

Aus der
Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

**Proteolytische Regulation der neutrophilen Migration durch
ADAM10 und ADAM17 in der Frühphase des akuten Lungenversagens (ARDS)**

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

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

vorgelegt von

Goerlich, Meike

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professorin Dr. F. Konrad
2. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Ehnert

Tag der Disputation: 22.07.2026

Diese Arbeit widme ich meinem Großvater, einem Mediziner der alten Schule, der mich nachhaltig geprägt hat. Auch wenn wir in vielerlei Hinsicht unterschiedlich waren, fühle ich mich ihm bis heute eng verbunden. Während des Schreibens habe ich oft an ihn gedacht – an seine optimistische Haltung zum Leben, seine Klarheit und seine Verlässlichkeit.

Zugleich widme ich diese Arbeit meiner Tochter Emma. So wie mein Großvater meine Vergangenheit geprägt hat, so steht sie für unsere Zukunft. Ihr Heranwachsen zu begleiten, war und ist ein besonderes Geschenk, für das ich sehr dankbar bin.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. Das akute respiratorische Distress-Syndrom (ARDS)	1
1.1.1. Definition, Ätiologie und klinische Relevanz	1
1.1.2. Epidemiologie	3
1.2. Pathogenese des ARDS	3
1.2.1. Die alveolokapilläre Barriere	5
1.2.2. Neutrophile Migration in der akuten pulmonalen Inflammation	6
1.3. ADAM10 und ADAM17 als Schlüsselfaktoren der Entzündungsregulation.....	8
1.3.1. Struktur, Aktivierung und Substrate	8
1.3.2. Funktionelle Rolle in der pulmonalen Inflammation	10
1.4. Forschungshypothese und Zielsetzung.....	11
2. Methoden.....	12
2.1. Überblick	12
2.2. <i>In vivo</i> Transmigrationsversuch mittels LPS-induzierter Inflammation.....	13
2.2.1. Mauslinien	13
2.2.2. Inhibitor-Injektion und LPS-Inhalation	13
2.2.3. Probenentnahme	14
2.2.4. Probenverarbeitung	17
2.2.5. Probenvorbereitung für die FACS-Analyse	18
2.3. Durchflusszytometrie	19
2.3.1. Prinzip	19
2.3.2. Materialien	20
2.3.3. Auswertung	22
2.3.4. Gating-Protokolle zur Identifikation spezifischer Zellpopulationen.....	24
2.4. Immunhistochemie.....	27
2.4.1. Vorbehandlung und Probengewinnung	27
2.4.2. Histologische Aufbereitung	28
2.4.3. Immunhistochemische Färbung neutrophiler Granulozyten	28
2.5. Immunfluoreszenzfärbung	30
2.6. <i>In vivo</i> Ventilationsversuch steriler pulmonaler Inflammation	32
2.6.1. Ventilation.....	32
2.6.2. Probenentnahme	32
2.7. ELISA	33

2.8.	MPO: Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität	35
2.9.	BCA: Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.10.	Statistik	36
3.	Ergebnisse	37
3.1.	Pharmakologische Hemmung von ADAM10 und ADAM17 reduziert die pulmonale PMN-Migration	37
3.1.1.	Einfluss der ADAM-Inhibitionen auf die Thrombozyten-Neutrophilen-Interaktion während der PMN-Migration	39
3.1.2.	Einfluss der ADAM-Inhibition auf die Expression relevanter Adhäsionsmoleküle in der Adhäsionskaskade von PMNs	43
3.1.3.	MPO-Aktivität als Marker für die Neutrophilenaktivierung	47
3.2.	Auswirkung der ADAM10- und ADAM17-Hemmung auf die Lungenbarriere nach LPS-induzierter Entzündung	48
3.3.	Proteaseninhibition und ihre Effekte auf proinflammatorische Mediatoren der Immunzell-Rekrutierung und -Aktivierung in der pulmonalen Inflammation	54
3.4.	Gegenseitige Regulation der Sheddaseexpression von ADAM10 und ADAM17 durch deren Hemmung	56
3.5.	Neutrophileninfiltration bei ventilationsinduzierter Inflammation unter ADAM-Inhibition	60
4.	Diskussion	64
4.1.	Reduzierte PMN-Migration durch pharmakologische ADAM10/17-Hemmung 64	
4.2.	Direkte Auslöser der gehemmten PMN-Migration	66
4.2.1.	Hemmung der PMN-Aktivierung und -Rekrutierung: Die Rolle von Chemokinen und Zytokinen	66
4.2.2.	Reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen und verminderte transendotheliale Migration	68
4.3.	Indirekte Auslöser der gehemmten PMN-Migration	73
4.3.1.	Verbesserte Endothelfunktion und Stabilisierung der Lungenbarriere	73
4.3.2.	Reduktion der Thrombozyten-Neutrophilen-Interaktion und PNC-Bildung 77	
4.4.	Translationale Bedeutung und weiterführende Forschung	81
4.4.1.	Zellspezifische Effekte und Interaktionen von ADAM10 und ADAM17 ...	81
4.4.2.	Funktionelle Unterschiede und Synergien in der pulmonalen Entzündungsantwort	82
4.4.3.	Schutz vor ventilationsbedingten Lungenschäden (VILI) und weiterführende Forschung	85
4.4.4.	Methodische Überlegungen: Interpretation und klinische Relevanz	86
4.5.	Fazit und Implikationen für zukünftige Forschung	88
5.	Zusammenfassung	90
6.	Anhang	92
6.1.	Ergänzende, nicht im Ergebnisteil dargestellte Befunde	92

6.2.	Literaturverzeichnis.....	96
6.3.	Material.....	103
6.3.1.	Antikörper	103
6.3.2.	Chemikalien.....	104
6.3.3.	Enzyme	105
6.3.4.	Geräte	105
6.3.5.	Lösungen.....	106
6.3.6.	Medikamente.....	107
6.3.7.	Verbrauchsmaterialien.....	108
6.3.8.	Software	110
6.4.	Erklärungen zum Eigenanteil	111
6.5.	Veröffentlichungen.....	112
6.6.	Danksagung	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Alveolokapilläre Barriere im gesunden und akut geschädigten Zustand: Zelluläre und molekulare Veränderungen bei akuter Lungenschädigung	4
Abbildung 2: Strukturelle und molekulare Veränderungen der alveolokapillären Barriere bei akuter Lungenschädigung.....	5
Abbildung 3: Veränderungen von Adhäsionsmolekülen während der neutrophilen Migration bei akuter pulmonaler Entzündung	7
Abbildung 4: Schematischer Aufbau der ADAM-Proteasen ADAM10 und ADAM17 sowie Darstellung der eingesetzten Inhibitoren.....	9
Abbildung 5: Überblick Methoden.....	12
Abbildung 6: Modell der LPS-Inhalation.	14
Abbildung 7: Zeitlicher Versuchsablauf.	15
Abbildung 8: Prinzip der FACS-Analyse.....	19
Abbildung 9: FACS-Leukozyten-Gating einer Lungenprobe.....	24
Abbildung 10: FACS-Thrombozyten-Gating einer Lungenprobe	25
Abbildung 11: FACS-PNC-Gating einer Blutprobe	26
Abbildung 12: FACS-Endothelzellen-Gating einer Lungenprobe.....	27
Abbildung 13: immunhistochemische PMN-Färbung.....	30
Abbildung 14: Sandwich-ELISA.....	34
Abbildung 15: PMN-Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente..	38
Abbildung 16: Thrombozyten-Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.....	39
Abbildung 17: Intravasal zirkulierende PNCs im murinen Blut.....	40
Abbildung 18: CD162-Expression auf PMNs während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.	41
Abbildung 19: CD62L-Expression auf PMNs während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.	42
Abbildung 20: CD62P-Expression auf Thrombozyten während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.	43
Abbildung 21: LFA-1 -Expression auf PMNs während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.	44
Abbildung 22: CD11b (Mac-1) -Expression auf PMNs während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.	45
Abbildung 23: CD54 (ICAM-1) und CD102 (ICAM-2) -Expression auf Endothelzellen der murinen Lunge.....	46
Abbildung 24: CD44 (HCAM)-Expression auf PMNs während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.	47
Abbildung 25: Bestimmung der MPO-Aktivität in der BAL muriner Lungen.....	48
Abbildung 26: Septendicke muriner Lungen während der pulmonalen Inflammation.....	50
Abbildung 27: Occludin und ZO-1 -Intensität am murinen Lungenendothel während der pulmonalen Inflammation.	51

