

Aus der Universitätsklinik für  
Anaesthesiologie und Intensivmedizin Tübingen

**Shifting der Adhäsionsmolekülexpression auf  
neutrophilen Granulozyten während deren Migration durch die  
verschiedenen Kompartimente der Lunge im Rahmen der  
akuten pulmonalen Inflammation**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

**Wohlert, Julia**

2019



Dekan: Professor Dr. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Reutershan

2. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. B. Nürnberg

Tag der Disputation: 08.02.2019

Für Jonas und meine Familie

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	8
Tabellenverzeichnis .....	8
Abkürzungsverzeichnis.....	8
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1 Pulmonale Inflammation und ARDS .....	10
1.1.1 Definition, Ätiologie, Pathophysiologie .....	10
1.1.2 Epidemiologie .....	11
1.1.3 Klinik und Therapie .....	11
1.2 Neutrophile Granulozyten in der akuten pulmonalen Inflammation .....	12
1.3 Migration neutrophiler Granulozyten durch die verschiedenen Kompartimente der Lunge .....	13
1.3.1 Selektine, Integrine und Zelladhäsionsmoleküle (CAMs) .....	13
1.3.2 Transendotheliale Migration der PMNs in der Lunge .....	14
1.3.3 Transepitheliale Migration der PMNs in der Lunge .....	15
1.4 Adhäsionsmoleküle in der pulmonalen Inflammation .....	18
1.4.1 CD-Nomenklatur .....	18
1.4.2 CD11a (Integrin $\alpha$ L) .....	18
1.4.3 CD11b (Integrin $\alpha$ M) .....	19
1.4.4 CD29 (Integrin- $\beta$ -1).....	20
1.4.5 CD54 (ICAM-1).....	21
1.4.6 CD31 (PECAM-1) .....	23
1.4.7 CD44 (HCAM) .....	24
1.4.8 CD47 (IAP) .....	25
1.4.9 CD172a (SIRP $\alpha$ ).....	26
1.4.10 CD162 (PSGL-1) .....	27
1.5 Fragestellung .....	28
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>30</b>
2.1 Migration von PMNs in vivo: murines Modell der pulmonalen Inflammation.....	30
2.1.1 Migrationsversuch in vivo.....	31
2.1.2 Adhäsionsmoleküle in murinen Lungen: RT-qPCR .....	33
2.1.3 Adhäsionsmoleküle in murinen Lungen: Immunfluoreszenz.....	36
2.1.4 Migration von PMNs in vivo: Durchflusszytometrie .....	40

2.2	Stimulation von humanem Vollblut .....	45
2.3	Stimulation von humanen pulmonalen Epithelzellen.....	47
2.4	Migration von PMNs in vitro: Transmigrationsversuch mit humanen pulmonalen Epithelzellen (H441) und humanem Vollblut .....	49
2.5	Statistik .....	52
3	Ergebnisse .....	53
3.1	Adhäsionsmoleküle in murinen Lungen: RT-qPCR.....	53
3.2	Adhäsionsmoleküle in murinen Lungen: Immunfluoreszenz .....	54
3.3	Migration von PMNs in vivo: Durchflusszytometrie .....	58
3.3.1	CD11a .....	60
3.3.2	CD11b .....	61
3.3.3	CD29 .....	62
3.3.4	CD54 .....	63
3.3.5	CD31 .....	64
3.3.6	CD44 .....	65
3.3.7	CD47 .....	67
3.3.8	CD172a .....	69
3.3.9	CD162 .....	70
3.4	Stimulation von humanem Vollblut .....	72
3.5	Stimulation von humanen pulmonalen Epithelzellen.....	76
3.6	Migration von PMNs in vitro: Transmigrationsversuch mit humanen pulmonalen Epithelzellen (H441) und humanem Vollblut .....	78
3.6.1	CD11a .....	79
3.6.2	CD11b .....	80
3.6.3	CD29 .....	81
3.6.4	CD54 .....	82
3.6.5	CD31 .....	83
3.6.6	CD44 .....	84
3.6.7	CD47 .....	84
3.6.8	CD172a .....	85
3.6.9	CD162 .....	86
4	Diskussion .....	87
4.1	Adhäsionsmoleküle in murinen Lungen: RT-qPCR und Immunfluoreszenz .....	88
4.2	Migration von PMNs in vivo: Durchflusszytometrie .....	88
4.2.1	CD11a .....	89

---

4.2.2	CD11b .....	90
4.2.3	CD29 .....	91
4.2.4	CD54 .....	92
4.2.5	CD31 .....	92
4.2.6	CD44 .....	94
4.2.7	CD47 .....	95
4.2.8	CD172a .....	96
4.2.9	CD162 .....	98
4.3	Stimulation von humanem Vollblut .....	100
4.4	Stimulation von humanen pulmonalen Epithelzellen.....	101
4.5	Migration von PMNs in vitro: Transmigrationsversuch mit humanen pulmonalen Epithelzellen (H441) und humanem Vollblut.....	101
5	Zusammenfassung .....	103
	Literaturverzeichnis.....	105
	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift .....	118
	Danksagung.....	119

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Migration Neutrophiler Granulozyten durch die Kompartimente der Lunge nach Inhalation von Lipopolysaccharid (LPS) .....	17
Abbildung 2: Modell der LPS-Inhalation.....	30
Abbildung 3: Unterschiedliche Leukozyten Populationen im humanen Vollblut.....	40
Abbildung 4: Zellen aus Blut, Lunge und BAL in der Durchflusszytometrie .....	43
Abbildung 5: Zuordnung der PMNs zu Endothel und Interstitium in den Lungen-Proben .....	43
Abbildung 6: Gating-Prozess der PMNs am Beispiel einer BAL-Probe .....	44
Abbildung 7: Viabilitätsfärbung humaner PMNs im FlowJo-Histogramm.....	47
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Transmigrationsversuchs .....	50
Abbildung 9: Genexpression der Adhäsionsmoleküle im murinen Lungengewebe .....	53
Abbildung 10: Murine Lungenschnitte mit immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung von CD29 .....	55
Abbildung 11: Murine Lungenschnitte mit immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung von CD54 .....	56
Abbildung 12: Murine Lungenschnitte mit immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung von CD31 .....	57
Abbildung 13: Interpretation der Medianen Fluoreszenz Intensität .....	59
Abbildung 14: CD11a-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimente der murinen Lunge .....	60
Abbildung 15: CD11b-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimente der murinen Lunge .....	61
Abbildung 16: CD29 -Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimente der murinen Lunge .....	62
Abbildung 17: CD54-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimenten der murinen Lunge .....	63
Abbildung 18: CD31-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimente der murinen Lunge .....	64
Abbildung 19: CD44-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimenten der murinen Lunge .....	65
Abbildung 20: Prozentualer Anteil (Freq. of parent) CD44 positiver PMNs an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment in der murinen Lunge .....	66
Abbildung 21: CD47-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimenten der murinen Lunge .....	67
Abbildung 22: Prozentualer Anteil (Freq. of parent) CD47 positiver PMNs an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment in der murinen Lunge .....	68

Abbildung 23: CD172a-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimenten der murinen Lunge .....	69
Abbildung 24: CD162-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimenten der murinen Lunge .....	70
Abbildung 25: Prozentualer Anteil (Freq. of parent) CD162 positiver PMNs an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment .....	71
Abbildung 26: CD11a-, CD 11b- und CD29-Expression (MFI) auf humanen PMNs in Vollblut nach Stimulation mit MIP-2, KC, TNF $\alpha$ und LPS.....	73
Abbildung 27: CD54-, CD31- und CD44-Expression (MFI) auf humanen PMNs in Vollblut nach Stimulation mit MIP-2, KC, TNF $\alpha$ und LPS.....	74
Abbildung 28: CD47-, CD172a- und CD162-Expression (MFI) auf humanen PMNs in Vollblut nach Stimulation mit MIP-2, KC, TNF $\alpha$ und LPS.....	75
Abbildung 29: CD44 positive H441-Zellen exemplarisch dargestellt am Histogramm dreier einzelner Proben in der Flow-Jo-Auswertung.....	77
Abbildung 30: Expression (MFI) von CD29, CD54, CD44 und CD47 auf H441-Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$ .....	77
Abbildung 31: Zellzahlen von PMNs im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut .....	78
Abbildung 32: Expression von CD11a (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	79
Abbildung 33: Expression von CD11b (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	80
Abbildung 34: Expression von CD29 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	81
Abbildung 35: CD29 positive PMNs (Freq. of parent) an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment im Trans-migrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	81
Abbildung 36: Expression von CD54 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	82
Abbildung 37: CD54 positive PMNs (Freq. of parent) an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment im Transmigra-tionsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	82
Abbildung 38: Expression von CD31 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	83
Abbildung 39: Expression von CD44 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	84

Abbildung 40: Expression von CD47 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	85
Abbildung 41: Expression von CD172a (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	85
Abbildung 42: Expression von CD162 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.....	86
Abbildung 43: Migration neutrophiler Granulozyten in der pulmonalen Inflammation mit schematischer Darstellung der Adhäsionsmoleküle in den Kompartimenten ihrer maximalen Expression auf den PMNs .....	99

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anästhetika pro Maus .....	31
Tabelle 2: Enzymlösung pro Maus.....	32
Tabelle 3: Lysepuffer (Zusammensetzung für 250 ml) .....	32
Tabelle 4: Färbepuffer (Zusammensetzung für 500ml) .....	32
Tabelle 5: Murine Primer mit Annealing-Temperatur .....	36
Tabelle 6: Phasen der Einbettung im Gewebeeinfiltrationsautomaten .....	37
Tabelle 7: Primärantikörper (anti-mouse) für Immunfluoreszenz.....	38
Tabelle 8: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz.....	39
Tabelle 9: Antikörper im Migrationsversuch in vivo (anti-mouse) .....	42
Tabelle 10: Stimulantien für Vollblut in vitro .....	45
Tabelle 11: FACS-Antikörper im Vollblut-Versuch (anti-human) .....	45
Tabelle 12: Zusammensetzung H441-Kulturmedium .....	48
Tabelle 13: Adhäsionsmolekülexpression (MFI) auf humanen PMNs in Vollblut nach Stimulation mit MIP-2, KC, TNF $\alpha$ und LPS.....	72

## Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin-D
AK	Antikörper
ALI	Acute Lung Injury (heute: mildes ARDS)
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum Albumin
CAM	Cell Adhesion Molecule
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
END	Am Endothel adhärenente PMN-Population
ESL-1	E-Selektin-Ligand-1
EZM	Extrazellulärmatix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting bzw. -Scanning
FiO <sub>2</sub>	Sauerstoffgehalt des Inspirationsgases
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
FP	Färbepuffer
FSC	Forward Scatter
HA	Hyaluronan
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HCAM	Homing Cell Adhesion Molecule (CD44)
IAP	Integrin-associated Protein (CD47)
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule-1 (CD54)
Ig	Immunglobulin
IL-8	Interleukin-8
IS	Interstitielle PMN-Population
IV	Intravasale PMN-Population
JAM	Junctional Adhesion Molecule
KC	Keratinocyte Chemoattractant
LFA-1	Lymphocyte Function-associated Antigen-1 (CD11a/CD18)
LPS	Lipopolysaccharid
Mac-1	Macrophage-1 Antigen (CD11b/CD18)
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MIP-2	Macrophage inflammatory protein-2

NFW	Nuklease-freies Wasser
OT	Objektträger
PaO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck im arteriellen Blut
PBS <sup>-</sup>	Phosphat-gepufferte Elektrolytlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31)
PMN	polymorphnukleäre Leukozyten/ Neutrophile Granulozyten
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (CD162)
qPCR	Echtzeit quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Reverse Transkriptase-quantitative Polymerase-Kettenreaktion
SIRP $\alpha$	Signal Regulatory Protein $\alpha$ (CD172a)
SSC	Side Scatter
TBS <sup>-</sup>	Trishydroxymethylaminomethane gepufferte Salzlösung
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
VLA-4	Very Late Antigen-4

# 1 Einleitung

## 1.1 Pulmonale Inflammation und ARDS

### 1.1.1 Definition, Ätiologie, Pathophysiologie

Die akute respiratorische Insuffizienz (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) bezeichnet einen überschießenden inflammatorischen Prozess in der Lunge, welcher trotz stetiger Optimierung der intensivmedizinischen Versorgung weltweit nach wie vor mit einer hohen Letalität von bis zu 46% behaftet ist (Bellani et al., 2016). Das Krankheitsbild hat dabei sehr variable und oft multiple Ursachen, zu denen in den häufigsten Fällen eine vorausgegangene Pneumonie oder eine Sepsis zählen (Matthay et al., 2012). Aber auch seltenere Auslöser wie ein Trauma, die Aspiration von Magensäure, eine Pankreatitis, Transfusionen oder Medikamente können zu einer respiratorischen Insuffizienz führen (Matthay and Zemans, 2011). Letztere wird aktuell nach den Berlin-Kriterien von 2012 definiert und unterschiedlichen Schweregraden zugeordnet. Bezeichnend für das Vorliegen eines ARDS sind der akute Beginn innerhalb einer Woche, diffuse und bilaterale Infiltrate im Röntgen-Thorax bei echokardiographisch ausgeschlossener kardialer Ätiologie des pulmonalen Ödems sowie eine therapierefraktäre Hypoxämie, verdeutlicht durch einen reduzierten Horowitz-Index. Dieser bezeichnet den Quotienten aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck ( $\text{PaO}_2$ ) und dem Sauerstoffgehalt des Inspirationsgases ( $\text{FiO}_2$ ), bei Lungengesunden liegt der Wert meist zwischen 350 und 450 mmHg. Er bestimmt den Grad der respiratorischen Insuffizienz: ein mildes ARDS liegt bei 300-201 mmHg vor, bei 200-101 mmHg handelt es sich um ein moderates ARDS, liegt der Wert unter 100 mmHg, wird es als schweres ARDS bezeichnet (Ranieri et al., 2012). Pathophysiologisch lässt sich der Verlauf des Krankheitsbildes in drei Stadien beschreiben. Zu Beginn steht die „exsudative Phase“ mit Bildung eines proteinreichen, interstitiellen Ödems, anschließend folgt die „proliferative Phase“ mit einem alveolären Lungenödem sowie Bildung von hyalinen Membranen und Atelektasen. Das Spätstadium wird als die „fibroproliferative Phase“ bezeichnet, in welcher es zu einem irreversiblen, fibrotischen Umbau des Lungenparenchyms kommt (Sharp et al., 2015).

### 1.1.2 Epidemiologie

Laut Rubenfeld et al. versterben trotz intensivmedizinischer Versorgung bei einer Inzidenz von ca. 200.000 Fällen/Jahr in den USA knapp 40% der Patienten (Rubenfeld et al., 2005). In einer aktuelleren, internationalen, multizentrischen, prospektiven Kohortenstudie über vier Wochen von Bellani et al. aus dem Jahr 2014 entwickelten 10% der Intensiv-Patienten ein ARDS (hiervon 30% ein mildes ARDS, 47% ein moderates ARDS und 23% ein schweres ARDS). Die Perioden-Prävalenz unter den insgesamt 12906 beatmungspflichtigen Patienten lag mit 23% bei knapp einem Viertel. Die Letalität der hospitalisierten Patienten mit mildem ARDS belief sich auf 35%, mit der moderaten Form auf 40% und beim schweren ARDS sogar auf 46% (Bellani et al., 2016).

### 1.1.3 Klinik und Therapie

Der Verlauf des ARDS präsentiert sich klinisch mit den Symptomen der zunehmenden Gasaustauschstörung: eine rasch progrediente Luftnot mit Zyanose und Tachypnoe beginnt bereits wenige Stunden nach dem auslösenden Ereignis, viele Patienten benötigen bei Manifestation bereits eine maschinelle Ventilation (Weilemann et al., 2011). Beginnend mit einer respiratorischen Alkalose in der Blutgasanalyse durch kompensatorische Hyperventilation, entwickelt sich die respiratorische Insuffizienz unter Ausbildung röntgenologisch sichtbarer Infiltrate zu einer respiratorischen Globalinsuffizienz. Hierbei liegt neben der Hypoxämie auch eine Hyperkapnie des arteriellen Blutes vor (Larsen and Ziegenfuß, 2013).

Rund 50 Jahre nach Erstbeschreibung des ARDS (Ashbaugh et al., 1967) sind therapeutisch bislang lediglich präventive und supportive Maßnahmen in der intensivmedizinischen Behandlung verankert. Die lungenprotektive Beatmung mit niedrigen Atemzugvolumina spielt eine wichtige Rolle (Brower et al., 2000), ebenso wie eine adäquate Volumentherapie (Grissom et al., 2015). Weitere Strategien beziehen sich auf die Früherkennung von Risikopatienten, die Anwendung der Bauchlage sowie den Einsatz von neuromuskulärer Blockade, Steroiden und ACE-Hemmern; Erfolgversprechende kausale Therapieansätze existieren derzeit jedoch noch nicht (Festic et al., 2015, Yadav et al., 2017).

## 1.2 Neutrophile Granulozyten in der akuten pulmonalen Inflammation

Unter den Leukozyten nehmen die neutrophilen Granulozyten (polymorphnukleäre Leukozyten, PMNs) mit einem Anteil von 50-70% im menschlichen Blut eine entscheidende Rolle in der angeborenen Immunabwehr ein. Sie haben die Fähigkeit mittels Adhäsionsmolekülen aktiv zum Ort der Inflammation zu migrieren und dort direkt Antigene zu phagozytieren. Zudem sind sie in der Lage, sogenannte Neutrophil Extracellular Traps (NETs) - kleine Komplexe aus DNA-Fragmenten, Proteinen und Enzymen- zur Elimination von Pathogenen zu formieren und Chemo- und Zytokine auszuschütten, um weitere Immunvorgänge zu initiieren (Kolaczkowska and Kubes, 2013, Sadik et al., 2011). Im Rahmen der akuten respiratorischen Insuffizienz kommt es jedoch zu einer überschießenden und damit schädigenden Infiltration des Lungenparenchyms durch die PMNs. Die Konzentration der Neutrophilen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) korreliert hierbei mit der Schwere des ARDS sowie einem schlechten Outcome der Patienten (Aggarwal et al., 2000, Steinberg et al., 1994). Neben dem endo- und epithelialen Defekt, der durch die massenhafte Migration der Neutrophilen verursacht wird, spielt auch der Einfluss freigesetzter Enzyme, anderer antimikrobieller Peptide und reaktiver Sauerstoffspezies auf das Parenchym eine entscheidende Rolle in der pulmonalen Schädigung (Uriarte et al., 2013). Der hiermit ebenfalls einhergehenden Permeabilitätserhöhung folgt ein eiweißreiches inflammatorisches Ödem, ein weiteres pathophysiologisches Merkmal des ARDS (Williams and Chambers, 2014).

Die Einwanderung der Granulozyten in die Alveole hat demnach einen großen Stellenwert in der pulmonalen Schädigung inne. Trotz der zerstörenden Infiltration sind die PMNs essentiell wichtig für die Pathogenabwehr. Zudem wird ihnen in jüngeren Untersuchungen eine unterstützende Rolle bei der Regeneration der Pneumozyten zugesprochen, indem sie intrazelluläre Signalwege aktivieren, die die Proliferation der Lungenzellen fördern sollen (Zemans et al., 2011, Paris et al., 2016). Nicht die gänzliche Inhibition, sondern vielmehr die Begrenzung bzw. die Modulation der PMN-Einwanderung stellen also das herausfordernde und gleichzeitig vielversprechende Ziel in der Entwicklung therapeutischer Optionen mit diesem Angriffspunkt dar. Eine genaue Kenntnis der Migrationsmechanismen ist hierfür unabdingbar.

### 1.3 Migration neutrophiler Granulozyten durch die verschiedenen Kompartimente der Lunge

Im Rahmen einer akuten Inflammation werden im betroffenen Gewebe durch ortsansässige Zellen wie Makrophagen verschiedene Signalproteine ausgeschüttet. Durch diese sogenannten Chemokine werden zirkulierende neutrophile Granulozyten aktiviert und zum Ort der Entzündung geleitet (Bhatia et al., 2012). Im menschlichen Organismus verlassen sie dabei das Gefäßbett in der Regel über die postkapillären Venulen, während in der Lunge besondere Umstände vorliegen: die Extravasation erfolgt in den feinsten Kapillaren (Downey et al., 1993). Die PMNs verändern hier zunächst ihre Form durch Umstrukturierung des Zytoskeletts, durchwandern dann die Gefäßwand, danach das Lungeninterstitium und schließlich das Lungenepithel bis in den Intraalveolarraum (Zemans and Matthay, 2017, Reutershan et al., 2005). Sie befinden sich auf ihrem Weg folglich in vier verschiedenen Kompartimenten: zuerst im zirkulierenden Blut, dann am Endothel adhärent, nachfolgend im Interstitium und nach Überschreitung der Epithelschicht letztendlich in der Alveole (vgl. Abbildung 1, S.17).

#### 1.3.1 Selektine, Integrine und Zelladhäsionsmoleküle (CAMs)

Drei Familien von Adhäsionsmolekülen spielen nach bisherigem Kenntnisstand eine zentrale Rolle im Rahmen der Leukozytenmigration: Selektine, Integrine und die CAMs der Immunglobulin-Superfamilie (DeLisser and Albelda, 1998). Die Transmembranproteine L-, P- und E-Selektin haben eine wichtige Aufgabe bei der Initiation der Leukozytenrekrutierung. Während L-Selektin auf allen Leukozyten exprimiert wird, findet sich E-Selektin vorwiegend auf aktivierten Endothelzellen und P-Selektin auf Thrombozyten. Sowohl E- als auch zum Teil P-Selektin können innerhalb von Millisekunden frei flottierende Leukozyten binden und so deren Flussgeschwindigkeit von  $>2000 \mu\text{m/s}$  auf  $<50 \mu\text{m/s}$  senken (Gaetgens, 2000). Der wichtigste Selektin-Ligand hierbei ist P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1, vgl. 1.4.10, S.27). PSGL-1 bindet an P-Selektin (Norman et al., 1995), E-Selektin (Xia et al., 2002) sowie L-Selektin (Sperandio et al., 2003) und vermittelt im Zusammenspiel mit weiteren Zelladhäsionsmolekülen nicht nur das lockere Anheften („Tethering“) und Rollen am Endothel (vgl. 1.3.2, S.14), sondern initiiert zum Teil auch die Aktivierung der für die weiteren Schritte wichtigen Integrine (Zarbock et al., 2011, Hidalgo et al., 2007).

Integrine sind aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten aufgebaute, heterodimere Glykoproteine. Bisher konnten 24 verschiedene Integrine, die aus 18  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -Ketten kombiniert sind, nachgewiesen werden. Sie sitzen als Transmembranproteine in allen tierischen Zelloberflächen - mit Ausnahme der Erythrozyten- und vermitteln Zell-Zell-Adhäsionen sowie Zell-Matrix-

Adhäsionen. Hierbei kann die Signalübertragung von intra- nach extrazellulär genauso wie in umgekehrter Richtung verlaufen (Grommes and Soehnlein, 2011, Kinashi, 2005). Eine wichtige Gruppe in der PMN-Migration sind die  $\beta$ 2-Integrine (Langereis, 2013). Sie haben die  $\beta$ -Kette CD18 gemeinsam und unterscheiden sich in der  $\alpha$ -Kette, die entweder CD11a, CD11b, CD11c oder CD11d darstellt. In der pulmonalen Inflammation von besonderer Bedeutung sind CD11a/CD18 bzw. Lymphocyte Function-associated Antigen-1 (LFA-1, vgl. 1.4.2, S.18) und CD11b/CD18 bzw. Macrophage-1 Antigen (Mac-1, vgl. 1.4.3, S.19) (Chesnutt et al., 2006, Asaduzzaman et al., 2008).

Integrine liegen bei zirkulierenden Leukozyten in inaktivem Zustand vor und werden via „Inside-out Signaling“ über inflammatorische Umgebungsreize in ihrer Konformation beeinflusst. Das heißt, infolge der Bindung von Chemokinen an membranständige, meist G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf den Leukozyten, läuft eine intrazelluläre Signalkaskade ab, die zur Änderung von Affinitätszustand und Wertigkeit der Integrinmoleküle führt (Ley et al., 2007). Aktivierte Integrine können mit der Extrazellulärmatrix (EZM) und zellulären Adhäsionsmolekülen wie dem Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1, vgl.1.4.5, S.21) interagieren und spielen so eine wichtige Rolle bei mehreren Teilschritten der Leukozytenmigration (Grommes and Soehnlein, 2011). Je nach inflammatorischem Stimulus unterscheidet sich die Bedeutung der Integrine für die Extravasation. Gramnegative Stimuli wie *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und Lipopolysaccharid (LPS) induzieren eine CD18-abhängige Migration, während *Streptokokkus pneumoniae* (Mizgerd et al., 1999) und *Staphylokokkus aureus* (Ramamoorthy et al., 1997) eine CD18-unabhängige PMN-Infiltration zur Folge haben; auch Interleukin-1 ruft eine abhängige Migration hervor, während die Extravasation nach Stimulation mit dem Komplementfaktor C5a unabhängig von CD18 abläuft (Hellewell et al., 1994).

Die Interaktionspartner der Integrine stellen die CAMs der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie dar. Sie befinden sich vor allem auf den Endo- und Epithelzellen und weisen in ihrer Proteinstruktur eine den Antikörpern ähnliche Domäne auf. Die CAMs sind primär mitverantwortlich für die Migrationsschritte der festen Adhäsion und der transendothelialen Diapedese der Leukozyten (DeLisser and Albelda, 1998).

### 1.3.2 Transendotheliale Migration der PMNs in der Lunge

Die Interaktion von Leukozyten mit Endothel im Rahmen der Inflammation ist seit vielen Jahren Gegenstand der Forschung und konnte bereits in verschiedensten Modellen detailliert definiert werden (Zarbock and Ley, 2008). Die ursprüngliche Vorstellung von der endothelialen Leukozytenmigration auf molekularer Ebene umfasste die Schritte des Selektin-vermittelten „Rolling“, der Chemokin-getriggerten „Aktivierung“ und der Integrin-

gesteuerten „Adhäsion“ und „Diapedese“ (Reutershan and Ley, 2004). Mit stetig wachsenden, detaillierteren Erkenntnissen wurde das Modell um zusätzliche Teilschritte ergänzt, welche den Prozess und die jeweils involvierten Moleküle noch genauer beschreiben. Hiernach beginnt die Interaktion mit dem Endothel durch das sogenannte „Tethering“, einer lockeren Anheftung v.a. mittels verschiedener Selektine (vgl. 1.3.1, S.13), dem  $\beta$ 1-Integrin Very Late Antigen-4 (VLA-4) und PSGL-1 (vgl. 1.4.10, S.27). Es folgt das primär Selektin-vermittelte „Rolling“ mit anschließendem „Slow Rolling“, bis es zum „Arrest“ durch Bindung verschiedener Integrine an CAMs des Endothels kommt. Eine Verstärkung der Anheftung mittels weiterer Adhäsionsmoleküle als nächster Teilschritt und ein intraluminales „Crawling“ gehen schließlich der endgültigen Transmigration durch das Endothel voraus (Ley et al., 2007). Letztere kann sowohl para- als auch im selteneren Fall transzellulär erfolgen; die anschließende Permeabilitätserhöhung der Gefäßwand unterscheidet sich hierbei nicht (Phillipson et al., 2008). Um weiter bis in den Alveolarraum zu gelangen, interagieren die PMNs mit den Strukturen des Lungeninterstitiums u.a. über das Adhäsionsmolekül CD29 (vgl. 1.4.4, S.20) (Ridger et al., 2001) und überqueren im letzten Migrationsschritt die epitheliale Barriere (vgl. Abbildung 1, S.17). Aufgrund der besonderen Architektur der pulmonalen Strombahn unterscheiden sich die Mechanismen hier deutlich von denen der systemischen Zirkulation.

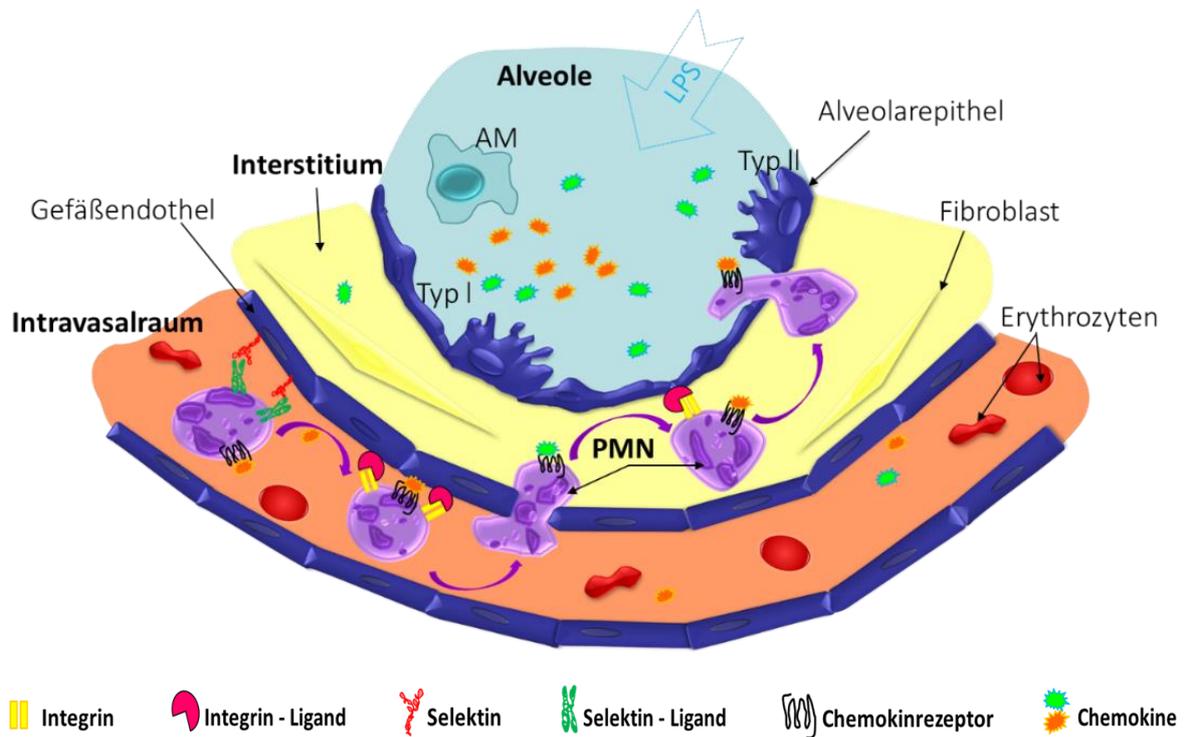
### 1.3.3 Transepitheliale Migration der PMNs in der Lunge

Das Lungenepithel wird aus zwei unterschiedlichen Pneumozytenpopulationen gebildet: Typ I Pneumozyten bedecken mit ihren langen Ausläufern den Großteil der Alveolaroberfläche, machen aber nur ca. 20% der Epithelzellen aus. Typ II Pneumozyten sind größer, kuboid geformt und in der Lage, als Vorläuferzellen für die Typ I Pneumozyten zu fungieren, sowie die zur Herabsetzung der Oberflächenspannung notwendigen Surfactant-Proteine zu produzieren (Sharp et al., 2015). Des Weiteren können Pneumozyten Typ II Flüssigkeit aus dem Alveolarraum resorbieren und so zum Abbau eines Lungenödems beitragen (Goodman et al., 1983, Matthay et al., 2002).

Die transepitheliale Diapedese ist der letzte Migrationsschritt der PMNs auf dem Weg in die Alveole und unterscheidet sich von der transendothelialen Durchwanderung in vielen Aspekten. Die Anheftung der PMNs findet am Epithel nicht wie im Intravasalraum am apikalen, sondern am basolateralen Pol der Parenchymzellen statt. Diese Zellfläche unterscheidet sich in Membranstruktur, Adhäsionsmolekülexpression und Art der Zell-Zell-Kontakte von der apikalen Seite. Zudem sind die PMNs zum Zeitpunkt der Migration eine längere Zeit Chemokin-exponiert als am Endothel und haben bereits eine Diapedese vollzogen (Zemans et al., 2009). Dies bedeutet, dass die Neutrophilen gewissermaßen

„geprimed“ an der Epithelbarriere ankommen und bereits durch den Einfluss der Chemokine und durchwanderten Kompartimente Struktur und Aktivierungsgrad verändert haben. Auch die Umgebungsbedingungen vor der Transmigration am Epithel sind durch die umgebende EZM und die fehlenden Scherkräfte des Gefäßbetts grundlegend andere als beim ersten Migrationsschritt (Zemans et al., 2009). Im Gegensatz zu der mit 2-4µm kurzen Strecke, die am Endothel überwunden werden muss, beträgt der Weg für die PMNs durch einen Epithelzellverband mit >20µm ein Vielfaches (Parkos, 1997), was einen Grund dafür darstellen könnte, dass am Epithel im Gegensatz zum Endothel bisher nur der parazelluläre Weg nachgewiesen werden konnte (Mul et al., 2000, Parkos et al., 1994).

Auf molekularer Ebene kann auch die transepitheliale Migration in mehrere -wenn auch bisher weniger differenzierte- Schritte unterteilt werden: Die basolaterale Adhäsion, die Migration und das postmigratorische Geschehen (Zen and Parkos, 2003). Beim Bronchial- und Alveolarepithel sind die  $\beta$ 2-Integrine (vgl.1.3.1, S.13) wesentlich an der basolateralen Adhäsion beteiligt, indem sie an epitheliales ICAM-1 binden (Tosi et al., 1992, Kidney and Proud, 2000). Ebenso können beide Moleküle eine Anheftung der PMNs an der apikalen Fläche der Pneumozyten nach vollzogener Migration vermitteln; genauere Daten hierzu existieren jedoch lediglich aus Assays mit intestinalen Epithelien (Chin and Parkos, 2006, Zen and Parkos, 2003). Zudem scheint es auch Integrin-unabhängige Wege für die PMNs durch das Epithel zu geben, ebenso wie eine variable Bedeutung der Integrine je nach inflammatorischem Stimulus (Doerschuk et al., 1990, Mizgerd et al., 1999). Die Diapedese erfolgt wahrscheinlich über sogenannte „Transmigration-Tunnels“ im Zwischenraum der Epithelzellen (Zemans et al., 2009), gebildet durch ein Zusammenspiel aus Integrin Associated Protein (IAP bzw. CD47, vgl.1.4.8, S.25) auf den Epithelzellen und Signal Regulatory Protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ , vgl.1.4.8, S.25) auf den PMNs (Liu et al., 2001, Liu et al., 2004). Außerdem beteiligt sind das ubiquitär exprimierte „Homing Cell Adhesion Molecule“ (HCAM bzw. CD44, vgl. 1.4.7, S.24) (Brazil et al., 2010) und sogenannte „Junctional Adhesion Molecules“ (JAMs), wichtige Regulator-Proteine auf Höhe der Tight Junctions, den Engstellen der Epithelzellkontakte (Zen et al., 2004, Liu et al., 2000). Insgesamt sind jedoch, im Gegensatz zur Interaktion von Neutrophilen Granulozyten mit dem Gefäßendothel, die genauen Mechanismen und Adhäsionsmoleküle bei Überschreitung der epithelialen Barriere weniger erforscht und verstanden (Brazil and Parkos, 2016). Während die meisten Erkenntnisse aus in vitro Beobachtungen singularer Epithelzellverbände oder der Untersuchung der intestinalen Inflammation stammen, existieren bezüglich der epithelialen Barriere in der Lunge mehr Vermutungen als Daten.



**Abbildung 1: Migration Neutrophiler Granulozyten durch die Kompartimente der Lunge nach Inhalation von Lipopolysaccharid (LPS), einem potenten Stimulus für die Rekrutierung von PMNs in den Alveolarraum (Basit et al., 2006). Die Neutrophilen werden von Chemokinen aktiviert und zum Ort der Inflammation geleitet (Bhatia et al., 2012). Sie interagieren durch verschiedene Selektine und deren Liganden beim „Tethering“ und „Rolling“ mit dem Endothel, verlangsamen dann ihre Bewegung bis zum Arrest und der Transmigration mittels Integrinen. Nach Durchwanderung des Interstitiums überqueren sie die epitheliale Barriere aus Pneumozyten (Typ I und Typ II) und gelangen in die Alveole (Reutershan and Ley, 2004). Am Endothel gibt es neben dem hier dargestellten parazellulären auch einen transzellulären Weg der PMNs (Phillipson et al., 2008). AM=Alveolarmakrophage, PMN=Neutrophiler Granulozyt, LPS=Lipopolysaccharid (Eigene Darstellung)**

## 1.4 Adhäsionsmoleküle in der pulmonalen Inflammation

### 1.4.1 CD-Nomenklatur

Alle Leukozyten tragen eine Vielzahl an unterschiedlichen Strukturen aus Glykanen und Lektinen auf ihrer Oberfläche, die Aussagen über Zelltyp, Zellfunktion oder Aktivierungszustand zulassen (Koubek, 2008, Gabius et al., 2015). Diese Moleküle können anhand ihrer Bindungseigenschaften durch monoklonale Antikörper (AK) differenziert werden (Schütt and Bröker, 2011). Um eine Systematik in die im Laufe der Zeit entstehende Datenfülle zu bringen, wurde 1982 die CD-Nomenklatur eingeführt, wobei CD für „Cluster of Differentiation“ steht (Zola et al., 2005). Die Nummerierung entspricht dabei einer chronologischen Folge; in regelmäßigen Abständen werden bei so genannten Human Leucocyte Differentiation Antigen Workshops neue Antigene „geclustert“. Derzeit reicht die Nomenklatur bis einschließlich CD363 (Matesanz-Isabel et al., 2011). Aus Gründen der Übersicht erfolgt in dieser Arbeit mit Ausnahme der Einleitung vorzugsweise die Benennung anhand der CD-Nummerierungen.

### 1.4.2 CD11a (Integrin $\alpha$ L)

CD11a wird auch Integrin  $\alpha$  L genannt und bildet in Form eines Heterodimers mit der  $\beta$ -Kette CD18 das LFA-1, eines von insgesamt vier verschiedenen  $\beta$ 2-Integrinen (vgl. 1.3.1, S.13). LFA-1 wird auf allen Leukozyten exprimiert und bindet nach Stimulation mit Chemokinen wie Interleukin-8 (IL-8) an ICAM-1 auf Endothel- und anderen Zellen (Basit et al., 2006, Lo et al., 1989). Über das Inside-out Signaling geht die extrazelluläre Domäne in einen intermediären und anschließend in einen hoch affinen Zustand über: Ersterer begünstigt das „Slow Rolling“ am Endothel, während das Integrin in hoch affinem Zustand den Arrest der PMNs am Endothel vermittelt (Lefort and Ley, 2012). Insgesamt unterliegen aber auch diese PMN-Endothel-Interaktionen einem Zusammenspiel aus mehreren Adhäsionsmolekülen: So induziert das durch die endothelialen Selektine gebundene PSGL-1 auf PMNs über intrazelluläre Signalkaskaden teilweise auch die Konformationsänderung des LFA-1 zum hoch affinen Zustand (Zarbock et al., 2007, Kuwano et al., 2010).

Basit und Reutershan beobachteten in CD11a-Knockout-Mäusen nach LPS-Vernebelung eine im Vergleich zu Wildtyptieren um die Hälfte reduzierte Migration von PMNs in den Alveolarraum, in ähnlichem Ausmaß ging die Anzahl nach Blockierung von CD11a mittels injizierten Antikörpern bei Wildtyptieren zurück (Basit et al., 2006). Beide Beobachtungen der Publikation sprechen für eine kritische Rolle dieses Integrins in der PMN-Migration. Auch beim Sepsis-induzierten Lungenschaden ließ sich durch eine CD11a-

Inhibition die PMN-Anzahl im Lungengewebe reduzieren (Asaduzzaman et al., 2008). Während die Studienlage dem LFA-1 die primäre Rolle bei der endothelialen Migration zuschreibt, ist die Bedeutung des Integrins für die nachfolgenden Migrationsschritte weniger gut verstanden. ICAM-1, der Bindungspartner von LFA-1, wird auch an der basolateralen und apikalen Fläche der Pneumozyten exprimiert, was eine mögliche Involvierung des Integrins bei der transepithelialen Diapedese nahelegt. Zwar zeigten in vitro Studien keinen Effekt einer CD11a-Blockade auf die Adhäsion bei intestinalem Epithel (Parkos et al., 1994) wohl aber eine Reduktion der PMN-Adhäsion an pulmonale Epithelzellen (Tosi et al., 1992), es scheinen also parenchymabhängige Unterschiede zu existieren. Auch eine Reduktion der PMN-Migration durch Monolayer aus pulmonalen Epithelzellen mittels CD11a-Blockade konnte erzielt werden (Kidney and Proud, 2000), was eine Beteiligung dieses Integrins an der transepithelialen Migration in der Lunge auch im lebenden Organismus wahrscheinlich macht.

Therapeutisch findet die Inhibierung des LFA-ICAM-Komplexes bisher Anwendung in der lokalen antiinflammatorischen Behandlung des trockenen Auges mit dem in den USA zugelassenen Medikament Lifitegrast (Holland et al., 2017). In der EU ist seit 2004 zur antiinflammatorischen Behandlung der Psoriasis ein speziell gegen CD11a gerichteter monoklonaler Antikörper namens Efalizumab als ergänzendes Therapeutikum zugelassen. Dieses hat jedoch vor allem die Begrenzung der T-Zell-Migration in der Haut zum Ziel (Nicolls and Gill, 2006). Mittels differenzierterer Informationen über die Funktion von LFA-1 in der pulmonalen Inflammation wäre eine Evaluation als Target auch in der pulmonalen PMN-Migration greifbar.

#### 1.4.3 CD11b (Integrin $\alpha$ M)

CD11b und CD18 bilden zusammen das  $\beta$ 2-Integrin Mac-1 (vgl. 1.3.1, S.13). Es findet sich auf allen Zellen der angeborenen Immunabwehr und ist involviert in vielfältige Mechanismen der körpereigenen Abwehr, wie Migration, Zellaktivierung und Phagozytose (Zhou et al., 2013). Mac-1 bindet an ICAM-1 auf der luminalen Endothelzellmembran und ist für die feste Adhäsion, den Arrest und die Diapedese (vgl.1.3.2, S.14) bei der Extravasation der Leukozyten das entscheidende Adhäsionsmolekül (Phillipson et al., 2006, Henderson et al., 2001). Sobald eine Inflammation im Gewebe vorliegt, gewinnt Mac-1 für die Zelladhäsion an Gewicht: unstimulierte PMNs werden in vitro durch Mac-1-inhibierende Antikörper in ihrer Anheftung ans Endothel nicht beeinflusst, während LFA-1-inhibierende Antikörper dort eine reduzierte Adhäsion von PMNs bewirken. Blockiert man Mac-1 jedoch auf stimulierten PMNs, wird die Anheftung ans Endothel reduziert (Smith et al., 1989). Ein weiterer Hinweis für die essentielle Rolle bei der inflammatorischen PMN-Migration lieferte die erhebliche

Reduktion der PMN-Zahlen in der BAL durch Einsatz von inhibierenden CD11b-Antikörpern im Tierversuch (Moreland et al., 2002). Bei Patienten mit ARDS wurde CD11b auf PMNs in der pulmonalarteriellen Strombahn höher exprimiert, als bei Lungengesunden (Simms, 1990), was ebenfalls die Bedeutung des Adhäsionsmoleküls für das Entzündungsgeschehen unterstreicht.

Mac-1 bindet neben den Endothelzellen auch an die pulmonalen Epithelzellen und trägt dort zur Diapedese der Leukozyten bei (McDonald et al., 1993), wobei neben ICAM-1 noch weitere, teils auch bisher unbekannte Liganden existieren. Ein weiterer Bindungspartner ist beispielsweise JAM-C (vgl. 1.3.3, S.15), ein Adhäsionsmolekül, das eine zusätzliche Interaktion von Mac-1 mit bestimmten Zwischenzellkontakten, den Desmosomen, nahelegt (Zen et al., 2004).

Die Migration der PMNs ist also maßgeblich von der Funktion von CD11b und dessen vielfältigen Interaktionen mitbestimmt. Im Tierversuchsmodell zeigte sich jedoch durch Blockierung der CD11b/CD18-abhängigen Migration bei gramnegativer Pneumonie eine Erhöhung der Mortalität (Zeni et al., 1999). Möglicherweise ist Mac-1 zu essentiell für die PMN-Migration, um als Target für eine inhibierende Therapie zu dienen; bisher befinden sich keine Mac-1 inhibierenden Antikörper in der präklinischen oder klinischen Erforschung. Eine genaue Kenntnis über die Expression von CD11b in den einzelnen Lungenkompartimenten existiert jedoch auch hier nicht und kann wichtige Aspekte im ganzheitlichen Verständnis der Funktion dieses Adhäsionsmoleküls liefern.

#### 1.4.4 CD29 (Integrin- $\beta$ -1)

Ebenfalls zur Familie der Integrine (vgl. 1.3.1, S.13) gehört die  $\beta$ 1-Kette CD29. Sie wird neben den Leukozyten auch von Endo- und Epithelzellen exprimiert und bildet mit insgesamt 9 unterschiedlichen  $\alpha$ -Ketten die sogenannten Very Late activated Antigens (VLAs). CD29 ist im Gegensatz zu den  $\beta$ 2-Integrinen vor allem im Kontext der Zell-Matrix-Interaktionen bekannt, also der Bindung von Zellen an Bindegewebsbestandteile der jeweiligen Organe. So nutzen Pneumozyten zum Beispiel das  $\beta$ 1-Integrin zum Kontakt mit Fibronectin, einem Matrixprotein, um sich im Rahmen der Proliferation während der Entzündungsresolution nach durchgemachtem ARDS im Lungenparenchym zu bewegen (Girault et al., 2015).

