Co-Betreuer angenommen hat. Seine fachliche Kompetenz und pragmatische Art haben mir sehr geholfen. Besonders hervorzuheben ist, dass er stets ansprechbar war, mein Wissen durch seine fachlichen Tipps nochmals deutlich erweitert wurde und sein Engagement mir gezeigt hat, was in der Wissenschaft möglich ist.

Zudem möchte ich mich bei Anna, Jutta und Catharina bedanken. Ihr seid immer für mich da gewesen, ob methodisch oder wenn ich jemanden zum Reden gebraucht habe. Ohne euch wäre der eine oder andere Tag hart geworden. Ein Dank gilt ebenfalls Meike, die ich während ihrer medizinischen Doktorarbeit einlernen und unterstützen durfte. Vielen Dank für deine Unterstützung.

Ein besonderer Dank geht an die Studienstiftung des deutschen Volkes, durch welche ich ab Februar 2022 finanziell unterstützt worden bin. Das Promotionsstipendium ist eine tolle Förderung, die vor allem auch jungen Müttern die Möglichkeit bietet, ohne finanzielle Sorgen zu promovieren.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner ganzen Familie, allen voran meinen Eltern, meinem Bruder und bei meinem Mann, für eure unermüdliche Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion bedanken. Ohne eure Liebe, Geduld, Ermutigung, und finanzielle Unterstützung hätte ich es nicht geschafft, all die Herausforderungen zu meistern. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt und mich auf meinem Weg begleitet habt. Jannis, mein kleiner Schatz, auch bei dir möchte ich mich bedanken. Deine Fröhlichkeit und bedingungslose Liebe hat mir immer wieder geholfen, weiterzumachen und mich daran erinnert, die kleinen Dinge des Lebens zu schätzen und zu feiern.