Abbildung 28: ICAM-1 und JAM-A -Intensität am murinen Lungenendothel während der pulmonalen Inflammation.	52
Abbildung 29: CD144 -Expression auf Endothelzellen der murinen Lunge.	53
Abbildung 30: Bestimmung der Proteinkonzentration in der BAL muriner Lungen.	54
Abbildung 31: Konzentration der Chemokine CXCL1 und CXCL2 sowie der Zytokine TNF- α und IL-6 in der BAL muriner Lungen.	55
Abbildung 32: ADAM10 -Expression auf PMNs während der Migration durch die vier Lungenkompartimente.	56
Abbildung 33: ADAM17-Expression auf PMNs während der Migration durch die vier Lungenkompartimente.	57
Abbildung 34: ADAM10 -Expression auf Thrombozyten während der Migration durch drei murine Lungenkompartimente.	58
Abbildung 35: ADAM17-Expression auf Thrombozyten während der Migration durch drei murine Lungenkompartimente.	59
Abbildung 36: ADAM10 und -17-Expression auf Endothelzellen der murinen Lunge.	59
Abbildung 37: PMN-Migration in der murinen Lunge unter Normal- und Überdruckbeatmung.	62
Abbildung 38: Septendicke im VILI-Versuch.	63
Abbildung 39: Die Migrationskaskade der PMNs.	69
Abbildung 40: Interaktion zwischen Thrombozyt und PMN auf molekularer Ebene.	79
Abbildung 41: Funktionelle Unterschiede und gemeinsame Effekte der ADAM10- und ADAM17-Hemmung auf die pulmonale Entzündungsantwort ...	84
Abbildung 42: CD162-Expression auf Endothelzellen muriner Lungen.	92
Abbildung 43: CD44 (HCA1) -Expression auf Thrombozyten während der Migration durch drei Kompartimente.	93
Abbildung 44: Occludin und ZO-1 -Intensität am murinen Lungenepithel während der pulmonalen Inflammation.	94
Abbildung 45: ICAM-1 und JAM-A -Intensität am murinen Lungenepithel während der pulmonalen Inflammation.	95

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der Berlin-Definition (2012) und der globalen ARDS-Definition (2024). PaO ₂ = arterieller Sauerstoffpartialdruck, FiO ₂ = inspiratorische Sauerstofffraktion, HFNO = <i>High-Flow-Sauerstofftherapie</i> , PEEP = positiver endexpiratorischer Druck, SpO ₂ = periphere Sauerstoffsättigung. Zusammenfassung basierend auf (Ranieri et al., 2012, Matthay et al., 2019, Matthay et al., 2024).....	2
Tabelle 2: Verwendete ADAM10- und ADAM17-Inhibitoren.....	14
Tabelle 3: Anästhetika Zusammensetzung für 10 ml.....	15
Tabelle 4: Enzymgemisch Zusammensetzung pro Maus	17
Tabelle 5: AK-Mix 1 (links) und 2 (rechts): PMNs. Zusammensetzung FACS-Röhrchen. PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, PE/Cyanine7 = Phycoerythrin/Cyanine7, APC = Allophycocyanin, PE = Phycoerythrin, FITC = Fluorescein isothiocyanate	21
Tabelle 6: AK-Mix 3: Thrombozyten. Zusammensetzung eines FACS-Röhrchens. PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, PE/Cyanine7 = Phycoerythrin/Cyanine7, APC = Allophycocyanin, PE = Phycoerythrin, FITC = Fluorescein isothiocyanate	21
Tabelle 7: AK-Mix 4 (links) und 5 (rechts): Endothel. Zusammensetzung FACS-Röhrchen. PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, PE/Cyanine7 = Phycoerythrin/Cyanine7, APC = Allophycocyanin, PE = Phycoerythrin, FITC = Fluorescein isothiocyanate	21
Tabelle 8: Erster Primärer- und Sekundärer Antikörper der Immunfluoreszenzfärbung	31
Tabelle 9: Zweiter Primärer- und Sekundärer Antikörper der Immunfluoreszenzfärbung	31
Tabelle 10: ELISA Antikörper	33
Tabelle 11: Legende der Asteriske	36

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
APC/Cy7	Allophycocyanin/Cyanine7, <i>Allophycocyanin/Cyanine7</i>
ARDS	Akutes respiratorisches Distress-Syndrom (<i>engl. acute respiratory distress syndrom</i>)
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of Differentiation
CD62L	Leukozyten-Selektin (<i>L-Selektin</i>)
ELISA	<i>enzyme-linked immunsorbent assay</i>
FACS	Durchflusszytometrie (<i>engl. Fluorescence Activbates Cell Sorting/Scanning</i>)
FiO ₂	inspiratorischer Sauerstofffraktion

FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. forward scatter channel)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H-CAM.....	<i>Homing-associated Cell Adhesion Molecule</i> (CD44)
HFNO	<i>High-Flow-Sauerstofftherapie</i>
IC ₅₀	<i>halbe maximale Inhibitionskonzentration, engl. inhibitory concentration 50</i>
ICAM-1	intrazelluläres Adhäsionsmolekül (engl.: <i>intracellular adhesion molecule 1</i>)
ICAM-1 (CD54).....	<i>intracellular adhesion molecule 1</i>
ICAM2 (CD102)	<i>intracellular adhesion molecule 2</i>
JAM-A.....	junktionales Adhäsionsmolekül, engl.: <i>junctional adhaesion molecule 1</i>
KG	Körpergewicht
LFA-1.....	<i>leucocyte function associated molecule-1</i>
Ly-6G.....	<i>Lymphocyte antigen 6 complex, locus G</i> , lymphocyte antigen 6 complex
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (engl. Mean Fluorescence Intensity")
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NaN ₃	Natriumazid, Natriumazid
NH ₄ Cl.....	Ammoniumchlorid
NIV	Nichtinvasive Beatmung <i>engl. noninvasive ventilation</i>
Notch1	<i>engl. Notch homolog 1</i>
OT	Objektträger
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PE/Cy7	Phycoerythrin/Cyanine7
PECAM-1.....	<i>Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>
PEEP	positiv-endexpiratorischer Druck (<i>engl. Positive End-Expiratory Pressure</i>)
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein/Cyanine5.5
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PNC.....	Platelet neutrophil complex
P-Selektin	Thrombozyten-Selektin (<i>platelet-selectin</i>)
PSGL-1 (CD162)	<i>P-selectin glycoprotein ligand-1</i>
ROS.....	reaktive Sauerstoffspezies, reaktive Sauerstoffspezies; engl.: <i>reaktive oxygen spexies</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT.....	Raumtemperatur
SpO ₂	periphere Sauerstoffsättigung
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. side scatter channel)
Tbl	Tablette