Durch die bei der endothelialen Migration aktiven  $\beta$ 2-Integrine wird die Expression der  $\beta$ 1-Integrine auch auf PMNs induziert (Werr et al., 2000). Neutrophile Granulozyten interagieren dann über CD29 mit Fibroblasten und Matrixproteinen (Gao and Issekutz, 1997). In der pulmonalen Inflammation migrieren Neutrophile mittels CD29 durch das Lungeninterstitium und von dort über die epitheliale Barriere in die Alveole (Ridger et al., 2001). Das Mausmodell von Ridger et al. nutzte LPS als Stimulus für einen  $\beta$ 2-Integrin abhängigen Weg

und Keratinocyte Chemoattractant (KC, Äquivalent zum humanen IL-8) als Induktor für einen  $\beta$ 2-Integrin unabhängigen Pfad (vgl. 1.3.1, S.13). Bei beiden Optionen zeigte sich durch CD29-Inhibition eine signifikante Reduktion der PMN-Zahlen in der BAL. Elektronenmikroskopisch konnte zudem beobachtet werden, dass die Migration der Neutrophilen aus der Kapillare ins Interstitium weitgehend unbeeinflusst blieb, während sich in der Alveole signifikant weniger Neutrophile befanden. Dies impliziert die vorrangige Involvierung von CD29 bei der Überquerung der epithelialen Barriere nach Durchwanderung des Interstitiums.

Da beim ARDS der Epithelschaden pathophysiologisch eine wichtige Rolle spielt (Gropper and Wiener-Kronish, 2008), stellt die Inhibition des  $\beta$ 1-Integrins eine plausible ergänzende Behandlungsoption dar. Diese Option könnte jedoch auch ein zweischneidiges Schwert sein, da die Entzündungsresolution und Regeneration des Epithels ebenfalls CD29-abhängig zu verlaufen scheinen, wie von Girault et al. postuliert (s.o.). Die genauere Definition der Funktionen dieses Adhäsionsmoleküls in der Inflammation bleibt also weiterhin von großem Interesse. Die Inhibition der  $\beta$ 1-Integrine spielt bisher vor allem in der präklinischen Erforschung von Therapien verschiedener Tumoren eine Rolle, da diese Adhäsionsmoleküle auch in der Zellmigration und -adhäsion von entarteten Zellen, ebenso wie in Angiogenese- und Wachstumsfaktor-Signalwege involviert sind (Senger et al., 2002, Chung et al., 2017).

#### 1.4.5 CD54 (ICAM-1)

Das Intercellular Adhesion Molecule-1 bzw. CD54 ist ein Adhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie (vgl. 1.3.1, S.13) und wird auf Epithel-, Endothel- sowie Immunzellen exprimiert. Auf Endothelzellen dient es den  $\beta$ 2-Integrinen LFA-1 und Mac-1 der neutrophilen Granulozyten als Rezeptor bei der Adhäsion und Diapedese im Rahmen der transendothelialen Migration (Ding et al., 1999, Smith et al., 1989). ICAM-1 vermittelt hierbei hauptsächlich die parazelluläre Bewegung der PMNs, wirkt aber ebenfalls beim weitaus seltener genutzten transzellulären Weg mit (Yang et al., 2005). Epithelzellen tragen ebenfalls CD54 auf ihrer Oberfläche; auf Alveolarepithelzellen wird es sogar 22-fach stärker exprimiert, als auf pulmonalem Endothel. Durch inflammatorische Stimuli wird die Expression hochreguliert (Burns et al., 1994). ICAM-1 wird auf den Epithelzellen vor allem apikal exprimiert und dient dort bereits migrierten Neutrophilen vermutlich zur Adhäsion (Parkos et al., 1996a). Auch PMNs selbst exprimieren ICAM-1 auf ihrer Oberfläche (Fortunati et al., 2009) und zeigten bei Stimulation eine Hochregulation der Genexpression sowie eine erhöhte Aggregation untereinander (Wang et al., 1997).

Wie bei den Integrinen konnte auch bei ICAM-1 eine Stimulusabhängigkeit festgestellt werden: gramnegative E-coli Bakterien rufen eine Hochregulation der Adhäsionsmolekül-

expression in der Lunge hervor, während grampositive Streptokokken keinen Effekt hierauf haben (Burns et al., 1994, Bullard et al., 1995). Neben der gesteigerten Expression durch inflammatorische Stimulation, deutet auch die Reduktion der PMN-Zahlen in der BAL durch Einsatz von inhibierenden Antikörpern auf die kritische Rolle von CD54 bei der pulmonalen Migration hin (Doerschuk et al., 1996, Kumasaka et al., 1996, Basit et al., 2006, Moreland et al., 2002). Die genaue Bedeutung des Adhäsionsmoleküls bleibt allerdings weiterhin viel diskutiert; vor allem bezüglich des Einflusses genetischer Modifikation von ICAM-1 in Mäusen existieren kontroverse Daten. Während Mäuse mit veränderten ICAM-1 Regionen durch einzelne Deletionen in der codierenden Sequenz des DNA-Strangs und einem dadurch defekten Adhäsionsmolekül keine geringere PMN-Infiltration der Lunge zeigten als Wildtypmäuse (Kumasaka et al., 1996, Qin et al., 1996, Doerschuk et al., 1996), beobachteten Basit et al. bei Mäusen mit komplettem Knockout der ICAM-1-Sequenz im codierenden DNA-Strang eine reduzierte Zahl von Neutrophilen in der BAL (Basit et al., 2006). Die Daten mit genveränderten Tieren von Doerschuk und Kumasaka (s.o.) lassen die Annahme zu, dass die Neutrophilen in der Lage sind, mutierte ICAM-1-Varianten zu nutzen oder alternative Migrationswege einzuschlagen. Ein kompletter Knockout des Adhäsionsmoleküls ebenso wie eine Blockierung durch Antikörper kann jedoch nicht gänzlich kompensiert werden, wie in der Publikation von Basit gezeigt (s.o.).

Therapeutisch kommt die Inhibition von CD54 aufgrund seiner komplexen Involvierung ins inflammatorische Geschehen in Frage, stellt aber aus gleichem Grund auch eine große Herausforderung dar. Im murinen Versuchsmodell eines Sepsis-induzierten Acute Lung Injury (ALI, heute als mildes ARDS betitelt) konnte von Zhao et al. durch inhibierende Antikörper neben der reduzierten PMN-Migration auch ein verbessertes Outcome gezeigt werden (Zhao et al., 2014). Zur Begrenzung der pulmonalen Inflammation mittels ICAM-1-Inhibition existieren für den klinischen Gebrauch bisher noch keine medikamentösen Optionen. Die Ergebnisse aus den in vivo Modellen legen einen therapeutischen Nutzen jedoch nahe, welcher mittels genauerer Darstellung der CD54-Funktion in der Lunge spezifiziert werden könnte.

In der Behandlung der intestinalen Inflammation war ein CD54-Inhibitor vor wenigen Jahren im klinischen Einsatz, konnte sich aber nicht gegenüber dem Placebo durchsetzen (Ghosh and Panaccione, 2010). Aktuell sind ICAM-1 inhibierende Medikamente vor allem in der Erforschung neuer Chemotherapeutika von Tumoren zu finden (Fujiwara et al., 2011), sowie im therapeutischen Einsatz bei lokaler Inflammation im Auge (Holland et al., 2017).

#### 1.4.6 CD31 (PECAM-1)

Das Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1 bzw. CD31) ist ein weiteres Adhäsionsmolekül der Ig-Superfamilie (Newman et al., 1990) und wird neben Endothelzellen und Thrombozyten auch auf Granulozyten, Monozyten und einigen Subpopulationen von Lymphozyten exprimiert (Stockinger et al., 1990). Es vermittelt bei der Leukozytenbewegung Adhäsionsvorgänge distal der Integrin-vermittelten Migrationsschritte und ist von großer Wichtigkeit für die transendotheliale Passage von PMNs und Monozyten (Muller et al., 1993). Dies wird auch an dem Verteilungsmuster des Moleküls auf der Endothelzelloberfläche deutlich: mehr als 85% des PECAM-1 konzentrieren sich im Bereich der Interzellularspalten (Muller et al., 1989). Bindet das Adhäsionsmolekül je nach involvierter extrazellulärer Domäne vor allem homophil (Albelda et al., 1991, Sun et al., 1996), also PECAM-1 an PECAM-1. Teils kann es aber auch heterophil binden, zum Beispiel an CD177, ein PMN-spezifisches Antigen, das mit einer besonders schnellen Migration der Neutrophilen in Verbindung gebracht wird (Sachs et al., 2007). Eine Stimulusabhängigkeit wurde ähnlich den Integrinen und ICAM-1 auch für PECAM-1 beschrieben: während PMNs durch Interleukin-1 $\beta$  CD31-abhängig migrieren, ist die durch Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) hervorgerufenen Extravasation unabhängig von PECAM-1 (Thompson et al., 2001).

Vaporciyan et al. zeigten bereits 1993, dass eine CD31-Blockade mittels Antikörpern eine Akkumulation von PMNs in der Alveole verhinderte (Vaporciyan et al., 1993). Während das „Rolling“ und die Adhäsion durch Inhibition nicht beeinflusst waren, zeigte sich eine Einschränkung der interzellulären Diapedese (Thompson et al., 2000). In den nachfolgenden Jahren wurde die Rolle von PECAM-1 als proinflammatorischem Oberflächenantigen weiter definiert: neben der Zelladhäsion wird den homophilen CD31-Interaktionen auch eine Bedeutung in der Aktivierung von Integrinen zuteil (Berman and Muller, 1995, Berman et al., 1996).

Als an der Leukozytenmigration beteiligtes Adhäsionsmolekül hat CD31 eine proinflammatorische Funktion inne. Zunehmend werden jedoch auch antiinflammatorische Eigenschaften des Antigens bekannt. PECAM-1 defiziente Mäuse zeigten nach systemischer Applikation von LPS einen aggravierten Krankheitsverlauf der Sepsis, was im Umkehrschluss für einen ursprünglich antiinflammatorischen bzw. protektiven Effekt des Moleküls spricht (Maas et al., 2005, Carrithers et al., 2005). Dieser protektive Effekt scheint auf einer Modulation der Leukozyten-Aktivierungsschwelle, einer stabileren vaskulären Barriere sowie der Eindämmung proinflammatorischer Zytokine zu basieren (Privratsky et al., 2010) und ist Gegenstand der Forschung in verschiedensten Inflammationsmodellen.

Durch seine vielfältigen Effekte und Funktionen bietet PECAM-1 ein attraktives Ziel zur Modulation inflammatorischer Geschehen. Gleichzeitig ist die Diversität der Einflüsse dieses Moleküls eine komplexe Aufgabe bei der Entwicklung von Medikamenten, sodass sich bisher

keine PECAM-1-inhibierenden Therapieoptionen in der klinischen Erforschung oder Anwendung befinden.

#### 1.4.7 CD44 (HCAM)

Das Homing Cell Adhesion Molecule CD44 ist ein sogenanntes „Klasse-I-Transmembran-Glykoprotein“ und wird auf sehr vielen Zelltypen und in verschiedenen Unterformen exprimiert. Es findet sich neben den Leukozyten auch auf Endothelzellen und hämatopoetischen Stammzellen und ist an der Zelladhäsion, -migration, -differenzierung, sowie dem Zellwachstum beteiligt (Zarbock et al., 2011). Während einige Unterformen von CD44 mit E- und L-Selektin als Liganden (Katayama et al., 2005, Dimitroff et al., 2000) beim Initiieren der Zellmigration eine Rolle spielen, reagiert das Adhäsionsmolekül auch mit Komponenten der EZM. Wichtige Bindungspartner im Bindegewebe sind zum Beispiel das Glykoprotein Fibronectin (Jalkanen and Jalkanen, 1992) und das Glykosaminoglykan Hyaluronan (HA) (Alejandro Aruffo et al., 1990, Lesley et al., 2000).

Die Polarisation und gerichtete Migration von neutrophilen Granulozyten sind in vivo und vitro proportional abhängig von der Menge an exprimiertem HCAM auf ihrer Oberfläche (Alstergren et al., 2004). Gleichzeitig scheint CD44 eine komplexe Rolle in der PMN-Migration einzunehmen; es sind ähnlich dem PECAM-1 sowohl pro-, als auch anti-inflammatorische Effekte bekannt. Bei Knockout-Mäusen mit *Escherichia coli*-Pneumonie zeigte sich ein aggravierter Krankheitsverlauf im Vergleich zu Wildtypmäusen (Wang et al., 2002) und die LPS-induzierte akute pulmonale Inflammation verlief bei CD44-Knockout-Mäusen mit erhöhten Zellzahlen und Chemokinspiegeln in der BAL (Liang et al., 2007). Auch bei der *Klebsiella* induzierten Pneumonie und dem Bleomycin induzierten Lungenschaden erlitten Knockout-Mäuse einen vermehrten Lungenschaden sowie eine verminderte Entzündungsresolution (van der Windt et al., 2010, Teder et al., 2002). Im Rahmen des hyperoxischen Lungenschadens resultierte die genetische CD44-Defizienz in gesteigerter Rekrutierung von PMNs in die Alveole und insgesamt in einer erhöhten Mortalität verglichen mit Wildtyp-Tieren (van der Windt et al., 2011). Sämtliche Erkenntnisse implizieren einen protektiven Effekt von HCAM in der akuten Inflammation bzw. eine tragende Rolle für die Entzündungsresolution.

Widersprüchlich hierzu konnten durch die Gabe von inhibierenden Antikörpern protektive Effekte im Sepsis-induzierten ALI beobachtet werden (Hasan et al., 2011) und auch im murinen Modell eines Streptokokken-Enterotoxin-B induzierten ALI zeigte sowohl das Knockout von CD44 auf genetischer Ebene als auch die Applikation von inhibierenden CD44-Antikörpern eine Reduktion der pulmonalen Inflammation (Sun et al., 2012); beide Studien beschreiben also eine eher proinflammatorische Funktion des Adhäsionsmoleküls.

Die Schwere der Entzündungsreaktion sowie der Zeitpunkt der Untersuchung könnten mögliche Faktoren für Ursachen der kontroversen Ergebnisse darstellen (Hollingsworth et al., 2007). Auffällig ist, dass die meisten Modelle mit genetischem Knockout eher eine protektive Funktion von CD44 implizieren, während der Einsatz von inhibierenden Antikörpern mit der Folge einer Reduktion der Inflammation auf eine gegenteilige Funktion schließen lässt. Die gezielte Inhibition bleibt somit als therapeutische Option bei Inflammation von Interesse.

In der Diabetesforschung (Kodama et al., 2015), der Therapie solider Tumoren (Menke-van der Houven van Oordt et al., 2016) sowie der Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie (Vey et al., 2016, Gadhoom et al., 2016) befinden sich inhibierende CD44-Antikörper bereits in klinischer Erforschung und zeigen teils vielversprechende Resultate. Eine antiinflammatorische HCAM-modulierende Therapie im Lungenversagen konnte sich bisher nicht etablieren und bedarf bei diesbezüglich positiven in vitro Daten der weiteren Untersuchung der Rolle von CD44.

#### 1.4.8 CD47 (IAP)

Das Integrin-associated Protein (IAP) ist wie ICAM-1 und PECAM-1 ein Transmembranprotein der Ig-Superfamilie (vgl.1.3.1, S.13). Es wird nahezu ubiquitär auf allen Zellen exprimiert -Erythrozyten und Thrombozyten eingeschlossen-, sowie in hoher Anzahl auch auf Tumorzellen (Barclay and Van den Berg, 2014, Reinhold et al., 1995). Es agiert, wie der Name impliziert, mit Integrinen derselben Zellmembran in Form von Komplexen, hat aber auch eigene Liganden. Zur Interaktion mit der EZM kommt es beispielsweise über das Matrixprotein Thrombospondin (Csanyi et al., 2012). Der interzellulären Interaktion dient als wahrscheinlich wichtigster Ligand des IAP das intrazellulär inhibitorisch wirkende Signal Regulatory Protein  $\alpha$  (SIRP $\alpha$ ) auf Granulozyten und Makrophagen, über das Migration und Phagozytose beeinflusst werden (Liu et al., 2004). Bei Bindung des IAP seitens der PMNs an SIRP $\alpha$  auf der Makrophagenoberfläche, wird der neutrophile Granulozyt nicht phagozytiert. Eine hohe Expression von CD47 geht mit einer verminderten Phagozytoserate einher (Barrera et al., 2017). Dieser Mechanismus des sogenannten „do not eat“-Signals greift nicht nur bei PMNs, Erythrozyten und Thrombozyten, sondern wird auch von verschiedensten Tumorzellen genutzt, um dem Immunsystem zu „entfliehen“ (Huang et al., 2017).

Ferner spielt das IAP eine wichtige Rolle bezüglich der PMN-Migration durch Endo- und Epithelzellverbände auf allen daran beteiligten Zellen (Cooper et al., 1995, Parkos et al., 1996b). In vivo profitierten CD47-Knockout Mäuse mit gramnegativer pulmonaler Inflammation von der Antigen-Defizienz. Sie zeigten gegenüber Wildtyp-Tieren ein

verbessertes Überleben mit Reduktion der PMN-Infiltration der Lunge, weniger Ödembildung und besserer Lungenfunktion (Su et al., 2008). In vitro konnte eine Verzögerung der Migration durch CD47-Inhibition beobachtet werden (Liu et al., 2001); zudem deutet eine Akkumulation von PMNs im Epithelzelllayer infolge der Inhibition von CD47 mittels Antikörpern auf eine primär postadhäsive Rolle des Adhäsionsmoleküls hin (Parkos et al., 1996b). Wie von Lindberg in einem murinen *Escherichia coli*-Peritonitis-Modell demonstriert, kann die eingeschränkte PMN-Migration durch genetisches CD47-Knockout aber auch eine Verschlechterung des Outcomes zufolge haben. Die homozygoten Tiere überlebten gegenüber den heterozygoten Tieren und Wildtypen die Entzündung nicht (Lindberg et al., 1996). Neuere Daten sprechen wiederum gänzlich gegen eine tragende Rolle des Adhäsionsmoleküls in der murinen Peritonitis, entstammen allerdings einem Modell mit Zymosan induzierter steriler Peritonitis (Bian et al., 2013). Angesichts der Stimulusabhängigkeit der Integrinaktivierung (vgl. 1.3.1, S.13) ist eine Stimulusabhängigkeit beim Integrin-assoziierten Protein ebenfalls denkbar und möglicherweise für diskrepante Ergebnisse mitverantwortlich.

Aufgrund der breit gefächerten Expression und Involvierung des CD47-Antigens stellt dieses in der Erforschung von antiinflammatorischen Therapieoptionen eine Herausforderung dar, eine weitere Differenzierung der Eigenschaften ist hier angezeigt. Derzeit steht in erster Linie vor allem die CD47-Inhibition zur Behandlung von Tumorleiden im Fokus der Wissenschaft. Als Target in der Therapie des Kleinzelligen Lungenkarzinoms (Weiskopf et al., 2016), sowie in der Therapie des Melanoms ergänzend zum Einsatz von bereits etablierten Biologicals (Liu et al., 2017), bietet das IAP einen vielversprechenden Ansatzpunkt. Die Anwendung von sogenannten „Checkpoint-Inhibitoren“, die den CD47-SIRP $\alpha$ -Komplex angreifen, zeigt präklinisch bei verschiedensten onkologischen Krankheitsbildern von Leukämien bis zu soliden Tumorarten bereits eine Reduktion von Tumormasse, Zellzahl oder Metastasierung; mit den ersten klinischen Daten zum Einsatz der Inhibitoren wird in naher Zukunft gerechnet (Matlung et al., 2017).

#### 1.4.9 CD172a (SIRP $\alpha$ )

Das Transmembran-Glykoprotein SIRP $\alpha$  gehört ebenfalls zur Gruppe der Ig-Superfamilie. Es findet sich auf Granulozyten, Makrophagen, einigen dendritischen Zellen und Knochenmarks-Progenitorzellen sowie in variabler Ausprägung auch auf Neuronen des zentralen Nervensystems (Adams et al., 1998, Barclay and Van den Berg, 2014). Als Komplex mit dem IAP wirkt SIRP $\alpha$ , wie in 1.4.8 beschrieben, antiapoptotisch: binden Erythrozyten, Thrombozyten und auch Leukozyten mittels ihres CD47-Antigens an CD172a auf Milz- Makrophagen, wird eine Phagozytose verhindert (Murata et al., 2014).

In der autoimmunen Inflammation scheint die Funktion je nach involviertem Zelltyp sowohl pro- als auch antiinflammatorische Komponenten zu beinhalten (Matozaki et al., 2009), die Rolle von SIRP $\alpha$  in der akuten Inflammation und vor allem in der akuten pulmonalen Inflammation ist bisher jedoch kaum genauer definiert. Als direkter Bindungspartner von CD47 wirkt CD172a in vitro an der Migration von PMNs durch Epithelzelllayer mit (Liu et al., 2002). Am Endothel wurde bisher nur eine Bedeutung für die Migration von Monozyten nachgewiesen (de Vries et al., 2002). In einem murinen Peritonitis-Modell konnte eine verzögerte PMN- und Makrophagen-Migration bei SIRP $\alpha$ -mutierten Mäusen beobachtet werden (Alvarez-Zarate et al., 2015), ebenso war die Chemokinproduktion von myeloiden Immunzellen in der Darmschleimhaut durch ein mutiertes SIRP $\alpha$ -Protein eingeschränkt (Kanazawa et al., 2010). Janssen et al. zeigten eine Interaktion von Surfactant-Proteinen mit CD172a auf Makrophagen (Janssen et al., 2008), was eine Bedeutung des Antigens auch auf PMNs nach Überwindung der alveolären Barriere denkbar macht. Angesichts der noch großen Lücken im Verständnis der Rolle von CD172a in der Inflammation bzw. Migration und der Tatsache der Co-Expression von CD47 und SIRP $\alpha$  auf neutrophilen Granulozyten, liegen weitere bisher unbekannt Funktionen des Adhäsionsmoleküls in der PMN-Migration nahe (Zen and Parkos, 2003).

Therapeutisch wird derzeit primär die Modulation von CD172a in Form der „Checkpoint-Inhibitoren“ des CD172a-CD47-Komplexes erforscht; Ziel ist hierbei, dessen antiphagozytäre Wirkung aufzuheben und so Tumorzellen der Phagozytose durch körpereigene Immunzellen zugänglich zu machen (vgl. 1.4.8, S.25) (Matlung et al., 2017). Um eine Aussage über Inhalte und Möglichkeiten einer antiinflammatorischen Therapie treffen zu können, bedarf es weiterer Evaluation von Expression und Funktion dieses Adhäsionsmoleküls.

#### 1.4.10 CD162 (PSGL-1)

Der P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 ist ein homodimeres Glykoprotein und wird von allen Leukozyten sowie auf Endothelzellen exprimiert (Moore, 1998, da Costa Martins et al., 2007). Es dient der Anheftung von Leukozyten ans Endothel über Bindung an dessen P-Selektine (Norman et al., 1995) und E-Selektine (Hirata et al., 2000, Xia et al., 2002). Auch die Aggregation von Leukozyten untereinander geschieht über PSGL-1, durch die Bindung an L-Selektin (Guyer et al., 1996, Walcheck et al., 1996). Ebenso haften Thrombozyten über das von ihnen exprimierte P-Selektin an PSGL-1 auf Endothelzellen (da Costa Martins et al., 2007) und an PSGL-1 auf Leukozyten (Zarbock et al., 2009). Neben der Funktion im Rahmen der Zell-Zell-Adhäsion leitet der Selektin-Ligand über seine zytoplasmatische Domäne auch die Aktivierung von LFA-1 ein und ist hierdurch für die feste Adhäsion am

Endothel mitverantwortlich (Miner et al., 2008). Somit spielt CD162 eine kritische Rolle in der Aggregation und Extravasation von Zellen der adaptiven und angeborenen Immunabwehr.

Veranschaulicht wird dies durch verschiedene in vivo Modelle, die anhand inhibierender Antikörper oder genetischem Knockout eine verminderte PMN-, Monozyten und Lymphozyten-Migration in entzündetes Gewebe zeigten (Jing Yang et al., 1999, Hirata et al., 2000, Zhang et al., 2013, Norman et al., 1995, Borges et al., 1997, Leon and Ardavin, 2008). Wie oben erwähnt, bringt das PSGL-1 auch die Rolle der Blutplättchen bei der Inflammation mit ins Spiel: Die Aggregation von thrombozytärem P-Selektin mit Neutrophilen über PSGL-1 verstärkt deren transendotheliale Migration zusätzlich (Lam et al., 2011). Die Thrombozyten sind als erste Blutzellen an der Gefäßwand adhären, vor allem in Nachbarschaft der Interzellularverbindungen lokalisiert und kommen damit als „Guides“ für die PMN-Transmigration in Frage (Zuchtriegel et al., 2016). Die PSGL-1-Bindung an das P-Selektin induziert dann die nötige Integrin-Aktivierung in den Neutrophilen für deren Arrest und Diapedese (Zuchtriegel et al., 2016, Zarbock et al., 2007).

Eine medikamentöse Inhibition von PSGL-1 in der pulmonalen Inflammation kommt angesichts der aussichtsreichen murinen Datenlage zwar in Betracht, die Daten sind bisher jedoch auf einzelne Erreger wie *Streptokokkus pyogenes* (Zhang et al., 2013) beschränkt. Außerdem werden zunehmend auch antibakterielle Eigenschaften des Glykoproteins bekannt: mittels PSGL-1 können *Streptokokkus pneumoniae* Bakterien gebunden, schneller phagozytiert und die systemische Dissemination eingedämmt werden (Ramos-Sevillano et al., 2016). Während die Bedeutung im Inflammationsgeschehen demnach außer Frage steht, sind bezüglich der Differenzierung der Funktionen des Adhäsionsmoleküls noch viele Fragen offen.

## 1.5 Fragestellung

Trotz jahrzehntelanger Forschung und stetiger Verbesserungen in der modernen Intensivmedizin ist die Letalität des akuten Lungenversagens nach wie vor sehr hoch und die Behandlungsmöglichkeiten weitgehend auf supportive Maßnahmen beschränkt. Angesichts des Parenchymschadens durch das unkontrollierte Inflammationsgeschehen mit PMN-Einwanderung und Zytokinausschüttung, wäre eine geeignete antiinflammatorische Ergänzung der bisherigen Therapieoptionen ein vielversprechender Schritt zur Verbesserung der Prognose von ARDS-Patienten. Die Architektur der Lunge mit der Blut-Luft-Schranke und ihren unterschiedlichen Kompartimenten sowie der individuellen Zirkulationsverhältnisse räumt dem Organ eine Sonderstellung im Organismus ein und erschwert die Erforschung der detaillierten Abläufe während der Inflammation. Zudem nehmen die neutrophilen Granulozyten je nach Entzündungsphase unterschiedliche Funktionen ein und können neben

den destruirenden auch regenerationsfördernde Eigenschaften haben. Nicht eine generelle Inhibition der Inflammation, sondern vielmehr eine Modulation von Aktivität und Migration der PMNs rückt deshalb als wünschenswert in den Vordergrund. Hierfür ist die genaue Kenntnis der Migrationsmechanismen und der involvierten Adhäsionsmoleküle auf den neutrophilen Granulozyten von großer Bedeutung. Diese Arbeit zeigt mittels eines murinen Inflammationsmodells erstmals die Adhäsionsmolekülexpression auf PMNs im gesamten Verlauf der Migration und widmet sich folgenden Fragen:

- Welche Auswirkung hat die Inflammation auf die Genexpression der jeweiligen Adhäsionsmoleküle in der murinen Lunge?
- Wie gestaltet sich die Expression der Adhäsionsmoleküle auf den PMNs im Verlauf ihrer Migration durch die verschiedenen Lungenkompartimente: Intravasal, am Endothel adhäriert, interstitiell und in der Alveole?
  - Gibt es Unterschiede im Verlauf der Migration und in welchem Kompartiment zeigen die jeweiligen Adhäsionsmoleküle die höchste Dichte auf der PMN-Oberfläche?
  - Welche Schlüsse lassen sich hinsichtlich der Bedeutung der einzelnen Moleküle für die jeweiligen Migrationsschritte ziehen?
- Wie verhalten sich einzelne Komponenten des Inflammationsmodells in vitro?
  - Wie reagieren humane PMNs in ihrer Adhäsionsmolekülexpression auf Behandlung mit LPS und anderen potenten Stimulanzen?
  - Welche der Adhäsionsmoleküle werden auch von humanen Lungenepithelzellen exprimiert und wie verhält sich deren Expression nach Stimulation?
  - Welchen Einfluss hat die Migration durch einen Epithelzelllayer auf die Adhäsionsmolekülexpression von humanen PMNs?

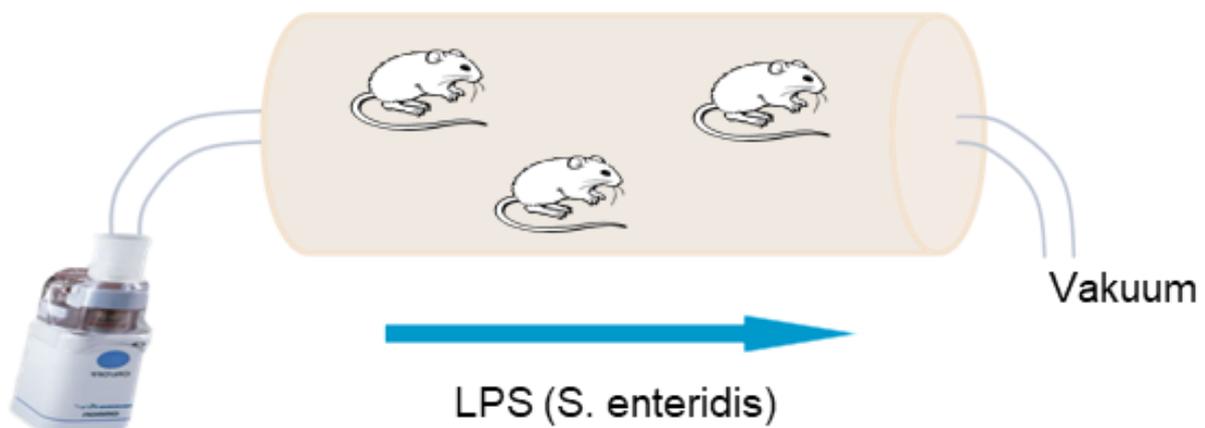
## 2 Material und Methoden

### 2.1 Migration von PMNs in vivo: murines Modell der pulmonalen Inflammation

Die verwendeten Mäuse im Tierversuchsmodell waren männliche Wildtyp-Tiere vom Typ C57Bl/6 (Charles River, Sulzfeld) und zum Zeitpunkt des Versuchs zwischen 8 und 12 Wochen alt. Die Unterbringung erfolgte bei einer Raumtemperatur (RT) von 21°C und einer Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 60% in Käfigen zu je vier Mäusen. Ein 12 stündiger Hell-Dunkel-Rhythmus im Tierstall war gewährleistet. Die Genehmigung für die Versuche wurde durch das Regierungspräsidium Tübingen erteilt (Genehmigungsnummern A5/12 und A6/13).

Zur Induktion der pulmonalen Inflammation inhalierten die Mäuse vernebeltes Lipopolysaccharid. Hierfür wurden je vier Mäuse unter einem Abzug in eine Plastikröhre (Medizintechnische Werkstatt Uniklinikum, Tübingen) gesetzt, welche an jedem Ende eine Anschlussöffnung besaß. Auf einer Seite war eine Wasserstrahlpumpe (159600, BRAND, Wertheim) angebracht, sodass ein kontinuierlicher Sog in der Röhre entstand. Auf der anderen Seite befand sich über einen Gummischlauch (Beatmungsschlauch von Siemens-Elerna, Stockholm, Schweden) verbunden ein Vernebler (MircoAIR, OMRON Healthcare, Kyoto, Japan). Durch diesen wurde ca. 1 h lang aus *Salmonella enteridis* gewonnenes LPS (L6011, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in die Röhre geleitet und von den Tieren inhaliert (vgl. Abbildung 2).

Das LPS wurde mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml in 7 ml Phosphat-gepufferter Elektrolytlösung (PBS<sup>-</sup>; D8537, Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst. Kontrolltiere erhielten diese Trägerlösung ohne das Stimulanz über die gleiche Zeit vernebelt.



**Abbildung 2: Modell der LPS-Inhalation** (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Reutershan). Ein Vernebler (links) ist an eine Plastikröhre angeschlossen, in der sich bis zu vier Versuchstiere befinden. Am anderen Ende wird mittels Wasserstrahlpumpe (nicht dargestellt) ein Vakuum erzeugt, sodass der LPS-Dampf kontinuierlich durch die Röhre strömt und von den Mäusen eingeatmet wird. LPS = Lipopolysaccharid, S. enteridis = Salmonella enteridis

### 2.1.1 Migrationsversuch in vivo

24 h nach Start der LPS-Inhalation wurde der Versuchsm Maus über die Schwanzvene 300 µl Alexa 633-konjugierter Ly6G-Antikörper (0,05 mg/ml, Lymphocyte Culture Center Core, Charlottesville, USA) verabreicht. Dieser band spezifisch an die Oberfläche aller intravasalen Neutrophilen Granulozyten, also sowohl an die im Blut zirkulierenden, als auch an die am Endothel adhärenierten PMNs. Direkt im Anschluss an die intravenöse Gabe des Antikörpers erhielt das Tier die Narkose (vgl. Tabelle 1) intraperitoneal.

Tabelle 1: Anästhetika pro Maus

Substanz	Artikelnummer, Hersteller, Ort	Menge
Ketamin 5%	N6339505, Ratiopharm, Ulm	60 µl
Rompun 2%	KP08LEA, Bayer, Leverkusen	15 µl
Natriumchlorid 0,9%	2350748, Braun, Melsungen	225 µl

Ketamin und Rompun wirken analgetisch und sedierend, Rompun zusätzlich muskelrelaxierend. Fünf min nach erfolgter Antikörper- und Narkose-Gabe wurde mit der Präparation begonnen: Die Maus wurde mit Klebestreifen in Rückenlage auf einem Kork-Operationstisch fixiert, sodass der Hals überstreckt war. Es folgte das vollständige Benetzen des Fells mit 70% Ethanol (Ethanol absolut, A3678, AppliChem, Darmstadt und destilliertes Wasser (Aqua dest.), 2351744, Braun, Melsungen) unter Abdeckung der Mundöffnung. Das Fell an Brustkorb und Bauchwand wurde abpräpariert, das Peritoneum unterhalb des Xyphoids eröffnet. Nun wurde über das Diaphragma auch der Brustkorb geöffnet, woraus ein Pneumothorax mit Kollaps beider Lungenflügel resultierte. Die Rippen beidseits des Sternums wurden nach kranial durchtrennt, das Brustschild hochgeklappt und mit einer Kanüle fixiert, sodass Herz und Lunge frei lagen. Aus dem rechten Ventrikel wurden 600 µl Blut in eine 1 ml Spritze mit 0,02 ml Natriumcitrat (entnommen aus Monovette, 5033011, Sarstedt, Nürnberg) abgenommen und anschließend bis zur Färbung für die Analyse in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis (Eismaschine AF-10, Scotsman, Sprockhoevel) gelagert. Nach supradiaphragmaler Durchtrennung von Aorta und Vena cava inferior wurde der Lungenkreislauf durch langsame Injektion von 3 ml PBS<sup>-</sup> in die rechte Herzkammer des noch schlagenden Herzens gespült. Ziel hierbei war es, die zirkulierenden PMNs aus dem Lungengefäßsystem zu entfernen. Anschließend wurde die Trachea mit zwei Pinzetten frei präpariert, ein „Tubus“ in Form eines Venenkatheters (Insyte 22G, 381223, BD, Heidelberg) eingeführt und dieser mittels einer Nähgarnschlinge fixiert. Zur Gewinnung der intraalveolären PMNs folgte mit 5x 1 ml PBS<sup>-</sup> die Bronchiallavage. Diese wurde in einem 10 ml Reaktionsgefäß gesammelt und bis zur Verarbeitung auf Eis gelagert. Zuletzt wurden am Hilus die Lunge mit dem Herzen herauspräpariert und die einzelnen Lungenlappen

bronchiennah abgetrennt. Letztere wurden in einer zuvor angesetzten Enzymlösung (vgl. Tabelle 2) in einer Petrischale mit der Schere zerkleinert, anschließend in ein 50 ml Reaktionsgefäß pipettiert und 30 min im Dunkeln bei 37°C und 70 rpm inkubiert (Orbitaler Schüttler-Inkubator ES-20, Biosan, Loiching).

Tabelle 2: Enzymlösung pro Maus

Substanz	Artikelnummer, Hersteller, Ort	Menge
Kollagenase XI	C7657, Sigma-Aldrich, Steinheim	2,5 µl
DNase	D4527, Sigma-Aldrich, Steinheim	2,5 µl
Hyaluronidase	H3506, Sigma-Aldrich, Steinheim	2,5 µl
PBS <sup>-</sup>	D8537, Sigma- Aldrich, Steinheim	2,5 ml
Ly6G-Antikörper (unkonjugiert)	Lymphocyte Culture Center Core, Charlottesville, USA	50 µl

Nach der Inkubation im Enzymgemisch wurde das zerkleinerte Organ mit ca. 17,5 ml PBS<sup>-</sup> und dem Konus einer 5 ml Spritze durch ein Zellsieb (Cell Strainer 70 µm, 352350, BD, Heidelberg) gedrückt und in einem mit Alufolie abgedunkelten 50 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die hierbei entstandene Zellsuspension mit dem Endvolumen von ca. 20 ml wurde bei 4°C und 292 g für 10 min zentrifugiert (Megafuge X1R, Hareaus, Hanau). Nachdem der Überstand dann verworfen wurde, resuspendierte man das Zellpellet zur Eliminierung der Erythrozyten in 5 ml Lysepuffer (vgl. Tabelle 3) und ließ den Ansatz für 5 min im Dunkeln stehen. Um die Reaktion zu stoppen, wurden nach Ablauf der Zeit 20 ml Färbepuffer (FP, vgl. Tabelle 4) hinzu gegeben.

Tabelle 3: Lysepuffer (Zusammensetzung für 250 ml)

Substanz	Artikelnummer, Hersteller	Menge
NH <sub>4</sub> Cl	3J002532, AppliChem, Darmstadt	2,006 g
NaHCO <sub>3</sub>	K10720529, Merck, Darmstadt	0,21 g
Disodium EDTA	ED4S, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	0,093 g
Aqua dest.	2351744, Braun, Melsungen	250 ml

Tabelle 4: Färbepuffer (Zusammensetzung für 500ml)

Substanz	Artikelnummer, Hersteller	Menge
PBS <sup>-</sup>	D8537, Sigma-Aldrich, Steinheim	500 ml
Bovines Serum Albumin (BSA)	A7906, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	5 g
NaN <sub>3</sub> -Lösung 20%	08591, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	2,5 ml

Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt zu den beschriebenen Konditionen, dann wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 4,8 ml FP resuspendiert und mittels Neubauer-Zählkammer (4427B233, NanoEnTek, Seoul, Korea) die Zellzahl bestimmt. Hierzu wurden 10 µl der Suspension in 90 µl Türk'sche Lösung (109277, Merck, Darmstadt) gegeben und mit dem Vortex homogenisiert (Vortex Genie 2, Scientific Industries, Bohemia, USA). Von dieser Verdünnung wurden wiederum 10 µl zum Auszählen (Mikroskop Leica DM-IRB, Leica, Wetzlar) genutzt. Die Zellzahl des Lungenhomogenats stellte man dann durch Zugabe von FP auf eine Zahl von 200.000 je 100 µl ein. Das BAL-Material wurde bei 292 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend fuhr man mit dem Resuspendieren in 1 ml FP fort. Die Bestimmung und Einstellung der Zellzahl erfolgte nun nach dem gleichen Prinzip wie bei den Lungenproben, die Lavage-Probe war dabei durchgehend auf Eis gelagert. Abschließend wurde das Probenmaterial aus Blut, Lunge und BAL durchflusszytometrisch untersucht.

### 2.1.2 Adhäsionsmoleküle in murinen Lungen: RT-qPCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Sequenzen *in vitro*, um Genexpressionen im Erbgut nachzuweisen und zu quantifizieren. Das erstmals 1986 von Mullis et al. publizierte Verfahren beruht auf dem Einsatz von Polymerasen zur Produktion mehrfacher Kopien eines gewünschten DNA-Abschnittes. Durch starkes Erhitzen auf 95°C wird der Doppelstrang der DNA in zwei Einzelstränge aufgetrennt, anschließend lagern sich ausgewählte Nukleotidsequenzen, die Primer, an die Zielsequenzen des Ausgangsstranges (Template), an. Diese Schritte bezeichnet man als „Denaturierung“ und „Annealing“.

Die Basenabfolgen der Einzelstränge sind komplementär zueinander aufgebaut, weshalb die Polymerasen anti-parallel die Stränge entlang laufen. Aus diesem Grund werden auch zwei verschiedene Primer benötigt: Der „forward“ Primer bindet an den codierenden Strang, auch Plusstrang genannt, welcher die Sequenz für die direkte Translation in ein Protein beinhaltet. Der „reverse“ Primer initiiert die Bindung der Polymerase am komplementären Strang, dem Minusstrang. Nach Anlagerung der Primer beginnt die DNA-Polymerase mit der Synthese eines neuen komplementären Stranges, dieser Vorgang ist die sogenannte „Elongation“. Die Temperaturen für das Annealing und die Elongation befinden sich zumeist zwischen 55 und 70 °C und variieren dabei je nach Länge und Basenzusammensetzung der Primer. Der synthetisierte DNA-Abschnitt wird als Amplifikat bezeichnet und dient in den darauffolgenden Zyklen wieder als Vorlage für die Polymerase, weshalb die Reaktionsprodukte sich exponentiell vermehren. Im Anschluss können letztere dann gelelektrophoretisch untersucht werden.

Bei der „real time quantitative PCR“, kurz „qPCR“, kann die Menge an Amplifikaten in den einzelnen Zyklen anhand interkalierender Fluoreszenzfarbstoffe in Echtzeit gemessen werden. Das heißt, ein hinzugegebener zunächst inaktiver Farbstoff, wie zum Beispiel SYBR-Green, wird bei Einlagerung in den DNA-Doppelstrang aktiviert, sodass das Fluoreszenzsignal mit jedem Zyklus, in dem neue Amplifikate entstehen, entsprechend deren Anzahl zunimmt. Die Messung des Signals erlaubt dadurch auch die Erfassung der Menge an Reaktionsprodukten, wodurch die gelektrophoretische Untersuchung nicht mehr nötig ist.

Der Begriff „RT-qPCR“ steht für „Reverse Transkriptase-quantitative PCR“ und bedeutet, dass vor der eigentlichen Kettenreaktion Ribonukleinsäure (RNA) mittels einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Diese cDNA dient im Anschluss als Template für die PCR. Bis zur eigentlichen Vervielfältigung muss also zunächst die RNA aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert und umgeschrieben werden.

### *RNA-Isolation aus murinen Lungen*

Um einen Verlust von RNA durch ubiquitär vorhandene Ribonukleinsäure spaltende Enzyme, die RNasen, zu vermeiden, wurden Handschuhe und Flächen bei allen Arbeitsschritten mit RNasefree (PN701024 #7002, Molecular Bio Products Inc., San Diego, USA) behandelt und ausschließlich sterile Filterspitzen (Nerbeplus, Winsen/Luhe) zum Pipettieren verwendet. Alle Schritte der RNA-Isolation erfolgten zur Reinhaltung der Proben und zum Schutz vor gesundheitsschädlichen Dämpfen unter dem Abzug.

3 h nach LPS-Vernebelung erhielt die Versuchsmaus eine Narkose (vgl. Tabelle 1, S.31) und die Lunge wurde für die RNA-Isolation herauspräpariert (vgl.2.1.1); 50 mg der entnommenen Lunge wurden in 1 ml Trifast-Lösung (113015, Peqlab, Erlangen) mithilfe von Keramikkügelchen (Precellys-Kit 91-PCS-CK14, Peqlab, Erlangen) bei 5000 rpm für 2x 20 Sekunden homogenisiert (000-1702, Bertin Technologies, Montigny le Bretonneux). Durch das Guanidinisothiocyanat in der Trifast-Lösung wurden die Zellen lysiert und RNasen denaturiert. Im Anschluss erfolgte die Lagerung der Proben bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung (Gefriertruhe C585 Innova, Eppendorf, Hamburg).

Nach dem Auftauen der Probengefäße wurden diese fünf Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nun gab man je Gefäß 200 µl Chloroform (SHBF3553, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) hinzu, schüttelte 15 Sekunden und ließ dann die Röhrchen 10 min bei RT stehen. Das Homogenat wurde anschließend 5 min bei 12000 g und RT zentrifugiert (Zentrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg), wodurch es sich in drei Phasen auftrennte. Von diesen enthielt die obere hydrophile Phase die durch Phenol und Chloroform gelöste RNA, die Interphase die DNA und die untere Phase die organischen Reste in Form eines DNA-Protein-Gemisches. Die obere Phase wurde in ein neues Gefäß pipettiert, 500 µl Isopropanol

(BCBQ1677, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) zum Herausfällen der RNA hinzugegeben und gemischt, dann 15 min auf Eis stehen gelassen. Nach erneuten 10 min Zentrifugation, diesmal bei 4°C und 12000 g, war ein RNA-Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes sichtbar. Der Isopropanol-Überstand wurde abpipettiert und die gefällte RNA zweimal mit 1000 µl 75%igem Ethanol gewaschen: mittels Vortex wurden Ethanol und Pellet homogenisiert und anschließend bei 4°C und 12000 g zentrifugiert, dann der Überstand wieder abpipettiert. Nach diesem Vorgang ließ man die Reaktionsgefäße offen unter dem Abzug für ca. 40 min liegen, um ein vollständiges Verdunsten des Alkohols zu gewährleisten. Abschließend resuspendierte man das Pellet in 40 µl Nuklease-freiem Wasser (NFW, AM9930, Ambion, Carlsbad, USA). Zuletzt wurden die Proben für 10 min bei 57°C auf dem Thermoschüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) erwärmt, um die Löslichkeit der RNA zu verbessern. Danach wurden Reinheit sowie Konzentration der Nukleinsäure photometrisch mittels Nanodrop (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, Peqlab, Wilmington, USA) bestimmt. Sofern die RNA im Anschluss nicht direkt in cDNA umgeschrieben wurde, konnten die Proben bei -80°C verwahrt werden.

### *cDNA-Synthese*

Nach der Bestimmung der RNA-Konzentration mit dem Nanodrop wurde der Gehalt jeder Probe durch Zugabe von NFW auf ca. 300 ng/µl eingestellt und das Volumen von genau 1 µg RNA ermittelt. Für den Umschrieb in cDNA gab man dann 1 µg RNA mit 5 µl „iScriptMix“ in ein kleines Reaktionsgefäß und füllte mit NFW auf ein Gesamtvolumen von 20 µl auf. Der iScriptMix bestand aus 4 µl 5x iScrip tReactionMix und 1 µl iScript Reverse Transkriptase, beides aus dem iScript cDNA Synthesis Kit von BioRad (170-8891, Hercules, USA). In dem Mix waren die RNA-abhängige DNA-Polymerase, eine DNA-abhängige DNA-Polymerase für die Synthese des Zweitstranges, Primer, Nucleotide und RNase Inhibitoren enthalten. Der Umschrieb erfolgte im Thermocycler von BioRad (580BR1260, Wilmington, USA). Nach Beendigung wurden je Probe 140 µl NFW hinzugefügt und die cDNA, falls nicht direkt die qPCR erfolgte, bei -80°C verwahrt.

### *qPCR*

Zu Beginn wurde für das zu untersuchende Gen sowie für das Referenzgen eine Standardreihe mit Verdünnungen (1:2, 1:4, 1:8 und 1:16 in NFW) einer LPS-stimulierten Probe angefertigt. Das verwendete Referenzgen war 18S, dieses codiert für die ubiquitär vorkommende ribosomale 18S-RNA und hat im Vergleich zu anderen Kontrollgenen die höchste Konstanz unter Zytokineinfluss (Bas et al., 2004).

Forward- und Reverse Primer wurden nach Herstellerangaben in NFW gelöst. In zwei Reaktionsgefäße pipettierte man dann jeweils 20 µl beider Primer und füllte mit 160 µl NFW

auf ein Gesamtvolumen von 200 µl auf. Je Well auf der PCR Platte (MLL9601 Multiplate 96 well, BioRad, UK) wurden 1 µl dieses „Primer-Mixes“ benötigt. Hinzu kamen je Well 12,5 µl SYBR Green (1708880, BioRad, Hercules, USA), 7,5 µl NFW und 4 µl cDNA-Probe, sodass jeweils ein Endvolumen von 20 µl vorhanden war. Das SYBR Green enthielt neben dem Fluoreszenzfarbstoff auch die für die PCR benötigten Nukleotide, Polymerasen und RNase-Inhibitoren. Nach dem Pipettieren der Platte wurde diese mit einer Folie verschlossen (MSB1001, BioRad, UK) und kurz an zentrifugiert (PerfectSpin P, Peqlab, Wilmington, USA). Für die qPCR wurde der Thermocycler von BioRad (C1000 Thermal Cycler CFX Real-Time-System, BioRad, Wilmington, USA) verwendet, die Auswertung erfolgte mittels der zugehörigen Software „CFX Manager“ Version 3.1.

Tabelle 5: Murine Primer mit Annealing-Temperatur

Target	Forward-Primer 5'-3'	Reverse-Primer 5'-3'	Hersteller, Ort	Temp.
<b>CD11a</b>	agatcgagtcggaccacag	ggcagtgaagaggcctcccg	biomers, Ulm	55°C
<b>CD11b</b>	atggacgctgatggcaatacc	tcccattcacgtctcca	biomers, Ulm	60,5°C
<b>CD29</b>	gccagggctggtatacaga	tcacaatggcacacaggtt	biomers, Ulm	58,8°C
<b>CD31</b>	ccaaggccaacaga	aagggagccttccgttct	biomers, Ulm	57,2°C
<b>CD44</b>	cgcacaccatggacaagttt	gaaagccttgacagagtcag	biomers, Ulm	59,5°C
<b>CD47</b>	catcgtggtgtggagccatc	acagtccgtcacttccctcac	biomers, Ulm	62°C
<b>CD162</b>	tttgctagctcactctcac	atgtttattggatgcctgtgc	biomers, Ulm	57°C
<b>CD172a</b>	agtccacctaagaggaccaagtagc	tgtacagaaacaggacgcgga	biomers, Ulm	62,6°C
<b>CD54</b>	caatttctatgccgcacag	agctggaagatcgaaagtccg	biomers, Ulm	59,1°C
<b>18-S</b>	gtaaccggtgaaccctt	ccatccaatcggtagtagcg	biomers, Ulm	58°C

### 2.1.3 Adhäsionsmoleküle in murinen Lungen: Immunfluoreszenz

Zunächst wurden Paraffinschnitte aus murinen Lungen hergestellt. Es handelte sich um Organe von Tieren, welche 24h vor Versuchsbeginn mit LPS bzw. mit PBS<sup>-</sup> vernebelt worden waren. Wie beim Migrationsversuch unter 2.1.1 beschrieben, erhielt die Maus eine Narkose und wurde auf dem Korktisch befestigt. Die Lunge wurde im Thorax freigelegt, der Lungenkreislauf über den rechten Ventrikel blutleer gespült und die Trachea kanüliert (vgl. 2.1.1, S.31). Anschließend wurde anstelle der Bronchiallavage passiv Formalin 4% (5F014852, AppliChem, Darmstadt) über 15 min mittels einer 20 ml Spritze in die Lunge infundiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Lunge entnommen und für 24 h in Einbettkassetten (K113.1, Carl Roth, Karlsruhe) mit Formalin 4% verbracht. Im Anschluss erfolgte das Waschen und Entwässern der fixierten Lungen mit Ethanol 70% für ca. 1 h. Nun konnte

das Gewebe im Tissue Embedder (EG 1150, Leica Microsystems, Shanghai, China) in Paraffin gegossen werden. Im Rahmen dieses Prozesses wurden 13 Stationen durchlaufen (vgl. Tabelle 6).

Tabelle 6: Phasen der Einbettung im Gewebefiltrationsautomaten

Station	Reagenz	Zeit in h	Station	Reagenz	Zeit in h
1	Ethanol 70%	1,5	8	Xylol	1,5
2	Ethanol 70%	1	9	Xylol	1,5
3	Ethanol 96%	1,5	10	Xylol	1
4	Ethanol 96%	1	11	Paraffin wax	1,5
5	Ethanol 100%	1,5	12	Paraffin wax	1,5
6	Ethanol 100%	1	13	Paraffin wax	1,5
7	Ethanol 100%	1			

Die Paraffinblöcke wurden zur besseren Weiterverarbeitung auf Eis gekühlt. Die im Anschluss am Mikrotom (RM2235, Leica, Nussloch) hergestellten Schnitte hatten eine Dicke von 3 µm und wurden mit einem Pinsel in ein auf 35°C vorgewärmtes Wasserbad (HI1210, Leica, Nussloch) verbracht. Dann konnten sie auf Objektträger (OT) gezogen werden und über Nacht auf der Wärmeplatte (HI1220, Leica, Nussloch) bei 42°C trocknen.

Das Färben der Präparate erfolgte in mehreren Etappen. Es handelte sich im Gegensatz zur Färbung für die Durchflusszytometrie (vgl. 2.1.4, S.40) um *indirekte* Immunfluoreszenz. Das heißt, ein Primärantikörper, der speziell an das gesuchte Antigen bindet, wurde zunächst mit dem Gewebe inkubiert. Da dieser anschließend mit einem farbstofftragenden Antikörper, dem Sekundärantikörper, markiert werden sollte, durfte es sich bei der Wirtsspezies des Primär-AK nicht um die Spezies des Gewebes -in diesem Falle Mausgewebe- handeln. Der Sekundärantikörper richtete sich nun gegen die Spezies des Erstantikörpers, sodass das gewünschte Antigen am Ende indirekt mit dem Leuchtfarbstoff gekennzeichnet war. In dieser Arbeit wurde das zu untersuchende Adhäsionsmolekül auf diese Weise grün angefärbt, die PMNs rot.

Für den Färbevorgang mussten die Lungenschnitte zunächst entparaffiniert werden: Hierfür wurden die Objektträger für je 5 min in Behälter mit Lösungsmitteln in absteigenden Konzentrationen sowie Aqua dest. gestellt und jeweils beim Herausnehmen geschwenkt. In der Reihe waren es zu Beginn drei Gefäße mit Xylol (28975.325, VWR Chemicals, Fontenay-sous-Boris, Frankreich), dann je zwei mit 100% Ethanol und 96% Ethanol, gefolgt von je einem mit 50% und 70% Ethanol und zum Schluss drei Gefäße mit destilliertem Wasser. Anschließend wurden zur Demaskierung der Antigene die Präparate in einem mit Unmasking Solution (H-3300, Vector Laboratories, Burlingame, USA) befüllten Behälter in der Mikrowelle (HF 22023, Siemens, München) bei 600 Watt für 20 min gekocht.

Einschränkungen der Immunreaktivität der Antigene durch den Fixierungs- und Einbettungsvorgang konnten so aufgehoben werden. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, musste ca. alle 3-5 min die Flüssigkeit nachgefüllt werden. Die heißen Objektträger ließ man bei Raumtemperatur eine Stunde lang abkühlen und spülte sie dann für 3 min in PBS<sup>-</sup>. Zur Permeabilisierung der Zellmembranen wurde ein kleiner Plastikbehälter mit 20 ml TritonX 0,1% (056K0045, Sigma-Aldrich, St- Louis, USA) befüllt und die Lungenschnitte für 10 min hineingestellt, sodass sie vollständig bedeckt waren. Danach folgte das Absättigen unspezifischer AK-Bindungsstellen mit einer Lösung aus Trockenmilch 5% in Trishydroxymethylaminomethane gepufferter Salzlösung (TBS<sup>-</sup>; 45008807 und A1086.1000, beides AppliChem, Darmstadt) und 1:100 Serum der Sekundär-Antikörper Spezies. In diesem Versuch handelte es sich um Esel-, Huhn- und Ziegen Serum (sc-2044, sc-2479, sc-2043, alle Santa Cruz, Dallas, USA). Um die Präparate herum wurden mit einem Fettstift (H-4000, Vector Laboratories, Burlingame, USA) Kreise gezogen, die Block-Lösung zu je 150 µl hinein pipettiert und die OT in einer feuchten Kammer (M981-2 StainTray, Simport, Kanada) 1 h bei RT inkubiert. Während dieser Zeit konnten die ersten Primärantikörper für die Adhäsionsmoleküldetektion (vgl. Tabelle 7) in der gewünschten Menge und Konzentration mit Trockenmilch 1% in TBS<sup>-</sup> angesetzt werden.

Tabelle 7: Primärantikörper (anti-mouse) für Immunfluoreszenz

Target, Spezies	Artikelnummer, Hersteller, Ort	Konzentration
CD29, rabbit	Sc-7884, Santa Cruz, Dallas, USA	2 µg/ml
Cytokeratin 12, goat	Sc-17101, Santa Cruz, Dallas, USA	4 µg/ml
Ly 6b, rat	MCA771GA, AbD Serotec, Kidlington, UK	5 µg/ml
CD54, goat	Sc-1511, Santa Cruz, Dallas, USA	2 µg/ml
CD31, goat	Sc-1506, Santa Cruz, Dallas, USA	2 µg/ml
CD31, rat	Sc-101454, Santa Cruz, Dallas, USA	2 µg/ml
rabbit IgG	Sc-2027, Santa Cruz, Dallas, USA	2 µg/ml
goat IgG	Sc-2028, Santa Cruz, Dallas, USA	2 µg/ml
rat IgG	Sc-2026, Santa Cruz, Dallas, USA	2 µg/ml

Nach Ablauf der Zeit wurde die Trockenmilch-Lösung abgekippt und die Antikörperlösungen in die Kreise pipettiert, sodass die Schnitte gut bedeckt waren. Dann wurden die OT in der feuchten Kammer über Nacht im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Am nächsten Morgen wusch man die Objektträger 3x in PBS<sup>-</sup> für jeweils 3 min auf der Schwenkplatte. Der grün fluoreszierende Sekundärantikörper (vgl. Tabelle 8, S.39) wurde währenddessen mit Trockenmilch 1% in TBS<sup>-</sup> angesetzt, dann unter Lichtschutz auf die Präparate aufgebracht und diese dann 1 h in der feuchten Kammer bei RT inkubiert.

Tabelle 8: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz

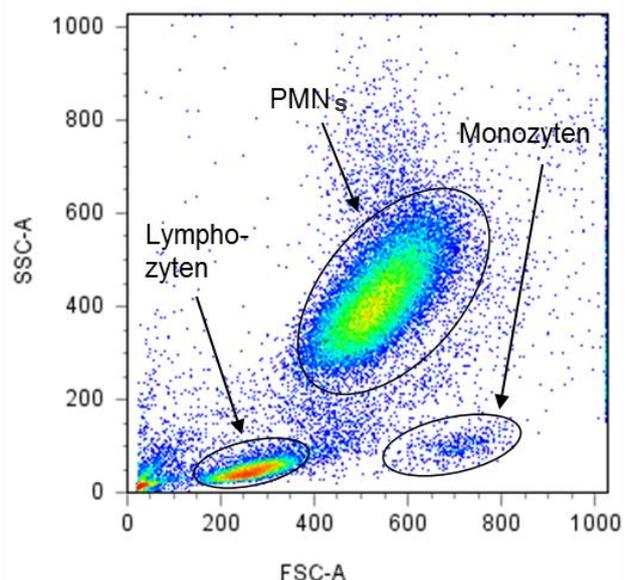
	<b>Flouorchrom, Spezies, Target</b>	<b>Artikelnummer, Hersteller, Ort</b>	<b>Konzentration</b>
ROT	Alexa Flour 594, donkey anti-goat	A-11058, Life technonolgies, Oregon, USA	4 µg/ml
	Alexa Flour 594, chicken anti-rat	A-21471, Life technonolgies, Oregon, USA	4 µg/ml
GRÜN	Alexa Fluor 488, goat anti-rabbit	A-11008 Life technonolgies, Oregon, USA	4 µg/ml
	Alexa Fluor 488, donkey anti-rabbit	Sc-362261, Santa Cruz, Dallas, USA	4 µg/ml
	Alexa Flour 488, chicken anti-rat	A-21470, Life technonolgies, Oregon, USA	4 µg/ml

Es folgte erneut dreimaliges Waschen mit PBS<sup>-</sup>, wobei ab diesem Zeitpunkt stets Lichtschutz eingehalten wurde. Bevor die Färbung mit den zweiten Primärantikörpern für die Markierung von PMNs erfolgen konnte, musste erneut 30 min wie oben beschrieben geblockt werden, hier war nochmals die Serum-Spezies des Sekundärantikörpers zu beachten. Dann wurden die Antikörperlösungen in die Kreise pipettiert und die Objektträger 1 h in der feuchten Kammer inkubiert. Nach Ablauf der Zeit mussten die Schnitte wieder 3x mit PBS<sup>-</sup> zur Entfernung der überschüssigen AK gewaschen werden. Dann konnte der rote Sekundärantikörper aufgetragen und 1 h in der lichtgeschützten Feuchtkammer inkubiert werden. Im Anschluss wurde ein letztes Mal der oben beschriebene Waschzyklus durchgeführt. Danach wurde direkt auf die noch feuchten Schnitte 1 Tropfen 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI, HP20.1, Carl Roth, Karlsruhe) zur blauen Kernfärbung getropft und die Deckgläschen aufgelegt. Die Präparate wurden mit Alufolie abgedeckt und zur Aushärtung über Nacht in den Kühlschrank verbracht. Mit dem Konfokalmikroskop AxioObserver Z1/LSM 510 der Firma ZEISS, Göttingen, wurden die Bilder aufgenommen und mittels der zugehörigen ZEN-Software sowie dem Bildbearbeitungsprogramm „ImageJ“ (<https://imagej.nih.gov/ij>) weiterverarbeitet.

### 2.1.4 Migration von PMNs in vivo: Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) genannt, ist ein zelluläres Messverfahren in der Medizin und Biochemie, mit welchem neben der Anzahl auch qualitative Eigenschaften wie Oberflächenstruktur und intrazelluläre Strukturen analysiert werden können. Der Begriff „Fluorescence Activated Cell Sorting“ ist zwar allgemein gebräuchlich für die Durchflusszytometrie, beschreibt jedoch ein Verfahren, bei welchem die Zellen nach der Analyse in einzelnen Gruppen zur Weiterverarbeitung aufgefangen werden können. Findet wie in dieser Arbeit ausschließlich die Charakterisierung der Zelleigenschaften im Durchflusszytometer statt, handelt es sich um „Fluorescence Activated Cell Scanning“. Hierbei wird eine Zellsuspension durch eine Messküvette gesaugt, in der am Analysepunkt ein Laserstrahl auf den Flüssigkeitsstrom trifft. Dieser Probenstrom wird von einem sogenannten Hüllstrom umflossen, der ersteren verdünnt und zentriert, sich aber nicht mit ihm vermengt. Durch die Verjüngung der Messküvette werden beide Ströme beschleunigt und die Zellen nacheinander an der besagten Laserquelle vorbeigeführt. Das

dabei in nur sehr geringem Winkel von der Zelle gestreute Licht wird als „Forward Scatter“ (FSC) bezeichnet und ist ein relatives Maß für die Größe, während das im 90° Winkel abgelenkte Licht, der „Side Scatter“ (SSC), Aussagen über die Granularität und intrazelluläre Struktur der Zelle zulässt. Anhand dieser Informationen lassen sich bereits grob die Leukozyten Populationen einer Vollblutprobe differenzieren (vgl. Abbildung 3), da zum Beispiel Lymphozyten relativ klein und glatt sind, während PMNs eine größere und raue Oberfläche sowie zahlreiche intrazelluläre Granula aufweisen. Neben den Streulichteigenschaften der Zelle können auch



**Abbildung 3: Unterschiedliche Leukozyten Populationen im humanen Vollblut.** Punktdiagramm in der FACS-Analyse (eigene Darstellung): Ein Punkt entspricht einer an der Laserquelle vorbei geführten Zelle, PMNs=Neutrophile Granulozyten

Fluoreszenzsignale detektiert und quantifiziert werden. Unter Fluoreszenz versteht man die Eigenschaft eines Stoffes, Licht einer bestimmten Wellenlänge zu absorbieren und nach Abfall auf ein energetisch ärmeres Niveau entsprechend langwelligere Lichtsignale wieder zu emittieren. Je nach verwendetem Fluorochrom liegen die Absorptions- und Emissionsspektren in unterschiedlichen Wellenlängenbereichen, was man bei der Auswahl der Farbstoffkombination bedenken muss: Die Überlappung der einzelnen Emissionsspektren

sollte möglichst gering sein. Um Beeinträchtigungen der Analyse durch spektrale Überlappungen, wie Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Einstrahlungen in den Phycoerythrin (PE)-Kanal, zu vermeiden, wird anhand von Einzelfärbungen eine Kompensation durchgeführt und anteilig Spannungswerte subtrahiert (Ulrich Sack, 2007).

In sämtlichen durchflusszytometrischen Untersuchungen dieser Arbeit wurde mit *direkter* Immunfluoreszenz gearbeitet. Das bedeutet, dass die Zelloberfläche mit Antikörpern markiert wurde, welche bereits mit einem Fluorochrom konjugiert waren. Die erfolgte Antikörperbindung an ein Oberflächenmolekül wurde dann durch Detektion des Fluoreszenzsignals nachgewiesen. Die Menge der Bindungen auf der einzelnen Zelle konnte anhand der Medianen Fluoreszenzintensität (MFI) ausgedrückt werden: Je höher die Dichte eines CD-Moleküls auf der Oberfläche, desto höher die gemessene MFI (vgl. Abbildung 13, S.59).

Für die Markierung der Zellen wurden die Antikörper (vgl. Tabelle 9, S.42) zunächst unter Lichtschutz mit Färbepuffer (vgl. Tabelle 4, S.32) verdünnt und in FACS-Röhrchen (352052, Corning Science, Corning, Mexico) je 1 µl unter Lichtschutz vorgelegt. Für die BAL-Proben wurde Anti-CD45, Anti-7/4, der gesuchte Adhäsionsmolekül-AK und der Gr-1-Antikörper verwendet. Bei den Blut- und Lungenproben wurde hingegen nur Anti-CD45 und Anti-7/4 zugegeben, da der Gr-1-AK bereits durch die intravenöse Gabe zu Beginn des Versuchs im Probenmaterial vorhanden war. Mit CD45, 7/4 und Gr-1 wurden die PMNs dreifach markiert: Während CD45 als allgemeiner Leukozytenmarker gilt, dienen 7/4 und Gr-1 zur PMN-Identifikation.

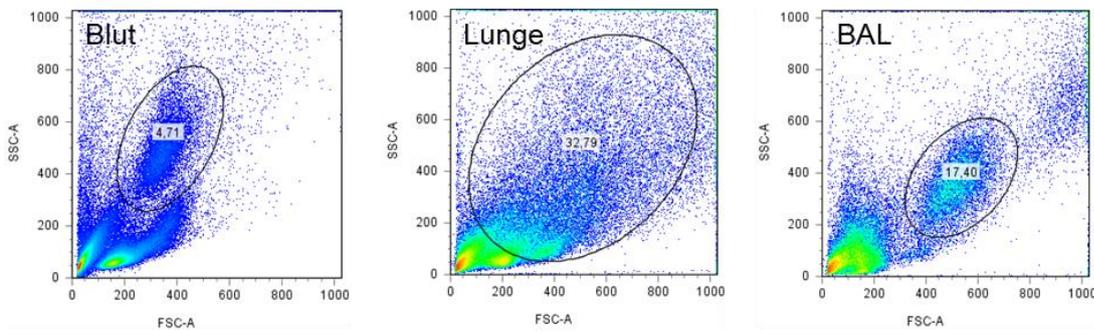
Nachdem die Marker-AK und der zu untersuchende AK vorgelegt waren, wurden mit einer Mehrfach-Pipette zügig 100 µl Probenmaterial aus Lavage oder Lunge bzw. 100 µl Blut je FACS-Röhrchen hinzugegeben. Es folgte eine Homogenisierung mittels Vortex und einmaliges kurzes „Anzentrifugieren“: Hierfür wurde die Zentrifuge mit den Einstellungen 292 g und 4°C gestartet und beim Erreichen von 250 g wieder gestoppt. Anschließend wurden alle Proben 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Erythrozyten in den Blut-Proben mit 2 ml FACS-Lyse (349202, BD, San Jose, USA) für 15 min im Dunkeln lysiert. Mit 10 min Zentrifugation bei 292 g und 4°C stoppte man diesen Vorgang schließlich und fügte nach Verwerfen des Überstandes 2 ml FP je Röhrchen hinzu. Auf die BAL- und Lungen-Proben pipettierte man ebenfalls 2 ml FP, dann wurden alle Proben zweimalig „gewaschen“: Nach Zentrifugation bei 292 g und 4°C für 5 min wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 2 ml FP resuspendiert, dann erneut zentrifugiert. Anschließend verwarf man den Überstand und wiederholte den Vorgang. Dieses „Waschen“ mit dem Färbepuffer diente dem Entfernen von überschüssigen Antikörpern sowie dem Verhindern unspezifischer Bindungen. Im Anschluss an den letzten Waschdurchgang wurde das Zellpellet in 400 µl Fixierlösung bestehend aus 1:1 FP (vgl. Tabelle 4, S.32) und

Paraformaldehyd 4% (P6148, Sigma-Aldrich, Taufkirchen) resuspendiert und die FACS-Röhrchen abgedeckt. Bis zur Analyse am Morgen des Folgetages wurden die Proben dunkel im Kühlschrank (FKS 5000-1, Liebherr, Ochsenhausen) verwahrt.

Tabelle 9: Antikörper im Migrationsversuch in vivo (anti-mouse)

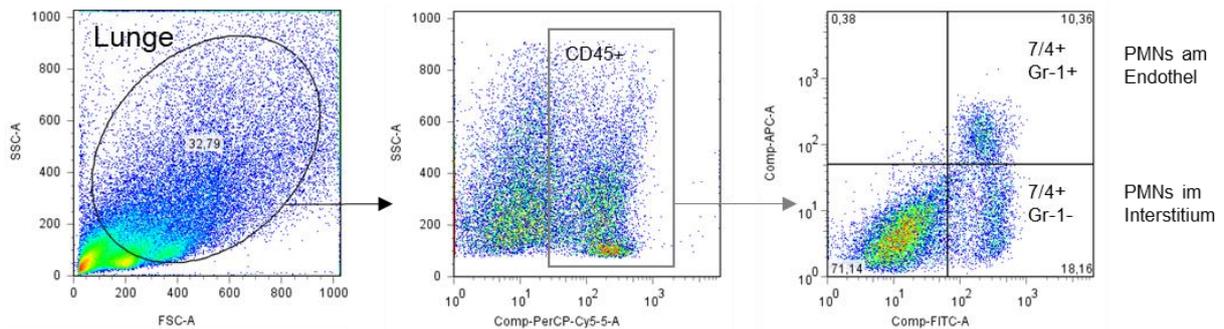
Cluster	Ziel-Antigen	Flouorchrom	Artikelnummer, Hersteller	Verdünnung
CD11a	LFA-1	PE	553121, BD, Heidelberg	1:2
CD11b	MAC-1	PE	553311, BD, Heidelberg	1:2
CD29	Integrin- $\beta$ -1	PE-Cy7	25-0291-80 eBioscience, San Diego, USA	1:2
CD31	PECAM-1	PE	553373, BD, Heidelberg	1:2
CD44	H-CAM	PE	553134, BD, Heidelberg	1:2
CD47	IAP	PE	563585, BD, Heidelberg	1:2
CD162	PSGL-1	PE	555306, BD, Heidelberg	1:2
CD172a	SIRP- $\alpha$	PE	144011, BioLegend	1:2
CD54	ICAM-1	PE	A16333, Life-technologies, Frederick, USA	1:2
CD45	LCA	PerCP	557235, BD, Heidelberg	1:10
Kein Cluster	7/4	FITC	MCA771F, AbD Serotec, Kidlington, UK	1:5
	Gr-1	Alexa633	Lymphocyte Culture Center Core, Charlottesville, USA	1:10
	IgG2a	FITC	553929, BD, Heidelberg	1:25
	IgG2b	APC	553991, BD, Heidelberg	1: 4
	IgG2a	PE	349053, BD, Heidelberg	1:1
	IgG2b	PE	0302B, AbD Serotec, Kidlington, UK	1:1
	IgG1	PE	345816, BD, Heidelberg	1:1

Für die Messung wurde das FACSCanto II Flow Cytometer von BD, Heidelberg, mit der zugehörigen Software (BD FACSDIVATM SOFTWARE, BD, Heidelberg) verwendet. Wie in Abbildung 4 dargestellt, zeigten sich unterschiedliche Punktdiagramme (Dotplots) je nach Probenmaterial. Ein Punkt wird als ein „Event“ bezeichnet und entspricht einer einzelnen, an der Laserquelle vorbeigeführten, Zelle.



**Abbildung 4: Zellen aus Blut, Lunge und BAL in der Durchflusszytometrie.** Die Kreise entsprechen den gesetzten PMN-Gates zu Beginn der Analyse (s.u.), die Zahlen dem prozentualen Anteil der darin liegenden Events an der Gesamtheit bei der Messung erfasster Events. (eigene Darstellung)

Im Anschluss an die Durchflusszytometrie erfolgte die Kompensation und die Auswertung mittels FlowJo-Software (V7.6.5, FLOWJO Lcc., Ashland, USA). Anhand der Markierung der PMNs wurden diese zunächst identifiziert (vgl. Abbildung 6 A-C, S.44) und in der Lunge auch dem jeweiligen Kompartiment -Endothel oder Interstitium- zugeordnet (vgl. Abbildung 5).

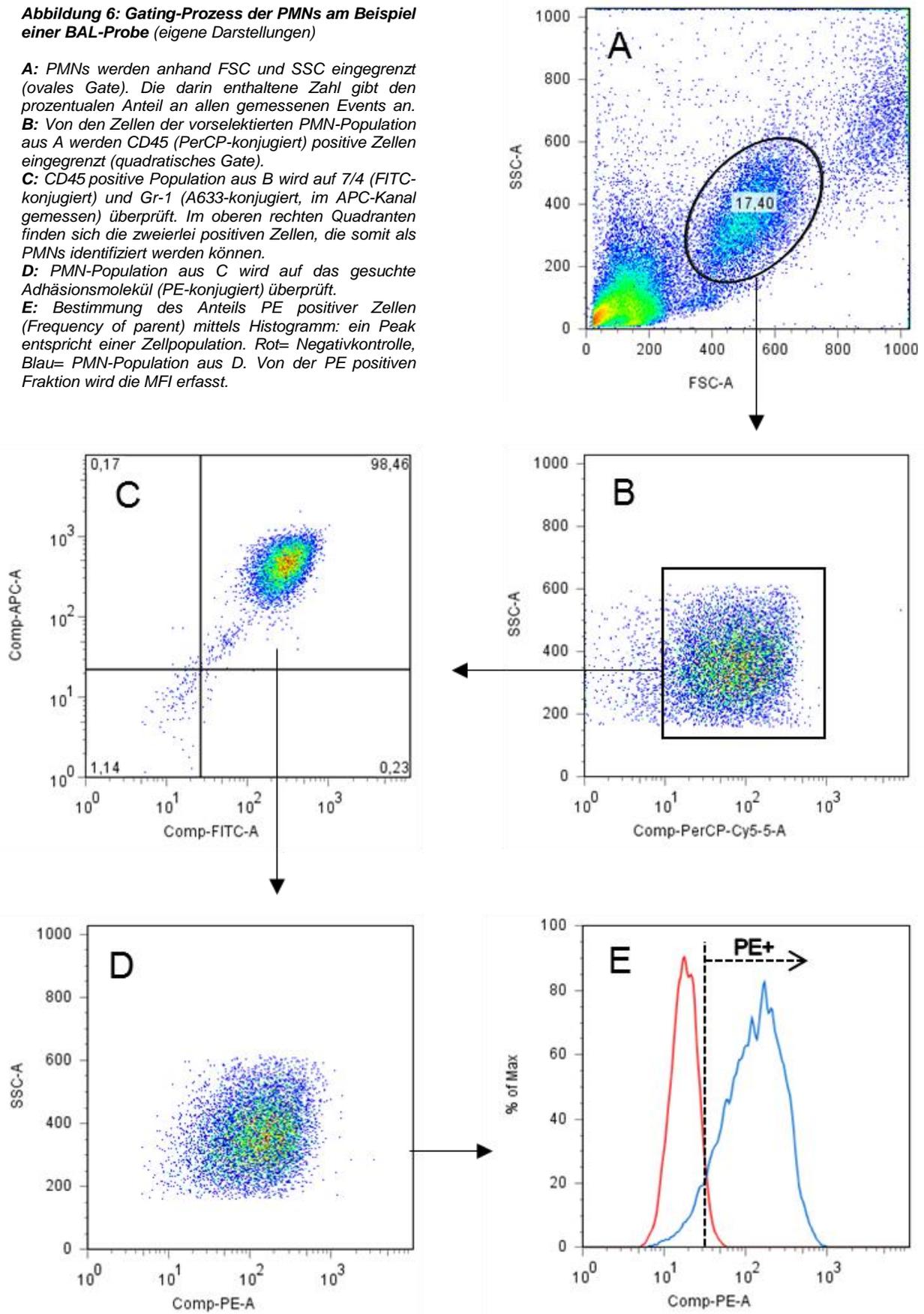


**Abbildung 5: Zuordnung der PMNs zu Endothel und Interstitium in den Lungen-Proben.** Aus der Lungenprobe (links) werden die Leukozyten bestimmt (mittleres Flowchart). Hiervon werden mittels 7/4 und Gr-1 die PMNs identifiziert (rechts): die PMNs am Endothel tragen den i.v. applizierten Gr-1-AK und den 7/4-AK, während die interstitiellen PMNs nur positiv für 7/4 sind. (eigene Darstellung)

Anschließend wurde zunächst der Anteil Adhäsionsmolekül-positiver PMNs (Frequency of parent) bestimmt (vgl. Abbildung 6 D+E, S.44). Von dieser ermittelten Population wiederum wurde dann die MFI erfasst, die auf den Expressionsgrad des Adhäsionsmoleküls schließen ließ (vgl.3.3, S.58).

**Abbildung 6: Gating-Prozess der PMNs am Beispiel einer BAL-Probe (eigene Darstellungen)**

**A:** PMNs werden anhand FSC und SSC eingegrenzt (ovales Gate). Die darin enthaltene Zahl gibt den prozentualen Anteil an allen gemessenen Events an.  
**B:** Von den Zellen der vorselektierten PMN-Population aus A werden CD45 (PerCP-konjugiert) positive Zellen eingegrenzt (quadratisches Gate).  
**C:** CD45 positive Population aus B wird auf 7/4 (FITC-konjugiert) und Gr-1 (A633-konjugiert, im APC-Kanal gemessen) überprüft. Im oberen rechten Quadranten finden sich die zweierlei positiven Zellen, die somit als PMNs identifiziert werden können.  
**D:** PMN-Population aus C wird auf das gesuchte Adhäsionsmolekül (PE-konjugiert) überprüft.  
**E:** Bestimmung des Anteils PE positiver Zellen (Frequency of parent) mittels Histogramm: ein Peak entspricht einer Zellpopulation. Rot= Negativkontrolle, Blau= PMN-Population aus D. Von der PE positiven Fraktion wird die MFI erfasst.



## 2.2 Stimulation von humanem Vollblut

Für diesen Versuch wurden zunächst die Stimulanzien in der gewünschten Menge und Konzentration mit PBS<sup>-</sup> angesetzt (vgl. Tabelle 10) und zur Erwärmung ins Wasserbad (HI 1210, Leica Biosystems, Nussloch) bei 37°C verbracht.

Tabelle 10: Stimulantien für Vollblut *in vitro*

Stimulanz	Artikelnummer, Hersteller, Ort	Konzentration
LPS	L6011, Sigma-Aldrich, Traufkirchen	100 µg/ml
MIP-2	25015, PeproTech, Hamburg	1 ng/ml
TNF $\alpha$	C63721, Promokine, Heidelberg	10 ng/ml
KC	OWO0213081, R&D Systems, Wiesbaden	1 ng/ml

Die erforderliche Menge an FACS-Antikörpern wurde berechnet, unter Lichtschutz die gewünschten Verdünnungen mit Färbepuffer hergestellt, die Ansätze mit Alufolie abgedeckt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert. Für die Berechnung der AK-Mengen galt: Je FACS-Röhrchen benötigte man 5 µl CD45-AK, 5 µl CD66b-AK und je nach Herstellerangaben 5 oder 20 µl Adhäsionsmolekül-AK, die mit Färbepuffer entsprechend verdünnt werden (vgl. Tabelle 11).

Tabelle 11: FACS-Antikörper im Vollblut-Versuch (*anti-human*)

Cluster	Ziel-Antigen	Fluoro-chrom	Artikelnummer, Hersteller, Ort	Verdünnung
CD11a	LFA-1	PE	3189709, BD, San José, USA	1:4
CD11b	MAC-1	PE	54342, BD, San José, USA	1:8
CD29	Integrin- $\beta$ -1	PE	4262918, BD, San José, USA	1:2
CD31	PECAM-1	PE	4065855, BD, San José, USA	1:4
CD44	H-CAM	PE	B180554, BioLegend	1:3
CD47	IAP	PE	E15361-103, eBioscience, San Diego, USA	1:1
CD162	PSGL-1	PE	61514, BD, San José, USA	1:4
CD172a	SIRP- $\alpha$	PE	3290897, BD, San José, USA	1:4
CD54	ICAM-1	PE	4301917, BD, San José, USA	1:4
CD45	LCA	PerCP	B183057, BioLegend	1:8
CD66b	CAECAM	APC	E16847-109 eBioscience, San Diego, USA	1:8
Kein Cluster	IgG1	PE	16651, BD, San José, USA	1:5
	DNA/RNA	7-AAD	559925, BD, San José, USA	1:2
	IgM	APC	E13114-104, eBioscience, San Diego, USA	1:5

Nach den Vorbereitungen wurde von einem gesunden Probanden Vollblut mit einer Butterfly-Kanüle (5053211, Sarstedt, Nürnberg) aus der Cubitalvene in eine Citrat-Monovette entnommen. Je eingesetztem Stimulanz und Adhäsionsmolekül-AK benötigte man ein FACS-Röhrchen mit 100 µl stimuliertem Vollblut. Um Ungenauigkeiten durch zu kleine Mengen an Blut und Stimulanzen zu vermeiden, wurden mindestens 2 ml Blut mit 2 ml Stimulanz versetzt. Beides wurde kurz mittels Vortex vermengt und 30 Minuten im Wärmebad bei 37°C inkubiert, dabei leicht geschwenkt (50 rpm). Als Verdünnungsreagenz wie auch als Kontrolle diente PBS<sup>-</sup> und wurde für letzteren Zweck in gleicher Menge wie die Stimulanzen zum Vollblut appliziert. Im Laufe der Inkubationszeit wurden die Antikörper-Ansätze in jedes FACS-Röhrchen in folgender Zusammensetzung vorgelegt:

**5 µl CD45**

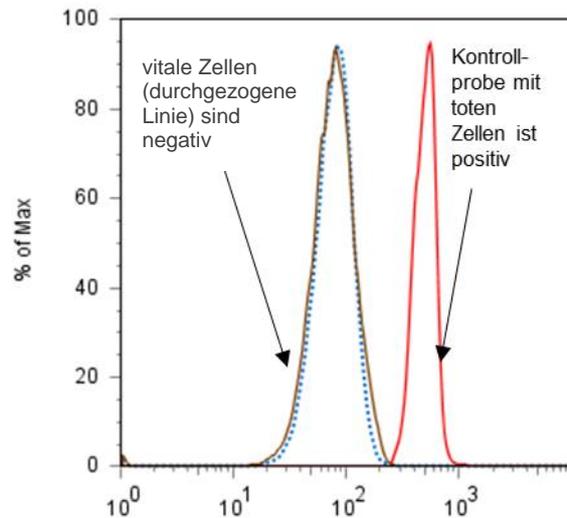
**5 µl CD66b**

**5 bzw. 20 µl Adhäsionsmolekül**

Während CD45 wie im murinen Modell die Leukozyten markierte (vgl. 2.1.4, S.40), erfolgte die Selektion der Neutrophilen Granulozyten über CD66b, da dieser speziell von humanen PMNs exprimiert wird (Paulsen et al., 2013). Durch Zentrifugation mit 500 g bei Raumtemperatur für 5 min wurde die Stimulation beendet, anschließend der Überstand aus Serum und Stimulanz abpipettiert und verworfen.

Das stimulierte Blut wurde nach kurzem Homogenisieren zu je 100 µl auf die FACS-Röhrchen mit den vorgelegten Antikörpern gegeben. Die Proben wurden dann mit dem Vortex gemischt und anzentrifugiert. Die anschließende Inkubation betrug 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der Zeit erfolgte, ebenfalls abgedunkelt, die Lyse der Erythrozyten mit 2 ml FACS-Lysing Solution je Röhrchen für 10 min. Danach wurde dieser Vorgang mit 5 minütiger Zentrifugation bei 500 g und RT beendet und der Überstand verworfen. Zuletzt wurden die Proben zweimal mit Färbepuffer gewaschen (vgl.2.1.4, S.40), mit 600 µl CellFix (340181, BD, Erembodegem, Belgien) je Probe konserviert und wenn nötig bis zur Analyse im Kühlschrank lichtgeschützt verwahrt.

Stichprobenartig wurde die Vitalität der Zellen mit einem „Viability Stain“ überprüft: hierzu wurden pro Versuch aus jeder Gruppe 2-3 Proben nicht fixiert, sondern in äquivalenter Menge PBS-resuspendiert und mittels DNA-Färbung (5 µl je Probe, 15 min Inkubation im dunklen Kühlschrank vor der FACS-Messung) die vitalen Zellen identifiziert. Der Nukleinsäuremarker 7-Aminoactinomycin-D (7AAD) kann nur bei toten Zellen die Zellmembran durchdringen, weshalb diese im FACS positiv erscheinen, die lebenden Zellen negativ. Da 7AAD sein Signal mit maximal 647 nm emittiert, konnte es im PerCP-Cy5-5-A-Kanal (Emissions-max. 697 nm)



**Abbildung 7: Viabilitätsfärbung humaner PMNs im FlowJo-Histogramm:** Ein Peak entspricht einer Zellpopulation. Blau gepunktete Linie links: IgG-Kontrolle (PerCP-Cy5-5-A negativ) braune Linie links: vitale Zellen (PerCP-Cy5-5-A negativ), rote Linie rechts: tote Zellen (PerCP-Cy5-5-A positiv). (eigene Darstellung)

detektiert werden (vgl. Abbildung 7). Sofern eine Probe mit dem Viability Stain versetzt wurde, musste diese innerhalb der ersten Stunde nach Applikation des Farbstoffes gemessen werden. In unseren Versuchen erfolgte dies stets nach Ablauf der 15 minütigen Inkubationszeit. Für die Kontrolle mit nicht vitalen Zellen (vgl. ebenfalls Abbildung 7) wurden die Zellen einer Referenzprobe für 10 min auf dem Thermoschüttler bei 65°C abgetötet. Die Messung aller Proben erfolgte im Durchflusszytometer der Firma BD, die Analyse mittels FlowJo Software. Die Neutrophilen Granulozyten wurden dabei über SSC und FSC (vgl. Abbildung 3, S.40) sowie anhand der AK-Markierungen bestimmt. Anschließend wurde die MFI, sowie der prozentuale Anteil positiver PMNs (Frequency of parent) für das jeweilige Adhäsionsmolekül erfasst.

### 2.3 Stimulation von humanen pulmonalen Epithelzellen

H441 sind adhärent und langsam wachsende humane Epithelzellen vom papillären Adenokarzinomtyp. Sie wurden im Brutschrank (Cytoperm2, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Anteil der Luft und 91% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle Arbeiten mit den Zellen wurden unter einer Sterilwerkbank (LaminAir HB 2472, Heraeus, Hanau) durchgeführt. Zweimal wöchentlich erfolgte ein Medienwechsel, bei welchem zunächst der Zelllayer mit PBS<sup>+</sup> gespült und anschließend 20 ml neues Medium (vgl. Tabelle 12, S.48) hinzugefügt wurde.

Tabelle 12: Zusammensetzung H441-Kulturmedium

Reagenz	Artikelnummer, Hersteller	Menge
Minimal essential Medium (MEM)	R-8758, Sigma-Aldrich, Steinheim	500 ml
Fetales Kälberserum (FCS)	Gold A15-649, PAA	50 ml
D-Glucose 100g/l	G8644, Sigma-Aldrich, Steinheim	12,5 ml
HEPES 1M	15630, Gibco, Waltham, USA	5 ml
Natrium-Pyruvat Sol. 100mM	S-8636, Sigma-Aldrich, Steinheim	5 ml
Antibiotik-Antimykotik Sol. 100x	A5955, Sigma-Aldrich, Steinheim	5 ml

Ein- bis zweimal wöchentlich wurden die Zellen 1:2 passagiert. Hierfür wurde der Zellrasen mit PBS<sup>-</sup> gespült und dann mit 4 ml Accutase (SLBN9948V, Sigma-Aldrich, Steinheim) beschichtet, geschwenkt und 10 min bei 37° C inkubiert. In dem Accutase-Reagenz waren proteolytische und kollagenolytische Enzyme enthalten, welche die Zellen vom Boden der Kulturflasche ablösten. Diese Reaktion wurde dann durch Zugabe von 6 ml Medium gestoppt und die Zellen auf zwei Zellkulturflaschen mit zusätzlich nochmal je 15 ml Medium aufgeteilt. Zum Einfrieren von H441-Zellen wurden pro Zellkulturflasche drei Kryoröhrchen und als Einfriermedium 500 µl DMSO in 9,5 ml Medium auf Eis vorgekühlt und dann die Zellen wie zuvor beschrieben mit Accutase abgelöst. Die Zellsuspension wurde anschließend auf 20 ml Medium gegeben und bei 139 g und 4°C 5-10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 3-5 ml Einfriermedium resuspendiert und auf die drei Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden zwischen 4 h und 1 d bei -80°C eingefroren und danach in Flüssigstickstoff zur weiteren Lagerung verbracht. Das Auftauen erfolgte im Wasserbad bei 37°C, wobei die Röhrchen zum Entlüften aufgedreht waren. Nach anschließender Desinfektion der Röhrchen konnte die Zellsuspension in 15 ml Medium gegeben und zentrifugiert werden (8 min, 172 g, RT). Es folgte die Resuspendierung der Pellets in 15 ml vorgewärmtem Medium, welches dann in die Zellkulturflasche pipettiert und diese zur Kultivierung in den Brutschrank gestellt wurde.

Für die Aussaat der H441-Zellen wurden diese zunächst wie bei der Passage (s.o.) abgelöst. Dann wurde 10 ml Medium pro Flasche hinzu gefüllt und je 5 ml auf Petrischalen mit Durchmesser 6 cm gegeben. Bis zu der benötigten Konfluenz von 70-80% wuchsen die Zellen zwischen 3 und 6 Tagen.

Für die Stimulation wurde TNF $\alpha$  in einer Konzentration von 10 ng/ml verwendet. Als Vehikel und Kontrolle diente H441-Kulturmedium (vgl. Tabelle 12). Je Petrischale wurden 7 ml Medium bzw. Stimulanz nach Spülung mit PBS<sup>-</sup> aufgebracht. Die Inkubationszeit betrug 20 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Nach Ablauf der Zeit zog man das Stimulanz bzw. das Medium ab und gab 3 ml PBS<sup>-</sup> auf den Zellrasen. Nun konnte man mit einem Zellschaber (3008, Corning Incorporated, Mexico) vorsichtig die adhärennten Zellen lösen und zur Aufbereitung für die FACS-Analyse durch ein Zellsieb in ein großes Reaktionsgefäß

pipettieren. Die Zellen wurden dabei mithilfe eines Spritzenkonus durch das Sieb gegeben und dieses mit insgesamt 22 ml PBS<sup>-</sup> fraktioniert gespült, sodass sich ein Endvolumen von 25 ml ergab. Anschließend wurde die Zellsuspension (ein Gefäß je ausgesäeter Petrischale) mit 292 g 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1500 µl FP (vgl. Tabelle 4, S.32) resuspendiert, dann auf Eis zwischengelagert.