TEM	transendotheliale Migration
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VE-Cadherin	<i>engl. Vascular endothelial Cadherin</i>
VE-Cadherin (CD144).....	<i>vascular endothelial cadherin</i>
VILI	Respirator-assoziierten Lungenschädigung. Engl.: <i>ventilator-induced lung injury</i>
ZO-1	Zonula-Occludens 1
ZZR	Zwischenzehenreflex

1. Einleitung

1.1. Das akute respiratorische Distress-Syndrom (ARDS)

1.1.1. Definition, Ätiologie und klinische Relevanz

Das akute respiratorische Distress-Syndrom (ARDS) zählt zu den schwerwiegendsten Formen des akuten Lungenversagens in der Intensivmedizin. Es beschreibt ein klinisches Syndrom des akuten hypoxämischen Lungenversagens infolge einer entzündlich bedingten Lungenschädigung, das nicht auf ein kardiales Lungenödem zurückzuführen ist (Matthay et al., 2024). Erstmals wurde das ARDS 1967 anhand von Fallberichten bei Patientinnen und Patienten mit Polytrauma, Pneumonie, Sepsis und Aspiration beschrieben (Ashbaugh et al., 1967).

Im Jahr 1994 wurden erste standardisierte Diagnosekriterien entwickelt und 2012 in der sogenannten Berlin-Definition überarbeitet (Bernard et al., 1994, Ranieri et al., 2012). Diese basiert auf vier Hauptkriterien: einen akuten Symptombeginn innerhalb einer Woche, bilaterale Infiltrate im Röntgen-Thorax oder CT ohne alternative Ursache, respiratorisches Versagen ohne primäre kardiale Ursache sowie eine Hypoxämie, bestimmt über den Horowitz-Index ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$). Abhängig vom Schweregrad erfolgt die Einteilung in mild (201–300 mmHg), moderat (101–200 mmHg) und schwer (≤ 100 mmHg), jeweils bei einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von mindestens 5 cmH₂O (Matthay et al., 2019).

Angesichts zunehmender Anwendung nicht-invasiver Beatmungstechniken und begrenzter Ressourcen in vielen Regionen wurde 2024 eine erweiterte globale ARDS-Definition vorgeschlagen. Neben der Anerkennung von High-Flow-Sauerstofftherapie ($\text{HFNO} \geq 30$ L/min) als Diagnosekriterium umfasst sie die Lungenso-nographie als Bildgebungsalternative sowie den $\text{SpO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotient als Surrogatparameter bei fehlender arterieller Blutgasanalyse. Die Schweregrade werden dabei analog zur klassischen Einteilung anhand des $\text{SpO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnisses differenziert (<315 = mild, <235 = moderat, <148 = schwer) (Matthay et al., 2024).

Diese Neuerungen sollen die weltweite Diagnostik erleichtern, müssen jedoch hinsichtlich ihrer praktischen Umsetzung und prognostischen Relevanz weiter

evaluiert werden. Eine Übersicht über die Kriterien der Berlin-Definition (2012) und der globalen Definition (2024) findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Vergleich der Berlin-Definition (2012) und der globalen ARDS-Definition (2024). PaO₂ = arterieller Sauerstoffpartialdruck, FiO₂ = inspiratorische Sauerstofffraktion, HFNO = *High-Flow-Sauerstofftherapie*, PEEP = positiver endexpiratorischer Druck, S_pO₂ = periphere Sauerstoffsättigung. Zusammenfassung basierend auf (Ranieri et al., 2012, Matthay et al., 2019, Matthay et al., 2024)

Kriterium	Berlin-Definition des ARDS (2012)	globale Definition (2024)
Zeitdauer	- Symptombeginn innerhalb 1 Woche - Akute oder sich verschlechternde respiratorische Symptome	<i>unverändert</i>
Bildgebung	- Bilaterale Infiltrate im Röntgen-Thorax oder CT - Nicht erklärbar durch Ergüsse, Atelektasen oder Raumforderungen	Lungensonographie als gleichwertige Alternative
Ursache	- Nicht vollständig durch Herzinsuffizienz oder Volumenüberladung erklärbares respiratorisches Versagen	<i>unverändert</i>
Oxygenierung/ Schweregrad	PaO ₂ /FiO ₂ : 201-300 mmHg = mild 101-200 mmHg = moderat ≤ 100 mmHg = schwer Voraussetzung: PEEP ≥ 5cm H ₂ O	S _p O ₂ /FiO ₂ : <315 = mild <235 = moderat <148 = schwer Voraussetzung: S _p O ₂ <97%
Beatmungstechnik	PEEP≥5 cmH ₂ O unter invasiver Beatmung oder NIV	+ ARDS-Diagnose auch bei HFNO >30L/min möglich

Das ARDS ist ein heterogenes klinisches Syndrom, das aus direkten pulmonalen oder indirekten systemischen Ursachen hervorgehen kann (Gottschaldt and Reske, 2018). Pneumonien (bakteriell, viral, seltener mykotisch oder parasitär) sind die häufigsten direkten Ursachen, gefolgt von Aspiration, Lungenkontusion, Beinahe-Ertrinken, Inhalationstrauma und Reperfusionsödemen. Indirekte Auslöser umfassen Sepsis, Polytrauma, Schockzustände, akute Pankreatitis oder Transfusionsreaktionen – stellvertretend für eine Vielzahl möglicher systemischer Ursachen. Diese Zustände führen unabhängig vom Auslöser zu einer alveolären Ödembildung, ausgeprägten pulmonalen Entzündung und einer Störung der Gasaustauschfunktion (Matthay et al., 2019, Gottschaldt and Reske, 2018).

Bestimmte Komorbiditäten und Umweltfaktoren wie Alkoholabusus, aktives Rauchen, Luftverschmutzung und Hypoalbuminämie erhöhen das Risiko, während Diabetes mellitus paradoxerweise mit einer reduzierten Inzidenz assoziiert ist - ein Zusammenhang, dessen Ursachen bislang nicht eindeutig geklärt sind (Moss et al., 1996, Calfee et al., 2015, Reilly et al., 2019, Mangialardi et al., 2000, Boyle et al., 2018).

1.1.2. Epidemiologie

Epidemiologische Erhebungen verdeutlichen die klinische Bedeutung des Syndroms: In einer multinationalen LUNG-SAFE-Studie erfüllten 10,4% von 29.144 Intensivpatientinnen und -patienten die Kriterien eines ARDS (Berlin-Definition 2012), wobei insbesondere leichtes ARDS häufig unerkannt blieb (Bellani et al., 2016). Trotz verfügbarer Therapiemöglichkeiten wie der Bauchlagerung fand diese nur bei einem kleinen Teil der schwer erkrankten Betroffenen (16,3%) Anwendung (Bellani et al., 2016). Die Krankenhausmortalität korreliert deutlich mit dem Schweregrad: von 34,9% bei leichtem, über 40,3% bei moderatem bis zu 46,1% bei schwerem ARDS (Bellani et al., 2016). Dennoch bleibt die Zuordnung der Mortalität allein zum ARDS schwierig, da auch Komorbiditäten, Alter und zusätzliche Organdysfunktionen eine Rolle spielen (Matthay et al., 2019). Sekundäranalysen wie die von Cortegiani *et al.* verdeutlichen, dass bestimmte Subgruppen, etwa immunsupprimierte Patientinnen und Patienten, eine signifikant höhere Mortalität aufwiesen (52% vs. 36%; $p < 0,0001$) (Cortegiani et al., 2018).