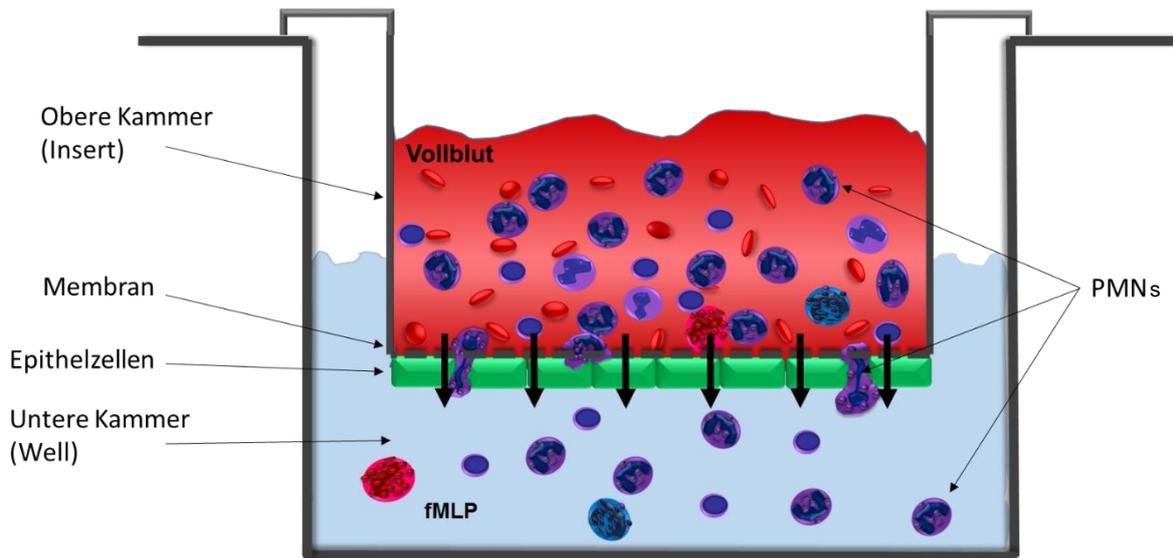
Die Verdünnung und das Vorlegen der Antikörper für die FACS-Färbung erfolgte gemäß dem Vorgehen im Vollblutstimulationsversuch (vgl. 2.2, S.45). Da ausschließlich Epithelzellen in der Zellsuspension vorhanden waren, mussten diese nicht extra markiert werden. 100 µl Zellsuspension wurde je FACS-Röhrchen mit vorgelegtem Antikörper pipettiert, dann mit dem Vortex homogenisiert und kurz anzentrifugiert (vgl. 2.1.2, S.33). Die Inkubation erfolgte im Kühlschrank bei 4°C für 30 Minuten. Nach Beendigung wurden die Proben 2x mit Färbepuffer „gewaschen“ (vgl.2.1.4, S.40) und zuletzt 300 µl PBS<sup>-</sup> hinzugegeben. Auch hier wurde stichprobenartig eine Identifizierung der vitalen Zellen mittels 7AAD- Färbung vorgenommen (vgl. 2.2, S.45).

Die Messung und Analyse erfolgte im FACSCanto II mit der zugehörigen Software sowie der FlowJo-Software. Von den vitalen Epithelzellen wurde die MFI der jeweiligen Adhäsionsmoleküle bestimmt, ebenfalls der prozentuale Anteil positiver Zellen (Frequency of parent).

## **2.4 Migration von PMNs in vitro: Transmigrationsversuch mit humanen pulmonalen Epithelzellen (H441) und humanem Vollblut**

In diesem Versuch wurde die Adhäsionsmolekülexpression auf PMNs unter Einfluss der Migration in vitro untersucht. Hierfür wurden im Vollblut befindliche Granulozyten durch einen Chemokingradienten dazu veranlasst, einen Epithelzell-Monolayer zu durchwandern. Anschließend wurden die nicht migrierten, die im Zelllayer adhären sowie die migrierten PMNs durchflusszytometrisch analysiert.

H441-Zellen wurden wie in 2.3 beschrieben kultiviert, zum Aussähen mit PBS<sup>-</sup> gespült und mit 4 ml Accutase abgelöst. 2 ml dieser Accutase-Zell-Suspension wurden dann abgenommen und auf 10 ml mit Medium (vgl. Tabelle 12, S.48) aufgefüllt. Mit dieser Zellsuspension wurde die Transwell-Platte (3472, Corning Incorporated, Kennebunk, USA) bestückt. Diese enthielt 4x6 Vertiefungen (Wells), die mittleren 12 Wells beinhalteten je einen Einsatz (Insert), deren Boden eine 3 µm dünne Membran bildete. Auf die umgedrehten Inserts wurden 100 µl Zellsuspension aufgebracht, sodass die Epithelzellen sich an der Unterseite der Membran anhefteten. Die PMNs konnten dadurch im späteren Versuch den Gegebenheiten im lebenden Organismus entsprechend von basolateral nach apikal durch den Epithelzellverbund migrieren (vgl. Abbildung 8, S.50).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Transmigrationsversuchs.** In der unteren Kammer befindet sich ein Stimulanz (*N*-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine, fMLP), welches einen Chemokingradienten zwischen oberer und unterer Kammer schafft. Dadurch werden PMNs und andere Leukozyten zur Migration durch die Epithelzellschicht veranlasst. (eigene Darstellung)

Am Folgetag der Aussaat wurden die Inserts umgedreht und in die mittleren Wells gesetzt, welche mit 1 ml Medium befüllt waren. Auf die apikale Seite der Membranen, also in die Inserts hinein, gab man zum Schluss noch 2 Tropfen Medium und ließ die Zellen dann bis zur vollständigen Konfluenz ca. 5 Tage wachsen.

War diese erreicht, wurde von einem gesunden Probanden 10 ml Blut aus der Cubitalvene in eine Citrat-Monovette entnommen. Die äußeren 12 Wells wurden mit je 900 µl Stimulanz befüllt. Hierbei handelte es sich um *N*-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP, F3506, Sigma Aldrich, Steinheim) in einer Konzentration von 20 ng/ml, verdünnt in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS<sup>-</sup>, 14175-053, life technologies, Grand Island, USA). Dann wurden die Inserts zweimal in HBSS<sup>-</sup> gespült und in die äußeren Wells gesetzt. Je Einsatz wurden 200 µl Vollblut hinein pipettiert und die Platte für 4h bei 37°C und 50 rpm im Schüttler-Inkubator inkubiert. Um ein zu starkes Absetzen des Hämatokrits zu vermeiden, wurde das Blut in den Inserts jede Stunde vorsichtig mit einer Pipette rehomogenisiert.

Nach Ablauf der 4h wurde zur Gewinnung der nicht migrierten PMNs das Blut aus den Inserts in je 10 ml Reaktionsgefäße pipettiert und die apikalen Membranflächen je zweimal mit 200 µl HBSS<sup>-</sup> gespült und dem Blut hinzugefügt. Dann konnten die leeren Inserts mit der Pinzette in die freien mittleren Wells verbracht werden. Zur Gewinnung der migrierten PMNs pipettierte man nun die fMLP-Zellsuspension aus den äußeren Wells ebenfalls in 10 ml Reaktionsgefäße und spülte zweimal mit 300 µl HBSS<sup>-</sup> nach, um Verlust von Zellmaterial zu

vermeiden. Beide Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (500 g, 10 min, RT), der Überstand abgenommen und die Pellets in FACS-Lysing Solution resuspendiert, da auch in die Fraktion der migrierten PMNs teilweise Erythrozyten gelangten. Auf die Blutpellets gab man 3 ml der Lyse, bei den Pellets der migrierten Zellen reichten bei nur sehr geringem Erythrozytenanteil 1 ml aus. Nach 10 min Inkubation wurde erneut bei 500 g und RT für 5 min zentrifugiert. Der rote Überstand mit den lysierten Erythrozyten wurde abpipettiert und zum Waschen 2 ml FP (vgl. Tabelle 4, S.32) hinzugegeben und mittels Vortex homogenisiert. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (500 g, 5 min, RT); anschließend konnten die Pellets nach Abnehmen des Überstandes in 100 µl FP resuspendiert und bis zur FACS-Färbung auf Eis gelagert werden. Zur Gewinnung der im Zellrasen adhären PMNs wurde in die mittleren Wells mit den Inserts je 800 µl Accutase gegeben und die Platte für 10 min im Schüttler-Inkubator bei 37°C und 70 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Platte leicht seitlich geschüttelt, um letzte Zellen von der Membran abzulösen, dann konnten die Einsätze entfernt werden. Je Well wurden nun 2 ml Medium hinzugefügt, um die Accutase zu neutralisieren. Die Zellsuspension aus Epithelzellen und PMNs wurde in 10 ml Reaktionsgefäße pipettiert und die Wells zweimal mit 800 µl HBSS<sup>-</sup> nachgespült. Nach 10 min Zentrifugation mit 500 g bei RT wurde auch dieses Zellpellet nun in 100 µl FP resuspendiert und auf Eis gestellt. Zum Auszählen der Zellen wurden je 10 µl der Suspensionen in 10 µl Türk'sche Lösung gegeben, davon wiederum 10 µl zum Auszählen verwendet. Durch Zugabe von Färbepuffer wurde die Leukozytenzahl aller Proben dann auf  $10^4/100\mu\text{l}$  eingestellt.

Die in 2.2 und 2.3 verwendeten Antikörper der Adhäsionsmoleküle sowie die AK zur PMN-Markierung kamen in diesem Versuch in gleicher Konzentration zum Einsatz (vgl. Tabelle 11, S.45). Sie wurden in FP verdünnt und in die FACS-Röhrchen unter Lichtschutz vorgelegt, dann je Röhrchen 50 µl Probe hinzugegeben. Nach Homogenisierung mittels Vortex und kurzem Anzentrifugieren folgte eine 30 minütige Inkubation bei 4°C im Dunkeln. Nach Ablauf der Zeit wurden je Röhrchen 2 ml FP hinzugegeben und 5 min bei 4°C und 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und dieser Waschvorgang wiederholt. Dann applizierte man je Probe 200 µl CellFix und verwahrte diese bis zur durchflusszytometrischen Analyse am nächsten Tag abgedeckt im Kühlschrank.

Die Messung erfolgte im FACSCanto II mit der zugehörigen Software von BD. Zur Analyse der gewonnenen Daten wurde wie bei den anderen Versuchen die FlowJo-Software verwendet. (vgl. 2.1.4, S.402.1.2). Neben der MFI wurde auch hier ebenfalls der Anteil positiver PMNs (Frequency of parent) bestimmt.

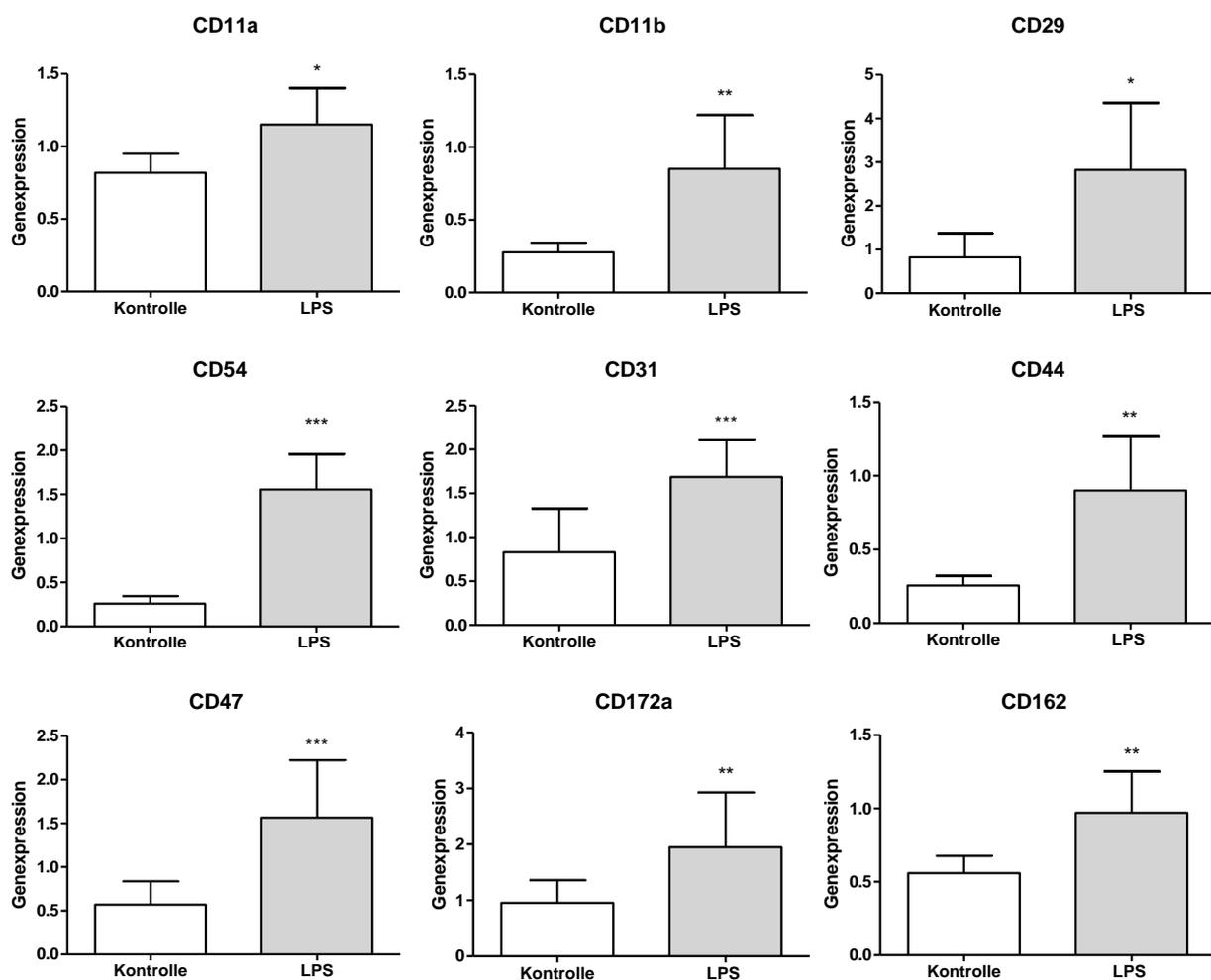
## 2.5 Statistik

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Graph Pad Prism 5.0 von Graph Pad Software, San Diego, USA. Ausgehend von einer Normalverteilung der Werte wurden Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Zur Ermittlung der Signifikanz wurden one-way Analysis of Variance (ANOVA) und folgend Bonferroni's post Test sowie der unpaired t-test zum Vergleich zweier Populationen herangezogen. Ein p- Wert von  $< 0,05$  wurde hierbei als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Adhäsionsmoleküle in murinen Lungen: RT-qPCR

Zur Untersuchung der Auswirkung einer pulmonalen Inflammation auf die Transkription der Adhäsionsmoleküle im murinen Lungengewebe wurden die Organe 3h nach LPS-Inhalation entnommen, die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und eine RT-qPCR durchgeführt. Die LPS-behandelten Lungen zeigten, wie in Abbildung 9 dargestellt, eine signifikant höhere Transkriptionsrate aller neun untersuchten Moleküle, als die Lungen der Kontrollgruppe.



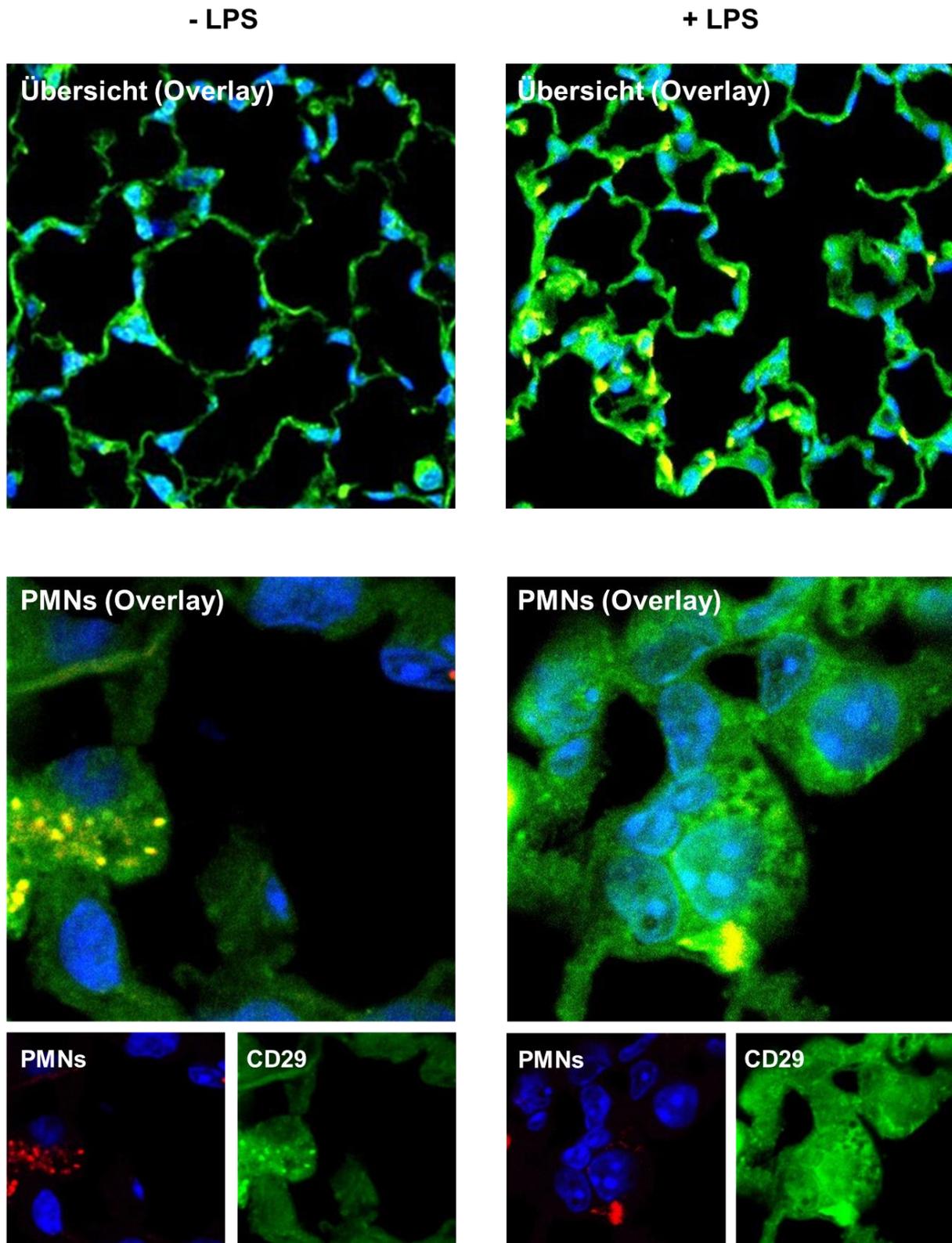
**Abbildung 9: Genexpression der Adhäsionsmoleküle im murinen Lungengewebe** nach Inhalation von PBS (Kontrolle) und LPS. Bei allen untersuchten Molekülen ließ sich eine Zunahme der Transkriptionsrate in den mit LPS behandelten Lungen verzeichnen. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p > 0,01$ , \*\* $p > 0,001$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 6-9$ .

(**CD11a**: Kontrolle  $0,82 \pm 0,13$  vs. LPS  $1,15 \pm 0,25$  mit  $p < 0,01$ ; **CD11b**: Kontrolle  $0,28 \pm 0,07$  vs. LPS  $0,85 \pm 0,37$  mit  $p < 0,001$ ; **CD29**: Kontrolle  $0,82 \pm 0,55$  vs. LPS  $2,82 \pm 1,53$  mit  $p < 0,01$ ; **CD54**: Kontrolle  $0,26 \pm 0,09$  vs. LPS  $1,56 \pm 0,40$  mit  $p < 0,0001$ ; **CD31**: Kontrolle  $0,83 \pm 0,50$  vs. LPS  $1,69 \pm 0,43$  mit  $p < 0,0001$ ; **CD44**: Kontrolle  $0,26 \pm 0,07$  vs. LPS  $0,90 \pm 0,37$  mit  $p < 0,001$ ; **CD47**: Kontrolle  $0,57 \pm 0,27$  vs. LPS  $1,57 \pm 0,66$  mit  $p < 0,0001$ ; **CD172a**: Kontrolle  $0,956 \pm 0,40$  vs. LPS  $1,95 \pm 0,98$  mit  $p < 0,001$ ; **CD162**: Kontrolle  $0,56 \pm 0,12$  vs. LPS  $0,97 \pm 0,29$  mit  $p < 0,001$ ).

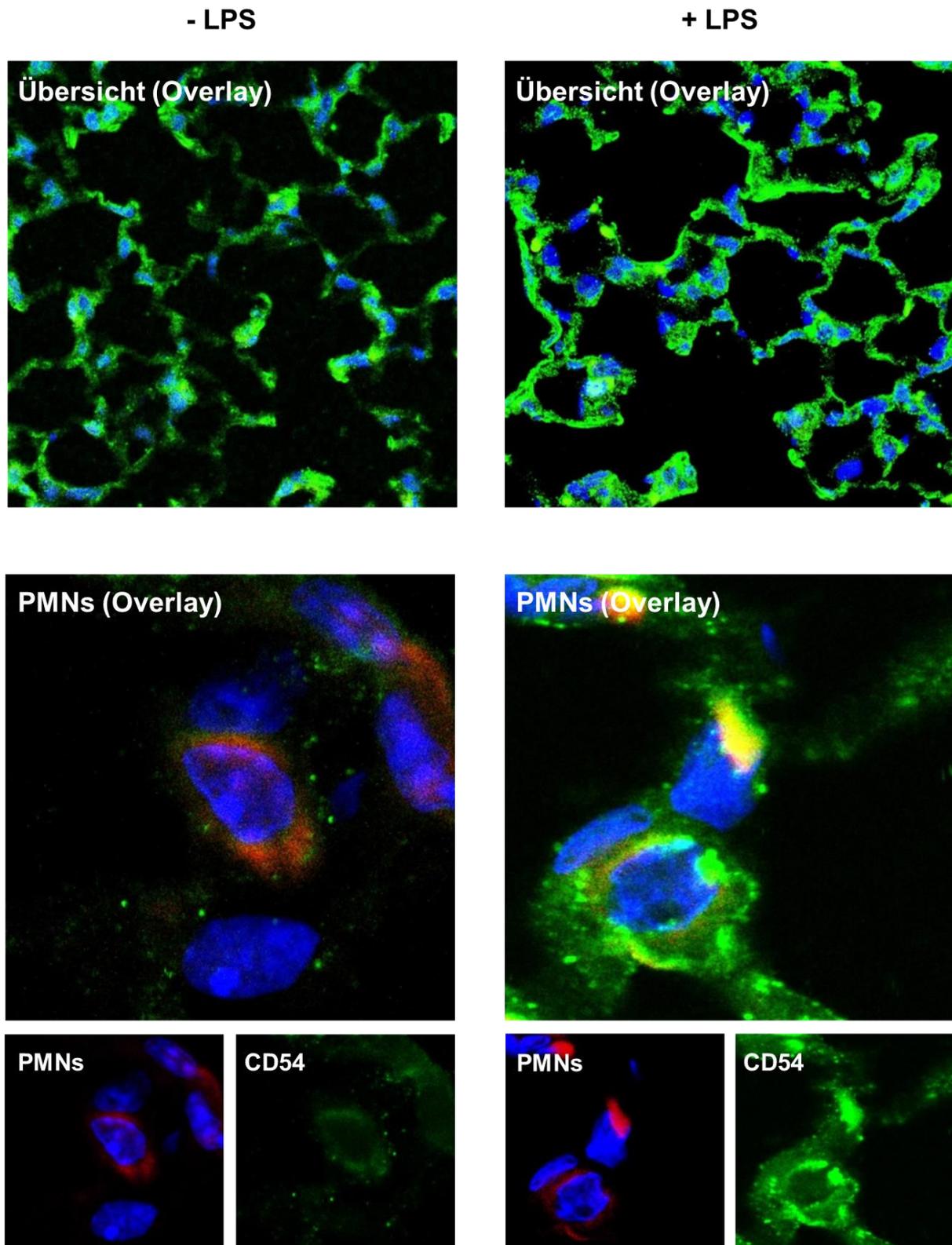
### 3.2 Adhäsionsmoleküle in murinen Lungen: Immunfluoreszenz

Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurden exemplarisch die Adhäsionsmoleküle CD54, CD29 und CD31 in histologischen Schnitten von murinem Lungengewebe dargestellt. Während eine Gruppe von Tieren mit LPS vernebelt wurde, erhielt, wie bei allen durchgeführten in vivo-Versuchen, die Kontrollgruppe PBS zur Inhalation. Das Zielantigen wurde jeweils grün angefärbt, die PMNs rot und die Zellkerne blau. Neben den PMNs zeigte auf den Bildern auch das Lungenparenchym eine grüne Fluoreszenz, da alle drei Adhäsionsmoleküle ebenfalls von diesem exprimiert werden (vgl. 1.4.4, S.20, 1.4.5, S.21 und 1.4.6, S.23).

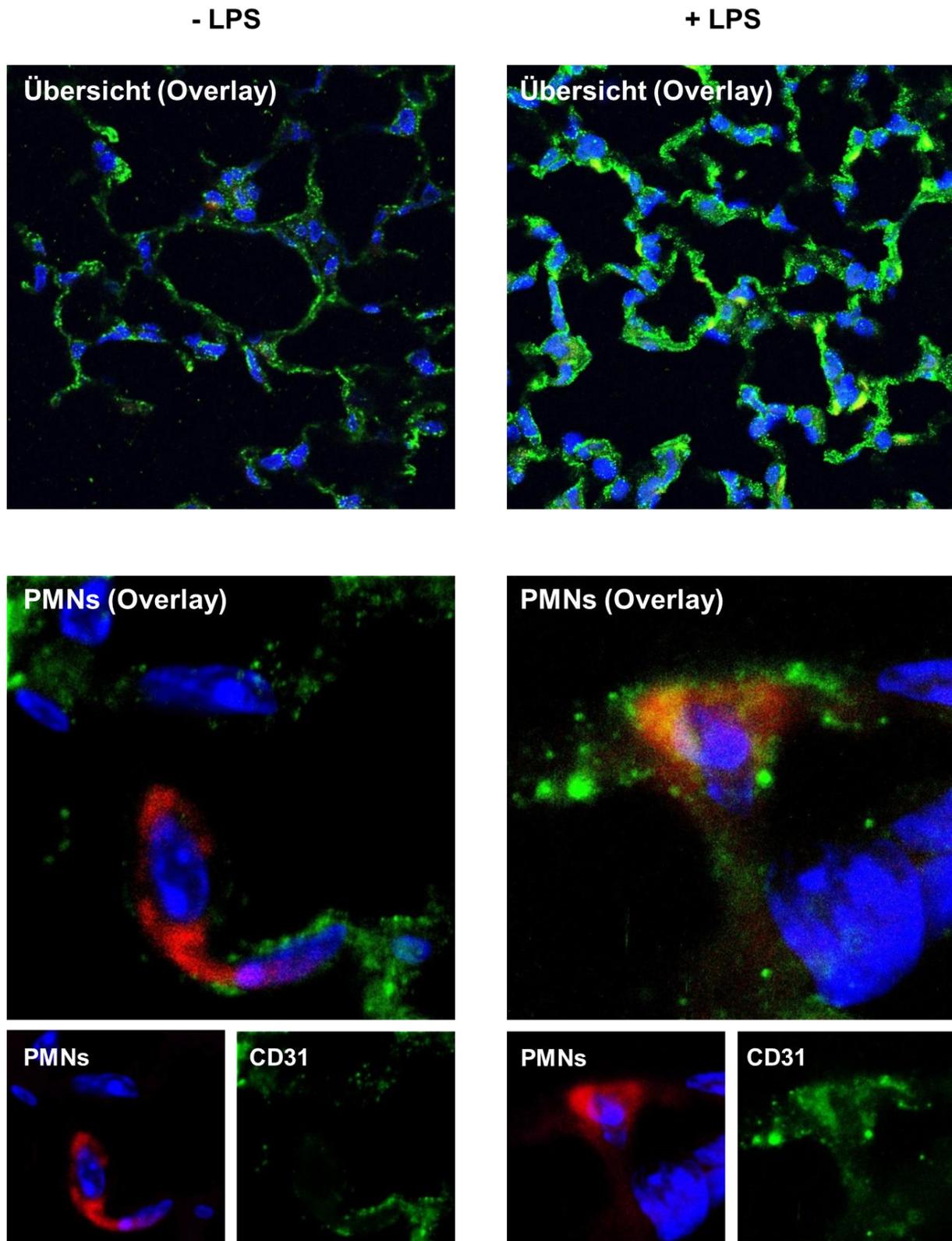
In den LPS-behandelten Organen leuchtete das Lungengewebe im Vergleich zu den Lungen der Kontrollgruppe verstärkt grün, was auf eine Zunahme der Adhäsionsmolekülexpression durch die Stimulation schließen lässt. Auch bei den einzelnen PMNs konnte man nach LPS-Inhalation eine vermehrte grüne Fluoreszenz beobachten (vgl. Abbildung 10, S.55; Abbildung 11, S.56 und Abbildung 12, S.57). Während die Ergebnisse der Lungen-PCRs (vgl. 3.1, S.53) die gesteigerte Genexpression quantifizieren, zeigen die vorliegenden Immunfluoreszenzfärbungen die damit einhergehende Steigerung der Proteinexpression in murinen Lungen und auf intrapulmonalen PMNs nach LPS-Exposition.



**Abbildung 10: Murine Lungenschnitte mit immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung von CD29.** Linke Spalte: Kontrolltiere (-LPS), rechts: LPS-vernebelte Lunge (+LPS). Im „Overlay“ sind jeweils PMN- (rot), Kern- (blau) und CD29-Färbung (grün) überlappend dargestellt. Die oberen großen Bilder zeigen eine Übersicht der Alveolarstruktur (64x Vergrößerung, 2x Zoom). Die großen Bilder unterhalb zeigen einzelne PMNs (64x Vergrößerung, 6x Zoom). Auf den kleinen Bildern zu unterst sind die gleichen PMNs und das Adhäsionsmolekül separat dargestellt: jeweils links die PMNs (rote Granula mit blauem Kern) sowie rechts die CD29 positiven Strukturen (grün). n=2.



**Abbildung 11: Murine Lungenschnitte mit immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung von CD54.** Linke Spalte: Kontrolltiere (-LPS), rechts: LPS-versebelte Lunge (+LPS). Im „Overlay“ sind jeweils PMN- (rot), Kern- (blau) und CD54-Färbung (grün) überlappend dargestellt. Die oberen großen Bilder zeigen eine Übersicht der Alveolarstruktur (64x Vergrößerung, 2x Zoom). Die großen Bilder unterhalb zeigen einzelne PMNs (64x Vergrößerung, 6x Zoom). Auf den kleinen Bildern zu unterst sind die gleichen PMNs und das Adhäsionsmolekül separat dargestellt: jeweils links die PMNs (rote Granula mit blauem Kern) sowie rechts die CD54 positiven Strukturen (grün). n=2.



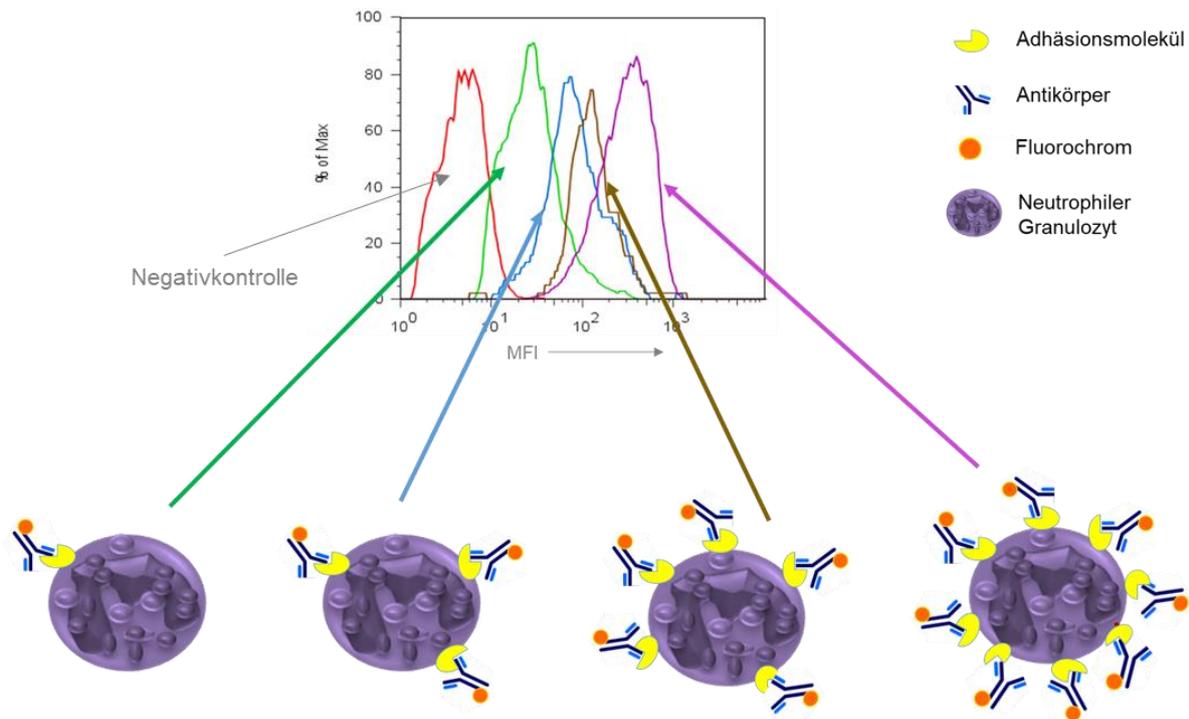
**Abbildung 12: Murine Lungenschnitte mit immunhistochemischer Fluoreszenzfärbung von CD31.** Linke Spalte: Kontrolltiere (-LPS), rechts: LPS-vernebelte Lunge (+LPS). Im „Overlay“ sind jeweils PMN- (rot), Kern- (blau) und CD31-Färbung (grün) überlappend dargestellt. Die oberen großen Bilder zeigen eine Übersicht der Alveolarstruktur (64x Vergrößerung, 2x Zoom). Die großen Bilder unterhalb zeigen einzelne PMNs (64x Vergrößerung, 6x Zoom). Auf den kleinen Bildern zu unterst sind die gleichen PMNs und das Adhäsionsmolekül separat dargestellt: jeweils links die PMNs (rote Granula mit blauem Kern) sowie rechts die CD31 positiven Strukturen (grün). n=2.

### 3.3 Migration von PMNs in vivo: Durchflusszytometrie

Um die Expression der Adhäsionsmoleküle auf PMNs in den unterschiedlichen Kompartimenten der Lunge im Verlauf der Migration zu vergleichen, wurde bei Mäusen mittels LPS-Inhalation eine pulmonale Inflammation induziert. Die Neutrophilen Granulozyten aus Blut, Lunge und Bronchiallavage wurden anschließend durchflusszytometrisch untersucht. Durch Markierung mittels spezifischen Antikörpern konnten die intrapulmonalen PMNs zweifach hinsichtlich ihres Migrationsstadiums differenziert werden. Somit wurden insgesamt vier unterschiedliche Migrationsstadien bzw. Kompartimente unterschieden: Intravasal (IV), am Endothel adhärirt (END), interstitiell (IS) und intraalveolär (BAL).

Die Frequency of parent besagt, wieviel Prozent der PMNs im jeweiligen Kompartiment das Adhäsionsmolekül exprimieren, also positiv sind (vgl. Abbildung 6E, S.44). Ist der Anteil positiver PMNs für das jeweilige Adhäsionsmolekül hoch, gehen wir von einer Bedeutung des Moleküls für den entsprechenden Migrationsschritt aus.

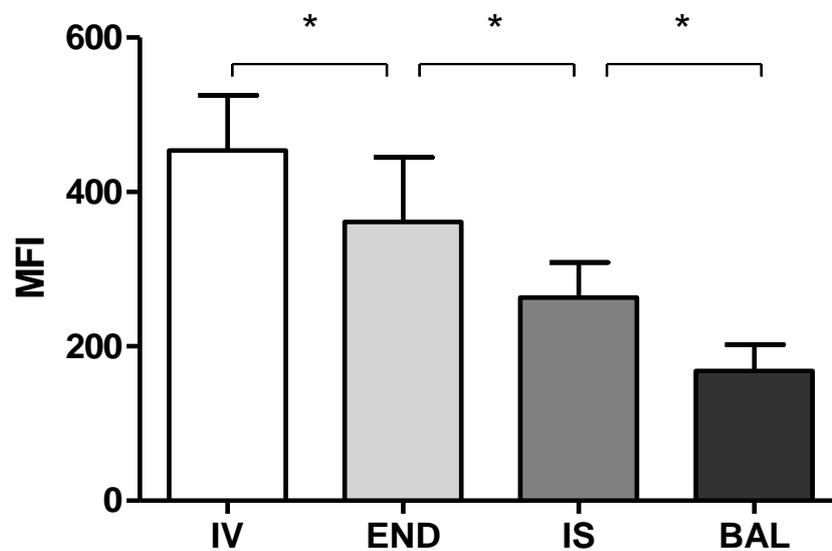
Die Intensität des fluoreszierenden Farbstoffes wurde ebenfalls gemessen und gibt anhand der MFI indirekt Auskunft über die Stärke der Oberflächenexpression des jeweiligen Adhäsionsmoleküls auf den einzelnen PMNs. In Abbildung 13, S.59 ist dies zum besseren Verständnis grafisch veranschaulicht. Eine hohe MFI ist auf eine hohe Anzahl gebundener Antikörper, die mit dem Fluorochrom konjugiert sind, zurückzuführen. Dadurch wiederum kann auf eine hohe Expression des jeweiligen Adhäsionsmoleküls auf der PMN-Oberfläche geschlossen werden. Je höher die MFI, desto größer also die Bedeutung des Moleküls für den jeweiligen Migrationsschritt. Ist gleichzeitig die Frequency of parent bzw. der Anteil positiver Zellen hoch, unterstreicht dies eine kritische Rolle des Adhäsionsmoleküls im jeweiligen Kompartiment.



**Abbildung 13: Interpretation der Medianen Fluoreszenz Intensität.** Beispiel anhand der Daten von CD172a aus den *in vivo* Versuchen in der FACS-Auswertung. Ein Peak im Histogramm entspricht einer PMN-Population in einem Kompartiment. Je höher der Besatz an fluoreszierenden Antikörpern, desto höher die gemessene MFI, desto höher die Dichte an Adhäsionsmolekülen auf jedem PMN dieser Population. Grün=PMNs intravasal (IV) mit der geringsten MFI, Blau=PMNs am Endothel (END), Braun=PMNs im Interstitium (IS), Violett=PMNs in der Alveole (BAL) mit der höchsten MFI. (eigene Darstellung)

### 3.3.1 CD11a

Im Laufe der Durchwanderung der Kompartimente von intravasal (IV) über endothelial adhärnt (END) durch das Interstitium (IS) bis in die Alveole (BAL) konnte mit jedem Migrationsschritt eine signifikante Abnahme der MFI und somit des Expressionsgrades von CD11a auf der PMN-Oberfläche beobachtet werden (vgl. Abbildung 14). Schließlich stellte die Alveole den Ort der geringsten Expression dar (IV  $453,9 \pm 71,15$  vs. END  $362,5 \pm 83,11$  vs. IS  $263,3 \pm 45,18$  vs. BAL  $168,4 \pm 33,68$ ).

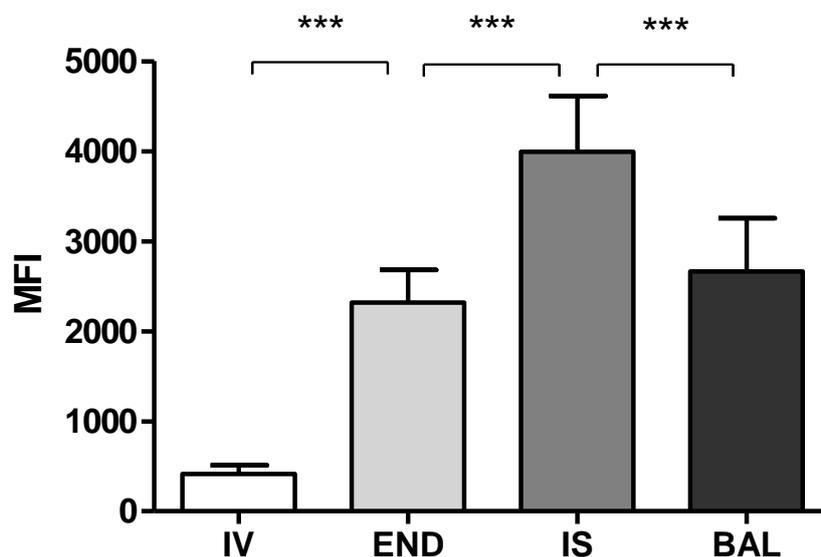


**Abbildung 14: CD11a-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimente der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhärenente PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL= PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, \* $p < 0,05$ ,  $n \geq 8$ .

Die Frequency of parent, also die prozentuale Anzahl CD11a positiver PMNs (vgl. Abbildung 6E, S.44), zeigte in den Migrationsschritten von Endothel zu Interstitium zu Intraalveolär eine Abnahme (END  $99,75 \pm 0,46\%$  vs. IS  $97,25 \pm 1,39\%$  vs. BAL  $94,50 \pm 2,51\%$ ). Das heißt, im Verlauf der Migration durch die Lunge nahm der Anteil CD11a positiver Neutrophiler ab. Zwischen zirkulierenden PMNs und endothelialen Zellen konnte kein Unterschied in der Frequency of parent festgestellt werden, in beiden Kompartimenten waren nahezu alle Neutrophilen CD11a positiv (IV  $98,22 \pm 3,44\%$  vs. END  $99,75 \pm 0,46\%$ ). Da stets zwischen 94,5 und 99,75% der PMNs positiv und die Unterschiede zwar signifikant, aber insgesamt gering waren, wird an dieser Stelle auf eine grafische Darstellung verzichtet. Alle Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung mit  $p < 0,05$  und  $n \geq 8$ .

### 3.3.2 CD11b

Wie in Abbildung 15 dargestellt, änderte sich die Mediane Fluoreszenz Intensität des CD11b-Antikörper-konjugierten Fluorochroms im Laufe der Migration der PMNs in die Alveole. Die Expression auf dem Weg ins Interstitium stieg dabei sukzessive an (IV  $414,70 \pm 97,58$  vs. END  $2321,00 \pm 358,80$  vs. IS  $3992,00 \pm 623,60$ ) und erreichte dort ihr Maximum. Anschließend nahm die Expression von CD11b auf den PMNs nach Überschreiten der alveolären Barriere wieder ab (IS  $3992,00 \pm 623,60$  vs. BAL  $2265,00 \pm 592,90$ ). Somit war der Ort der stärksten CD11b-Expression auf der PMN-Oberfläche das Lungeninterstitium.

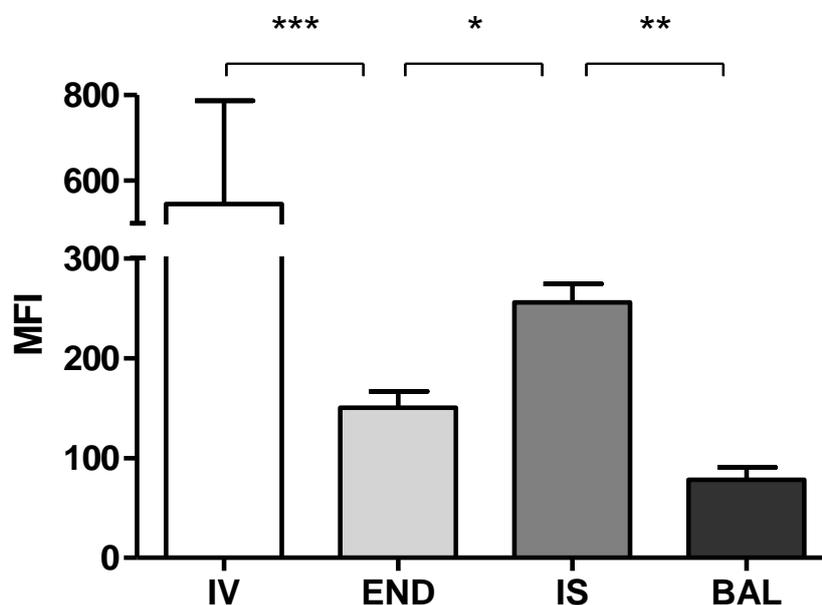


**Abbildung 15: CD11b-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimente der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhärenente PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL= PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 10-16$ .

Der Anteil CD11b positiver PMNs an der Gesamtheit aller PMNs des jeweiligen Kompartimentes der Lunge veränderte sich nur geringfügig und nicht signifikant, nahezu alle PMN trugen das Adhäsionsmolekül auf ihrer Oberfläche (IV  $99,54 \pm 0,80\%$ , END  $97,56 \pm 1,79\%$ , IS  $99,06 \pm 0,60\%$ , BAL  $99,8 \pm 0,43\%$ ). Aus diesem Grund wird an dieser Stelle auf eine grafische Darstellung verzichtet; alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, bei IV ist  $n = 10$ , bei END, IS und BAL entspricht  $n = 16$ .

### 3.3.3 CD29

Die Veränderungen der CD29-Expression auf der PMN-Oberfläche während der Migration von intravasal nach intraalveolär sind in Abbildung 16 dargestellt. Während die MFI des Adhäsionsmolekül-AK im zirkulierenden Blut am stärksten war, zeigte sie am Endothel eine Abnahme, gefolgt von einem erneuten Anstieg im Interstitium nach Durchwanderung der endothelialen Barriere (IV  $545,30 \pm 241,30$  vs. END  $159,30 \pm 53,38$  vs. IS  $255,70 \pm 58,46$ ). Schließlich zeigte sich in der Alveole die geringste MFI und somit geringste Expression von CD29 auf den PMNs ( $78,30 \pm 42,31$ ).

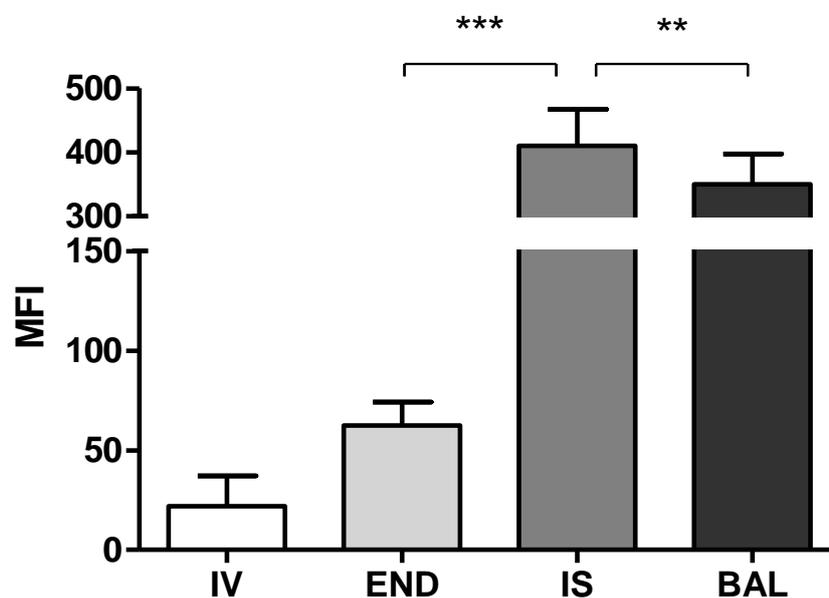


**Abbildung 16: CD29 -Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimente der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhärenente PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL= PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=8$ .

Der Anteil CD29 positiver PMNs an der Gesamtheit aller PMNs belief sich in allen vier Kompartimenten auf über 90%, weshalb an dieser Stelle auf eine grafische Darstellung verzichtet wird. Es fanden sich eine Zunahme der Anzahl von am Endothel adhärenent zu interstitiell (END  $94,18 \pm 3,38$  vs. IS  $97,46 \pm 1,50$ ), sowie eine Abnahme des Anteils nach Durchwanderung der epithelialen Barriere zu Alveole (IS  $97,46 \pm 1,50$  vs. BAL  $92,59 \pm 0,81$ ). Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $p < 0,005$  und  $n=8$ .

### 3.3.4 CD54

Die Expression von CD54 auf der PMN-Oberfläche veränderte sich im Laufe der Migration durch die Lungenkompartimente, wie in Abbildung 17 dargestellt. Die MFI nahm vom Endothel ins Interstitium signifikant zu (END 62,36±11,84 vs. IS 410,1±57,23), dann mit der Durchwanderung der epithelialen Barriere wieder signifikant ab (IS 410,1±57,23 vs. BAL 350,2±47,22). Zwischen den intravasalen und den endothelialen PMNs fand sich kein signifikanter Anstieg in der CD54 Expression (IV 21,89±15,20 vs. END 62,36±11,84). Somit war das Kompartiment mit der maximalen Expression das Lungeninterstitium.

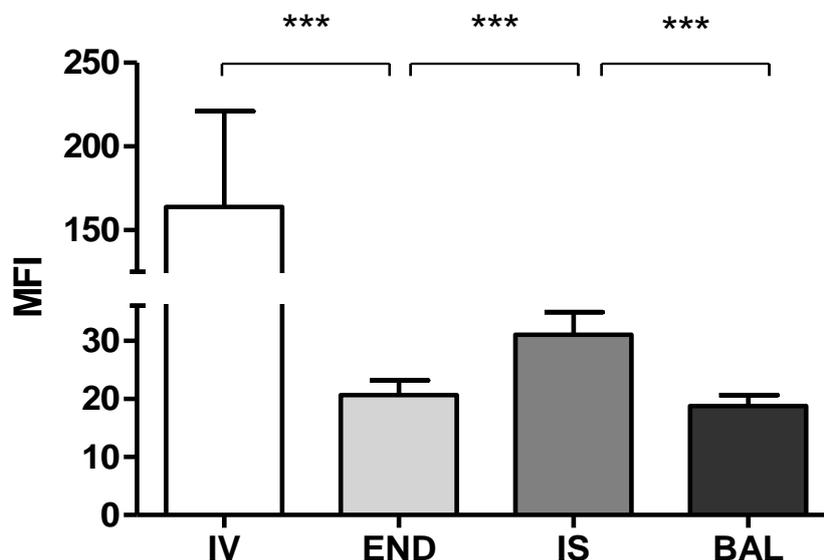


**Abbildung 17: CD54-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimenten der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhärenente PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL: PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n \geq 8$ .

Die intravasalen PMNs wiesen im Anteil CD54-positiver Zellen keinen signifikanten Unterschied zu den am Endothel adhärenente Zellen auf. (IV 85,78±7,376 vs. END 88,43±3,44) Infolge des Migrationsschrittes durch das Endothel ins Interstitium zeigte sich dann ein Anstieg CD54 positiver PMNs (END 88,43±3,44% vs. IS 98,03±0,91), der sich im weiteren Verlauf der Migration nicht mehr signifikant änderte (IS 98,03±0,91 vs. BAL 97,18±1,026), weshalb auch hier auf eine grafische Darstellung verzichtet wird. Die Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung mit  $p < 0,0001$  und  $n = 12$ .

### 3.3.5 CD31

Abbildung 18 zeigt die Veränderungen der Expression von CD31 auf der PMN-Oberfläche im Verlauf der Migration in die Alveole: Während die Mediane Fluoreszenzintensität und somit die Expression von CD31 auf der Granulozytenoberfläche im zirkulierenden Blut am stärksten war, zeigte sie bei den am Endothel adhären PMN eine signifikante Abnahme (IV  $163,9 \pm 57,08$  vs. END  $20,63 \pm 2,571$ ). Es folgte ein erneuter leichter Anstieg von CD31 nach Durchwanderung der endothelialen Barriere ins Interstitium (END  $20,63 \pm 2,571$  vs. IS  $31,03 \pm 3,908$ ). Schließlich war nach Durchwanderung des Alveolarepithels wieder eine verminderte Expression gegenüber dem Interstitium (IS  $31,03 \pm 3,908$  vs. BAL  $18,78 \pm 1,878$ ) vorhanden.

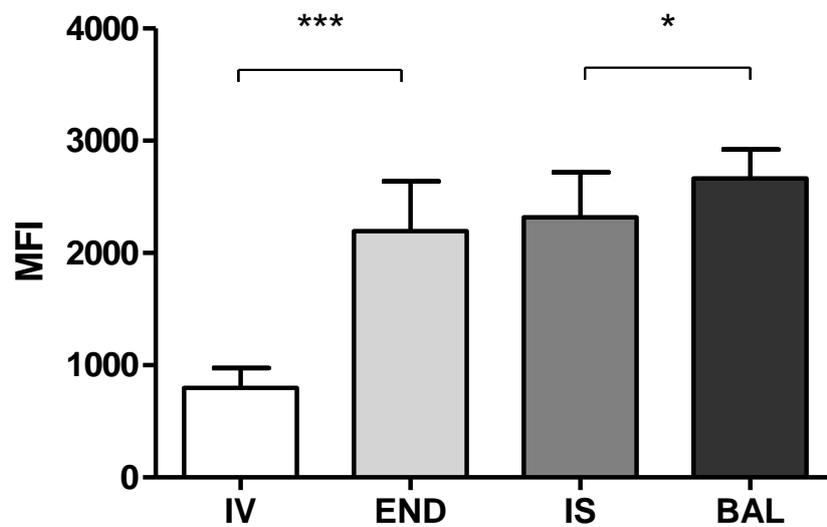


**Abbildung 18: CD31-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimente der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhären PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL: PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n \geq 8$ .

Der Anteil CD31 positiver PMNs veränderte sich im Laufe der Durchwanderung der Lungenkompartimente nicht signifikant, weshalb hier von einer grafischen Darstellung der Werte abgesehen wird. Der Anteil positiver Zellen hielt sich konstant bei über 90% gemessen an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment (IV  $93,53 \pm 3,152$ , END  $91,85 \pm 4,740$ , IS  $92,2 \pm 2,938$ , und BAL  $90,75 \pm 3,291$ ). Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $n \geq 8$ .

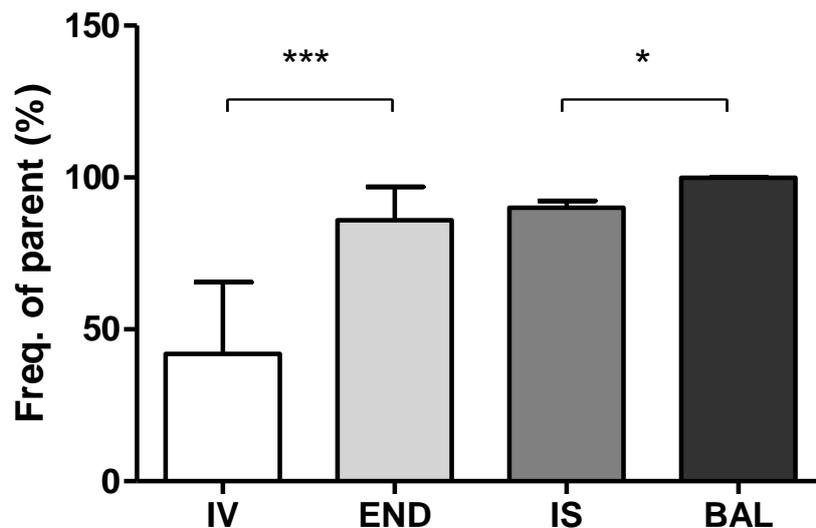
### 3.3.6 CD44

Die Expression des Adhäsionsmoleküls CD44 auf der PMN-Oberfläche zeigte einen graduellen Anstieg im Verlauf der Migration (vgl. Abbildung 19, S.65). Signifikant erhöhte sich die MFI des CD44-Antikörpers zunächst beim ersten Migrationsschritt, der Anheftung ans Endothel (IV  $798,5 \pm 177,9$  vs. END  $2194 \pm 444,4$ ). Auch der Übertritt durch die epitheliale Barriere zeigte eine Zunahme der Expression auf den PMNs (IS  $2320 \pm 397,9$  vs. BAL  $2665 \pm 256,6$ ). Gleichzeitig war die Alveole der Ort der höchsten Expression von CD44.



**Abbildung 19: CD44-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimenten der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhärenente PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL: PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 7-11$ .

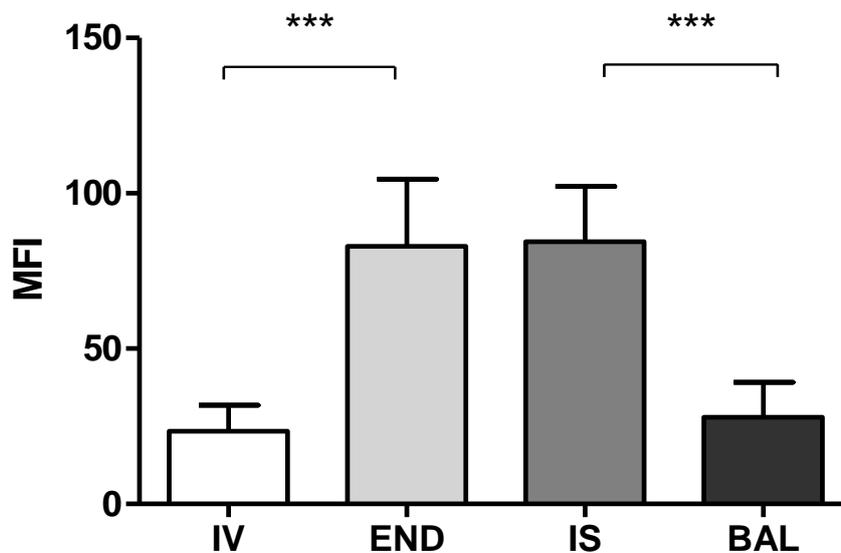
Ähnlich der Zunahme der MFI nahm auch der Anteil CD44 positiver PMN im Verlauf der Migration in die Lunge, wie in Abbildung 20 dargestellt, in zwei Etappen zu. Zunächst erhöhte er sich von  $41,89 \pm 23,67\%$  im zirkulierenden Blut auf  $85,98 \pm 11,01\%$  der am Endothel adhären PMNs. Während der Anteil bei Einwanderung ins Lungeninterstitium im Anschluss nicht signifikant anstieg (END  $85,98 \pm 11,01\%$  vs. IS  $90,08 \pm 2,207\%$ ), nahm er nochmals nach Durchtritt der epithelialen Barriere zu. In der Alveole waren schließlich nahezu alle PMNs CD44 positiv ( $99,97 \pm 0,048\%$ ).



**Abbildung 20: Prozentualer Anteil (Freq. of parent) CD44 positiver PMNs an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment in der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhären PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL: PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n \geq 8$ .

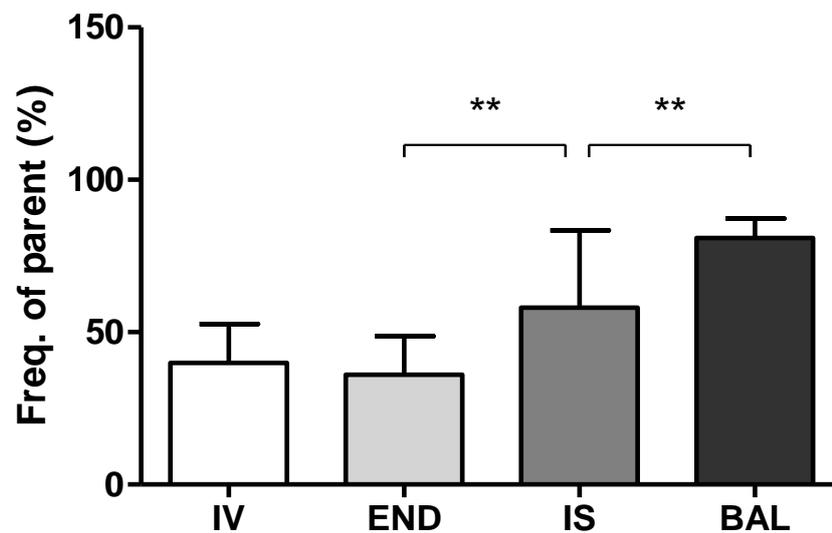
## 3.3.7 CD47

Die Expression von CD47 auf der Granulozytenoberfläche zeigte sich, wie in Abbildung 21 dargestellt, am Endothel und im Interstitium am höchsten. Sie nahm bei der Anheftung ans Endothel signifikant zu (IV  $23,44 \pm 8,408$  vs. END  $82,98 \pm 21,63$ ), blieb bei der Durchwanderung des Interstitiums weitgehend konstant und nahm nach Durchwanderung des Alveolarepithels wieder ab (IS  $84,41 \pm 17,82$  vs. BAL  $27,96 \pm 11,21$ ).



**Abbildung 21: CD47-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimenten der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhärenente PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL: PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 7-11$ .

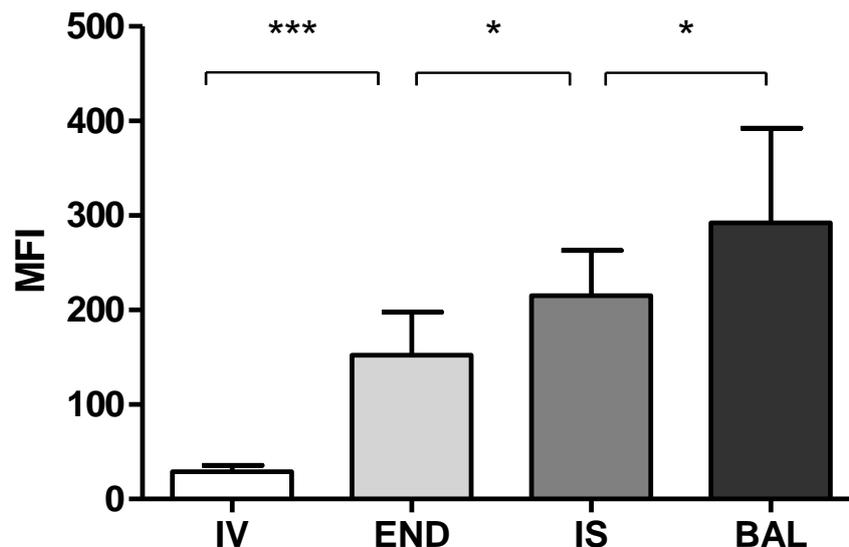
Im Laufe der Migration durch die Lungenkompartimente nahm der Anteil CD47 positiver PMNs, wie in Abbildung 22 dargestellt, zu. Während unter den intravasal zirkulierenden sowie am Endothel adhärenen PMNs weniger als die Hälfte das Adhäsionsmolekül CD47 auf ihrer Oberfläche trugen (IV  $39,91 \pm 12,72\%$  und END  $36,06 \pm 12,61\%$ ), zeigte sich eine signifikante Zunahme im Interstitium und eine weiterer Anstieg nach Durchtritt in den Intraalveolarraum (IS  $58 \pm 25,5\%$  und BAL  $80,88 \pm 6,418\%$ ).



**Abbildung 22: Prozentualer Anteil (Freq. of parent) CD47 positiver PMNs an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment in der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhärenen PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL: PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\* $p < 0,005$ ,  $n \geq 8$ .

### 3.3.8 CD172a

In Abbildung 23 ist der stufenweise Anstieg der MFI von CD172a gezeigt. Die Expression nahm somit in jedem Migrationsschritt sukzessive zu, bis im Intraalveolarraum schließlich das Maximum erreicht wurde (IV  $28,85 \pm 6,91$  vs. END  $152,1 \pm 45,39$  vs. IS  $215,4 \pm 47,87$  vs. BAL  $292,1 \pm 99,97$ ).

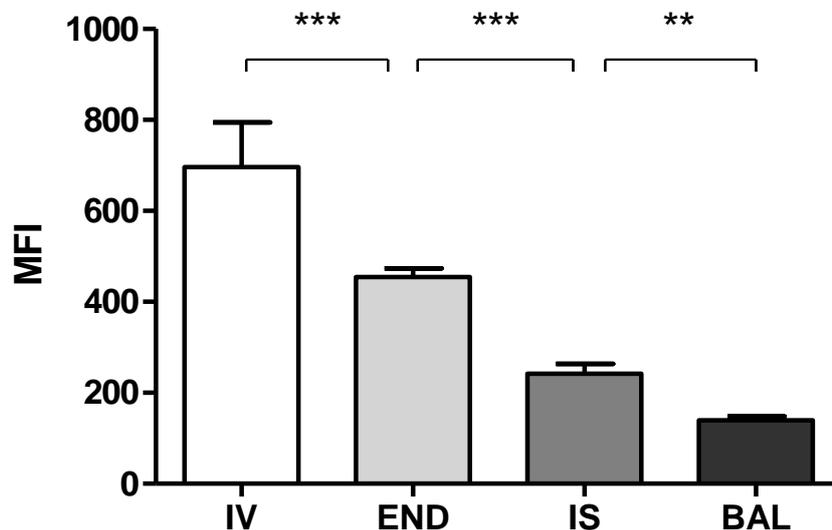


**Abbildung 23: CD172a-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimenten der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhärenente PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL: PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 8-13$ .

Der Anteil CD172a positiver PMNs an der Gesamtheit aller PMNs lag im intravasalen Kompartiment bei  $90,26 \pm 6,87\%$ , stieg dann mit der Adhäsion am Endothel signifikant an auf  $96,98 \pm 2,095\%$  und blieb anschließend auf dem Weg in die Alveole konstant hoch (IS  $97,98 \pm 1,387\%$  und BAL  $98,93 \pm 1,305\%$ ), weshalb an dieser Stelle von einer grafischen Darstellung abgesehen wird. Alle Daten sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $p > 0,005$  und  $n = 8$  bei IV sowie  $n \geq 13$  bei END, IS und BAL.

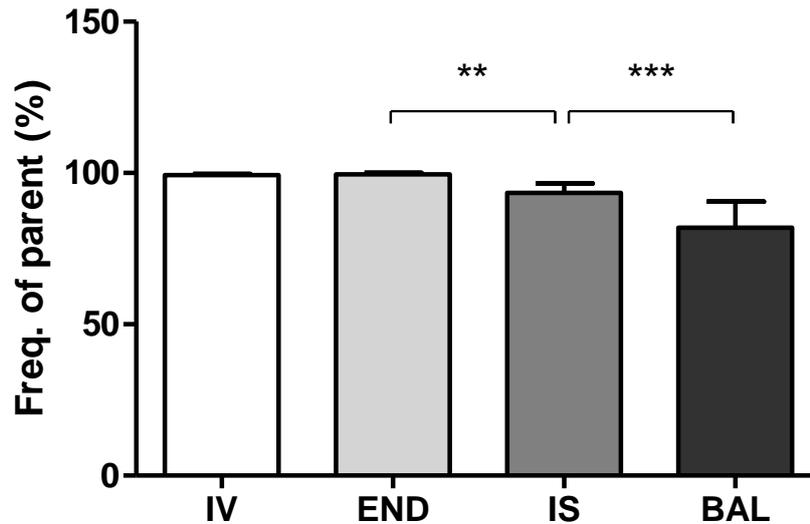
### 3.3.9 CD162

Die Expression von CD162 nahm im Verlauf der Einwanderung in die Alveole stetig ab (vgl. Abbildung 24). Während die MFI des CD162-Antikörpers und somit die Expression des Adhäsionsmoleküls auf den intravasal zirkulierenden PMNs noch bei  $695,9 \pm 98,91$  lag, ließ sich auf den endothelial adhären PMNs nur noch eine MFI von  $454,5 \pm 67,86$  messen. Im Interstitium zeigte sich eine weitere signifikante Minderung der MFI (END  $454,5 \pm 67,86$  vs. IS  $242,5 \pm 74,11$ ), bis schließlich in der Alveole mit  $139,2 \pm 30,58$  das Minimum der Expression erreicht war.



**Abbildung 24: CD162-Expression (MFI) auf PMNs während der Migration durch die unterschiedlichen Kompartimenten der murinen Lunge.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhären PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL: PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 8-11$ .

Wie in Abbildung 25 dargestellt, ging die Migration der Neutrophilen Granulozyten in die Alveole mit einem Rückgang des Anteils CD162 positiver PMNs an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment einher. Während intravasal und am Endothel noch weitgehend alle PMNs das Adhäsionsmolekül trugen (IV 99,28±0,37% und END 99,59±0,41%), sank der Anteil mit Einwanderung ins Interstitium signifikant auf 93,42±3,14% und mit Eintritt in die Alveole um weitere 11,49% auf 81,93±8,58%.



**Abbildung 25: Prozentualer Anteil (Freq. of parent) CD162 positiver PMNs an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment.** IV= Intravasal zirkulierende PMNs; END= am Endothel adhärenente PMNs; IS= PMNs im Lungeninterstitium; BAL: PMNs im Alveolarraum. Alle Angaben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, \*\*p < 0,005, \*\*\*p < 0,0001, n=8-11.

### 3.4 Stimulation von humanem Vollblut

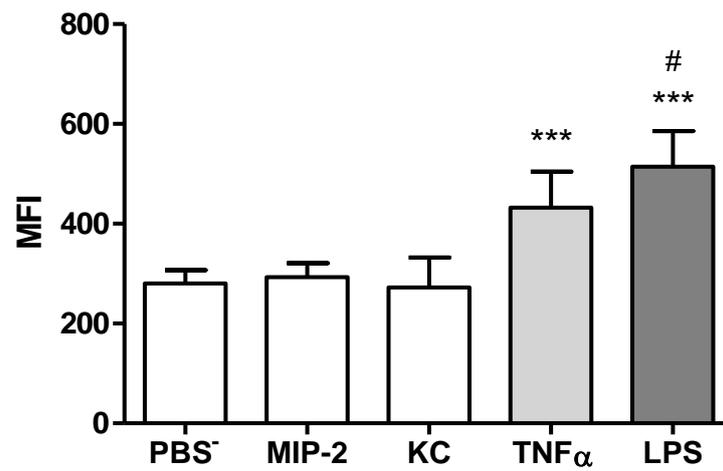
Vollblut von gesunden Probanden wurde mit PBS<sup>-</sup> als Kontrollreagenz und MIP-2, KC, TNF $\alpha$  sowie LPS als Stimulanzen versetzt. Deren Einfluss auf die Expression der verschiedenen Adhäsionsmoleküle an der PMN-Oberfläche wurde anschließend durchflusszytometrisch mittels MFI-Bestimmung quantifiziert. Es zeigte sich bei allen untersuchten Molekülen durch Behandlung mit TNF $\alpha$  und LPS ein Anstieg der MFI des jeweiligen Adhäsionsmolekül-AK-konjugierten Fluorochroms, wobei LPS bei CD11a, CD11b, CD29, CD54, CD47 und CD172a einen signifikant stärkeren MFI-Anstieg als TNF $\alpha$  hervorrief. Bei CD31, CD44 und CD162 war dieser stärkere Anstieg zwar in der Grafik ersichtlich, jedoch nicht statistisch signifikant. MIP-2 und KC bewirkten hingegen keine Steigerung der MFI. Die Daten aller Moleküle mit den jeweiligen Stimulanzen sind in Tabelle 13 sowie in Abbildung 26, S.73, Abbildung 27, S.74 und Abbildung 28, S.75 dargestellt.

Es ließ sich feststellen, dass in allen Versuchen der Anteil positiver PMNs für das jeweilige Adhäsionsmolekül ohne signifikante Schwankungen konstant hoch zwischen 97 und 100% lag, weshalb an dieser Stelle auf eine grafische Darstellung verzichtet wird (alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit n=6-10).

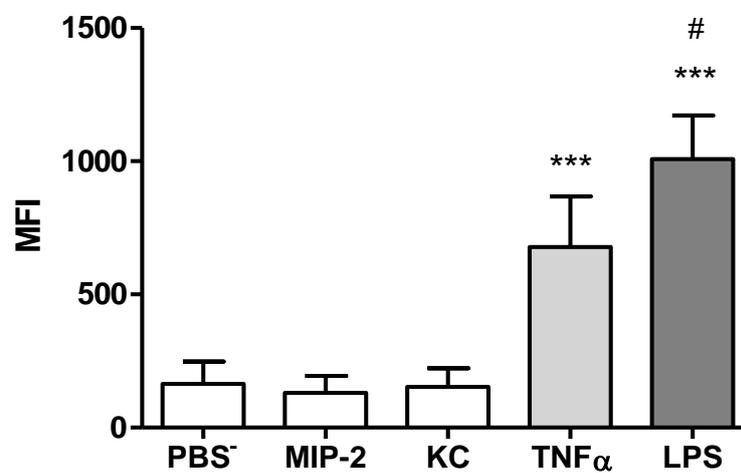
Tabelle 13: Adhäsionsmolekülexpression (MFI) auf humanen PMNs in Vollblut nach Stimulation mit MIP-2, KC, TNF $\alpha$  und LPS. PBS<sup>-</sup>= Kontrollprobe, Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, n=6-10.

	<b>PBS<sup>-</sup></b>	<b>MIP-2</b>	<b>KC</b>	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>LPS</b>
<b>CD11a</b>	280 $\pm$ 26,4	293,3 $\pm$ 27,4	272,1 $\pm$ 60,6	432,3 $\pm$ 72,2	514,4 $\pm$ 71,9
<b>CD11b</b>	164,7 $\pm$ 83	130,8 $\pm$ 63,2	153,3 $\pm$ 70,2	678,7 $\pm$ 189,4	1008 $\pm$ 164,1
<b>CD29</b>	69,9 $\pm$ 17,5	75 $\pm$ 19,3	74,6 $\pm$ 18	161,2 $\pm$ 63,4	220,2 $\pm$ 60,7
<b>CD54</b>	63,8 $\pm$ 17,2	67,4 $\pm$ 20	70,2 $\pm$ 14,2	136,2 $\pm$ 28,9	201,7 $\pm$ 37,3
<b>CD31</b>	272,7 $\pm$ 43,3	307,1 $\pm$ 62	299,7 $\pm$ 67,3	417,2 $\pm$ 107	486 $\pm$ 76,5
<b>CD44</b>	228,5 $\pm$ 39,7	295,6 $\pm$ 67,3	271,3 $\pm$ 77,4	438,4 $\pm$ 152,7	471,5 $\pm$ 164
<b>CD47</b>	37,6 $\pm$ 8,4	38,9 $\pm$ 7,2	38,4 $\pm$ 8	60,1 $\pm$ 18,1	73,8 $\pm$ 17,1
<b>CD172a</b>	109,7 $\pm$ 31,7	125,7 $\pm$ 24,5	114,8 $\pm$ 26	266 $\pm$ 81,9	326,4 $\pm$ 92,2
<b>CD162</b>	159,4 $\pm$ 22,9	130,8 $\pm$ 31,4	130,6 $\pm$ 31,9	206,8 $\pm$ 44,3	236 $\pm$ 40,2

## CD11a



## CD11b



## CD29

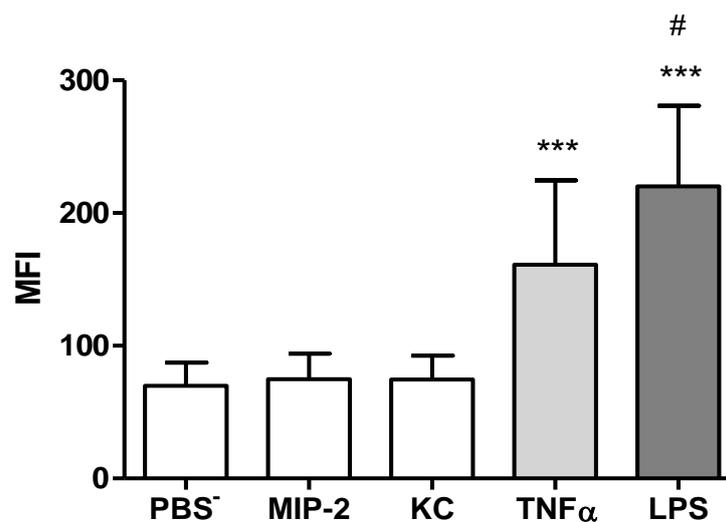
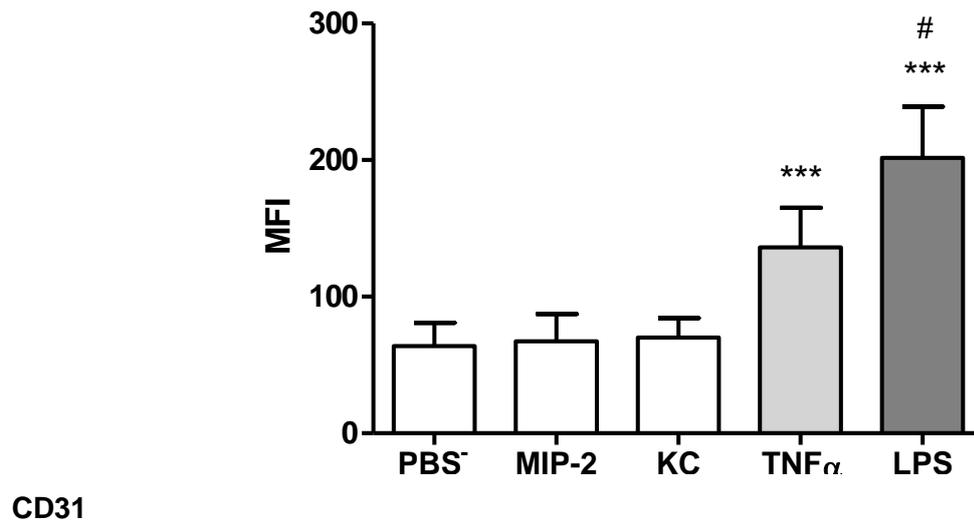
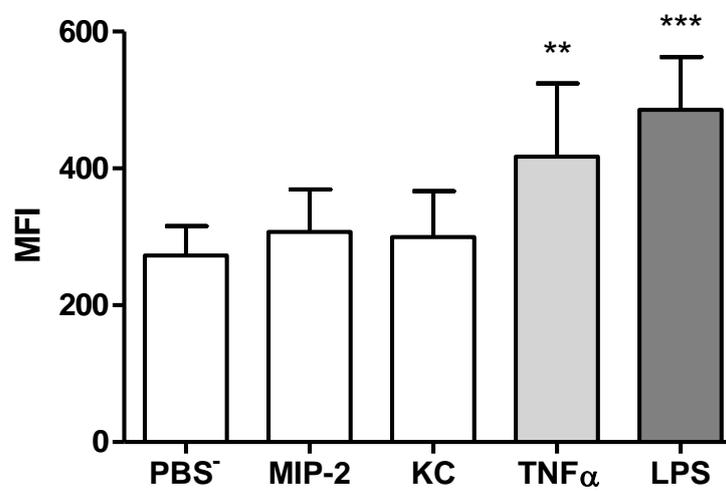


Abbildung 26: CD11a-, CD 11b- und CD29-Expression (MFI) auf humanen PMNs in Vollblut nach Stimulation mit MIP-2, KC, TNF $\alpha$  und LPS. PBS- = Kontrollprobe, Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\*\* $p$  < 0,0001 gegenüber Kontrollprobe, #  $p$  < 0,05 gegenüber TNF $\alpha$ , n=8.

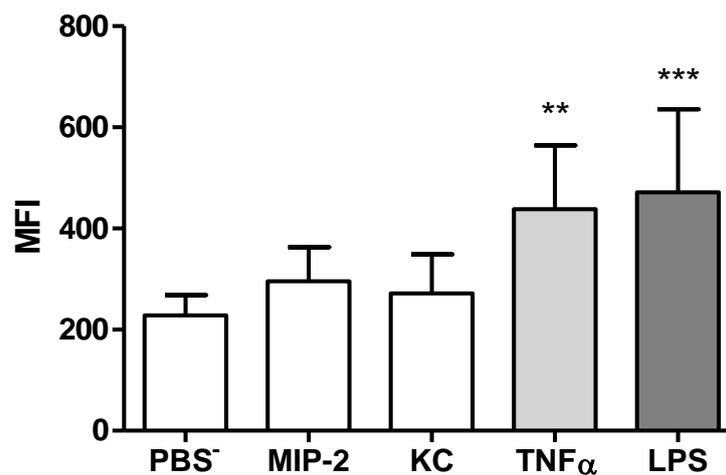
## CD54



CD31

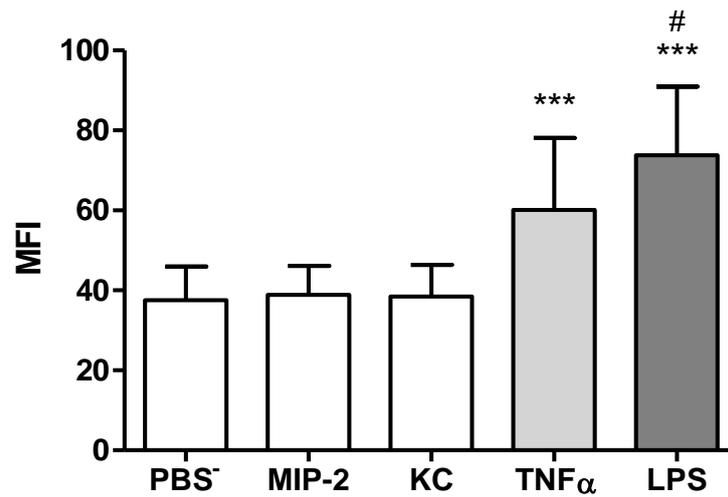


CD44

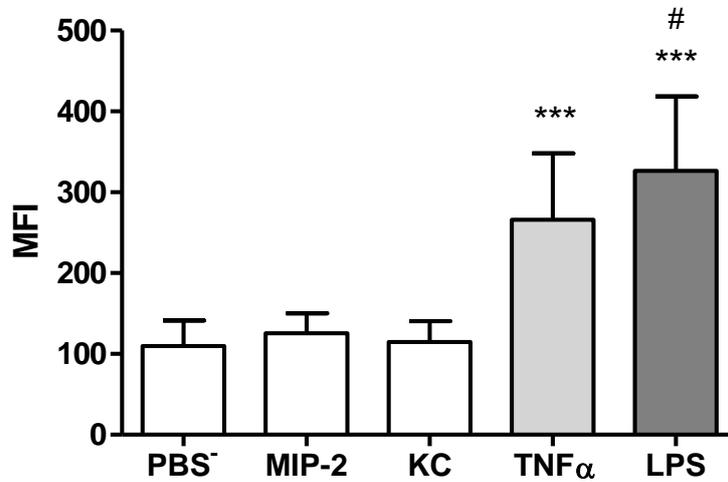


CD47

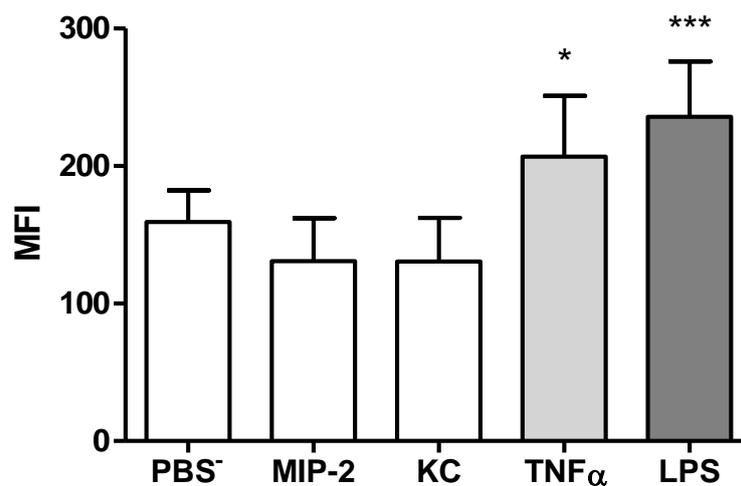
**Abbildung 27: CD54-, CD31- und CD44-Expression (MFI) auf humanen PMNs in Vollblut nach Stimulation mit MIP-2, KC, TNF $\alpha$  und LPS. PBS<sup>-</sup>= Kontrollprobe, Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\* $p$  < 0,005 gegenüber Kontrollprobe, \*\*\* $p$  < 0,0001 gegenüber Kontrollprobe, #  $p$  < 0,05 gegenüber TNF $\alpha$ , n=6-10.**



CD172a



CD162



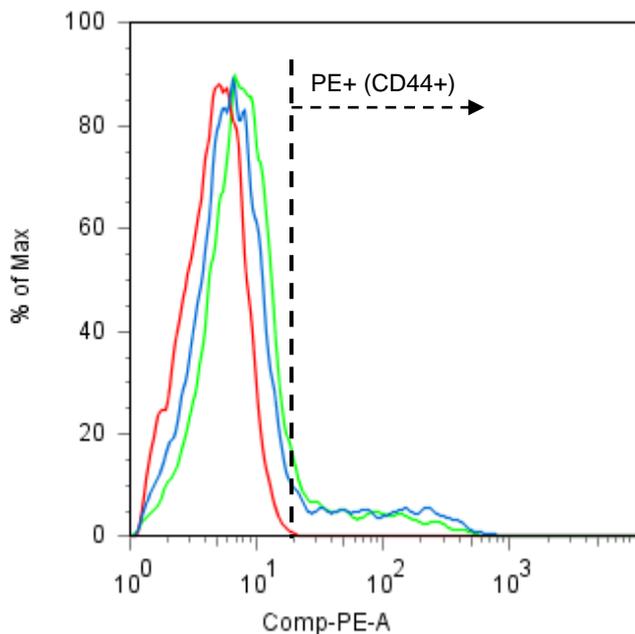
**Abbildung 28: CD47-, CD172a- und CD162-Expression (MFI) auf humanen PMNs in Vollblut nach Stimulation mit MIP-2, KC, TNF $\alpha$  und LPS.** PBS<sup>-</sup>= Kontrollprobe, Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p$  < 0,05 gegenüber Kontrollprobe, \*\*\* $p$  < 0,0001 gegenüber Kontrollprobe, #  $p$  < 0,05 gegenüber TNF $\alpha$ , n=8-9.

### 3.5 Stimulation von humanen pulmonalen Epithelzellen

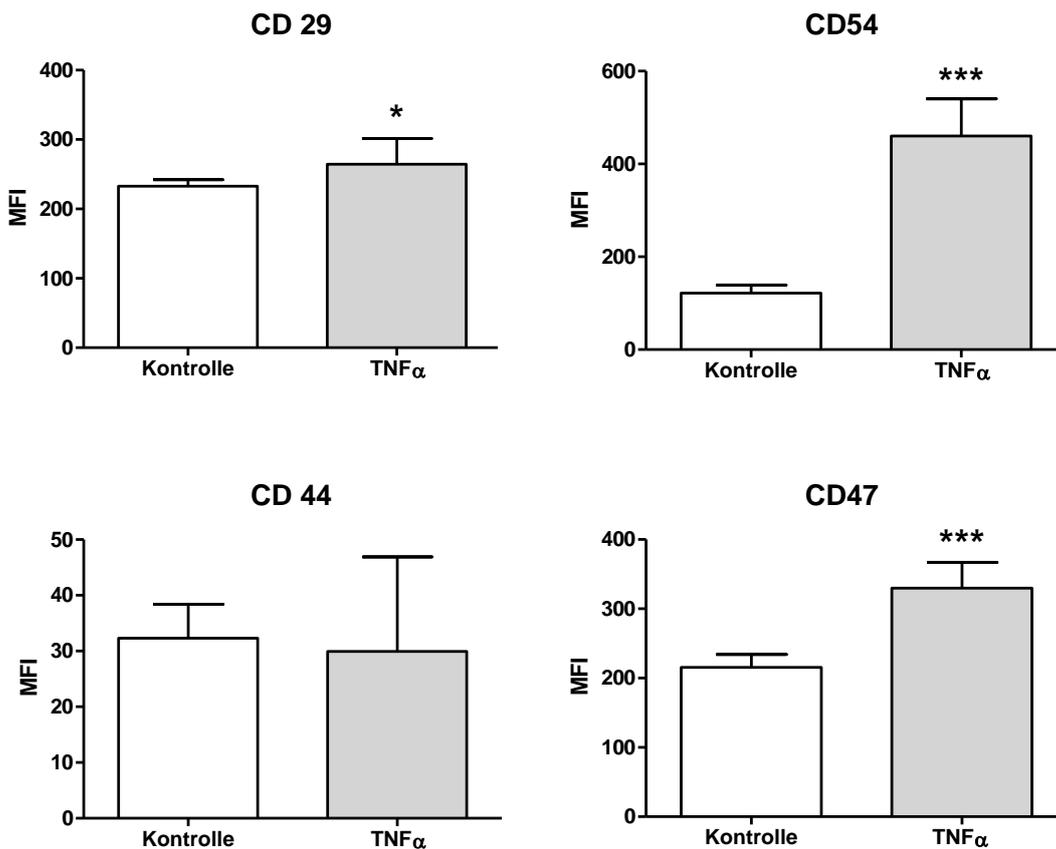
H441-Zellen wurden mit TNF $\alpha$  stimuliert, da Vorversuche mit LPS in verschiedenen Konzentrationen keinen Effekt auf die Molekülexpression zeigten (Daten nicht abgebildet). Die Expression der Adhäsionsmoleküle wurde im Anschluss an die Stimulation durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrollreagenz und Vehikel diente H441-Kulturmedium. Es zeigte sich, dass die pulmonalen Epithelzellen die Moleküle CD54, CD29, CD47 und CD44 auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Für CD54, CD29 und CD47 ergab sich eine konstant hohe Frequency of parent, das heißt, nahezu alle Zellen waren vor und nach Stimulation positiv, weshalb diesbezüglich auf die grafische Darstellung verzichtet wird (**CD54**: Kontrolle 97,40 $\pm$ 1,98% vs. TNF $\alpha$  99,46 $\pm$ 0,24%; **CD29**: Kontrolle 99,63 $\pm$ 0,55% vs. TNF $\alpha$  99,74 $\pm$ 0,21%; **CD47**: Kontrolle 97,40 $\pm$ 1,98% vs. TNF $\alpha$  99,46 $\pm$ 0,24%, alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit n=8). Gleichzeitig verzeichneten wir, wie in Abbildung 30, S.77, dargestellt, bei CD54, CD29 und CD47 jeweils einen signifikanten Anstieg der MFI nach Stimulation (**CD54**: Kontrolle 121,8 $\pm$ 17,47 vs. TNF $\alpha$  460,4 $\pm$ 79,81; **CD29**: Kontrolle 232,8 $\pm$ 9,53 vs. TNF $\alpha$  264,5 $\pm$ 37,16; **CD47**: Kontrolle 215,5 $\pm$ 18,66 vs. TNF $\alpha$  329,9 $\pm$ 37,28).

Auch das Adhäsionsmolekül CD44 wird auf den Epithelzellen exprimiert, jedoch war nur ein kleiner Anteil der Zellen positiv, bzw. die Frequency of parent sehr gering. Diese änderte sich auch nach Stimulation nicht signifikant (**CD44**: Kontrolle 14,08 $\pm$ 4,12% vs. TNF $\alpha$  14,20 $\pm$ 6,73%). Exemplarisch ist dieser Sachverhalt anhand des Histogramms einer Probe in Abbildung 29, S.77, dargestellt. Eine Steigerung der ohnehin schon sehr geringen MFI der wenigen positiven Zellen wurde durch Stimulation mit TNF $\alpha$  ebenfalls nicht erreicht (**CD44**: Kontrolle 32,30 $\pm$ 6,08 vs. TNF $\alpha$  29,93 $\pm$ 16,95). Alle vier Balkendiagramme mit der MFI der exprimierten Adhäsionsmoleküle vor und nach der Stimulation mit TNF $\alpha$  sind in Abbildung 30, S.77 dargestellt.