1.2. Pathogenese des ARDS

Die Pathogenese des ARDS ist komplex und multifaktoriell und bildet eine zentrale Grundlage für das Verständnis aktueller und zukünftiger therapeutischer Ansätze. Im Zentrum steht eine Entzündungsreaktion, ausgelöst durch direkte (z.B. Pneumonie) oder indirekte (z.B. Sepsis) Lungenschädigung. Diese führt zu einer erhöhten Permeabilität der alveolokapillären Barriere und massiver Infiltration durch Immunzellen (Bellani et al., 2016). Die daraus resultierende Dysfunktion der alveolokapillären Barriere stellt ein zentrales Merkmal des ARDS dar und wird in der Regel in drei Phasen unterteilt: die exsudative, die proliferative und die fibrotische Phase (Matthay et al., 2019). Im Fokus dieser Arbeit steht die

exsudative Frühphase, die bereits in den ersten Stunden nach Krankheitsbeginn einsetzt. Eine schematische Darstellung der zugrunde liegenden zellulären und molekularen Prozesse ist in Abbildung 1 dargestellt. Die Abbildung veranschaulicht den Übergang der alveolokapillären Einheit vom gesunden zum geschädigten Zustand und verdeutlicht zentrale pathophysiologische Veränderungen wie Immunzellrekrutierung, Zytokeratinfreisetzung, endothelialen Schaden und Flüssigkeitsansammlung.

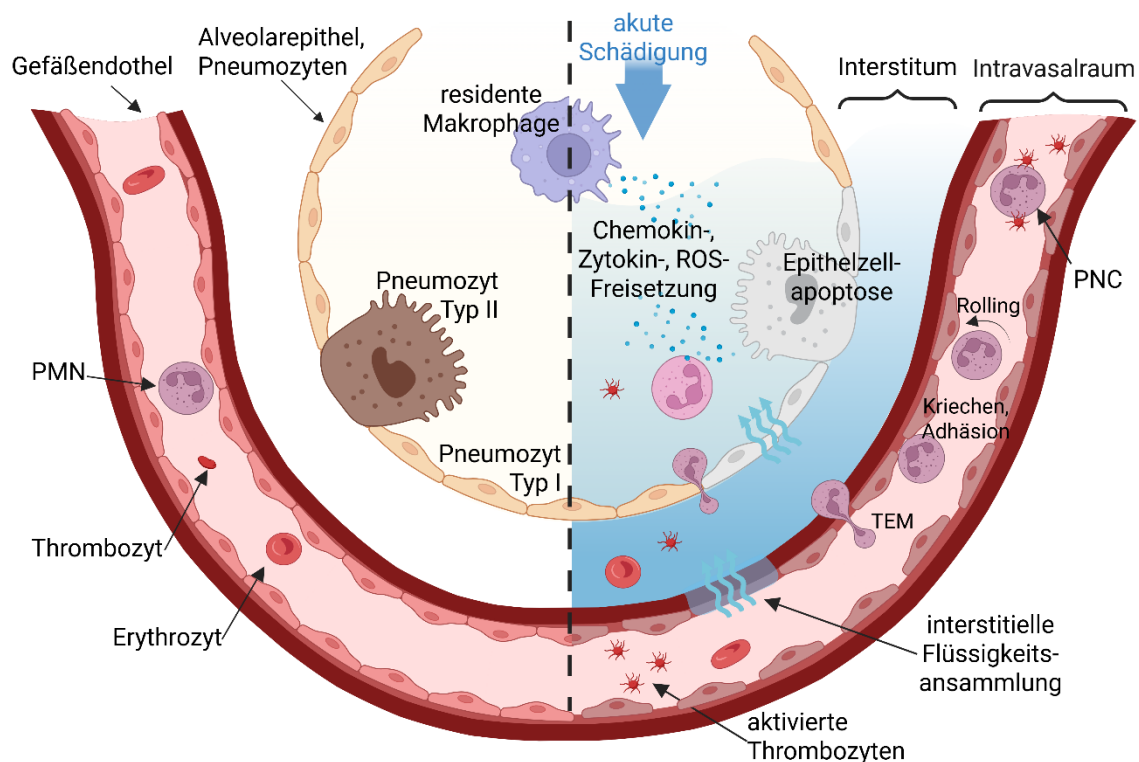


Abbildung 1: Alveolokapilläre Barriere im gesunden und akut geschädigten Zustand: Zelluläre und molekulare Veränderungen bei akuter Lungenschädigung

Die Abbildung zeigt schematisch die alveolokapilläre Einheit im Querschnitt mit Darstellung des Übergangs von einem physiologischen Zustand (links) zu einer durch akute Schädigung veränderten Struktur in der exsudativen Phase des ARDS (rechts). Infolge der Schädigung kommt es zur Aktivierung residenter Immunzellen (z.B. Makrophagen), zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren (Chemokine, Zytokine, ROS) und zur Apoptose von Epithelzellen. Die konsekutive Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (PMN), Thrombozytenaktivierung mit der Ausbildung von Thrombozyten-Neutrophilen-Komplexen (PNC) sowie die Entstehung einer interstitiellen Flüssigkeitsansammlung kennzeichnen den inflammatorischen Prozess der exsudativen Phase. Weitere Prozesse wie das „Rolling“, die Adhäsion und transendotheliale Migration (TEM) von PMNs sind dargestellt. Eigene Darstellung nach (Thompson et al., 2017, Matthay et al., 2019).

1.2.1. Die alveolokapilläre Barriere

Die alveolokapilläre Barriere besteht aus alveolärem Epithel (Pneumozyten Typ I und II), interstitieller Matrix und Kapillarendothel. Im gesunden Zustand ist sie durch Tight Junctions (z.B. Claudine, Occludine, ZO-1) und Adhäsionsmoleküle (v.a. VE-Cadherin) stabilisiert, die eine kontrollierte Permeabilität ermöglichen (Matthay et al., 2019, Thompson et al., 2017).

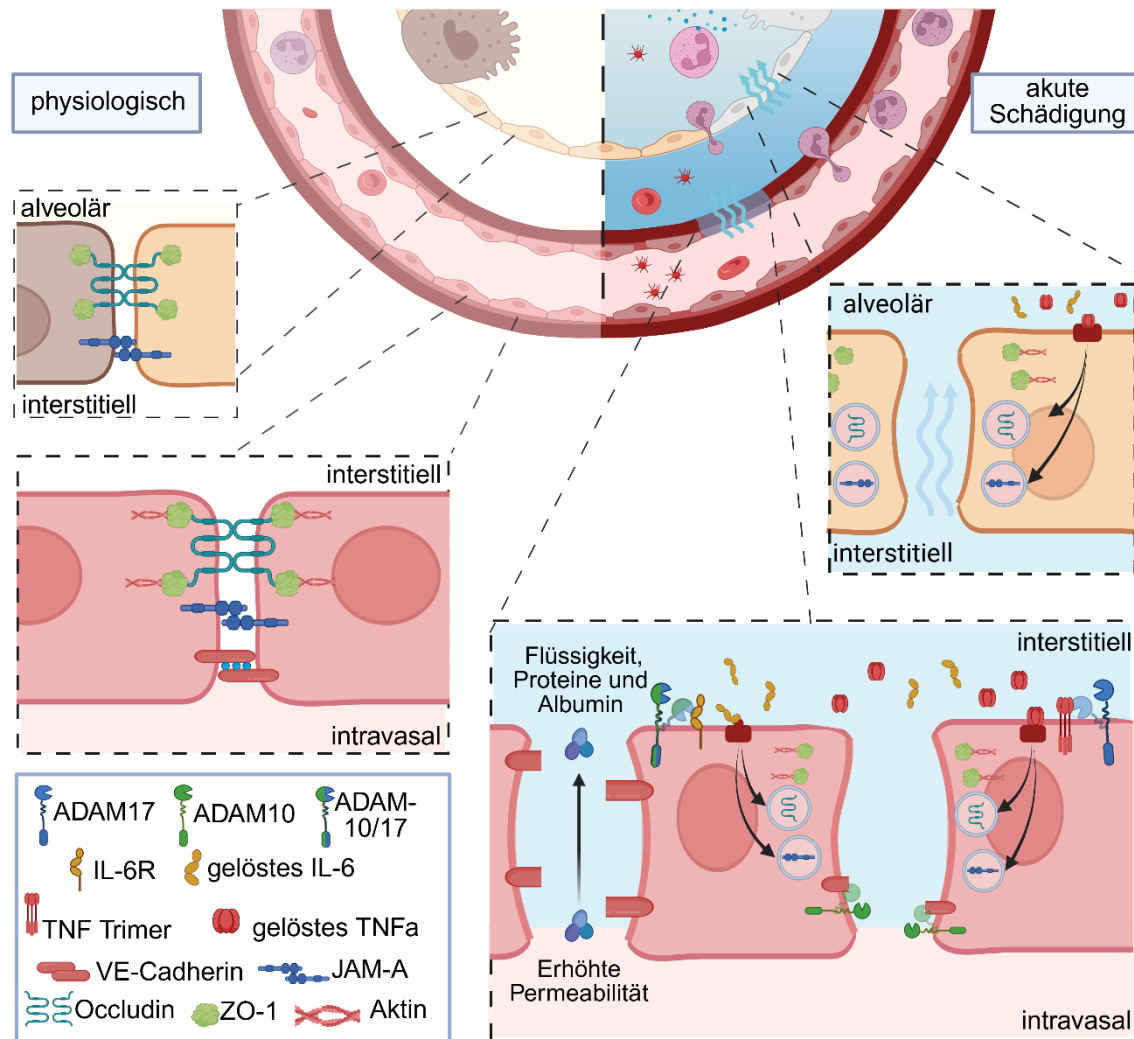


Abbildung 2: Strukturelle und molekulare Veränderungen der alveolokapillären Barriere bei akuter Lungenschädigung

Vergleich zwischen dem physiologischen Zustand (links) und einem durch akute Schädigung veränderten Zustand (rechts) der alveolokapillären Barriere. Im gesunden Zustand sind interzelluläre Verbindungen wie Tight Junctions (z.B. ZO-1, Occludin) und Adhäsionsmoleküle (z.B. VE-Cadherin, JAM-A) intakt. Bei akuter Schädigung führt die Aktivierung der Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 zur Spaltung von Zellkontakten und einer erhöhten Permeabilität. Daraus resultiert ein Flüssigkeits- und Proteindurchtritt ins Interstitium sowie eine Auflösung der Barrierefunktion. Die schematischen Vergrößerungen zeigen alveoläre und vaskuläre Veränderungen im Detail. Eigene Darstellung nach (Koenen et al., 2009, Liu et al., 2014, Thompson et al., 2017, Filippi, 2019, Matthay et al., 2019)

Bei akuter Schädigung wird diese Integrität durch entzündliche Mediatoren wie TNF- α und IL-6 sowie durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und bakterielle Toxine gestört (Thompson et al., 2017, Su et al., 2024). Diese führen zu einer Apoptose von Endothel- und Epithelzellen sowie zur proteolytischen Abspaltung intrazellulärer Kontakte, insbesondere durch die ADAM-Proteasen (engl. *A disintegrin and metalloproteinase*) ADAM10 und ADAM17 (Koenen et al., 2009, Flemming et al., 2015).

Die Folge ist eine unkontrollierte Passage von Plasma, Proteinen und Immunzellen in das Interstitium und den Alveolarraum. Die alveoläre Flüssigkeitsansammlung beeinträchtigt den Gasaustausch und führt zur Hypoxämie (Matthay et al., 2019). Abbildung 2 illustriert diese strukturellen und molekularen Veränderungen vom gesunden zum geschädigten Endothel, sowie den Einfluss proteolytischer Mechanismen durch ADAM10 und ADAM17 auf zentrale Junction-Proteine.

1.2.2. Neutrophile Migration in der akuten pulmonalen Inflammation

Ein zentrales Merkmal der exsudativen Phase ist die massive Rekrutierung und Aktivierung polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten (PMN) (Soethout et al., 2002). Diese werden durch Chemokine und Zytokine – wie etwa Tumornekrosefaktor (TNF- α) und Interleukin-6 (IL-6) - aus dem Knochenmark mobilisiert und wandern entlang von Konzentrationsgradienten in das Lungengewebe ein (Sadik et al., 2011). Der Übertritt über das Endothel erfolgt über mehrere Schritte: „Rolling“, Adhäsion, „Kriechen“ und transendotheliale Migration (TEM) (Filippi, 2019).

Diese Prozesse werden durch Adhäsionsmoleküle - wie beispielsweise *Intercellular Adhesion Molecules 1 und 2* (ICAM-1/2) und Selektine - reguliert, deren Funktion wiederum durch proteolytisches Shedding durch die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 modifiziert wird (Filippi, 2019, Drey Mueller et al., 2015, Pruessmeyer et al., 2014). Abbildung 3 zeigt einen Überblick über diese molekularen Veränderungen während der Migration von PMNs.

Nach ihrer Migration in den Alveolarraum setzen PMNs entzündungsfördernde Mediatoren, Enzyme (z.B. Myeloperoxidase) und ROS frei, die die Schädigung des Lungengewebes verstärken (Aratani, 2018, Thompson et al., 2017). Zudem kommt es zur Interaktion mit Thrombozyten und zur Bildung von Thrombozyten-

Neutrophilen-Komplexen (kurz: PNC, engl.: *Platelet neutrophil complex*), welche die Mikrozirkulation beeinträchtigen und zur Bildung von Mikrothromben beitragen (Page and Pitchford, 2013, Rossaint et al., 2018, Idell, 2003).