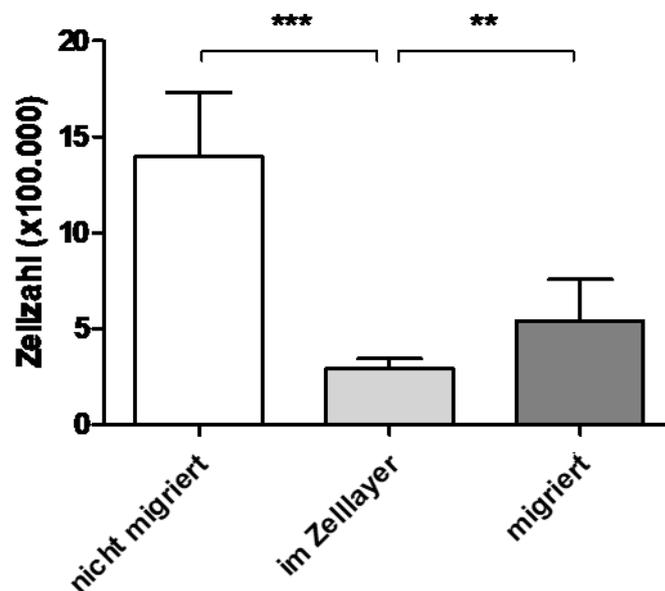
**Abbildung 29: CD44 positive H441-Zellen exemplarisch dargestellt am Histogramm dreier einzelner Proben in der Flow-Jo-Auswertung.** Rot: Negativ-IgG-Kontrolle, Blau: unstimulierte Zellen (=Kontrollgruppe mit H441-Medium), grün: mit TNF $\alpha$  stimulierte Zellen. Nur eine kleine Population der Epithelzellen ist PE-positiv, bzw. exprimiert CD44 auf seiner Oberfläche. Der positive Anteil zeigt auch nach Stimulation (grün) keine Veränderung. Alle Daten der Auswertung sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit n=8



**Abbildung 30: Expression (MFI) von CD29, CD54, CD44 und CD47 auf H441-Zellen nach Stimulation mit TNF $\alpha$ .** Als Kontrolle dient H441-Kulturmedium. Bis auf CD44 ist ein Anstieg der Expression nach Stimulation sichtbar. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*p < 0,05 gegenüber Kontrollprobe, \*\*\*p < 0,0001 gegenüber Kontrollprobe, n=7 bei CD29, alle weiteren n=8.

### 3.6 Migration von PMNs in vitro: Transmigrationsversuch mit humanen pulmonalen Epithelzellen (H441) und humanem Vollblut

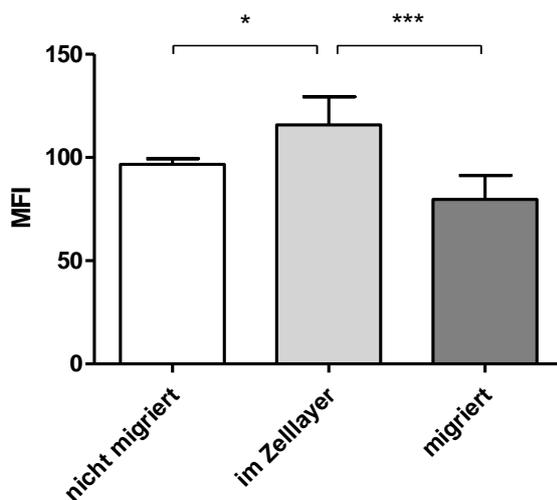
Der direkte Einfluss der Durchwanderung einer zellulären Barriere bezüglich der Adhäsionsmolekülexpression auf der PMN-Oberfläche wurde in vitro mittels eines sogenannten Transwell-Versuchs untersucht. Neutrophile Granulozyten in Vollblut migrierten hierbei entlang eines Chemokin-Gradienten durch eine H441-Lungenepithelzellschicht. Im Anschluss wurden sie durchflusszytometrisch identifiziert sowie auf das Ausmaß ihrer Adhäsionsmolekül-Expression in Zusammenhang mit dem Migrationsstadium hin untersucht. Die Anzahl der PMN war in den einzelnen Kompartimenten des Versuchsaufbaus unterschiedlich, wie in Abbildung 31 dargestellt. Während sich in der Fraktion der nicht migrierten PMN im oberen Well die meisten Zellen befanden ( $14,01 \times 10^6 \pm 3,30 \times 10^6$ ), wurde im Epithellayer die geringste Anzahl Granulozyten nachgewiesen ( $2,94 \times 10^6 \pm 0,50 \times 10^6$ ); in der migrierten Fraktion waren wieder etwas mehr PMN als in der Zellschicht vorhanden ( $5,40 \times 10^6 \pm 2,17 \times 10^6$ ).



**Abbildung 31: Zellzahlen von PMNs im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht befindliche PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\* $p < 0,005$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=11$ .

### 3.6.1 CD11a

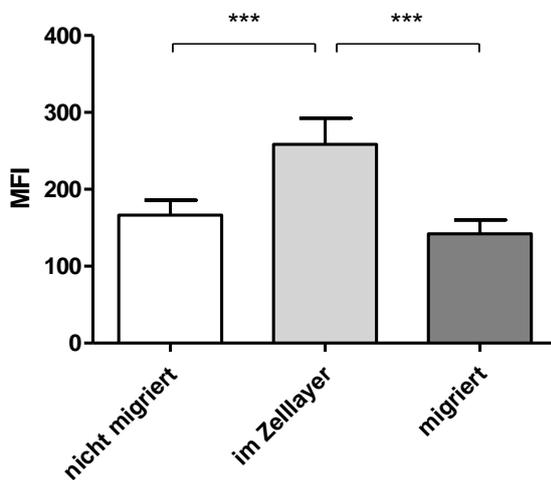
Im Transmigrationsversuch konnte, wie in Abbildung 32 dargestellt, beim Migrationsschritt aus dem Vollblut in den Epithelzelllayer ein signifikanter Anstieg der MFI und somit der Expression von CD11a auf der PMN-Oberfläche gemessen werden. Nach Durchwanderung der Zellschicht lagen anschließend wieder eine Abnahme und gleichzeitig die niedrigste Expression des Adhäsionsmoleküls in der Fraktion der migrierten PMNs vor (nicht migriert  $96,67 \pm 2,81$  vs. im Zelllayer  $115,8 \pm 13,66$  vs. migriert  $79,67 \pm 11,64$ ). Der Anteil der CD11a positiven PMNs an den gesamten Granulozyten im jeweiligen Kompartiment änderte sich im Verlauf der Migration nur geringfügig. Bei den migrierten Zellen waren  $96,63 \pm 4,07\%$  positiv, während die PMNs im oberen Well und im Zelllayer nahezu gesamt positiv für CD11a waren (nicht migriert  $99,50 \pm 0,53\%$  und im Zelllayer  $99,88 \pm 0,35\%$ , alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $n=8$ ). Aus diesem Grund wird an dieser Stelle auf die grafische Darstellung verzichtet.



**Abbildung 32: Expression von CD11a (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhärenente PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=6$ .

### 3.6.2 CD11b

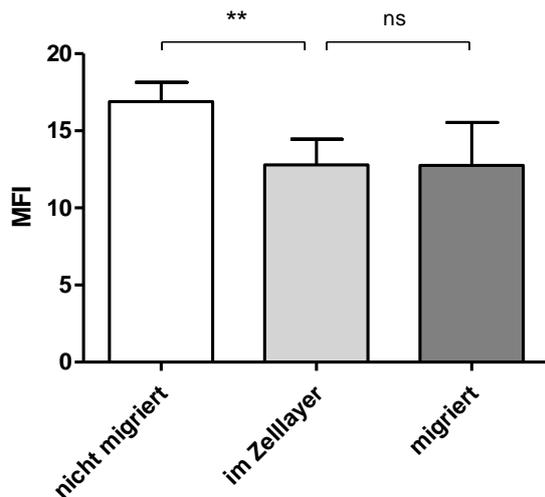
Die MFI und somit die Expression von CD11b war bei den im Epithelzelllayer befindlichen PMNs signifikant höher als bei den nicht migrierten Zellen. Auch die Granulozyten nach Durchwanderung der zellulären Barriere wiesen eine niedrigere Expression des Adhäsionsmoleküls im Vergleich zu den epithelial adhären PMNs auf (vgl. Abbildung 33, nicht migriert  $166,6 \pm 19,23$  vs. im Zelllayer  $258,7 \pm 33,70$  vs. migriert  $142,1 \pm 17,93$ ). Der Anteil der CD11b positiven PMNs an der Gesamtheit der Granulozyten im jeweiligen Kompartiment änderte sich im Verlauf der Migration nur geringfügig, bei den migrierten Zellen waren  $97,73 \pm 2,20\%$  positiv, während die PMNs im oberen Well und im Zelllayer ebenfalls nahezu gesamt positiv für CD11b waren (nicht migriert  $98,94 \pm 1,04\%$  und im Zelllayer  $99,78 \pm 0,67\%$ , alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $n=10$ ).



**Abbildung 33: Expression von CD11b (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhären PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=9$ .

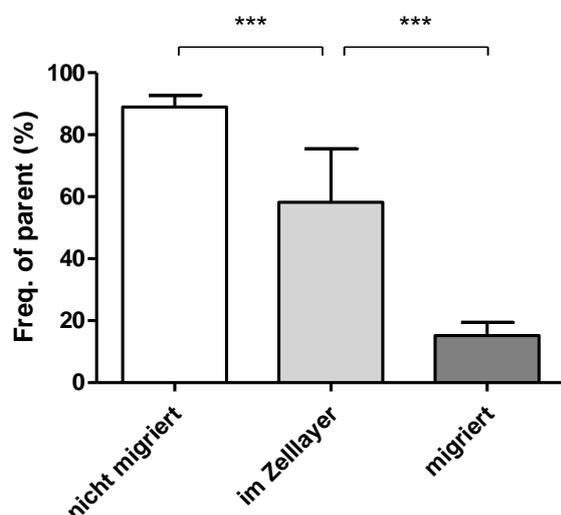
### 3.6.3 CD29

Das Adhäsionsmolekül CD29 wurde, wie in Abbildung 34 dargestellt, im Transmigrationsversuch am stärksten auf den PMNs im oberen Well, also den nicht migrierten PMNs, exprimiert. Im Zelllayer und in der migrierten Fraktion wiesen die Granulozyten eine geringere MFI und somit Expression von CD29 auf (nicht migriert  $16,90 \pm 1,25$  vs. im Zelllayer  $12,78 \pm 1,67$  vs. migriert  $12,76 \pm 2,78$ ).



**Abbildung 34: Expression von CD29 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhärenente PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, \*\* $p < 0,005$ , ns=nicht signifikant,  $n=5$ .

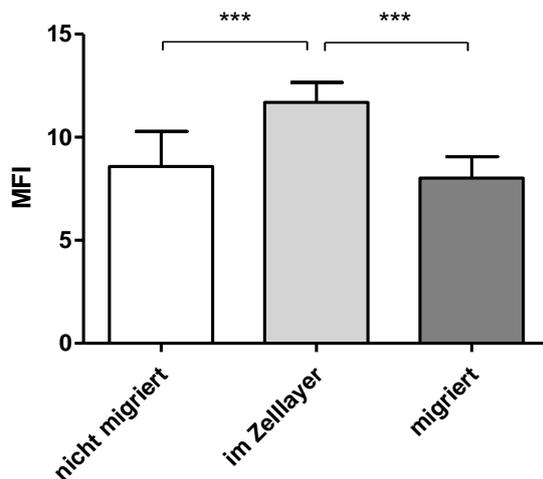
Der Anteil CD29 positiver PMNs zeigte in den unterschiedlichen Kompartimenten des Transwell-Versuchs eine deutliche Abnahme mit jedem Migrationsschritt. In Abbildung 35 sieht man, dass zu Beginn im Vollblut der größte Anteil der PMNs mit  $88,97 \pm 3,72\%$  positiv für das Adhäsionsmolekül war. Unter den im Zelllayer befindlichen Neutrophilen zeigten nur noch etwas mehr als die Hälfte ( $58,24 \pm 17,23\%$ ) der Zellen eine Expression des gesuchten Moleküls, während im unteren Well schließlich nur noch  $15,24 \pm 4,25\%$  CD29 positiv waren.



**Abbildung 35: CD29 positive PMNs (Freq. of parent) an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhärenente PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte ± Standardabweichung, \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=5$ .

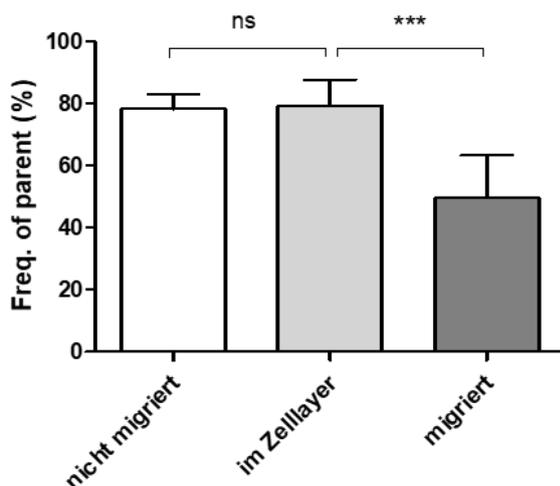
## 3.6.4 CD54

Die MFI und somit die Expression von CD54 war bei den im Epithelzelllayer befindlichen PMNs signifikant höher, als bei den nicht migrierten und den bereits migrierten Zellen (vgl. Abbildung 36; nicht migriert  $8,59 \pm 1,69$  vs. im Zelllayer  $11,69 \pm 0,96$  vs. migriert  $8,02 \pm 1,03$ ).



**Abbildung 36: Expression von CD54 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhärenente PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=8$ .

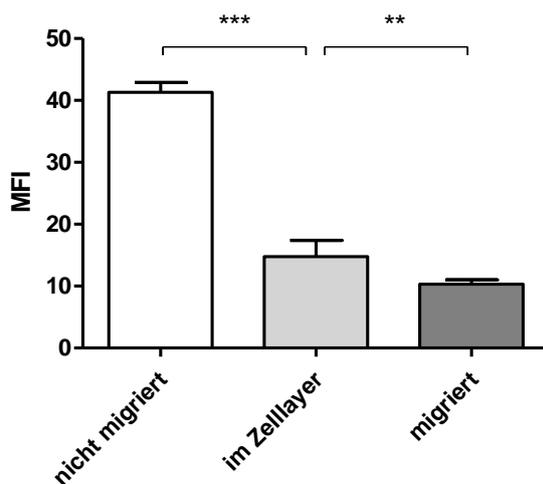
Der Anteil der CD54 positiven PMNs an den Granulozyten im jeweiligen Kompartiment änderte sich, wie in Abbildung 37 dargestellt, im Verlauf der Migration. Bei den migrierten Zellen waren mit nur  $49,60 \pm 13,74\%$  etwa die Hälfte der PMNs positiv, während die PMNs im oberen Well und im Zelllayer noch signifikant mehr CD54 auf ihrer Oberfläche trugen (nicht migriert  $78,20 \pm 4,85\%$  und im Zelllayer  $79,30 \pm 8,33\%$ ).



**Abbildung 37: CD54 positive PMNs (Freq. of parent) an der Gesamtheit der PMNs im jeweiligen Kompartiment im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhärenente PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n=10$ .

### 3.6.5 CD31

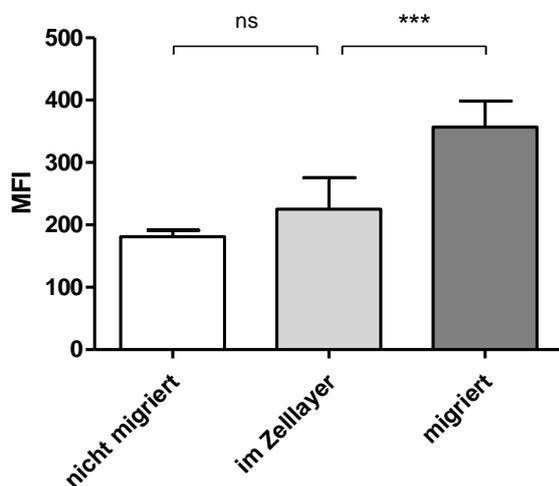
Das Adhäsionsmolekül CD31 wurde auf den PMNs in den verschiedenen Kompartimenten des Transmigrationsversuchs in signifikant abnehmender Stärke exprimiert. Auf den Neutrophilen Granulozyten im Vollblut ohne stattgefundene Migration war die Expression am größten. Sie zeigte dann einen Abfall bei den im Epithel adhärennten Zellen und schließlich die geringste Expression bei den PMNs, welche den Zelllayer vollständig durchwandert hatten (vgl. Abbildung 38; nicht migriert  $41,33 \pm 1,58$  vs. im Zelllayer  $14,75 \pm 2,63$  vs. migriert  $10,33 \pm 0,69$ ). Auch die Frequency of parent wurde im Verlauf der Migration bzw. in den verschiedenen Kompartimenten kleiner. Im unteren Well zeigten weniger PMNs die Expression des untersuchten Moleküls, als im Zelllayer und in der nicht-migrierten Fraktion (nicht migriert  $99,00 \pm 0,0\%$  vs. im Zelllayer  $95,38 \pm 4,24\%$  vs. migriert  $84,44 \pm 17,39\%$ , alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $n=8$ ,  $*p < 0,05$ ). Da jedoch insgesamt stets weit über die Hälfte der PMNs positiv waren, wird hier auf eine grafische Darstellung verzichtet.



**Abbildung 38: Expression von CD31 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhärennte PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung,  $**p < 0,001$ ,  $***p < 0,0001$ ,  $n=4-8$ .

### 3.6.6 CD44

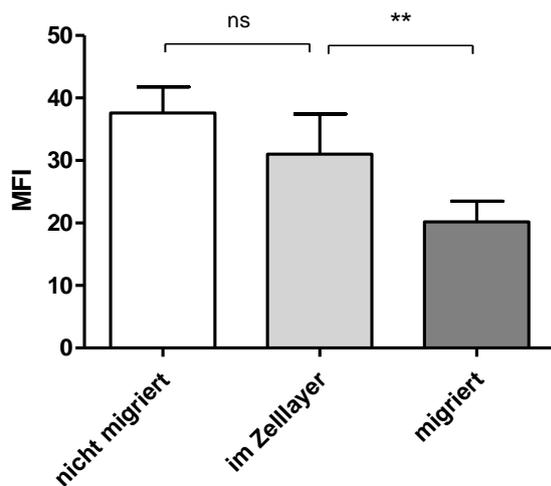
Als einziges der untersuchten Adhäsionsmoleküle zeigte CD44 einen Anstieg der MFI in den unterschiedlichen Kompartimenten des Transwell-Versuchs. Die PMNs im unteren Well, also nach durchlaufener Migration, zeigten die signifikant höchste Expression des Moleküls im Vergleich zu den im Zelllayer sitzenden und den nicht gewanderten PMNs (vgl. Abbildung 39; nicht migriert  $181,20 \pm 10,06$  vs. im Zelllayer  $225,40 \pm 50,41$  vs. migriert  $356,80 \pm 41,80$ ). Die Anzahl der positiven PMNs veränderte sich hierbei nicht, weshalb in diesem Falle auf die grafische Darstellung verzichtet wird (nicht migriert  $99,30 \pm 0,48\%$  vs. im Zelllayer  $99,60 \pm 6,99\%$  vs. migriert  $99,00 \pm 1,82\%$ , alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $n=10$ ).



**Abbildung 39: Expression von CD44 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhärenente PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\*\* $p < 0,0001$ , ns=nicht signifikant,  $n=5$ .

### 3.6.7 CD47

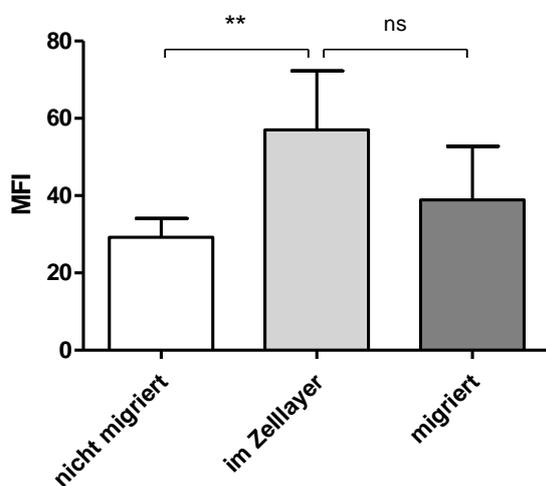
Im Transmigrationsversuch zeigte sich die stärkste Expression des Adhäsionsmoleküls CD47 auf den PMNs im oberen Well mit einer nicht signifikanten Abnahme der MFI bei den PMNs im Epithelzelllayer. Die migrierten Zellen im unteren Well wiesen schließlich die geringste Expression von CD47 an ihrer Oberfläche auf (vgl. Abbildung 40, S.85, nicht migriert  $37,60 \pm 4,16$  vs. im Zelllayer  $31,00 \pm 6,44$  vs. migriert  $20,20 \pm 3,27$ ). Der Anteil der für dieses Adhäsionsmolekül positiven PMNs ließ zwar eine tendenzielle Abnahme erkennen, die jedoch sehr gering und nicht signifikant war, weshalb an dieser Stelle auf die grafische Darstellung verzichtet wird (nicht migriert  $99,00 \pm 1,32\%$  vs. im Zelllayer  $94,22 \pm 11,34\%$  vs. migriert  $94,38 \pm 9,68\%$ , alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $n=9$ ).



**Abbildung 40: Expression von CD47 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhäre PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\* $p < 0,005$ , ns=nicht signifikant,  $n=5$ .

### 3.6.8 CD172a

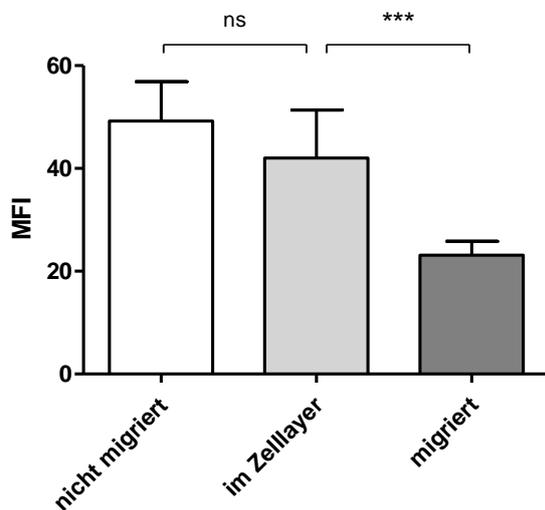
CD172a wurde auf der PMN-Oberfläche in den Kompartimenten des Transmigrationsversuchs unterschiedlich stark exprimiert. Mit Beginn der Migration war ein signifikanter Anstieg der MFI von den nicht migrierten PMNs zu den epithelial adhären Zellen zu beobachten. Die Adhäsionsmolekülexpression auf den migrierten Zellen im unteren Well unterschied sich jedoch nicht signifikant zu dem vorangegangenen Kompartiment des Epithelzelllayers (vgl. Abbildung 41, nicht migriert  $29,21 \pm 4,86$  vs. im Zelllayer  $57,00 \pm 15,28$  vs. migriert  $38,90 \pm 13,87$ ). In dem Anteil CD172a positiver PMNs an der Gesamtheit der PMNs des jeweiligen Kompartiments zeigte sich im unteren Well ein signifikant geringerer Anteil positiv als bei den nicht migrierten Zellen und den PMNs im Zelllayer (nicht migriert  $91,83 \pm 9,27\%$  vs. im Zelllayer  $93,75 \pm 7,48\%$  vs. migriert  $79,75 \pm 15,49\%$ , alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $n=8$ ).



**Abbildung 41: Expression von CD172a (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhäre PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\* $p < 0,005$ , ns=nicht signifikant,  $n=5$ .

### 3.6.9 CD162

Im Transmigrationsversuch wurde das Adhäsionsmolekül CD162 am stärksten auf den nicht gewanderten PMNs im oberen Well exprimiert. Im nächsten Migrationsschritt zeigte sich zunächst eine nicht signifikante Abnahme der MFI, bis schließlich im unteren Well signifikant weniger CD162 auf den Neutrophilen als auf den Zellen in der Epithelschicht detektiert wurde, sodass dies auch das Kompartiment der niedrigsten Expression darstellte (vgl. Abbildung 42, nicht migriert  $49,20 \pm 7,66$  vs. im Zelllayer  $42,00 \pm 9,38$  vs. migriert  $23,13 \pm 2,70$ ). Der Anteil positiver PMNs änderte sich im Verlauf der Migration nicht signifikant, es trugen nahezu alle PMNs konstant das Adhäsionsmolekül CD162 auf der Oberfläche (nicht migriert  $96,44 \pm 1,81\%$  vs. im Zelllayer  $94,22 \pm 4,94\%$  vs. migriert  $94,44 \pm 5,94\%$ , alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mit  $n=9$ ).



**Abbildung 42: Expression von CD162 (MFI) im Transmigrationsversuch mit H441-Zellen und Vollblut.** Nicht migriert= im oberen Well befindliche PMNs, im Zelllayer= in der Epithelschicht adhärenente PMNs, migriert= im unteren Well befindliche PMNs. Alle Angaben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*\*\* $p < 0,0001$ , ns=nicht signifikant,  $n=5$ .

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit zeigen wir erstmals den kompletten Verlauf der Adhäsionsmolekülexpression neutrophiler Granulozyten auf ihrem Weg durch die Lungenkompartimente: von intravasal durch das Endothel und das Interstitium bis in die Alveole. Die hierbei untersuchten Adhäsionsmoleküle wurden in Vorarbeiten als wichtige Rezeptoren für die PMN-Migration identifiziert (Smith et al., 1989, Werr et al., 1998, Dangerfield et al., 2002, Alstergren et al., 2004, Parkos et al., 1996b, Liu et al., 2002, Norman et al., 1995). Zu allen in dieser Arbeit betrachteten Molekülen existieren zudem konkrete Hinweise auf eine kritische Rolle in der pulmonalen Inflammation (Moreland et al., 2002, Basit et al., 2006, Burns et al., 2001, Vaporciyan et al., 1993, van der Windt et al., 2010, Xiao Su<sup>2</sup>, 2008, Gardai et al., 2003, Zhang et al., 2013). Ebenso ist seit langem bekannt, dass PMNs durch ihre überschießende Infiltration für die Schwere des Krankheitsverlaufs mitverantwortlich sind (Steinberg et al., 1994). Sämtliche bisher vorliegenden Untersuchungen geben lediglich Einblick in einzelne Teilschritte dieser Wanderung, die meisten Daten liegen zur transendothelialen Migration vor. Der Fokus dieser Arbeit lag deshalb auf der systematischen Untersuchung und Darstellung der Adhäsionsmolekülexpression im gesamten Verlauf der Migration. Hierfür wurde die Molekülexpression auf PMNs in den oben genannten unterschiedlichen Migrationsstadien durchflusszytometrisch quantifiziert. Es zeigte sich, dass die Expression der Adhäsionsmoleküle auf den Neutrophilen Granulozyten abhängig vom Migrationsstadium und Molekül stark variierte. Somit kann auf unterschiedliche Bedeutungen der einzelnen Moleküle für die jeweiligen Migrationsschritte geschlossen werden. Zudem zeigte sich eine durch Inflammation gesteigerte Transkriptionsrate aller Adhäsionsmoleküle im Lungengewebe. In den Abschnitten 4.2.1, S.89, bis 4.2.9, S.98, werden die in vivo Ergebnisse der untersuchten Moleküle im Einzelnen diskutiert.

Ergänzend zum murinen Modell wurde die Bedeutung der Moleküle für die Entzündungsreaktion anhand verschiedener in vitro Untersuchungen evaluiert. Inflammatorische Stimuli bewirkten eine Erhöhung der Adhäsionsmolekülexpression auch auf humanen PMNs und teilweise auf humanen Epithelzellen. Diese Ergebnisse unterstreichen die kritische Rolle der jeweiligen Moleküle im Rahmen eines Entzündungsvorgangs. Dass die Erkenntnisse bezüglich der Variabilität der Adhäsionsmolekülexpression auch auf den humanen Organismus übertragbar sind, wird durch die Ergebnisse der Transmigrations-Versuche impliziert. Humane PMNs wurden hier im Verlauf ihrer Durchwanderung einer humanen Epithelzellschicht untersucht und zeigten ebenfalls unterschiedliche Expressionsgrade je nach Migrationsstadium.

## **4.1 Adhäsionsmoleküle in murinen Lungen: RT-qPCR und Immunfluoreszenz**

In verschiedensten Organsystemen wurde den hier untersuchten Adhäsionsmolekülen eine kritische Rolle im Rahmen der Entzündungsreaktion zugeschrieben (Moreland et al., 2002, Basit et al., 2006, Burns et al., 2001, Vaporciyan et al., 1993, van der Windt et al., 2010, Xiao Su<sup>2</sup>, 2008, Gardai et al., 2003, Zhang et al., 2013). Mittels RT-qPCR und Immunfluoreszenzfärbung im Rahmen des in dieser Arbeit verwendeten murinen Modells konnte die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle speziell für die pulmonale Inflammation objektiviert werden. Das Prinzip der Inflammationsinduktion bei Mäusen durch LPS-Inhalation mit anschließender Präparation der Lungen und Durchführung einer PCR sowie einer immunhistochemischen Fluoreszenzfärbung wurde bereits mehrfach in unserer Arbeitsgruppe praktiziert und publiziert (Konrad et al., 2014, Ngamsri et al., 2017).

Durch die LPS-induzierte Entzündungssituation zeigte sich im Lungengewebe der Mäuse bei allen untersuchten Molekülen ein signifikanter Anstieg der Transkriptionsrate, was für einen Zuwachs der Bedeutung der Moleküle im inflammatorischen Kontext spricht. Hierzu passend imponierte auch in der zur Veranschaulichung ergänzend durchgeführten Immunfluoreszenz eine vermehrte Proteinexpression von CD54, CD31 und CD29. Unsere Ergebnisse stehen somit im Einklang mit bisherig bekannten Hinweisen auf die kritische Rolle der hier betrachteten Moleküle bei Inflammation.

## **4.2 Migration von PMNs in vivo: Durchflusszytometrie**

Um vom Blutgefäß in die Alveole zu gelangen, durchwandern PMNs verschiedene Kompartimente im Lungenparenchym. Die hierbei verwendeten Adhäsionsmoleküle konnten in der vorliegenden Arbeit mittels des Migrationsmodells und Durchflusszytometrie im Verlauf dieser Wanderung quantifiziert und erstmals von Kompartiment zu Kompartiment verglichen werden. Das besagte Modell umfasste gemäß seiner ursprünglichen Entwicklung die Kompartimente „Endothel“, „Interstitium“ und „Alveole“ (Reutershan et al., 2005). In der jetzigen Arbeit ergänzten wir durch eine Blutentnahme das Versuchsdesign um das Kompartiment „Intravasal“, um auch den Expressionsstatus der zirkulierenden Neutrophilen zu erfassen und in Vergleich mit den endothelialen PMNs setzen zu können. Mit dem Modell konnten wir zeigen, dass die neutrophilen Granulozyten während der Durchwanderung der Lungenkompartimente ihre Adhäsionsmolekülexpression verändern.

Die Identifikation der Neutrophilen erfolgte mittels Dreifach-Markierung mit CD45, 7/4 und Gr-1 (vgl. 2.1.4, S.40). Sowohl 7/4 als auch Gr-1 sind auch auf Monozyten exprimiert (Rosas et al., 2010). Deren Anteil im zirkulierenden Mausblut beträgt dabei allerdings  $\leq 6\%$

(Sunderkötter et al., 2004, Voisin et al., 2009) und von dieser Population wiederum exprimiert nur ein Teil den Gr-1 Marker (Geissmann et al., 2003). Des Weiteren findet die Migration der Monozyten ins betroffene Gewebe erst in einer späteren Phase der Inflammation statt (Abraham et al., 2000, Soehnlein and Lindbom, 2010), sodass eine Beeinträchtigung der PMN-Identifikation durch zusätzliche Anfärbung von Monozyten als vernachlässigbar gering anzusehen war.

#### 4.2.1 CD11a

Die Expression von CD11a auf der Oberfläche der aktivierten PMNs nahm im Verlauf der Migration sukzessive ab. Die im Blut zirkulierenden Neutrophilen wiesen den höchsten Expressionsgrad auf (vgl. Abbildung 43, S.99), die PMNs in der Alveole die geringste Expression. Diese Ergebnisse weisen auf eine primäre Involvierung und kritische Rolle des Adhäsionsmoleküls in den ersten Schritten der Migration hin.

In vitro wurde schon früh beschrieben, dass CD11a bedeutsam für die Anheftung von PMNs ans Endothel ist (Smith et al., 1989). Auch zeigte Gao bereits 1996, dass CD11a in vitro eine größere Rolle für die endotheliale Migration der PMNs als für die Interaktion mit interstitiellen Zellen inne hat (Gao and Issekutz, 1996). Die degressive CD11a-Expression auf den interstitiellen Neutrophilen unseres Modells bekräftigt diese Annahme. In den Folgejahren lieferte die weitere Evaluation des Integrins in der PMN-Migration diesbezüglich noch tiefergehende Erkenntnisse und beschrieb die Involvierung beim „Rolling“ und Arrest am Endothel (Henderson et al., 2001, Chesnutt et al., 2006). Unsere Daten unterstützen demnach das bestehende Verständnis der Rolle von CD11a als Ligand primär in der endothelialen Interaktion.

Eine in früheren Studien beobachtete Inhibition von Adhäsion und Migration an bzw. durch pulmonale Epithelzellen (Tosi et al., 1992, Kidney and Proud, 2000) ließ eingangs die Vermutung zu, dass das Integrin auch an der epithelialen Barriere eine Funktion in der PMN-Migration innehaben könnte. Angesichts der in unserer Arbeit stark abnehmenden Expression in Interstitium und Alveole erscheint dies jedoch eher unwahrscheinlich.

Die kritische Rolle von CD11a speziell in der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation wurde von Basit und Reutershan beschrieben. Der Einsatz von inhibierenden AK führte zu einer Reduktion der Zellzahlen in der BAL um etwa die Hälfte (Basit et al., 2006). Unsere Daten implizieren, dass der von ihnen beobachtete Effekt vor allem durch die Inhibition der ersten Migrationsschritte verursacht wurde. Bei Basit et. al wurde der PMN-Influx durch CD11a-Blockierung um ca. 50% reduziert, in der vorliegenden Arbeit zeigten sich jedoch nahezu alle PMNs in den unterschiedlichen Migrationsstadien CD11a positiv. Eine mögliche Erklärung dieser Inkongruenz wäre, dass nicht alle PMNs die gleichen Expressionsmuster

zur Migration nutzen oder einige PMNs im Falle eines Defekts oder einer Blockierung in der Lage sind, andere Adhäsionsstrukturen zu involvieren und CD11a-unabhängig zu migrieren. Letztere Hypothese wird dadurch unterstützt, dass PMNs generell in der Lage sind, Integrin-unabhängig zu migrieren, auch wenn dies bisher nur im Zusammenhang mit einzelnen Stimuli gezeigt wurde (Doerschuk et al., 1990). Außerdem denkbar ist die Möglichkeit, dass stets ein Teil der CD11a-Antigene in der niedrig affinen Konformation (Lefort and Ley, 2012) vorliegt und somit zwar vom Antikörper markiert wurde, aber aufgrund eben dieses Aktivierungszustandes am Migrationsprozess unbeteiligt blieb.

#### 4.2.2 CD11b

Die Expression von CD11b zeigte sich auf den intravasal zirkulierenden Zellen signifikant niedriger, als auf den pulmonalen PMNs. Bisherigen Erkenntnissen zufolge dient Mac-1 nicht primär der Anbahnung der Extravasation, sondern kommt erst nach über CD11a erfolgter Adhäsion zum Einsatz. Vor allem ist CD11b beim Crawling involviert (Phillipson et al., 2006), spielt aber auch in den nachfolgenden Migrationsschritten eine Rolle (Henderson et al., 2001). Passend hierzu zeigten unsere Daten einen Anstieg der Expression bei den endothelial adhären Zellen und einen weiteren Anstieg bei den interstitiellen Zellen.

Unter den pulmonalen PMNs wies die Fraktion der interstitiellen Zellen die höchste Expressionsrate auf (vgl. Abbildung 43, S.99). Daraus lässt sich ableiten, dass CD11b in der Migration durch das Interstitium ein wichtiger Rezeptor ist. Unterstützt wird diese Annahme von Daten unterschiedlicher in vitro Studien. So wurde bereits 1996 die Involvierung von CD11b bei der PMN-Migration im Bindegewebe beschrieben (Gao and Issekutz, 1996). Shang et al. zeigten ebenfalls die Interaktion von PMNs mit Fibroblasten, den Zellen des interstitiellen Gewebes, via CD11b (Shang and Issekutz, 1997). Auch Vitronectin, ein Protein der Extrazellulärmatrix, wurde im Verlauf als Rezeptor für CD11b in der PMN-Migration entdeckt (Kanse et al., 2004).

In der BAL nahm die Expression von CD11b zwar im Vergleich zum Interstitium wieder ab, war dort aber weiterhin hoch -in ähnlichem Ausmaß wie am Endothel-, was für eine Involvierung von CD11b auch bei der transepithelialen Migration spricht. In vitro zeigten Kidney et. al diese These unterstreichend die CD11b-Abhängigkeit der PMN-Transmigration durch Bronchialepithelzell-Monolayer (Kidney and Proud, 2000). Des weiteren wird ICAM-1, ein wichtiger Interaktionspartner von Mac-1, auch an der apikalen Epithelzellmembran exprimiert (Parkos et al., 1996a) und dient dort wahrscheinlich der postmigratorischen Adhäsion der Neutrophilen im Inneren der Alveole. Eine Rolle von CD11b bei eben dieser Adhäsion liegt demnach ebenfalls nahe (Parkos, 2016) und wird durch die in der vorliegenden Arbeit gemessene hohe Expression von CD11b in der BAL unterstützt.

### 4.2.3 CD29

Die Expression von CD29 zeigte sich auf den im Blut zirkulierenden PMNs am höchsten (vgl. Abbildung 43, S.99). Das Ergebnis war zunächst überraschend, da das Integrin vor allem als Rezeptor interstitieller Proteine und Zellen bekannt ist (Ridger et al., 2001, Gao and Issekutz, 1997). Werr et al. beobachteten zudem eine verminderte Expression von CD29 auf zirkulierenden PMNs verglichen mit nach extravasal migrierten PMNs (Werr et al., 1998). Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit handelte es sich in besagter Studie jedoch um ein Modell der mesenterialen und peritonealen Inflammation mit Platelet Activating Factor als Stimulus und früherem Entnahmezeitpunkt der PMNs bzw. des Blutes, was die Vergleichbarkeit mit dem in dieser Arbeit verwendeten Versuchsmodell stark einschränkt. 2014 publizierten Lerman et al., dass VLA-3, welches CD29 als  $\beta$ -Kette beinhaltet (vgl. 1.4.4, S.20), bei septischen Patienten und LPS-behandelten Mäusen im Blut stark hochreguliert wurde (Lerman et al., 2014). Ein Grund für diese Hochregulation und die hohe Expression auf den intravasalen PMNs in unseren Daten könnte die möglichen Beteiligung des Integrins an Adhäsion (Reinhardt et al., 1997) und „Rolling“ (Henderson et al., 2001) am Endothel sein.

Auf den Neutrophilen im Interstitium der Lunge war CD29 höher exprimiert als auf denen am Endothel und im alveolären Kompartiment, wo die insgesamt niedrigste Expression gemessen wurde. Diese Daten unterstreichen die bekannte Funktion von CD29 im Interstitium (Shang and Issekutz, 1997, Ridger et al., 2001). Ebenfalls wird die Vermutung der primären Bedeutung bei der transepithelialen Migration (Ridger et al., 2001), welche an der basolateralen Membran auf Seiten des Interstitiums beginnt, durch die hohe Expression in diesem Kompartiment unterstützt. Gleichzeitig ist angesichts der endothelialen Expression eine weniger prominente aber dennoch vorhandene Rolle entsprechend Reinhardt und Henderson (s.o.) bei der Extravasation denkbar. Für die apikale Adhäsion in der Alveole scheint das Integrin in Anbetracht des Expressionsminimums in der BAL keine tragende Rolle zu spielen, vergleichbare Untersuchungen hierzu liegen bisher nicht vor.

Im Sepsis Modell führte die Blockade von CD49c/CD29 (VLA-3) zu einer Reduktion der Einwanderung in die Alveole (Lerman et al., 2014). In der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation zeigten Burns et. al durch CD49d/CD29 (VLA-4)- und CD49e/CD29 (VLA-5)-Blockade ebenfalls eine reduzierte PMN-Akkumulation in der BAL (Burns et al., 2001). Auch in der grampositiven Lungenentzündung hatte die VLA-4 Blockade eine Reduktion der PMN-Zahlen im Lungengewebe zur Folge (Kadioglu et al., 2011). In Zusammenschau dieser Ergebnisse sowie der von Ridger et al. ist eine Inhibition von CD29 ein potentielles Target für eine antiinflammatorische Therapie in der pulmonalen Inflammation. Unsere Daten lassen nun erstmals den Schluss zu, dass die CD29-Blockierung primär im ersten Migrationsschritt greift.

#### 4.2.4 CD54

CD54 wurde auf den PMNs im Lungeninterstitium am höchsten exprimiert (vgl. Abbildung 43, S.99), gefolgt von den Neutrophilen in der Alveole. Die intravasalen und endothelialen PMN trugen signifikant weniger Adhäsionsmolekül auf ihrer Oberfläche. Ebenso waren im Interstitium und in der Alveole mehr Zellen CD54 positiv, als intravasal und am Endothel (vgl.3.3.4, S.63).

Während die Expression von CD54 vorwiegend auf Epi- und Endothelzellen erforscht ist (vgl.1.4.5, S.21), existieren zur Expression auf PMNs hauptsächlich in vitro Daten. Unsere Ergebnisse liefern neue Erkenntnisse über die Funktion in vivo und deuten auf eine große Bedeutung des Adhäsionsmoleküls im Interstitium und in der Alveole hin. Wir zeigen erstmals, dass die neutrophilen Granulozyten sowohl im Interstitium als auch in der Alveole CD54 auf ihrer Oberfläche tragen. Eine Interaktion der PMNs mit der EZM oder untereinander mittels CD54 könnte eine Ursache für den hohen Expressionsgrad sein. Welche Adhäsionsmoleküle die Neutrophilen nach Durchwanderung des Epithels in der Alveole nutzen, um auf der Epithelzelloberfläche zu patrouillieren und Pathogene zu bekämpfen, ist bisher größtenteils unklar (Parkos, 2016); unsere Daten lassen die Annahme zu, dass CD54 hier eine entsprechende Rolle spielen könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Annahme, dass CD54 hauptsächlich in der Migration durch das Endothel von Bedeutung sei und bei der transepithelialen Migration der PMNs keine Rolle spiele (Mayadas et al., 2014), darauf beruhte, dass das Molekül epithelial ausschließlich apikal nachgewiesen wurde (Madjdpour et al., 2000). Unsere Daten deuten nun drauf hin, dass eine Rolle von CD54 in der transepithelialen Migration existiert und dabei auf Seiten der PMNs zu sehen ist. Gleichzeitig ist bei der hohen Expression in der BAL denkbar, dass die alveolären Neutrophilen das Molekül postmigratorisch weiterhin zu nutzen, um mit anderen Immunzellen zu interagieren oder um auf der Pneumozytenoberfläche zu patrouillieren.

#### 4.2.5 CD31

Das Expressionsmaximum von CD31 zeigte sich in unseren Ergebnissen deutlich bei den im Blut zirkulierenden PMNs, also dem ersten Kompartiment (vgl. Abbildung 43, S.99). Auf den endothelialen, interstitiellen und alveolären PMNs wurde das Adhäsionsmolekül weitaus geringer exprimiert. Die bekannte Rolle von CD31 in der Extravasation von Leukozyten am Endothel (vgl.1.4.6, S.23) steht im Gegensatz zu der von uns beobachteten Abnahme der Expression auf am Endothel adhären PMNs, denn die Involvierung von CD31 in der endothelialen Transmigration wurde bisher als distal der Integrin-vermittelten

Migrationschritte lokalisiert (Muller et al., 1993, Thompson et al., 2000). Zu erwarten wäre demnach ein Anstieg oder zumindest eine gleichbleibend hohe Expression am Endothel und eventuell auch im nachfolgenden Kompartiment gewesen.

Dass die Bindungsstelle des detektierenden Antikörpers am CD31-Molekül durch die Interaktion mit dem Endothel belegt war, kommt als mögliche Ursache für den ausgebliebenen Anstieg in Frage. Eine ähnliche Vermutung äußerte Christofidou-Solomidou, nachdem sie eine Downregulation des Adhäsionsmoleküls nach Migration feststellte (Christofidou-Solomidou et al., 1997). In besagtem Modell wurde jedoch die abdominale Inflammation untersucht und keine differenzierte Beurteilung aller dort gegebenen Kompartimente vorgenommen, was die Vergleichbarkeit der Aussage mit unseren Ergebnissen einschränkt. Eine weitere Ursache für den beschriebenen Widerspruch der Expressionsabnahme am Endothel bei eigentlich dort lokalisierter Funktion könnte im verwendeten Stimulanz liegen. Albelda et al. stellten fest, dass PMNs nach TNF $\alpha$ -Stimulation CD31-unabhängig in die Lunge migrieren (Albelda et al., 2004). TNF $\alpha$  wiederum ist ein Chemokin, welches von ortsansässigen Zellen bei LPS-Stimulation ausgeschüttet wird (Lu et al., 2008). Eine CD31-unabhängige Migration wäre demnach auch bei LPS-Stimulus denkbar und würde den Abfall der Expression am Endothel und die im Vergleich zum IV-Kompartiment geringe Expression im Interstitium und der Alveole erklären.