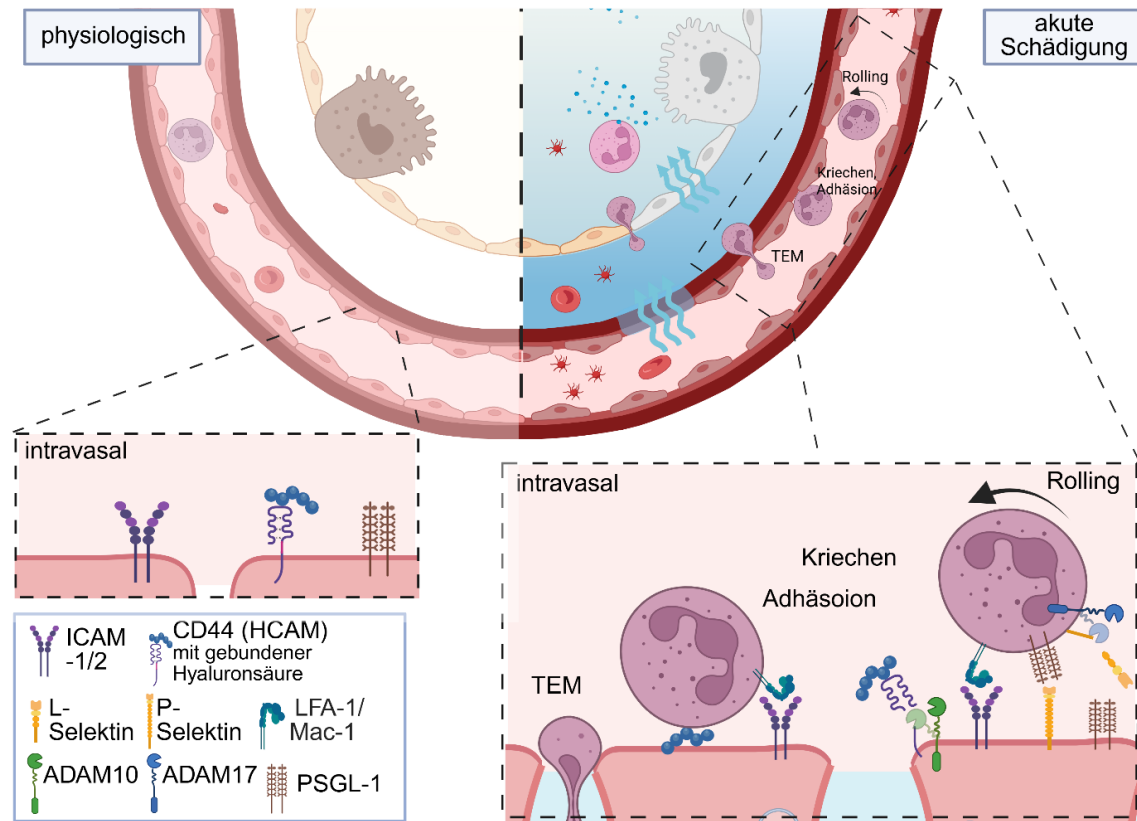


Abbildung 3: Veränderungen von Adhäsionsmolekülen während der neutrophilen Migration bei akuter pulmonaler Entzündung

Schematische Darstellung der Gefäßwand im physiologischen Zustand (links) im Vergleich zur akuten Entzündung (rechts). In der Entzündungsphase fördern proinflammatorische Stimuli die Hochregulation und das proteolytische Shedding zentraler Adhäsionsmoleküle durch ADAM10 (z.B. CD44) und ADAM17 (z.B. L-Selektin). Die Interaktion zwischen Endothel und neutrophilen Granulozyten (PMNs) wird dabei über Liganden wie ICAM-1/2, P-Selektin, und PSGL-1 vermittelt. Diese Prozesse ermöglichen die typischen Migrationsschritte „Rolling“, „Kriechen“, „Adhäsion“ und „transendotheliale Migration“ (TEM). Eigene Darstellung nach (Andrew et al., 1998, Filippi, 2019, Morsing et al., 2021).

Diese pathophysiologischen Abläufe unterstreichen die zentrale Rolle der neutrophilen Entzündungsantwort bei der Schädigung der alveolokapillären Barriere im ARDS. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen werden im folgenden Abschnitt im Fokus auf die Proteasen ADAM10 und ADAM17 vertieft.

1.3. ADAM10 und ADAM17 als Schlüsselfaktoren der Entzündungsregulation

1.3.1. Struktur, Aktivierung und Substrate

Die ADAM-Proteasen sind eine Familie membranständiger, zinkabhängiger Endopeptidasen mit wichtigen Funktionen in der Zell-Zell-Kommunikation, Signaltransduktion und Gewebshomöostase (Dreymueller et al., 2015). Beim Menschen existieren 21 funktionelle ADAMs, wovon 12 proteolytisch aktiv sind (Saftig and Reiss, 2011, Reiss and Saftig, 2009). Ein zentrales Merkmal ist das sogenannte „Ektodomain-Shedding“. Dabei werden extrazelluläre Domänen transmembranärer Proteine abgespalten, wodurch eine Vielzahl biologischer Prozesse beeinflusst wird, darunter Zellmigration, Immunzellaktivierung und Entzündungsregulation (Saftig and Reiss, 2011).

ADAM10 und ADAM17 stehen im Fokus der Forschung, da sie auf vielen Immunzellen exprimiert werden und eine Vielzahl entzündungsrelevanter Substrate spalten (Lambrecht et al., 2018). Sie zeigten sowohl überlappende, aber auch spezifische Substratspektren. ADAM10 bevorzugt Adhäsionsmoleküle wie *Vascular endothelial Cadherin* (VE-Cadherin), *Notch homolog 1* (Notch1) und ICAM-1 (Liao et al., 2023). ADAM17 hingegen spaltet vorrangig Zytokine (z.B. TNF- α), Zytokinrezeptoren (z.B. IL-6R) und Adhäsionsmoleküle wie L-Selektin (Bell et al., 2007, Lambrecht et al., 2018, Condon et al., 2001).

Beide Enzyme zeigen jedoch Substratüberschneidungen. So kann z.B. TNF- α sowohl durch ADAM17 als auch ADAM10 freigesetzt werden (Rosendahl et al., 1997). Ebenso wurde für ADAM17 eine Rolle bei der Spaltung von ICAM-1, einem klassischen ADAM10-Substrat, beschrieben (Tsakadze et al., 2006).

Strukturell bestehen ADAM10 und ADAM17 aus mehreren funktionellen Domänen. Dazu gehören eine Pro-Domäne mit Signalpeptid, die die Aktivierung reguliert, eine katalytisch aktive Metalloproteinase-Domäne, eine Disintegrin- und eine cysteinreiche Domäne sowie eine Transmembran- und zytoplasmatische Region (siehe Abbildung 4A). Die spezifische Domänenstruktur ist verantwortlich für die proteolytischen, adhäsiven und signalvermittelnden Funktionen der Proteasen (Reiss and Saftig, 2009).

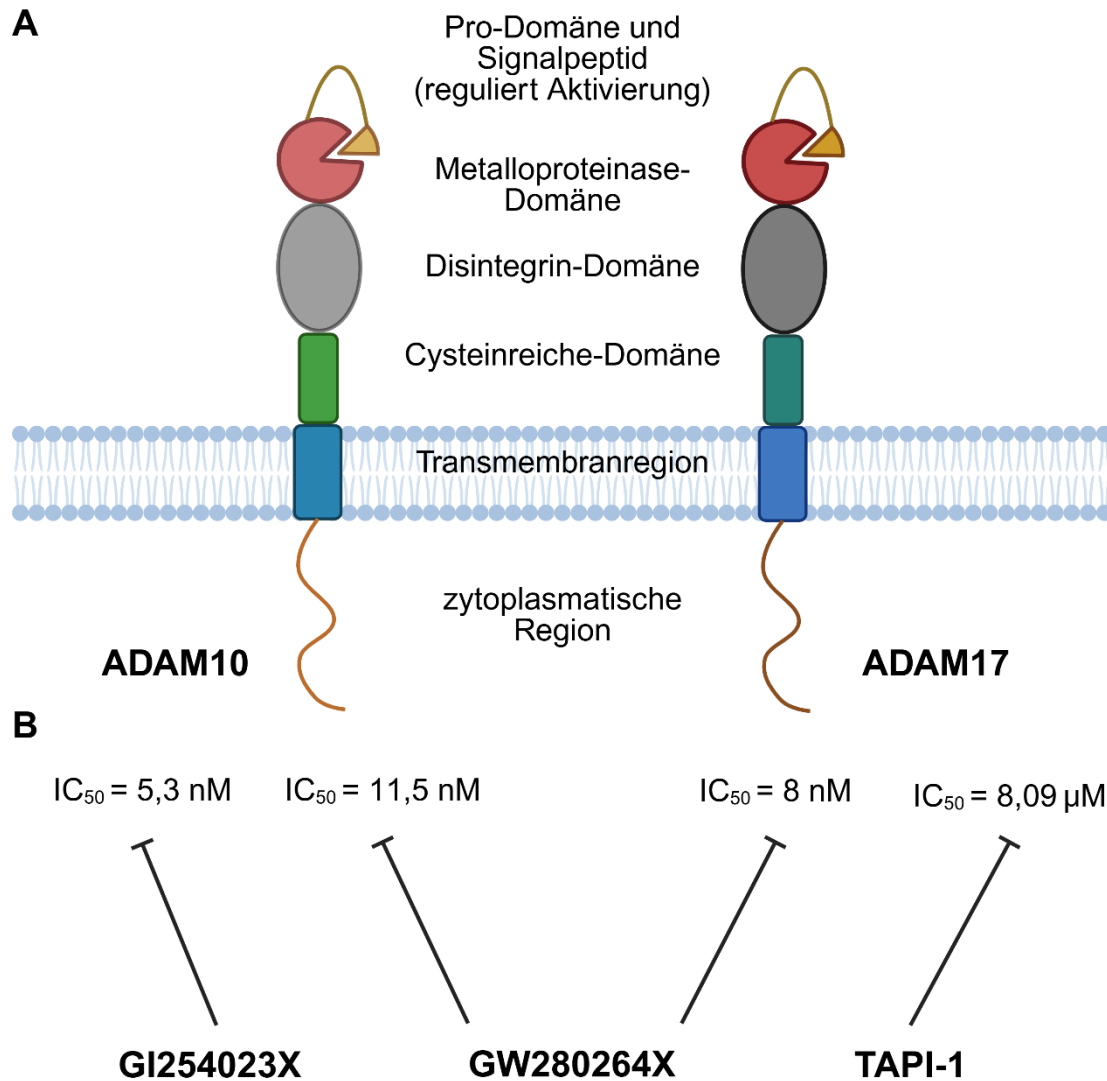


Abbildung 4: Schematischer Aufbau der ADAM-Proteasen ADAM10 und ADAM17 sowie Darstellung der eingesetzten Inhibitoren.

(A) Struktur der Proteasen mit Pro-Domäne, Metalloproteinase-Domäne, Disintegrin-Domäne, cysteinreicher Domäne, Transmembranregion und zytoplasmatischer Region.

(B) Die in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren – GI254023X, GW280264X und TAPI-1 – binden an die katalytische Domäne. GI254023X wirkt hochselektiv auf ADAM10, TAPI-1 hemmt bevorzugt ADAM17, während GW280264X als potenter dualer Inhibitor auf beide Proteasen wirkt. Die angegebenen IC_{50} -Werte dienen dem Vergleich von Potenz und Selektivität. Eigene Darstellung nach (Saftig and Reiss, 2011, MedChemExpress, 2024a, MedChemExpress, 2024b, Tocris, 2024, Lambrecht et al., 2018).

Die katalytische Domäne enthält ein Zinkion und ist Zielstruktur spezifischer Inhibitoren wie GI254023X (ADAM10), GW280264X (ADAM10/17) und TAPI-1 (ADAM17), die sich in ihrer Potenz unterscheiden (siehe Abbildung 4B). Die Wirksamkeit eines Inhibitors wird durch den IC_{50} -Wert (*inhibitory concentration 50*) angegeben, die Konzentration, bei der die Proteasenaktivität um 50% reduziert wird. Je niedriger dieser Wert, desto potenter der Inhibitor. IC_{50} -Werte < 100 nM

gelten als hoch potent, $>1 \mu\text{m}$ als schwach. Eine mindestens zehnfache Differenz zu verwandten Proteasen spricht für ihre Selektivität (Copeland, 2005).

Angeichts ihrer zentralen Rolle in Entzündung, Gewebeschädigung und Barriereverlust gelten ADAM10 und ADAM17 als potenzielle therapeutische Zielstrukturen, insbesondere bei entzündlichen Lungenerkrankungen wie dem ARDS (Dreymueller et al., 2015).

1.3.2. Funktionelle Rolle in der pulmonalen Inflammation

ADAM10 und ADAM17 sind entscheidende Mediatoren der akuten pulmonalen Entzündungsantwort und tragen wesentlich zur Dysregulation der alveolokapillären Barriere im ARDS bei. Beide Proteasen beeinflussen die Migration von Immunzellen, die Integrität des Endothels und die zelluläre Kommunikation durch gezieltes Shedding wichtiger Strukturen wie Adhäsionsmoleküle und Zytokinrezeptoren (Dreymueller et al., 2015, Lambrecht et al., 2018).

Während ADAM17 beispielsweise für die Spaltung von L-Selektin auf PMNs verantwortlich ist, ein essenzieller Schritt zur Regulation der Zelladhäsion im Rahmen der neutrophilen Rekrutierung, spielt ADAM10 die dominierende Rolle bei der Modulation von Endothelzellkontakten, etwa durch den proteolytischen Abbau von VE-Cadherin oder ICAM-1 (Liao et al., 2023, Condon et al., 2001, Schulz et al., 2008, Morsing et al., 2021). Diese Veränderungen begünstigen die TEM der PMNs und verstärken die entzündliche Antwort.

Mehrere experimentelle Modelle zeigten, dass eine pharmakologische Hemmung oder genetische Inaktivierung von ADAM10 bzw. ADAM17 die Permeabilität der alveolären Barriere reduzierte und die Infiltration von PMNs signifikant einschränkte (Lambrecht et al., 2018, Dreymueller et al., 2015). Zudem ging eine erhöhte Expression beider Proteasen mit einer gesteigerten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine einher, was eine Eskalation der inflammatorischen Kaskade im ARDS begünstigte (Dreymueller et al., 2012, Lambrecht et al., 2018).

Diese Befunde unterstreichen die potenzielle Bedeutung von ADAM10 und ADAM17 als therapeutische Zielstruktur im Rahmen von entzündungsbedingten Lungenerkrankungen. Ihre zentrale Rolle in Zellmigration, Barrierefunktion und

Signaltransduktion macht sie zu Schlüsselfaktoren in der Pathophysiologie des ARDS.

1.4. Forschungshypothese und Zielsetzung

Die zentrale Hypothese dieser Arbeit postuliert, dass die pharmakologische Hemmung der ADAM-Proteasen ADAM10 und ADAM17 signifikante Auswirkungen auf die Migration von PMNs, die Expression von Adhäsionsmolekülen, sowie die Integrität der alveolokapillären Barriere, während einer LPS-induzierten pulmonalen Entzündung hat. Darüber hinaus wird angenommen, dass die gezielte Inhibition dieser Proteasen potenziell auch ventilationsbedingte Lungenschäden (VILI) mildern könnte.