Eine von Schenkel und Seidman postulierte, genetisch bedingte, CD31-unabhängige PMN-Migration bei C57Bl/6 Mäusen (Schenkel et al., 2004, Seidman et al., 2009) kann als weitere mögliche Ursache für die niedrigen Expressionsmuster auf dem PMNs distal des Intraavasalraums in Erwägung gezogen werden. Die Hypothese steht jedoch im Widerspruch zu den Ergebnissen der von Albelda und Thompson durchgeführten Untersuchungen zur Stimulusabhängigkeit von CD31 (Thompson et al., 2001, Albelda et al., 2004): Die Studien erfolgten ebenfalls an C57Bl/6-Mäusen und zeigten bei IL1- $\beta$  eine CD31-abhängige PMN-Extravasation. Woodfin et. al untersuchten aus diesem Grund den Stimulus- und Mausstamm-Einfluss in einer Studie mit unterschiedlichen Mauslinien und unterschiedlichen Stimuli. Sie konnten in allen Linien bei TNF $\alpha$  eine CD31-Unabhängigkeit und bei IL1- $\beta$  eine CD31-abhängige PMN-Migration feststellen (Woodfin et al., 2009). Die Mauslinie kann somit für die in dieser Arbeit gemessene niedrige CD31-Expression auf den PMNs nach Verlassen des intravasalen Kompartiments nicht hinreichend als kausal angesehen werden. Die Daten von Woodfin wiederum unterstreichen die Annahme, dass LPS als Stimulus eine CD31-unabhängige Migration auslösen könnte (s.o.).

Trotz der auffällig niedrigen Expression auf den PMNs ab der endothelialen Adhäsion zeigten sich im Interstitium ein Anstieg von CD31 und ein erneuter Abfall auf den intraalveolären PMNs. Dieses interstitielle Expressionsmaximum könnte durch eine Interaktion der Immunzellen untereinander bedingt sein. Die homophile Bindungseigenschaft

des Adhäsionsmoleküls wurde mehrfach beschrieben (Dangerfield et al., 2002, O'Brien et al., 2003), während CD31 auf Epithelzellen und Fibroblasten nicht exprimiert wird. Somit kommen hier die Immunzellen selbst als Bindungspartner in Frage. Des Weiteren ist die homophile Bindung des Moleküls als Aktivator von Integrinen bekannt (Berman and Muller, 1995, Berman et al., 1996), welche wiederum im Interstitium sehr hoch exprimiert werden (vgl. Abbildung 15, S. 61). Die Hypothese der homophilen Interaktion unter Immunzellen via CD31 im Interstitium der Lunge wird durch das in dieser Arbeit gemessene dort lokalisierte Expressionsmaximum auf den PMNs bekräftigt.

#### 4.2.6 CD44

Die Expression von CD44 und auch die Anzahl CD44-positiver PMNs stiegen im Verlauf der Migration am Endothel und in der Alveole an. Der Verlauf der zunehmenden Expression deutet auf eine steigende Bedeutung des Adhäsionsmoleküls im Laufe der Migration hin. Am Endothel kann der Anstieg durch die Rolle des Adhäsionsmoleküls beim „Rolling“ erklärt werden: gemeinsam mit PSGL-1 und dem E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1) interagiert das CD44-Antigen mit den endothelialen Selektinen (Hidalgo et al., 2007, Katayama et al., 2005). Dabei triggert es das „Slow Rolling“ (vgl. 1.3.2, S.14) durch eine CD11a-aktivierende intrazelluläre Signalkaskade (Yago et al., 2010). Im Interstitium war die Expression von CD44 auf den Neutrophilen weiterhin hoch bei gleichbleibendem Anteil positiver Zellen, was eine kritische Rolle des Adhäsionsmoleküls auch in diesem Kompartiment impliziert. Diese Hypothese unterstützend ist die Interaktion mit EZM-Bestandteilen seit langem bekannt, bereits 1990 konnte die Bindung an HA als wichtigstem Liganden von CD44 nachgewiesen werden (Alejandro Aruffo et al., 1990). Auch das Matrixprotein Fibronectin kommt als Bindungspartner in Frage, für Lymphozyten ist es ein nachgewiesener Ligand von CD44 (Jalkanen and Jalkanen, 1992).

Das Kompartiment mit der höchsten Expression und den meisten positiven PMNs war die Alveole (vgl. Abbildung 43, S.99). Dies stellt eine gänzlich neue Erkenntnis dar, da bisher kaum Daten zu einer postmigratorischen Funktion des Antigens seitens der Neutrophilen am Epithel existieren. Am Darmepithel konnte eine Ablösung der PMNs nach der Migration durch CD44 nachgewiesen werden, hier wurde jedoch epitheliales und nicht neutrophiles CD44 untersucht (Brazil et al., 2010). Alstergren et al. zeigten, dass die Polarisierung und gerichtete Migration von PMNs mit dem Grad der CD44-Expression steigen (Alstergren et al., 2004). Die hohe Expression in der Alveole könnte demnach ein Hinweis dafür sein, dass die PMNs dort auf der Epitheloberfläche mittels CD44 gezielt in Richtung der höchsten Pathogenpräsenz patrouillieren.

Die weiterführende Evaluation der Funktion von CD44 stellt eine sehr komplexe Herausforderung dar, da das Adhäsionsmolekül wie einleitend beschrieben in verschiedenen Inflammationsmodellen sowohl protektiven (Liang et al., 2007, van der Windt et al., 2011, van der Windt et al., 2010, Wang et al., 2002) als auch proinflammatorischen (Hasan et al., 2011, Sun et al., 2012) Charakter zeigte. Sowohl die vielseitige Interaktion mit Hyaluronan (Lesley et al., 2000), welches selbst ebenfalls pro- und antiinflammatorische Eigenschaften aufweist (Yang et al., 2012, Muto et al., 2009, Liang et al., 2007), als auch die ubiquitäre Expression des Adhäsionsmoleküls erschweren die Analyse der Funktion von CD44 auf PMNs. Die in dieser Arbeit erstmals gezeigte hohe intrapulmonale Expression auf PMNs - insbesondere auf den Neutrophilen in der Alveole - impliziert, dass die LPS-Antwort der Neutrophilen in der pulmonalen Inflammation CD44-abhängig zu verlaufen scheint. Ob die hohe Dichte des Adhäsionsmoleküls auf den alveolären PMNs im Sinne einer protektiven Expression zur Unterstützung der Entzündungsresolution oder einer proinflammatorischen Expression zur Verstärkung der Immunantwort zu sehen ist, bleibt in Zukunft zu differenzieren. Ein selektiver Knockout von CD44 in Neutrophilen oder eine Verabreichung von inhibierenden Antikörpern über Vernebelung, also eine intraalveoläre Applikation, mit anschließender Beurteilung des Inflammationsgrades könnte weiterführenden Aufschluss über die pro- und antiinflammatorische Komponente der CD44-Funktion im Alveolarraum geben.

#### 4.2.7 CD47

Die Expression von CD47 imponierte auf den Neutrophilen Granulozyten am Endothel und im Interstitium am höchsten (vgl. Abbildung 43, S.99). Als Integrin-assoziiertes Protein ist CD47 an der transendothelialen Migration beteiligt (Cooper et al., 1995), was den Anstieg der Expression in diesem Kompartiment erklärt. Am Endothel war dabei weniger als die Hälfte der PMNs CD47-positiv, während im darauf folgenden Interstitium die „Frequency of parent“ anstieg. In diesem Kompartiment zeigten sich schließlich mehr als die Hälfte der Neutrophilen Granulozyten CD47 positiv und der Expressionsgrad auf den einzelnen Zellen blieb hoch. Die kritische Rolle des Adhäsionsmoleküls lässt sich demnach dem Interstitium zuordnen. Verschiedene in vitro Daten stehen im Einklang mit dieser Hypothese: Neben Interaktion mit dem Basalmembran-assoziierten Protein Entactin (Senior et al., 1992) bindet CD47 auch das EZM-Protein Thrombospondin (Csanyi et al., 2012) und das EZM-Protein Vitronectin (Ong et al., 2005). Letzteres wird bei LPS-induzierter pulmonaler Inflammation hochreguliert (Tsuruta et al., 2007) und ist auch durch seine Interaktion mit dem Adhäsionsmolekül CD11b bekannt, welches ebenfalls sein Expressionsmaximum im interstitiellen Kompartiment aufwies (vgl. 4.2.2, S.90).

Bei der Durchquerung vom Epithel spielt sowohl das CD47 auf Epithelzellen, als auch das CD47 seitens der PMNs eine Rolle, denn die differenzierte Inhibition des Adhäsionsmoleküls auf beiden Zelltypen führte jeweils zu einer Verzögerung der Migration (Liu et al., 2001, Parkos et al., 1996b). In Anbetracht dieser Daten geht man derzeit davon aus, dass zwischen einzelnen Epithelzellen ein „Tunnel“ aus CD172a seitens der PMN und CD47 seitens des Epithels entsteht, durch welchen der Zellverbund durchwandert wird (Zemans et al., 2009). Während die kritische Rolle des *neutrophilen* CD47 im Interstitium durch die hohe Expression in unseren Ergebnissen impliziert wird, ist die Frage nach dessen Bindungspartner bei diesem Migrationsschritt weiterhin offen und bleibt in Zukunft zu evaluieren.

In der Alveole trugen zwar die meisten PMNs noch CD47 auf ihrer Oberfläche, jedoch in signifikant geringerer Konzentration als die PMNs im Interstitium. Postmigratorisch sind bisher keine adhäsiven Eigenschaften von CD47 bekannt. Dass dennoch ein prozentual hoher Anteil der PMNs CD47-positiv ist, kann dadurch bedingt sein, dass CD47-negative PMNs die Alveole erst gar nicht „erreicht“ haben. Vor Ort könnten die intraalveolären PMNs die CD47-Expression im Sinne des „do not eat me“-Signals nutzen, um einer Phagozytose durch Alveolarmakrophagen zu entgehen, wie es bereits für intravasale PMNs (Barrera et al., 2017) und Krebszellen (Liu et al., 2017) postuliert wurde.

#### 4.2.8 CD172a

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass CD172a auf der PMN-Oberfläche im Verlauf der Migration durch die Lungenkompartimente sukzessive zunehmend exprimiert wurde, was für eine Zunahme der Bedeutung mit jedem Migrationsschritt spricht.

In vitro Daten von Alvarez et al. belegten jüngst eine Beteiligung von CD172a an der transendothelialen Migration von PMNs (Alvarez-Zarate et al., 2015), für Monozyten konnte eine transendotheliale Diapedese unter Einbezug von CD172a schon einige Jahre zuvor nachgewiesen werden (de Vries et al., 2002). Diese Erkenntnisse lassen eine Rolle bei der PMN-Migration auch in der pulmonalen Strombahn vermuten, der Anstieg der Expression am Endothel in unserem Modell verstärkt diese Hypothese.

Vom Endothel zum Interstitium war eine weitere Zunahme der Expression zu beobachten. Als ein Grund hierfür kommt eine Interaktion mit der EZM in Frage, in vitro zeigt sich passend dazu die PMN-Migration durch Kollagen-Membranen CD172a-abhängig (Liu et al., 2002). Die intraalveolären Neutrophilen wiesen schließlich die höchste Dichte des Adhäsionsmoleküls im Gesamtverlauf auf (vgl. Abbildung 43, S.99). Passend hierzu regulieren PMNs in vitro bei Aktivierung und Degranulation -wie sie auch in der Alveole als Ort der höchsten Pathogen- und Chemokin-Konzentration stattfindet- ihre CD172a-

Expression hoch (Liu et al., 2002, Stenberg et al., 2013). Eine Interaktion mit Surfactant-Proteinen via SIRP $\alpha$ , wie sie für Makrophagen nachgewiesen wurde (Janssen et al., 2008, Gardai et al., 2003), könnte ebenfalls die in dieser Arbeit nachgewiesene hohe Expression von CD172a auf PMNs in der Alveole bedingen. Somit liefern die Ergebnisse erstmals einen Hinweis darauf, dass auch PMNs mit Surfactant interagieren.

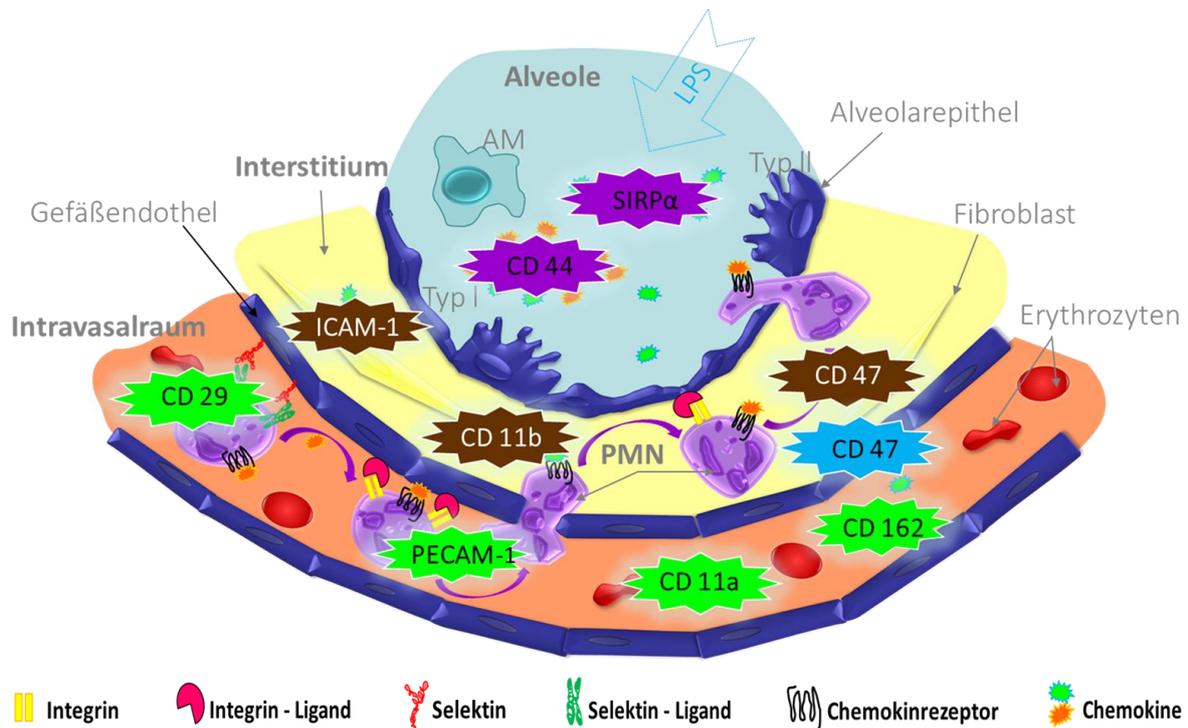
Ein weiterer möglicher Faktor für die zunehmende Oberflächenexpression in den Lungenkompartimenten ist die Interaktion mit CD47. Das Adhäsionsmolekül ist ein bekannter Bindungspartner von CD172a (Jiang et al., 1999, Vernon-Wilson et al., 2000). An intestinale Epithel wurde durch Liu et al. gezeigt, dass Neutrophile mittels CD172a an das CD47 der Epithelzellen binden und den Zellverband durchwandern. Die Migration wurde durch CD47-Inhibition jedoch nur zeitlich verzögert (Liu et al., 2002, Liu et al., 2001) und auch in vivo beobachteten Alvarez et al. einen verzögernden Effekt und keine absolute Reduktion der PMN-Zahlen im Peritonitis-Modell mit CD172a-mutierten Tieren (Alvarez-Zarate et al., 2015). Unsere Daten liefern den Anhaltspunkt für eine ebenfalls existierende Rolle von CD172a an pulmonal transepithelialen Migration. Ob auch hier der CD47-CD172a-Komplex mehr als Faktor für das Timing der Migration fungiert, als die PMN-Zahlen per se zu beeinflussen, könnte durch den Einsatz von inhibierenden Antikörpern im ARDS-Modell geklärt werden.

Insgesamt sind die Daten in der Inflammationsforschung zu CD172a noch sehr lückenhaft und auf einzelne Organsysteme und Stimuli beschränkt, während sich in der Tumorforschung neue Erkenntnisse und Studien zu „CD47-CD172a-Checkpoint-Inhibitoren“ häufen, welche vor allem zum Ziel haben, Tumorzellen der Phagozytose durchs angeborene Immunsystem zugänglich zu machen (Weiskopf, 2017). Der gleiche Ansatzpunkt könnte auch eine überschießende inflammatorische Antwort, wie sie beim ARDS stattfindet, modulieren. Die kritische Rolle des Adhäsionsmoleküls, wie sie durch die in dieser Arbeit gezeigte steigende Expression in den Lungenkompartimenten impliziert wird, spricht ebenso für SIRP $\alpha$  als sinnvolles Target immunmodulatorischer Therapie.

#### 4.2.9 CD162

Das Adhäsionsmolekül CD162 wurde auf den neutrophilen Granulozyten während der Migration durch die Lungenkompartimente sukzessive weniger exprimiert und auch die Anzahl CD162 positiver PMNs nahm mit zunehmendem Migrationsstadium ab. Dieser Verlauf deutet auf eine primäre Rolle des Moleküls in den ersten Stadien der Migration hin (vgl. Abbildung 43, S.99). Verschiedene bereits bekannte Eigenschaften von CD162 unterstützen diese Schlussfolgerung. Bereits beim „Tethering“ (vgl. 1.3.2, S.14), dem initialen Schritt der transendothelialen Migration, ist das Adhäsionsmolekül involviert (Ley et al., 2007). Zusammen mit ESL-1 und CD44 ist CD162 am vaskulären Endothel für die Selektin-Interaktion der Neutrophilen bei der Extravasation verantwortlich; Dies wird durch eine bis zu 85%ige Reduktion der PMN-Migration bei Defizienz dieser Adhäsionsmoleküle evident (Hidalgo et al., 2007). Als E-Selektin Ligand vermittelt CD162 auch das „Slow Rolling“ (vgl. 1.3.2, S.14) der PMNs (Yago et al., 2010). Neben dieser direkten Funktion bei der Initiation der transendothelialen Durchwanderung begünstigt das Molekül zusätzlich indirekt die Migration: Die Bindung der Selektine an PSGL-1 resultiert in Aktivierung der  $\beta$ 2-Integrine am Endothel (Gong et al., 2017).

Die vermutete Bedeutung von CD162 primär in den initialen Migrationsstadien sowie die Annahme, dass in der transepithelialen Durchwanderung aufgrund des fehlenden Rolling Prozesses keine Selektin-Liganden involviert seien (Brazil and Parkos, 2016), stützen sich auf die Erkenntnisse funktioneller Studien mit Blick auf singuläre bzw. partielle Stadien des Migrationsprozesses. Wir können nun erstmals mittels der vorliegenden strukturellen Arbeit den regressiven Verlauf der Molekülexpression über die gesamte Strecke der Migration zeigen, eine abnehmende Bedeutung von PSGL-1 im Laufe der PMN-Wanderung durch die Lungenkompartimente liegt angesichts dieser Erkenntnisse nahe.



**Abbildung 43: Migration neutrophiler Granulozyten in der pulmonalen Inflammation (vgl. Abbildung 1, S.17) mit schematischer Darstellung der Adhäsionsmoleküle in den Kompartimenten ihrer maximalen Expression auf den PMNs.** Die Moleküle sind in dem Kompartiment eingezeichnet, in welchem die PMNs die jeweils höchste Dichte auf ihrer Oberfläche tragen (grün=Intravasal, blau=am Endothel adhärirt, braun=im Interstitium, violett=intraalveolär). Während CD29, PECAM (CD31), CD11a und CD162 intravasal ihr Expressionsmaximum und damit scheinbar die größte Bedeutung in der Initialphase der Migration haben, wird CD47 am Endothel und im Interstitium gleichsam stark exprimiert. Da jedoch im Interstitium weitaus mehr CD47 PMNs positiv sind als am Endothel, kann man die kritische Rolle des Adhäsionsmoleküls dem Interstitium zuordnen. Der bekannte Leukozyten-Aktivierungsmarker CD11b und das ICAM-1 (CD54) sind ebenfalls im Interstitium sehr hoch exprimiert, was für eine Involvierung bei der Interaktion mit Extrazellulärmatrix und/oder bei der basolateralen Epitheladhäsion spricht. Die beiden Adhäsionsmoleküle CD44 und SIRPα (CD712a) sind in der Alveole am stärksten exprimiert, wodurch eine Rolle bei postmigratorischen Prozessen wie dem Patrouillieren an der Alveolaroberfläche nahelegt.

AM=Alveolarmakrophage, PMN=Neutrophiler Granulozyt, LPS=Lipopolysaccharid, PECAM-1=Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1, ICAM-1=Intercellular Adhesion Molecule-1, SIRPα=Signal Regulatory Protein α (eigene Darstellung)

### 4.3 Stimulation von humanem Vollblut

Um dem komplexen Zusammenspiel von immunologischen Faktoren bei Vorliegen einer Inflammation gerecht zu werden, wurde der Einfluss verschiedener Stimulanzen auf neutrophile Granulozyten in ihrem ursprünglichen Milieu, dem Vollblut, anstelle auf isolierten PMNs untersucht. Durch die Anwesenheit von Plasmaproteinen und die von weiteren Immunzellen ausgeschütteten Zytokine war somit eine physiologischere Imitation der Einflüsse eines inflammatorischen Stimulus auf die PMNs möglich, als wenn die PMNs zuvor einem Isolationsverfahren unterzogen worden wären.

Die Expression der Adhäsionsmoleküle zeigte durch Stimulation mit LPS und TNF $\alpha$  eine Hochregulation, wobei LPS in den meisten Fällen eine höhere Expression bewirkte, als TNF $\alpha$ . Die Ergebnisse verdeutlichen, dass das in unserem murinen Modell verwendete Lipopolysaccharid direkt Einfluss auf die Expression jedes untersuchten Moleküls nimmt. Dies war bisher nur für einzelne Adhäsionsmoleküle wie CD11b nachgewiesen (Gomes et al., 2010). TNF $\alpha$  wiederum ist ein Zytokin, welches downstream der LPS getriggerten Signalkaskaden ausgeschüttet wird (Lu et al., 2008). Es ist anzunehmen, dass durch Applikation dieses Stimulanz nur ein Teil der inflammatorischen LPS-Kaskade induziert wurde und somit auch ein geringerer Expressionsanstieg auf den PMNs zu erwarten war.

Weiterhin untersuchten wir die Effekte von MIP-2 und KC, beides funktionelle Analoga zum humanen IL-8, welches eine kritische Rolle in Pathogenese und Verlauf vom ARDS spielt (Donnelly et al., 1993, Chollet-Martin et al., 1993, Le et al., 2015). Des Weiteren zeigten die Stimulanzen in Vorarbeiten eine PMN-aktivierende und migrationsinduzierende Wirkung (Reutershan et al., 2006, Zhang et al., 2001, Phillipson et al., 2006). Der ausgebliebene Effekt von MIP-2- und KC-Stimulation war insofern überraschend. Keins der neun Adhäsionsmoleküle wurde trotz ausführlicher Dosistitration in Vorversuchen durch MIP-2 oder KC hochreguliert. Obwohl die Stimulanzen spezieübergreifend angewendet werden können, ist ein Wirkungsdefizit der Substanzen bei humanen Zellen als Ursache des ausgebliebenen Effekts nicht auszuschließen.

#### **4.4 Stimulation von humanen pulmonalen Epithelzellen**

Da zur transendothelialen Migration weitaus mehr Daten vorliegen, als zur Migration über die epitheliale Barriere, wurden die beteiligten Komponenten der transepithelialen Migration separat untersucht. Lungenepithelzellen selbst wurden einer Stimulation unterzogen und auch die PMNs wurden auf den Einfluss der Wanderung durch einen Epithelzelllayer *in vitro* untersucht.

Durch Stimulation mit TNF $\alpha$  regulierten die Epithelzellen größtenteils ihre Adhäsionsmolekülexpression hoch. Das Stimulanz wurde gewählt, da LPS in Vorversuchen keinerlei Effekt auf die Expression zeigte. Dieser ausbleibende Effekt war insofern plausibel, als dass LPS über den TLR-4 Rezeptor wirkt, der vor allem auf Makrophagen bzw. Monozyten und nicht auf Epithelzellen exprimiert wird (Lu et al., 2008). Es konnte somit belegt werden, dass die Epithelzellen auf das TNF $\alpha$  und nicht auf das LPS selbst reagieren respektive dass die Produktion des Chemokins durch anwesende Immunzellen von Nöten ist, um eine Aktivierung des Epithels in der Inflammation hervorzurufen. Diese Aktivierung konnten wir anhand der Hochregulation der Adhäsionsmoleküle zeigen.

#### **4.5 Migration von PMNs *in vitro*: Transmigrationsversuch mit humanen pulmonalen Epithelzellen (H441) und humanem Vollblut**

Zumeist werden die PMNs vor Versuchsdurchführung einem Isolationsprozess aus dem Blut zu unterzogen und die Zellen in isotonischer Lösung zu resuspendiert (Edens et al., 2002, Brazil et al., 2010). Um die Einflussfaktoren der anderen Blutkomponenten nicht auszuschließen und eine vorzeitige Aktivierung der PMNs durch den Isolationsprozess zu umgehen, gaben wir anstelle isolierter PMNs Vollblut auf die Transwells.

Die einzelnen Komponenten des Versuchsaufbaus bargen Einschränkungen in der Abbildung der Verhältnisse des lebenden Organismus. So treffen PMNs in der Lunge nach ihrem Aufenthalt in der Blutbahn normalerweise zunächst auf Endothel und EZM, in unserem Modell bestand der Kontakt direkt zwischen Blut und Epithel. In der Lunge selbst grenzen die Pneumozyten im lebenden Organismus apikal an Luft, in unserem Modell befand sich an dieser Stelle das flüssige Stimulanz. Die Umsetzung dieses Einflussfaktors in ein *in vitro* Modell wird derzeit vielversprechend erforscht (Chu et al., 2017, Yonker et al., 2017).

Trotz der eingeschränkten Vergleichbarkeit mit den Migrationsschritten *in vivo*, konnten teils ähnliche Verläufe der Expression beobachtet werden. So zeigte CD162 *in vitro* wie *in vivo* eine sukzessive Expressionsabnahme. Die CD44 Expression auf den PMNs stieg sowohl in den murinen Kompartimenten, als auch in den Transwell-Kompartimenten. CD11b

und CD54 wurden in vivo im Interstitium maximal exprimiert, die PMNs in vitro verzeichneten hierzu passend im Epithelzelllayer die höchste Expression.

Die PMNs zeigten in vitro wie in vivo Veränderungen der Expression abhängig vom Migrationsstadium. Der Einfluss der Migration speziell durch die epitheliale Barriere wird durch die Transwell-Ergebnisse verdeutlicht. Gleichzeitig weisen diese Beobachtungen auf eine Übertragbarkeit der murinen Ergebnisse auf den menschlichen Organismus hin. Die Hypothese, dass auch die humanen PMN auf dem Weg in die Alveole ihre Adhäsionsmoleküle verändern, wird hierdurch gestützt.

## 5 Zusammenfassung

Das ARDS ist trotz stetiger Optimierung der intensivmedizinischen Versorgung weltweit nach wie vor mit einer hohen Letalität von bis zu 46% behaftet. Der Verlauf der akuten pulmonalen Inflammation wird maßgeblich vom Ausmaß der PMN-Infiltration mitbestimmt. Die neutrophilen Granulozyten migrieren dabei mittels Adhäsionsmolekülen durch unterschiedliche Lungenkompartimente: Aus dem Intravasalraum heften sie sich zunächst an das Endothel und durchwandern dieses. Anschließend gelangen die Neutrophilen durch das Interstitium und das Pulmonalepithel in die Alveole. Bisherige Kenntnisse zur Funktion einzelner Moleküle in der Lunge beziehen sich vor allem auf die transendotheliale Migration oder die Zellen in der Bronchiallavage als Endpunkt der Migration, lassen also keine durchgehende Verfolgung des Expressionsverlaufs zu.

Zielsetzung dieser Arbeit war deshalb die differenzierte Untersuchung und Darstellung der Adhäsionsmoleküle auf den neutrophilen Granulozyten im Rahmen der vollständigen Durchwanderung der Lunge. Hierfür wurde bei Mäusen durch LPS-Inhalation eine Inflammation induziert. Mittels spezifischer Markierung in der Durchflusszytometrie konnte anschließend die Adhäsionsmolekülexpression von PMN-Populationen aus insgesamt vier verschiedenen Migrationsstadien erfasst werden: den intravasalen PMNs, endothelial adhären PMNs, interstitiellen PMNs und intraalveolären PMNs. Ergänzend wurden in vitro verschiedene Untersuchungen zur inflammatorischen und migratorischen Bedeutung der Adhäsionsmoleküle auf humanen Zellen durchgeführt.

Es zeigten sich abhängig von Migrationsstadium und Molekül sehr variable Verläufe der Expression auf den Neutrophilen, was einen unterschiedlichen Impact der einzelnen Moleküle für die jeweiligen Migrationsschritte nahelegt. Während die Expressionen der Integrine CD11a und CD29 sowie die Expression des Selektin-Liganden CD162 und von PECAM-1 bzw. CD31 auf ihrem Weg in die Alveole abnahmen und dementsprechend ihr Einfluss auf die PMN-Migration, steigerte sich die Expression von CD44 und CD172a. Letztere Adhäsionsmoleküle tragen vermutlich zur transepithelialen Migration und möglichen postmigratorischen Prozessen wie dem Patrouillieren am apikalen Alveolarepithel bei. CD47, CD54 und der leukozytäre Aktivierungsmarker CD11b waren im Interstitium maximal exprimiert, was für eine entscheidende Rolle bei der Interaktion mit Komponenten der Extrazellulärmatrix und/oder bei der epithelialen basolateralen Adhäsion spricht. In vitro konnten die inflammatorische Bedeutung sowie migrationsbedingte Veränderungen der Molekülexpression auf humanen PMNs bestätigt werden.

Die Daten dieser Arbeit zeigen erstmals die Adhäsionsmolekülexpression der PMNs abhängig von ihrem Migrationsstadium und liefern so den molekularen Hintergrund für das

ganzheitliche Verständnis der PMN-Migration respektive die Basis für die Entwicklung und Verbesserung therapeutischer Strategien.

## Literaturverzeichnis

- ABRAHAM, E., CARMODY, A., SHENKAR, R. & ARCAROLI, J. 2000. Neutrophils as early immunologic effectors in hemorrhage- or endotoxemia-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 279, L1137-45.
- ADAMS, S., VAN DER LAAN, L. J., VERNON-WILSON, E., RENARDEL DE LAVALETTE, C., DOPP, E. A., DIJKSTRA, C. D., SIMMONS, D. L. & VAN DEN BERG, T. K. 1998. Signal-regulatory protein is selectively expressed by myeloid and neuronal cells. *J Immunol*, 161, 1853-9.
- AGGARWAL, A., BAKER, C. S., EVANS, T. W. & HASLAM, P. L. 2000. G-CSF and IL-8 but not GM-CSF correlate with severity of pulmonary neutrophilia in acute respiratory distress syndrome. *Eur Respir J*, 15, 895-901.
- ALBELDA, S. M., LAU, K. C., CHIEN, P., HUANG, Z. Y., ARGUIRIS, E., BOHEN, A., SUN, J., BILLET, J. A., CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M., INDIK, Z. K. & SCHREIBER, A. D. 2004. Role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in macrophage Fcγ receptor function. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 31, 246-55.
- ALBELDA, S. M., MULLER, W. A., BUCK, C. A. & NEWMAN, P. J. 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol*, 114, 1059-68.
- ALEJANDRO ARUFFO, MICHAEL MELNICK, IVAN STAMENKOVIC, CHARLES B. UNDERHILL & SEED, A. B. 1990. CD44 Is the Principal Cell Surface Receptor for Hyaluronate. *Cell*, 61, 1303- 1313.
- ALSTERGREN, P., ZHU, B., GLOGAUER, M., MAK, T. W., ELLEN, R. P. & SODEK, J. 2004. Polarization and directed migration of murine neutrophils is dependent on cell surface expression of CD44. *Cell Immunol*, 231, 146-57.
- ALVAREZ-ZARATE, J., MATLUNG, H. L., MATOZAKI, T., KUIJPERS, T. W., MARIDONNEAU-PARINI, I. & VAN DEN BERG, T. K. 2015. Regulation of Phagocyte Migration by Signal Regulatory Protein-Alpha Signaling. *PLoS One*, 10, e0127178.
- ASADUZZAMAN, M., ZHANG, S., LAVASANI, S., WANG, Y. & THORLACIUS, H. 2008. LFA-1 and MAC-1 mediate pulmonary recruitment of neutrophils and tissue damage in abdominal sepsis. *Shock*, 30, 254-9.
- ASHBAUGH, D. G., BIGELOW, D. B., PETTY, T. L. & LEVINE, B. E. 1967. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, 2, 319-23.
- BARCLAY, A. N. & VAN DEN BERG, T. K. 2014. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRPα) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol*, 32, 25-50.
- BARRERA, L., MONTES-SERVIN, E., HERNANDEZ-MARTINEZ, J. M., GARCIA-VICENTE, M. L. A., MONTES-SERVIN, E., HERRERA-MARTINEZ, M., CRISPIN, J. C., BORBOLLA-ESCOBOZA, J. R. & ARRIETA, O. 2017. CD47 overexpression is associated with decreased neutrophil apoptosis/phagocytosis and poor prognosis in non-small-cell lung cancer patients. *Br J Cancer*.
- BAS, A., FORSBERG, G., HAMMARSTROM, S. & HAMMARSTROM, M. L. 2004. Utility of the housekeeping genes 18S rRNA, beta-actin and glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase for normalization in real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction analysis of gene expression in human T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 59, 566-73.
- BASIT, A., REUTERSCHAN, J., MORRIS, M. A., SOLGA, M., ROSE, C. E., JR. & LEY, K. 2006. ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 291, L200-7.
- BELLANI, G., LAFFEY, J. G., PHAM, T., FAN, E., BROCHARD, L., ESTEBAN, A., GATTINONI, L., VAN HAREN, F., LARSSON, A., MCAULEY, D. F., RANIERI, M., RUBENFELD, G., THOMPSON, B. T., WRIGGE, H., SLUTSKY, A. S. & PESENTI, A. 2016. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *Jama*, 315, 788-800.

- BERMAN, M. E. & MULLER, W. A. 1995. Ligation of platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1/CD31) on monocytes and neutrophils increases binding capacity of leukocyte CR3 (CD11b/CD18). *J Immunol*, 154, 299-307.
- BERMAN, M. E., XIE, Y. & MULLER, W. A. 1996. Roles of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1, CD31) in natural killer cell transendothelial migration and beta 2 integrin activation. *J Immunol*, 156, 1515-24.
- BHATIA, M., ZEMANS, R. L. & JEYASEELAN, S. 2012. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46, 566-72.
- BIAN, Z., GUO, Y., LUO, Y., TREMBLAY, A., ZHANG, X., DHARMA, S., MISHRA, A. & LIU, Y. 2013. CD47 deficiency does not impede polymorphonuclear neutrophil transmigration but attenuates granulopoiesis at the postacute stage of colitis. *J Immunol*, 190, 411-7.
- BORGES, E., EYTNER, R., MOLL, T., STEEGMAIER, M., CAMPBELL, M. A., LEY, K., MOSSMANN, H. & VESTWEBER, D. 1997. The P-selectin glycoprotein ligand-1 is important for recruitment of neutrophils into inflamed mouse peritoneum. *Blood*, 90, 1934-42.
- BRAZIL, J. C., LEE, W. Y., KOLEGRAFF, K. N., NUSRAT, A., PARKOS, C. A. & LOUIS, N. A. 2010. Neutrophil migration across intestinal epithelium: evidence for a role of CD44 in regulating detachment of migrating cells from the luminal surface. *J Immunol*, 185, 7026-36.
- BRAZIL, J. C. & PARKOS, C. A. 2016. Pathobiology of neutrophil-epithelial interactions. *Immunol Rev*, 273, 94-111.
- BROWER, R. G., MATTHAY, M. A., MORRIS, A., SCHOENFELD, D., THOMPSON, B. T. & WHEELER, A. 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, 1301-8.
- BULLARD, D. C., QIN, L., LORENZO, I., QUINLIN, W. M., DOYLE, N. A., BOSSE, R., VESTWEBER, D., DOERSCHUK, C. M. & BEAUDET, A. L. 1995. P-selectin/ICAM-1 double mutant mice: acute emigration of neutrophils into the peritoneum is completely absent but is normal into pulmonary alveoli. *J Clin Invest*, 95, 1782-8.
- BURNS, A. R., TAKEI, F. & DOERSCHUK, C. M. 1994. Quantitation of ICAM-1 expression in mouse lung during pneumonia. *J Immunol*, 153, 3189-98.
- BURNS, J. A., ISSEKUTZ, T. B., YAGITA, H. & ISSEKUTZ, A. C. 2001. The alpha 4 beta 1 (very late antigen (VLA)-4, CD49d/CD29) and alpha 5 beta 1 (VLA-5, CD49e/CD29) integrins mediate beta 2 (CD11/CD18) integrin-independent neutrophil recruitment to endotoxin-induced lung inflammation. *J Immunol*, 166, 4644-9.
- CARRITHERS, M., TANDON, S., CANOSA, S., MICHAUD, M., GRAESSER, D. & MADRI, J. A. 2005. Enhanced susceptibility to endotoxic shock and impaired STAT3 signaling in CD31-deficient mice. *Am J Pathol*, 166, 185-96.
- CHESNUTT, B. C., SMITH, D. F., RAFFLER, N. A., SMITH, M. L., WHITE, E. J. & LEY, K. 2006. Induction of LFA-1-dependent neutrophil rolling on ICAM-1 by engagement of E-selectin. *Microcirculation*, 13, 99-109.
- CHIN, A. C. & PARKOS, C. A. 2006. Neutrophil transepithelial migration and epithelial barrier function in IBD: potential targets for inhibiting neutrophil trafficking. *Ann N Y Acad Sci*, 1072, 276-87.
- CHOLLET-MARTIN, S., MONTRAVERS, P., GIBERT, C., ELBIM, C., DESMONTS, J. M., FAGON, J. Y. & GOUGEROT-POCIDALO, M. A. 1993. High levels of interleukin-8 in the blood and alveolar spaces of patients with pneumonia and adult respiratory distress syndrome. *Infect Immun*, 61, 4553-9.
- CHRISTOFIDOU-SOLOMIDOU, M., NAKADA, M. T., WILLIAMS, J., MULLER, W. A. & DELISSER, H. M. 1997. Neutrophil platelet endothelial cell adhesion molecule-1 participates in neutrophil recruitment at inflammatory sites and is down-regulated after leukocyte extravasation. *J Immunol*, 158, 4872-8.
- CHU, K. K., KUSEK, M. E., LIU, L., SOM, A., YONKER, L. M., LEUNG, H., CUI, D., RYU, J., EATON, A. D., TEARNEY, G. J. & HURLEY, B. P. 2017. Illuminating dynamic neutrophil trans-epithelial migration with micro-optical coherence tomography. *Sci Rep*, 8, 45789.

- CHUNG, C. H., CHANG, C. H., HSU, C. C., LIN, K. T., PENG, H. C. & HUANG, T. F. 2017. Aggretin Venom Polypeptide as a Novel Anti-angiogenesis Agent by Targeting Integrin  $\alpha 2\beta 1$ . *Sci Rep*, 7, 43612.
- COOPER, D., LINDBERG, F. P., GAMBLE, J. R., BROWN, E. J. & VADAS, M. A. 1995. Transendothelial migration of neutrophils involves integrin-associated protein (CD47). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3978-82.
- CSANYI, G., YAO, M., RODRIGUEZ, A. I., AL GHOULEH, I., SHARIFI-SANJANI, M., FRAZZIANO, G., HUANG, X., KELLEY, E. E., ISENBERG, J. S. & PAGANO, P. J. 2012. Thrombospondin-1 regulates blood flow via CD47 receptor-mediated activation of NADPH oxidase 1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, 2966-73.
- DA COSTA MARTINS, P., GARCIA-VALLEJO, J. J., VAN THIENEN, J. V., FERNANDEZ-BORJA, M., VAN GILS, J. M., BECKERS, C., HORREVOETS, A. J., HORDIJK, P. L. & ZWAGINGA, J. J. 2007. P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27, 1023-9.
- DALEY, J. M., THOMAY, A. A., CONNOLLY, M. D., REICHNER, J. S. & ALBINA, J. E. 2008. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*, 83, 64-70.
- DANGERFIELD, J., LARBI, K. Y., HUANG, M. T., DEWAR, A. & NOURSHARGH, S. 2002. PECAM-1 (CD31) homophilic interaction up-regulates  $\alpha 6\beta 1$  on transmigrated neutrophils in vivo and plays a functional role in the ability of  $\alpha 6$  integrins to mediate leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *J Exp Med*, 196, 1201-11.
- DE VRIES, H. E., HENDRIKS, J. J., HONING, H., DE LAVALETTE, C. R., VAN DER POL, S. M., HOOIJBERG, E., DIJKSTRA, C. D. & VAN DEN BERG, T. K. 2002. Signal-regulatory protein  $\alpha$ -CD47 interactions are required for the transmigration of monocytes across cerebral endothelium. *J Immunol*, 168, 5832-9.
- DELISSER, H. M. & ALBELDA, S. M. 1998. The Function of Cell Adhesion Molecules in Lung Inflammation: More Questions Than Answers. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 19, 533-536.
- DEVI, S., LI, A., WESTHORPE, C. L., LO, C. Y., ABEYNAIKE, L. D., SNELGROVE, S. L., HALL, P., OOI, J. D., SOBEY, C. G., KITCHING, A. R. & HICKEY, M. J. 2013. Multiphoton imaging reveals a new leukocyte recruitment paradigm in the glomerulus. *Nat Med*, 19, 107-12.
- DIMITROFF, C. J., LEE, J. Y., FUHLBRIGGE, R. C. & SACKSTEIN, R. 2000. A distinct glycoform of CD44 is an L-selectin ligand on human hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13841-6.
- DING, Z. M., BABENSEE, J. E., SIMON, S. I., LU, H., PERRARD, J. L., BULLARD, D. C., DAI, X. Y., BROMLEY, S. K., DUSTIN, M. L., ENTMAN, M. L., SMITH, C. W. & BALLANTYNE, C. M. 1999. Relative contribution of LFA-1 and Mac-1 to neutrophil adhesion and migration. *J Immunol*, 163, 5029-38.
- DOERSCHUK, C. M., QUINLAN, W. M., DOYLE, N. A., BULLARD, D. C., VESTWEBER, D., JONES, M. L., TAKEI, F., WARD, P. A. & BEAUDET, A. L. 1996. The role of P-selectin and ICAM-1 in acute lung injury as determined using blocking antibodies and mutant mice. *J Immunol*, 157, 4609-14.
- DOERSCHUK, C. M., WINN, R. K., COXSON, H. O. & HARLAN, J. M. 1990. CD18-dependent and -independent mechanisms of neutrophil emigration in the pulmonary and systemic microcirculation of rabbits. *J Immunol*, 144, 2327-33.
- DONNELLY, S. C., STRIETER, R. M., KUNKEL, S. L., WALZ, A., ROBERTSON, C. R., CARTER, D. C., GRANT, I. S., POLLOK, A. J. & HASLETT, C. 1993. Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups. *Lancet*, 341, 643-7.
- DOWNEY, G. P., WORTHEN, G. S., HENSON, P. M. & HYDE, D. M. 1993. Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum. *Am Rev Respir Dis*, 147, 168-76.
- EDENS, H. A., LEVI, B. P., JAYE, D. L., WALSH, S., REAVES, T. A., TURNER, J. R., NUSRAT, A. & PARKOS, C. A. 2002. Neutrophil transepithelial migration: evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjunctional migration. *J Immunol*, 169, 476-86.

- FESTIC, E., KOR, D. J. & GAJIC, O. 2015. Prevention of acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care*, 21, 82-90.
- FORTUNATI, E., KAZEMIER, K. M., GRUTTERS, J. C., KOENDERMAN, L. & VAN DEN BOSCH V, J. 2009. Human neutrophils switch to an activated phenotype after homing to the lung irrespective of inflammatory disease. *Clin Exp Immunol*, 155, 559-66.
- FUJIWARA, Y., FURUKAWA, K., HARUKI, K., SHIMADA, Y., IIDA, T., SHIBA, H., UWAGAWA, T., OHASHI, T. & YANAGA, K. 2011. Nafamostat mesilate can prevent adhesion, invasion and peritoneal dissemination of pancreatic cancer thorough nuclear factor kappa-B inhibition. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*, 18, 731-9.
- GABIUS, H. J., KALTNER, H., KOPITZ, J. & ANDRE, S. 2015. The glycobiochemistry of the CD system: a dictionary for translating marker designations into glycan/lectin structure and function. *Trends Biochem Sci*, 40, 360-76.
- GADHOUM, S. Z., MADHOUN, N. Y., ABUELELA, A. F. & MERZABAN, J. S. 2016. Anti-CD44 antibodies inhibit both mTORC1 and mTORC2: a new rationale supporting CD44-induced AML differentiation therapy. *Leukemia*, 30, 2397-2401.
- GAEHTGENS, B. W. A. P. 2000. Adhesion Molecules: The Path to a New Understanding of Acute Inflammation. *News Physiol. Sci.*, 15.
- GAO, J. X. & ISSEKUTZ, A. C. 1996. Mac-1 (CD11b/CD18) is the predominant beta 2 (CD18) integrin mediating human neutrophil migration through synovial and dermal fibroblast barriers. *Immunology*, 88, 463-70.
- GAO, J. X. & ISSEKUTZ, A. C. 1997. The beta 1 integrin, very late activation antigen-4 on human neutrophils can contribute to neutrophil migration through connective tissue fibroblast barriers. *Immunology*, 90, 448-54.
- GARDAL, S. J., XIAO, Y. Q., DICKINSON, M., NICK, J. A., VOELKER, D. R., GREENE, K. E. & HENSON, P. M. 2003. By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell*, 115, 13-23.
- GEISSMANN, F., JUNG, S. & LITTMAN, D. R. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19, 71-82.
- GHOSH, S. & PANACCIONE, R. 2010. Anti-adhesion molecule therapy for inflammatory bowel disease. *Therap Adv Gastroenterol*, 3, 239-58.
- GIRAULT, A., CHEBLI, J., PRIVE, A., TRINH, N. T., MAILLE, E., GRYGORCZYK, R. & BROCHIERO, E. 2015. Complementary roles of KCa3.1 channels and beta1-integrin during alveolar epithelial repair. *Respir Res*, 16, 100.
- GOMES, N. E., BRUNIALTI, M. K. C., MENDES, M. E., FREUDENBERG, M., GALANOS, C. & SALOMÃO, R. 2010. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43, 853-858.
- GONG, Y., ZHANG, Y., FENG, S., LIU, X., LU, S. & LONG, M. 2017. Dynamic contributions of P- and E-selectins to beta2-integrin-induced neutrophil transmigration. *Faseb j*, 31, 212-223.
- GOODMAN, B. E., FLEISCHER, R. S. & CRANDALL, E. D. 1983. Evidence for active Na<sup>+</sup> transport by cultured monolayers of pulmonary alveolar epithelial cells. *Am J Physiol*, 245, C78-83.
- GRISSOM, C. K., HIRSHBERG, E. L., DICKERSON, J. B., BROWN, S. M., LANSPA, M. J., LIU, K. D., SCHOENFELD, D., TIDSWELL, M., HITE, R. D., ROCK, P., MILLER, R. R., 3RD & MORRIS, A. H. 2015. Fluid management with a simplified conservative protocol for the acute respiratory distress syndrome\*. *Crit Care Med*, 43, 288-95.
- GROMMES, J. & SOEHNLEIN, O. 2011. Contribution of neutrophils to acute lung injury. *Mol Med*, 17, 293-307.
- GROPPER, M. A. & WIENER-KRONISH, J. 2008. The epithelium in acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care*, 14, 11-5.
- GUYER, D. A., MOORE, K. L., LYNAM, E. B., SCHAMMEL, C. M., ROGELJ, S., MCEVER, R. P. & SKLAR, L. A. 1996. P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) is a ligand for L-selectin in neutrophil aggregation. *Blood*, 88, 2415-21.

- HASAN, Z., PALANI, K., RAHMAN, M. & THORLACIUS, H. 2011. Targeting CD44 expressed on neutrophils inhibits lung damage in abdominal sepsis. *Shock*, 35, 567-72.
- HELLEWELL, P. G., YOUNG, S. K., HENSON, P. M. & WORTHEN, G. S. 1994. Disparate role of the beta 2-integrin CD18 in the local accumulation of neutrophils in pulmonary and cutaneous inflammation in the rabbit. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 10, 391-8.
- HEMLER, M. E. 1990. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol*, 8, 365-400.
- HENDERSON, R. B., LIM, L. H., TESSIER, P. A., GAVINS, F. N., MATHIES, M., PERRETTI, M. & HOGG, N. 2001. The use of lymphocyte function-associated antigen (LFA)-1-deficient mice to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *J Exp Med*, 194, 219-26.
- HIDALGO, A., PEIRED, A. J., WILD, M. K., VESTWEBER, D. & FRENETTE, P. S. 2007. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*, 26, 477-89.
- HIRATA, T., MERRILL-SKOLOFF, G., AAB, M., YANG, J., FURIE, B. C. & FURIE, B. 2000. P-Selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is a physiological ligand for E-selectin in mediating T helper 1 lymphocyte migration. *J Exp Med*, 192, 1669-76.
- HOLLAND, E. J., LUCHS, J., KARPECKI, P. M., NICHOLS, K. K., JACKSON, M. A., SALL, K., TAUBER, J., ROY, M., RAYCHAUDHURI, A. & SHOJAEI, A. 2017. Lifitegrast for the Treatment of Dry Eye Disease: Results of a Phase III, Randomized, Double-Masked, Placebo-Controlled Trial (OPUS-3). *Ophthalmology*, 124, 53-60.
- HOLLINGSWORTH, J. W., LI, Z., BRASS, D. M., GARANTZIOTIS, S., TIMBERLAKE, S. H., KIM, A., HOSSAIN, I., SAVANI, R. C. & SCHWARTZ, D. A. 2007. CD44 regulates macrophage recruitment to the lung in lipopolysaccharide-induced airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 37, 248-53.
- HUANG, Y., MA, Y., GAO, P. & YAO, Z. 2017. Targeting CD47: the achievements and concerns of current studies on cancer immunotherapy. *J Thorac Dis*, 9, E168-e174.
- JALKANEN, S. & JALKANEN, M. 1992. Lymphocyte CD44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol*, 116, 817-25.
- JANSSEN, W. J., MCPHILLIPS, K. A., DICKINSON, M. G., LINDERMAN, D. J., MORIMOTO, K., XIAO, Y. Q., OLDHAM, K. M., VANDIVIER, R. W., HENSON, P. M. & GARDAI, S. J. 2008. Surfactant proteins A and D suppress alveolar macrophage phagocytosis via interaction with SIRP alpha. *Am J Respir Crit Care Med*, 178, 158-67.
- JIANG, P., LAGENAUR, C. F. & NARAYANAN, V. 1999. Integrin-associated protein is a ligand for the P84 neural adhesion molecule. *J Biol Chem*, 274, 559-62.
- JING YANG, T. H., KEVIN CROCE, GLENN MERRILL-SKOLOFF,, BORIS TCHERNYCHEV, E. W., ROBERT FLAUMENHAFT, & BARBARA C. FURIE, A. B. F. 1999. Targeted Gene Disruption Demonstrates That P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL-1) Is Required for P-Selectin-mediated but Not E-Selectin-mediated Neutrophil Rolling and Migration. *J. Exp. Med.* , 190 1769–1782
- KADIOGLU, A., DE FILIPPO, K., BANGERT, M., FERNANDES, V. E., RICHARDS, L., JONES, K., ANDREW, P. W. & HOGG, N. 2011. The integrins Mac-1 and alpha4beta1 perform crucial roles in neutrophil and T cell recruitment to lungs during *Streptococcus pneumoniae* infection. *J Immunol*, 186, 5907-15.
- KANAZAWA, Y., SAITO, Y., SUPRIATNA, Y., TEZUKA, H., KOTANI, T., MURATA, Y., OKAZAWA, H., OHNISHI, H., KINOCHI, Y., NOJIMA, Y., OHTEKI, T., SHIMOSEGAWA, T. & MATOZAKI, T. 2010. Role of SIRPalpha in regulation of mucosal immunity in the intestine. *Genes Cells*, 15, 1189-200.
- KANSE, S. M., MATZ, R. L., PREISSNER, K. T. & PETER, K. 2004. Promotion of leukocyte adhesion by a novel interaction between vitronectin and the beta2 integrin Mac-1 (alphaMbeta2, CD11b/CD18). *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 2251-6.
- KATAYAMA, Y., HIDALGO, A., CHANG, J., PEIRED, A. & FRENETTE, P. S. 2005. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med*, 201, 1183-9.

- KIDNEY, J. C. & PROUD, D. 2000. Neutrophil transmigration across human airway epithelial monolayers: mechanisms and dependence on electrical resistance. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 23, 389-95.
- KINASHI, T. 2005. Intracellular signalling controlling integrin activation in lymphocytes. *Nat Rev Immunol*, 5, 546-59.
- KODAMA, K., TODA, K., MORINAGA, S., YAMADA, S. & BUTTE, A. J. 2015. Anti-CD44 antibody treatment lowers hyperglycemia and improves insulin resistance, adipose inflammation, and hepatic steatosis in diet-induced obese mice. *Diabetes*, 64, 867-75.
- KOLACZKOWSKA, E. & KUBES, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75.
- KONRAD, F. M., BRAUN, S., NGAMSRI, K. C., VOLLMER, I. & REUTERSHAN, J. 2014. Heme oxygenase-1 attenuates acute pulmonary inflammation by decreasing the release of segmented neutrophils from the bone marrow. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 307, L707-17.
- KOUBEK, K. 2008. [Human leukocyte differentiation antigens and CD classification]. *Vnitr Lek*, 54, 402-9.
- KUMASAKA, T., QUINLAN, W. M., DOYLE, N. A., CONDON, T. P., SLIGH, J., TAKEI, F., BEAUDET, A., BENNETT, C. F. & DOERSCHUK, C. M. 1996. Role of the intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1) in endotoxin-induced pneumonia evaluated using ICAM-1 antisense oligonucleotides, anti-ICAM-1 monoclonal antibodies, and ICAM-1 mutant mice. *J Clin Invest*, 97, 2362-9.
- KUWANO, Y., SPELTEN, O., ZHANG, H., LEY, K. & ZARBOCK, A. 2010. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood*, 116, 617-24.
- LAM, F. W., BURNS, A. R., SMITH, C. W. & RUMBAUT, R. E. 2011. Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 300, H468-75.
- LANGEREIS, J. D. 2013. Neutrophil integrin affinity regulation in adhesion, migration, and bacterial clearance. *Cell Adh Migr*, 7, 476-81.
- LARSEN, R. & ZIEGENFUß, T. 2013. *Beatmung: Grundlagen und Praxis*, Springer Berlin Heidelberg.
- LE, N. P., CHANNABASAPPA, S., HOSSAIN, M., LIU, L. & SINGH, B. 2015. Leukocyte-specific protein 1 regulates neutrophil recruitment in acute lung inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 309, L995-1008.
- LEE, P. Y., WANG, J. X., PARISINI, E., DASCHER, C. C. & NIGROVIC, P. A. 2013. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol*, 94, 585-94.
- LEFORT, C. T. & LEY, K. 2012. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol*, 3, 157.
- LENNON, F. E. & SINGLETON, P. A. 2011. Role of hyaluronan and hyaluronan-binding proteins in lung pathobiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 301, L137-47.
- LEON, B. & ARDAVIN, C. 2008. Monocyte migration to inflamed skin and lymph nodes is differentially controlled by L-selectin and PSGL-1. *Blood*, 111, 3126-30.
- LERMAN, Y. V., LIM, K., HYUN, Y. M., FALKNER, K. L., YANG, H., PIETROPAOLI, A. P., SONNENBERG, A., SARANGI, P. P. & KIM, M. 2014. Sepsis lethality through exacerbated tissue infiltration and TLR-induced cytokine production by neutrophils is dependent on integrin alpha3beta1. *Blood*.
- LESLEY, J., HASCALL, V. C., TAMMI, M. & HYMAN, R. 2000. Hyaluronan binding by cell surface CD44. *J Biol Chem*, 275, 26967-75.
- LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. & NOURSHARGH, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-89.
- LIANG, J., JIANG, D., GRIFFITH, J., YU, S., FAN, J., ZHAO, X., BUCALA, R. & NOBLE, P. W. 2007. CD44 Is a Negative Regulator of Acute Pulmonary Inflammation and Lipopolysaccharide-TLR Signaling in Mouse Macrophages. *The Journal of Immunology*, 178, 2469-2475.
- LINDBERG, F. P., BULLARD, D. C., CAVER, T. E., GRESHAM, H. D., BEAUDET, A. L. & BROWN, E. J. 1996. Decreased resistance to bacterial infection and granulocyte defects in IAP-deficient mice. *Science*, 274, 795-8.

- LIU, F., JIANG, C. C., YAN, X. G., TSENG, H. Y., WANG, C. Y., ZHANG, Y. Y., YARI, H., LA, T., FARRELLY, M., GUO, S. T., THORNE, R. F., JIN, L., WANG, Q. & ZHANG, X. D. 2017. BRAF/MEK inhibitors promote CD47 expression that is reversible by ERK inhibition in melanoma. *Oncotarget*.
- LIU, Y., BUHRING, H. J., ZEN, K., BURST, S. L., SCHNELL, F. J., WILLIAMS, I. R. & PARKOS, C. A. 2002. Signal regulatory protein (SIRPalpha), a cellular ligand for CD47, regulates neutrophil transmigration. *J Biol Chem*, 277, 10028-36.
- LIU, Y., MERLIN, D., BURST, S. L., POCHET, M., MADARA, J. L. & PARKOS, C. A. 2001. The role of CD47 in neutrophil transmigration. Increased rate of migration correlates with increased cell surface expression of CD47. *J Biol Chem*, 276, 40156-66.
- LIU, Y., NUSRAT, A., SCHNELL, F. J., REAVES, T. A., WALSH, S., POCHET, M. & PARKOS, C. A. 2000. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci*, 113 ( Pt 13), 2363-74.
- LIU, Y., O'CONNOR, M. B., MANDELL, K. J., ZEN, K., ULLRICH, A., BUHRING, H. J. & PARKOS, C. A. 2004. Peptide-mediated inhibition of neutrophil transmigration by blocking CD47 interactions with signal regulatory protein alpha. *J Immunol*, 172, 2578-85.
- LO, S. K., VAN SEVENTER, G. A., LEVIN, S. M. & WRIGHT, S. D. 1989. Two leukocyte receptors (CD11a/CD18 and CD11b/CD18) mediate transient adhesion to endothelium by binding to different ligands. *J Immunol*, 143, 3325-9.
- LU, Y. C., YE, W. C. & OHASHI, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42, 145-51.
- MAAS, M., STAPLETON, M., BERGOM, C., MATTSON, D. L., NEWMAN, D. K. & NEWMAN, P. J. 2005. Endothelial cell PECAM-1 confers protection against endotoxic shock. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 288, H159-64.
- MADJDOUR, C., OERTLI, B., ZIEGLER, U., BONVINI, J. M., PASCH, T. & BECK-SCHIMMER, B. 2000. Lipopolysaccharide induces functional ICAM-1 expression in rat alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278, L572-9.
- MATESANZ-ISABEL, J., SINTES, J., LLINAS, L., DE SALORT, J., LAZARO, A. & ENGEL, P. 2011. New B-cell CD molecules. *Immunol Lett*, 134, 104-12.
- MATLUNG, H. L., SZILAGYI, K., BARCLAY, N. A. & VAN DEN BERG, T. K. 2017. The CD47-SIRPalpha signaling axis as an innate immune checkpoint in cancer. *Immunol Rev*, 276, 145-164.
- MATOZAKI, T., MURATA, Y., OKAZAWA, H. & OHNISHI, H. 2009. Functions and molecular mechanisms of the CD47-SIRPalpha signalling pathway. *Trends Cell Biol*, 19, 72-80.
- MATTHAY, M. A., FOLKESSON, H. G. & CLERICI, C. 2002. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev*, 82, 569-600.
- MATTHAY, M. A., WARE, L. B. & ZIMMERMAN, G. A. 2012. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*, 122, 2731-40.
- MATTHAY, M. A. & ZEMANS, R. L. 2011. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*, 6, 147-63.
- MAYADAS, T. N., CULLERE, X. & LOWELL, C. A. 2014. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol*, 9, 181-218.
- MCDONALD, R. J., ST GEORGE, J. A., PAN, L. C. & HYDE, D. M. 1993. Neutrophil adherence to airway epithelium is reduced by antibodies to the leukocyte CD11/CD18 complex. *Inflammation*, 17, 145-51.
- MENKE-VAN DER HOUVEN VAN OORDT, C. W., GOMEZ-ROCA, C., VAN HERPEN, C., COVELER, A. L., MAHALINGAM, D., VERHEUL, H. M., VAN DER GRAAF, W. T., CHRISTEN, R., RUTTINGER, D., WEIGAND, S., CANNARILE, M. A., HEIL, F., BREWSTER, M., WALZ, A. C., NAYAK, T. K., GUARIN, E., MERESSE, V. & LE TOURNEAU, C. 2016. First-in-human phase I clinical trial of RG7356, an anti-CD44 humanized antibody, in patients with advanced, CD44-expressing solid tumors. *Oncotarget*, 7, 80046-80058.
- MINER, J. J., XIA, L., YAGO, T., KAPPELMAYER, J., LIU, Z., KLOPOCKI, A. G., SHAO, B., MCDANIEL, J. M., SETIADI, H., SCHMIDTKE, D. W. & MCEVER, R. P. 2008. Separable requirements for cytoplasmic domain of PSGL-1 in leukocyte rolling and signaling under flow. *Blood*, 112, 2035-45.

- MIZGERD, J. P., HORWITZ, B. H., QUILLEN, H. C., SCOTT, M. L. & DOERSCHUK, C. M. 1999. Effects of CD18 deficiency on the emigration of murine neutrophils during pneumonia. *J Immunol*, 163, 995-9.
- MOORE, K. L. 1998. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma*, 29, 1-15.
- MORELAND, J. G., FUHRMAN, R. M., PRUESSNER, J. A. & SCHWARTZ, D. A. 2002. CD11b and intercellular adhesion molecule-1 are involved in pulmonary neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced airway disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 27, 474-80.
- MUL, F. P., ZUURBIER, A. E., JANSSEN, H., CALAFAT, J., VAN WETERING, S., HIEMSTRA, P. S., ROOS, D. & HORDIJK, P. L. 2000. Sequential migration of neutrophils across monolayers of endothelial and epithelial cells. *J Leukoc Biol*, 68, 529-37.
- MULLER, W. A., RATTI, C. M., MCDONNELL, S. L. & COHN, Z. A. 1989. A human endothelial cell-restricted, externally disposed plasmalemmal protein enriched in intercellular junctions. *J Exp Med*, 170, 399-414.
- MULLER, W. A., WEIGL, S. A., DENG, X. & PHILLIPS, D. M. 1993. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*, 178, 449-60.
- MURATA, Y., KOTANI, T., OHNISHI, H. & MATOZAKI, T. 2014. The CD47-SIRPalpha signalling system: its physiological roles and therapeutic application. *J Biochem*, 155, 335-44.
- MUTO, J., YAMASAKI, K., TAYLOR, K. R. & GALLO, R. L. 2009. Engagement of CD44 by hyaluronan suppresses TLR4 signaling and the septic response to LPS. *Mol Immunol*, 47, 449-56.
- NEWMAN, P. J., BERNDT, M. C., GORSKI, J., WHITE, G. C., 2ND, LYMAN, S., PADDOCK, C. & MULLER, W. A. 1990. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. *Science*, 247, 1219-22.
- NGAMSRI, K. C., MULLER, A., BOSMULLER, H., GAMPER-TSIGARAS, J., REUTERSHAN, J. & KONRAD, F. M. 2017. The Pivotal Role of CXCR7 in Stabilization of the Pulmonary Epithelial Barrier in Acute Pulmonary Inflammation. *J Immunol*, 198, 2403-2413.
- NICOLLS, M. R. & GILL, R. G. 2006. LFA-1 (CD11a) as a therapeutic target. *Am J Transplant*, 6, 27-36.
- NORMAN, K. E., MOORE, K. L., MCEVER, R. P. & LEY, K. 1995. Leukocyte rolling in vivo is mediated by P-selectin glycoprotein ligand-1. *Blood*, 86, 4417-21.
- O'BRIEN, C. D., LIM, P., SUN, J. & ALBELDA, S. M. 2003. PECAM-1-dependent neutrophil transmigration is independent of monolayer PECAM-1 signaling or localization. *Blood*, 101, 2816-25.
- ONG, E., GAO, X. P., PREDESCU, D., BROMAN, M. & MALIK, A. B. 2005. Role of phosphatidylinositol 3-kinase-gamma in mediating lung neutrophil sequestration and vascular injury induced by E. coli sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289, L1094-103.
- PARIS, A. J., LIU, Y., MEI, J., DAI, N., GUO, L., SPRUCE, L. A., HUDOCK, K. M., BRENNER, J. S., ZACHARIAS, W. J., MEI, H. D., SLAMOWITZ, A. R., BHAMIDIPATI, K., BEERS, M. F., SEEHOLZER, S. H., MORRISEY, E. E. & WORTHEN, G. S. 2016. Neutrophils promote alveolar epithelial regeneration by enhancing type II pneumocyte proliferation in a model of acid-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 311, L1062-11075.
- PARKOS, C. A. 1997. Cell adhesion and migration. I. Neutrophil adhesive interactions with intestinal epithelium. *Am J Physiol*, 273, G763-8.
- PARKOS, C. A. 2016. Neutrophil-Epithelial Interactions: A Double-Edged Sword. *Am J Pathol*, 186, 1404-16.
- PARKOS, C. A., COLGAN, S. P., DIAMOND, M. S., NUSRAT, A., LIANG, T. W., SPRINGER, T. A. & MADARA, J. L. 1996a. Expression and polarization of intercellular adhesion molecule-1 on human intestinal epithelia: consequences for CD11b/CD18-mediated interactions with neutrophils. *Mol Med*, 2, 489-505.
- PARKOS, C. A., COLGAN, S. P., LIANG, T. W., NUSRAT, A., BACCARRA, A. E., CARNES, D. K. & MADARA, J. L. 1996b. CD47 mediates post-adhesive events required for neutrophil migration across polarized intestinal epithelia. *J Cell Biol*, 132, 437-50.
- PARKOS, C. A., COLGAN, S. P. & MADARA, J. L. 1994. Interactions of neutrophils with epithelial cells: lessons from the intestine. *J Am Soc Nephrol*, 5, 138-52.

- PAULSEN, G., EGNER, I., RAASTAD, T., REINHOLT, F., OWE, S., LAURITZEN, F., BRORSON, S. H. & KOSKINEN, S. 2013. Inflammatory markers CD11b, CD16, CD66b, CD68, myeloperoxidase and neutrophil elastase in eccentric exercised human skeletal muscles. *Histochem Cell Biol*, 139, 691-715.
- PHILLIPSON, M., HEIT, B., COLARUSSO, P., LIU, L., BALLANTYNE, C. M. & KUBES, P. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, 203, 2569-75.
- PHILLIPSON, M., KAUR, J., COLARUSSO, P., BALLANTYNE, C. M. & KUBES, P. 2008. Endothelial domes encapsulate adherent neutrophils and minimize increases in vascular permeability in paracellular and transcellular emigration. *PLoS ONE*, 3, e1649.
- PRIVRATSKY, J. R., NEWMAN, D. K. & NEWMAN, P. J. 2010. PECAM-1: conflicts of interest in inflammation. *Life Sci*, 87, 69-82.
- QIN, L., QUINLAN, W. M., DOYLE, N. A., GRAHAM, L., SLIGH, J. E., TAKEI, F., BEAUDET, A. L. & DOERSCHUK, C. M. 1996. The roles of CD11/CD18 and ICAM-1 in acute Pseudomonas aeruginosa-induced pneumonia in mice. *J Immunol*, 157, 5016-21.
- RAMAMOORTHY, C., SASAKI, S. S., SU, D. L., SHARAR, S. R., HARLAN, J. M. & WINN, R. K. 1997. CD18 adhesion blockade decreases bacterial clearance and neutrophil recruitment after intrapulmonary E. coli, but not after S. aureus. *J Leukoc Biol*, 61, 167-72.
- RAMOS-SEVILLANO, E., URZAINQUI, A., DE ANDRES, B., GONZALEZ-TAJUELO, R., DOMENECH, M., GONZALEZ-CAMACHO, F., SANCHEZ-MADRID, F., BROWN, J. S., GARCIA, E. & YUSTE, J. 2016. PSGL-1 on Leukocytes is a Critical Component of the Host Immune Response against Invasive Pneumococcal Disease. *PLoS Pathog*, 12, e1005500.
- RANIERI, V. M., RUBENFELD, G. D., THOMPSON, B. T., FERGUSON, N. D., CALDWELL, E., FAN, E., CAMPOROTA, L. & SLUTSKY, A. S. 2012. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Jama*, 307, 2526-33.
- REINHARDT, P. H., ELLIOTT, J. F. & KUBES, P. 1997. Neutrophils can adhere via alpha4beta1-integrin under flow conditions. *Blood*, 89, 3837-46.
- REINHOLD, M. I., LINDBERG, F. P., PLAS, D., REYNOLDS, S., PETERS, M. G. & BROWN, E. J. 1995. In vivo expression of alternatively spliced forms of integrin-associated protein (CD47). *J Cell Sci*, 108 ( Pt 11), 3419-25.
- REUTERSHAN, J., BASIT, A., GALKINA, E. V. & LEY, K. 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, L807-15.
- REUTERSHAN, J. & LEY, K. 2004. Bench-to-bedside review: acute respiratory distress syndrome - how neutrophils migrate into the lung. *Crit Care*, 8, 453-61.
- REUTERSHAN, J., MORRIS, M. A., BURCIN, T. L., SMITH, D. F., CHANG, D., SAPRITO, M. S. & LEY, K. 2006. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest*, 116, 695-702.
- RIDGER, V. C., WAGNER, B. E., WALLACE, W. A. H. & HELLEWELL, P. G. 2001. Differential Effects of CD18, CD29, and CD49 Integrin Subunit Inhibition on Neutrophil Migration in Pulmonary Inflammation. *The Journal of Immunology*, 166, 3484-3490.
- ROSAS, M., THOMAS, B., STACEY, M., GORDON, S. & TAYLOR, P. R. 2010. The myeloid 7/4-antigen defines recently generated inflammatory macrophages and is synonymous with Ly-6B. *J Leukoc Biol*, 88, 169-80.
- RUBENFELD, G. D., CALDWELL, E., PEABODY, E., WEAVER, J., MARTIN, D. P., NEFF, M., STERN, E. J. & HUDSON, L. D. 2005. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*, 353, 1685-93.
- SACHS, U. J., ANDREI-SELMER, C. L., MANIAR, A., WEISS, T., PADDOCK, C., ORLOVA, V. V., CHOI, E. Y., NEWMAN, P. J., PREISSNER, K. T., CHAVAKIS, T. & SANTOSO, S. 2007. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J Biol Chem*, 282, 23603-12.

- SADIK, C. D., KIM, N. D. & LUSTER, A. D. 2011. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.*, 32, 452-460.
- SANCHEZ-MADRID, F., KRENSKY, A. M., WARE, C. F., ROBBINS, E., STROMINGER, J. L., BURAKOFF, S. J. & SPRINGER, T. A. 1982. Three distinct antigens associated with human T-lymphocyte-mediated cytotoxicity: LFA-1, LFA-2, and LFA-3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 7489-93.
- SCHENKEL, A. R., CHEW, T. W. & MULLER, W. A. 2004. Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule Deficiency or Blockade Significantly Reduces Leukocyte Emigration in a Majority of Mouse Strains. *The Journal of Immunology*, 173, 6403-6408.
- SCHÜTT, C. & BRÖKER, B. 2011. *Grundwissen Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag.
- SEIDMAN, M. A., CHEW, T. W., SCHENKEL, A. R. & MULLER, W. A. 2009. PECAM-independent thioglycollate peritonitis is associated with a locus on murine chromosome 2. *PLoS One*, 4, e4316.
- SENGER, D. R., PERRUZZI, C. A., STREIT, M., KOTELIANSKY, V. E., DE FOUGEROLLES, A. R. & DETMAR, M. 2002. The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol*, 160, 195-204.
- SENIOR, R. M., GRESHAM, H. D., GRIFFIN, G. L., BROWN, E. J. & CHUNG, A. E. 1992. Entactin stimulates neutrophil adhesion and chemotaxis through interactions between its Arg-Gly-Asp (RGD) domain and the leukocyte response integrin. *J Clin Invest*, 90, 2251-7.
- SHANG, X. Z. & ISSEKUTZ, A. C. 1997. Beta 2 (CD18) and beta 1 (CD29) integrin mechanisms in migration of human polymorphonuclear leucocytes and monocytes through lung fibroblast barriers: shared and distinct mechanisms. *Immunology*, 92, 527-35.
- SHARP, C., MILLAR, A. B. & MEDFORD, A. R. 2015. Advances in understanding of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome. *Respiration*, 89, 420-34.
- SIMMS, H. H. 1990. Increased PMN CD11b/CD18 Expression following Post-traumatic ARDS
- SMITH, C. W., MARLIN, S. D., ROTHLEIN, R., TOMAN, C. & ANDERSON, D. C. 1989. Cooperative interactions of LFA-1 and Mac-1 with intercellular adhesion molecule-1 in facilitating adherence and transendothelial migration of human neutrophils in vitro. *J Clin Invest*, 83, 2008-17.
- SOEHNLEIN, O. & LINDBOM, L. 2010. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*, 10, 427-39.
- SPERANDIO, M., SMITH, M. L., FORLOW, S. B., OLSON, T. S., XIA, L., MCEVER, R. P. & LEY, K. 2003. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates L-selectin-dependent leukocyte rolling in venules. *J Exp Med*, 197, 1355-63.
- SPRINGER, T., GALFRE, G., SECHER, D. S. & MILSTEIN, C. 1979. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *Eur J Immunol*, 9, 301-6.
- STEINBERG, K. P., MILBERG, J. A., MARTIN, T. R., MAUNDER, R. J., COCKRILL, B. A. & HUDSON, L. D. 1994. Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 150, 113-22.
- STENBERG, A., SEHLIN, J. & OLDENBORG, P. A. 2013. Neutrophil apoptosis is associated with loss of signal regulatory protein alpha (SIRPalpha) from the cell surface. *J Leukoc Biol*, 93, 403-12.
- STOCKINGER, H., GADD, S. J., EHER, R., MAJDIC, O., SCHREIBER, W., KASINERER, W., STRASS, B., SCHNABL, E. & KNAPP, W. 1990. Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31. *J Immunol*, 145, 3889-97.
- SU, X., JOHANSEN, M., LOONEY, M. R., BROWN, E. J. & MATTHAY, M. A. 2008. CD47 deficiency protects mice from lipopolysaccharide-induced acute lung injury and Escherichia coli pneumonia. *J Immunol*, 180, 6947-53.
- SUN, J., LAW, G. P., BRIDGES, C. C. & MCKALLIP, R. J. 2012. CD44 as a novel target for treatment of staphylococcal enterotoxin B-induced acute inflammatory lung injury. *Clin Immunol*, 144, 41-52.

- SUN, Q. H., DELISSER, H. M., ZUKOWSKI, M. M., PADDOCK, C., ALBELDA, S. M. & NEWMAN, P. J. 1996. Individually distinct Ig homology domains in PECAM-1 regulate homophilic binding and modulate receptor affinity. *J Biol Chem*, 271, 11090-8.
- SUNDERKÖTTER, C., NIKOLIC, T., DILLON, M. J., VAN ROOIJEN, N., STEHLING, M., DREVETS, D. A. & LEENEN, P. J. M. 2004. Subpopulations of Mouse Blood Monocytes Differ in Maturation Stage and Inflammatory Response. *The Journal of Immunology*, 172, 4410-4417.
- TEDER, P., VANDIVIER, R. W., JIANG, D., LIANG, J., COHN, L., PURE, E., HENSON, P. M. & NOBLE, P. W. 2002. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science*, 296, 155-8.
- THOMPSON, R. D., NOBLE, K. E., LARBI, K. Y., DEWAR, A., DUNCAN, G. S., MAK, T. W. & NOURSHARGH, S. 2001. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1)-deficient mice demonstrate a transient and cytokine-specific role for PECAM-1 in leukocyte migration through the perivascular basement membrane. *Blood*, 97, 1854-60.
- THOMPSON, R. D., WAKELIN, M. W., LARBI, K. Y., DEWAR, A., ASIMAKOPOULOS, G., HORTON, M. A., NAKADA, M. T. & NOURSHARGH, S. 2000. Divergent Effects of Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 and 3 Integrin Blockade on Leukocyte Transmigration In Vivo. *The Journal of Immunology*, 165, 426-434.
- TOSI, M. F., STARK, J. M., SMITH, C. W., HAMEDANI, A., GRUENERT, D. C. & INFELD, M. D. 1992. Induction of ICAM-1 expression on human airway epithelial cells by inflammatory cytokines: effects on neutrophil-epithelial cell adhesion. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 7, 214-21.
- TSURUTA, Y., PARK, Y. J., SIEGAL, G. P., LIU, G. & ABRAHAM, E. 2007. Involvement of vitronectin in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *J Immunol*, 179, 7079-86.
- ULRICH SACK, A. T., G. ROTHE 2007. *Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Karger Medical and Scientific Publishers.
- URIARTE, S. M., RANE, M. J., MERCHANT, M. L., JIN, S., LENTSCH, A. B., WARD, R. A. & MCLEISH, K. R. 2013. Inhibition of neutrophil exocytosis ameliorates acute lung injury in rats. *Shock*, 39, 286-92.
- VAN DER WINDT, G. J., FLORQUIN, S., DE VOS, A. F., VAN'T VEER, C., QUEIROZ, K. C., LIANG, J., JIANG, D., NOBLE, P. W. & VAN DER POLL, T. 2010. CD44 deficiency is associated with increased bacterial clearance but enhanced lung inflammation during Gram-negative pneumonia. *Am J Pathol*, 177, 2483-94.
- VAN DER WINDT, G. J., SCHOUTEN, M., ZEERLEDER, S., FLORQUIN, S. & VAN DER POLL, T. 2011. CD44 is protective during hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44, 377-83.
- VAPORCIYAN, A., DELISSER, H., YAN, H., MENDIGUREN, THOM, JONES, M., WARD, P. & ALBELDA, S. 1993. Involvement of platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 in neutrophil recruitment in vivo. *Science*, 262, 1580-1582.
- VERNON-WILSON, E. F., KEE, W. J., WILLIS, A. C., BARCLAY, A. N., SIMMONS, D. L. & BROWN, M. H. 2000. CD47 is a ligand for rat macrophage membrane signal regulatory protein SIRP (OX41) and human SIRPalpha 1. *Eur J Immunol*, 30, 2130-7.
- VEY, N., DELAUNAY, J., MARTINELLI, G., FIEDLER, W., RAFFOUX, E., PREBET, T., GOMEZ-ROCA, C., PAPAYANNIDIS, C., KEBENKO, M., PASCHKA, P., CHRISTEN, R., GUARIN, E., BROSKE, A. M., BAEHNER, M., BREWSTER, M., WALZ, A. C., MICHELIN, F., RUNZA, V., MERESSE, V. & RECHER, C. 2016. Phase I clinical study of RG7356, an anti-CD44 humanized antibody, in patients with acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, 7, 32532-42.
- VOISIN, M. B., WOODFIN, A. & NOURSHARGH, S. 2009. Monocytes and neutrophils exhibit both distinct and common mechanisms in penetrating the vascular basement membrane in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29, 1193-9.
- WALCHECK, B., MOORE, K. L., MCEVER, R. P. & KISHIMOTO, T. K. 1996. Neutrophil-neutrophil interactions under hydrodynamic shear stress involve L-selectin and PSGL-1. A mechanism that amplifies initial leukocyte accumulation of P-selectin in vitro. *J Clin Invest*, 98, 1081-7.
- WANG, J. H., SEXTON, D. M., REDMOND, H. P., WATSON, R. W., CROKE, D. T. & BOUCHIER-HAYES, D. 1997. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is expressed on human neutrophils and is essential for neutrophil adherence and aggregation. *Shock*, 8, 357-61.

- WANG, J. X., BAIR, A. M., KING, S. L., SHNAYDER, R., HUANG, Y. F., SHIEH, C. C., SOBERMAN, R. J., FUHLBRIGGE, R. C. & NIGROVIC, P. A. 2012. Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a beta2-integrin-dependent mechanism. *Blood*, 120, 1489-98.
- WANG, Q., TEDER, P., JUDD, N. P., NOBLE, P. W. & DOERSCHUK, C. M. 2002. CD44 deficiency leads to enhanced neutrophil migration and lung injury in *Escherichia coli* pneumonia in mice. *Am J Pathol*, 161, 2219-28.
- WEILEMANN, L. S., LORENZ, J. & VOIGTLÄNDER, T. 2011. *Internistische Intensivmedizin und Notfallmedizin*, Ludwig Sacha Weilemann Joachim Lorenz Thomas Voigtländer
- WEISKOPF, K. 2017. Cancer immunotherapy targeting the CD47/SIRPalpha axis. *Eur J Cancer*, 76, 100-109.
- WEISKOPF, K., JAHCHAN, N. S., SCHNORR, P. J., CRISTEA, S., RING, A. M., MAUTE, R. L., VOLKMER, A. K., VOLKMER, J. P., LIU, J., LIM, J. S., YANG, D., SEITZ, G., NGUYEN, T., WU, D., JUDE, K., GUERSTON, H., BARKAL, A., TRAPANI, F., GEORGE, J., POIRIER, J. T., GARDNER, E. E., MILES, L. A., DE STANCHINA, E., LOFGREN, S. M., VOGEL, H., WINSLOW, M. M., DIVE, C., THOMAS, R. K., RUDIN, C. M., VAN DE RIJN, M., MAJETI, R., GARCIA, K. C., WEISSMAN, I. L. & SAGE, J. 2016. CD47-blocking immunotherapies stimulate macrophage-mediated destruction of small-cell lung cancer. *J Clin Invest*, 126, 2610-20.
- WERR, J., ERIKSSON, E. E., HEDQVIST, P. & LINDBOM, L. 2000. Engagement of beta2 integrins induces surface expression of beta1 integrin receptors in human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 68, 553-60.
- WERR, J., XIE, X., HEDQVIST, P., RUOSLAHTI, E. & LINDBOM, L. 1998. beta1 integrins are critically involved in neutrophil locomotion in extravascular tissue *In vivo*. *J Exp Med*, 187, 2091-6.
- WILLIAMS, A. E. & CHAMBERS, R. C. 2014. The mercurial nature of neutrophils: still an enigma in ARDS? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 306, L217-30.
- WOODFIN, A., VOISIN, M. B., IMHOF, B. A., DEJANA, E., ENGELHARDT, B. & NOURSHARGH, S. 2009. Endothelial cell activation leads to neutrophil transmigration as supported by the sequential roles of ICAM-2, JAM-A, and PECAM-1. *Blood*, 113, 6246-57.
- XIA, L., SPERANDIO, M., YAGO, T., MCDANIEL, J. M., CUMMINGS, R. D., PEARSON-WHITE, S., LEY, K. & MCEVER, R. P. 2002. P-selectin glycoprotein ligand-1-deficient mice have impaired leukocyte tethering to E-selectin under flow. *J Clin Invest*, 109, 939-50.
- XIAO SU<sup>2</sup>, METTE JOHANSEN<sup>†</sup>, MARK R. LOONEY<sup>\*</sup>, ERIC J. BROWN<sup>†</sup>, AND MICHAEL A. MATTHAY<sup>\*</sup> 2008. CD47 Deficiency Protects Mice from Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury and *Escherichia coli* Pneumonia<sup>1</sup>. *J Immunol*. 2008 May 15; 180(10): 6947–6953.
- YADAV, H., THOMPSON, B. T. & GAJIC, O. 2017. Fifty Years of Research in ARDS. Is Acute Respiratory Distress Syndrome a Preventable Disease? *Am J Respir Crit Care Med*, 195, 725-736.
- YAGO, T., SHAO, B., MINER, J. J., YAO, L., KLOPOCKI, A. G., MAEDA, K., COGGESHALL, K. M. & MCEVER, R. P. 2010. E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin alpha beta2-mediated slow leukocyte rolling. *Blood*, 116, 485-94.
- YANG, C., CAO, M., LIU, H., HE, Y., XU, J., DU, Y., LIU, Y., WANG, W., CUI, L., HU, J. & GAO, F. 2012. The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering. *J Biol Chem*, 287, 43094-107.
- YANG, L., FROIO, R. M., SCIUTO, T. E., DVORAK, A. M., ALON, R. & LUSCINSKAS, F. W. 2005. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*, 106, 584-92.
- YIPP, B. G. & KUBES, P. 2013. Antibodies against neutrophil LY6G do not inhibit leukocyte recruitment in mice *in vivo*. *Blood*, 121, 241-242.
- YONKER, L. M., MOU, H., CHU, K. K., PAZOS, M. A., LEUNG, H., CUI, D., RYU, J., HIBBLER, R. M., EATON, A. D., FORD, T. N., FALCK, J. R., KINANE, T. B., TEARNEY, G. J., RAJAGOPAL, J. & HURLEY, B. P. 2017. Development of a Primary Human Co-Culture Model of Inflamed Airway Mucosa. *Sci Rep*, 7, 8182.
- ZARBOCK, A. & LEY, K. 2008. Mechanisms and consequences of neutrophil interaction with the endothelium. *Am J Pathol*, 172, 1-7.

- ZARBOCK, A., LEY, K., MCEVER, R. P. & HIDALGO, A. 2011. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*, 118, 6743-51.
- ZARBOCK, A., LOWELL, C. A. & LEY, K. 2007. Spleen tyrosine kinase Syk is necessary for E-selectin-induced alpha(L)beta(2) integrin-mediated rolling on intercellular adhesion molecule-1. *Immunity*, 26, 773-83.
- ZARBOCK, A., MULLER, H., KUWANO, Y. & LEY, K. 2009. PSGL-1-dependent myeloid leukocyte activation. *J Leukoc Biol*, 86, 1119-24.
- ZEMANS, R. L., BRIONES, N., CAMPBELL, M., MCCLENDON, J., YOUNG, S. K., SUZUKI, T., YANG, I. V., DE LANGHE, S., REYNOLDS, S. D., MASON, R. J., KAHN, M., HENSON, P. M., COLGAN, S. P. & DOWNEY, G. P. 2011. Neutrophil transmigration triggers repair of the lung epithelium via beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 15990-5.
- ZEMANS, R. L., COLGAN, S. P. & DOWNEY, G. P. 2009. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 40, 519-35.
- ZEMANS, R. L. & MATTHAY, M. A. 2017. What drives neutrophils to the alveoli in ARDS? *Thorax*, 72, 1-3.
- ZEN, K., BABBIN, B. A., LIU, Y., WHELAN, J. B., NUSRAT, A. & PARKOS, C. A. 2004. JAM-C is a component of desmosomes and a ligand for CD11b/CD18-mediated neutrophil transepithelial migration. *Mol Biol Cell*, 15, 3926-37.
- ZEN, K. & PARKOS, C. A. 2003. Leukocyte-epithelial interactions. *Curr Opin Cell Biol*, 15, 557-64.
- ZENI, F., PARENT, C., CORREA, R., NATANSON, C., FREEMAN, B., FONTANA, J., QUEZADO, M., DANNER, R. L., FITZ, Y., RICHMOND, S., GERSTENBERGER, E., BANKS, S. M. & EICHACKER, P. Q. 1999. ICAM-1 and CD11b inhibition worsen outcome in rats with E. coli pneumonia. *J Appl Physiol (1985)*, 87, 299-307.
- ZHANG, S., SONG, L., WANG, Y., HERWALD, H. & THORLACIUS, H. 2013. Targeting CD162 protects against streptococcal M1 protein-evoked neutrophil recruitment and lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305, L756-63.
- ZHANG, X. W., LIU, Q., WANG, Y. & THORLACIUS, H. 2001. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration in vivo. *Br J Pharmacol*, 133, 413-21.
- ZHAO, Y. J., YI, W. J., WAN, X. J., WANG, J., TAO, T. Z., LI, J. B., WANG, J. F. & DENG, X. M. 2014. Blockade of ICAM-1 improves the outcome of polymicrobial sepsis via modulating neutrophil migration and reversing immunosuppression. *Mediators Inflamm*, 2014, 195290.
- ZHOU, H., LIAO, J., ALOOR, J., NIE, H., WILSON, B. C., FESSLER, M. B., GAO, H. M. & HONG, J. S. 2013. CD11b/CD18 (Mac-1) is a novel surface receptor for extracellular double-stranded RNA to mediate cellular inflammatory responses. *J Immunol*, 190, 115-25.
- ZOLA, H., SWART, B., NICHOLSON, I., AASTED, B., BENSUSSAN, A., BOUMSELL, L., BUCKLEY, C., CLARK, G., DRBAL, K., ENGEL, P., HART, D., HOREJSI, V., ISACKE, C., MACARDLE, P., MALAVASI, F., MASON, D., OLIVE, D., SAALMUELLER, A., SCHLOSSMAN, S. F., SCHWARTZ-ALBIEZ, R., SIMMONS, P., TEDDER, T. F., UGUCCIONI, M. & WARREN, H. 2005. CD molecules 2005: human cell differentiation molecules. *Blood*, 106, 3123-6.
- ZUCHTRIEGEL, G., UHL, B., PUHR-WESTERHEIDE, D., PORNbacher, M., LAUBER, K., KROMBACH, F. & REICHEL, C. A. 2016. Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation. *PLoS Biol*, 14, e1002459.

## **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde im Forschungslabor des Universitätsklinikums für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Tübingen unter Betreuung von Professor Dr. Reutershan, Chefarzt Klinikum Bayreuth, durchgeführt. Die Konzeption und Supervision der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. Konrad, Assistenzärztin Universitätsklinikum für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Tübingen. Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Irene Vollmer, MTA Universitätsklinikum für Anästhesiologie und Intensivmedizin Tübingen, von mir eigenständig und in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Konrad durchgeführt. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls eigenständig durch mich. Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

## Danksagung

Ein herzlicher Dank geht an meine Betreuerin vor Ort im Labor und zu jeder Zeit während Anfertigung der Arbeit: Frau Dr. Franziska Konrad. Die exzellente Betreuung während der Planung und der Durchführung der Experimente sowie die mentale und fachliche Unterstützung in Höhen und Tiefen haben entscheidend zum Gelingen dieses Projektes beigetragen. Ihr menschliches und gleichzeitig professionelles Charisma war eine Inspiration und eine Bereicherung meiner Arbeitszeit an der Dissertation über den Einblick in die experimentelle Forschungsarbeit hinaus.

Zudem gilt ein großer Dank für das Überlassen des Themas an Prof. Dr. Jörg Reutershan, durch dessen Expertise ich das Modell der pulmonalen Inflammation in meiner Studie verwenden konnte und mit dessen Unterstützung die Bewerbung beim IZKF-Promotionskolleg möglich war. Auch bedanke ich mich für die konstante Unterstützung und allzeit motivierende Betreuung seinerseits.

Ein weiterer Dank geht an Frau Irene Vollmer, welche mich sehr gut in die verwendeten Methoden eingearbeitet hat und stets eine Ansprechpartnerin bei Fragen und Problemen vor Ort war. Ebenso möchte ich Frau Jutta Gamper-Tsigaras für die motivierte und hilfsbereite Unterstützung bei der Durchführung einiger Experimente danken.

Ein Dank gilt ebenfalls dem IZKF Promotionskolleg der medizinischen Fakultät der Universität Tübingen, durch welches meine Arbeit von Oktober 2014 bis Oktober 2015 unterstützt wurde. Hier möchte ich besonders Prof. Dr. Marlies Knipper, Dr. Inka Montero und Pia-Sarah Henger für die freundliche Beratung während der Anfertigung meiner Arbeit danken.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden von Herzen für die ausdauernde Unterstützung, sehr viel Verständnis und fortwährende positive Verstärkung während der letzten Jahre danken. Hier möchte ich besonders meinen Partner, Jonas Veltkamp, sowie Carolin Land, Lisa Lorenz, Julia Küppers, Rahna Lange, Isabel Spielhaupter und Marlene Böcker erwähnen, die vor Ort in Tübingen viele Höhen und Tiefen mit mir durchlebt haben und stets eine wertvolle Stütze für mich waren und sind.