Das Hauptziel dieser Arbeit besteht darin, diese Hypothese zu validieren und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der ADAM-Proteasen in der Regulation entzündlicher Prozesse, insbesondere bei der Neutrophilenmigration, der Immunzelladhäsion an das Endothel, die Stabilisierung der Lungenbarriere sowie den Schutz vor VILI, eingehend zu untersuchen. Darüber hinaus wird die therapeutische Relevanz der gezielten Hemmung von ADAM10 und ADAM17 bewertet, um potenzielle neue Ansatzpunkte für die Behandlung des ARDS zu identifizieren.

Im Folgenden werden die experimentellen Methoden erläutert, die zur Untersuchung dieser Fragestellung entwickelt und angewandt wurden.

2. Methoden

2.1. Überblick

Grundlage dieser Arbeit war ein Migrationsversuch der pulmonalen Inflammation im murinen Modell. Nach Injektion von ADAM10- und ADAM17-Inhibitoren wurden drei Kompartimente der Maus durchflusszytometrisch analysiert, um die Migration spezifischer Immunzellpopulationen zu untersuchen.

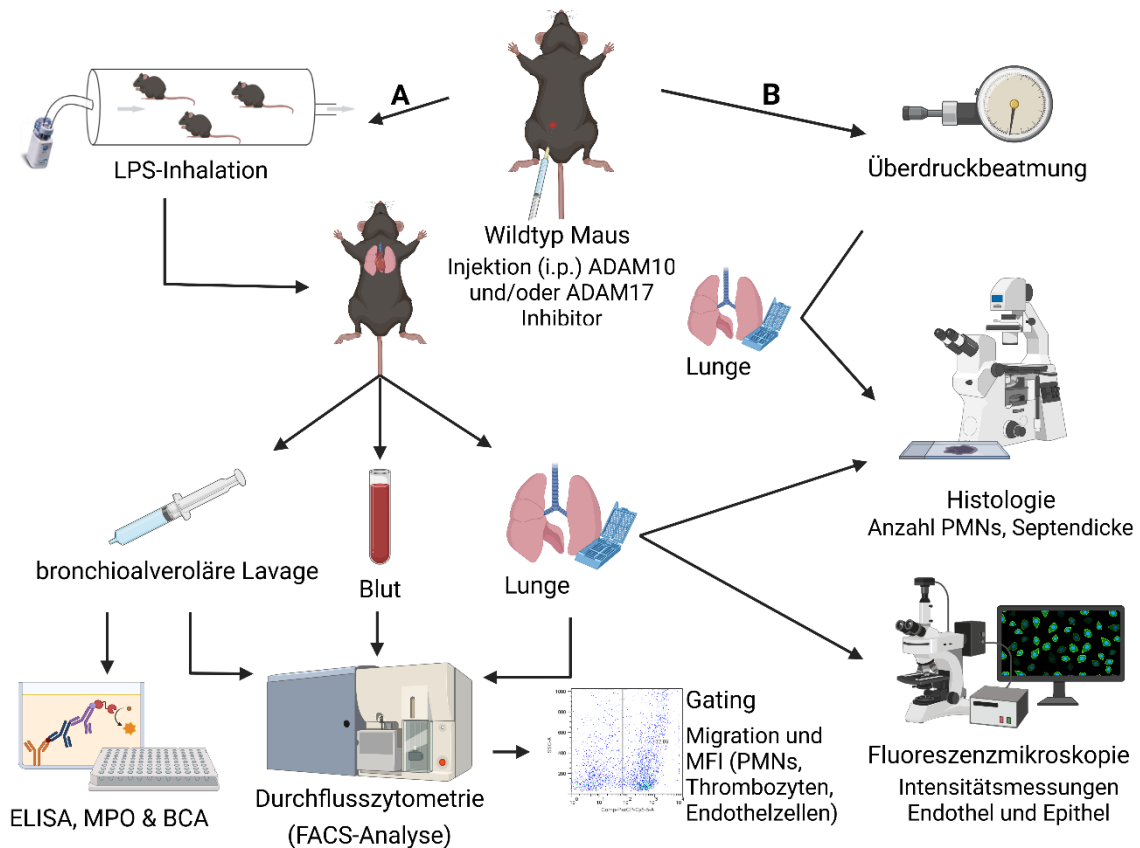


Abbildung 5: Überblick Methoden

Die Versuchstiere erhielten eine Stunde vor der LPS-Inhalation eine Injektion eines ADAM10- bzw. ADAM17-Inhibitors. A) Vier bzw. 24 Stunden nach erfolgter LPS-Inhalation wurden Blut, bronchioalveroläre Lavage (BAL) und die Lungen entnommen und weiterverarbeitet. Mittels durchflusszytometrischer Analyse konnten Aussagen bezüglich der Migration und Eigenschaften von polymorphkernigen Neutrophilen (PMN), Thrombozyten und Endothelzellen getroffen werden. Histologisch wurde das Lungenpaket mittels Immunfluoreszenz und -histochemie untersucht. Die Durchführung von Enzym-linked Immunsorbent Assays (ELISA), Bicinchoninsäure- (BCA) und Myeloperoxidase-Analysen (MPO) ermöglichten weitere Aussagen bezüglich Antigen- und Proteinexpression. B) Ein Teil der Wildtypmäuse erhielt im Rahmen des Ventilationsversuchs eine sechsstündige Überdruckbeatmung. Auch deren Lungen wurden im Anschluss immunhistochemisch untersucht. (ADAM = A disintegrin and metalloproteinase). Eigene Darstellung.

Im Fokus standen PMNs, Thrombozyten und Endothelzellen, deren Quantität sowie die Expression ausgewählter Oberflächenmarker erfasst wurden.

Ergänzend wurden die Mäuselungen histologisch mittels Immunfluoreszenz und Immunhistochemie aufgearbeitet. Aus der bronchoalveolären Lavage (BAL) lieferten Enzyme-linked Immunsorbent Assays (ELISA), Myeloperoxidase-Assays (MPO) sowie Bicinchoninsäure-Assays (BCA) Informationen zur Proteinexpression. Neben der Analyse der LPS-induzierten Inflammation wurden Erkenntnisse zur beatmungsbedingten sterilen Lungenschädigung durch Normal- und Überdruckbeatmung gewonnen. Eine sechsstündige Beatmung unter tiefer Sedierung mit anschließender Lungenentnahme und histologischer Untersuchung ermöglichte weiterführende Einblicke und lieferte Ansätze für zukünftige Forschungsarbeiten (vgl. Abbildung 5).

2.2. *In vivo* Transmigrationsversuch mittels LPS-induzierter Inflammation

2.2.1. Mauslinien

Die tierexperimentellen Studien wurden gemäß Tierversuchsantrag beim Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Genehmigungsnummer A03/18G). Zum Einsatz kamen 8-12 Wochen alte, gefloxt ADAM10- bzw. ADAM17-Mäuse aus eigener Zucht, die als Wurfgeschwister (Littermates) der ADAM10/17^{catchup} und ADAM10/17^{PF4} Zuchtlinien dienten. Zur Reduktion der Tieranzahl wurden diese Littermates als Wildtyptiere betrachtet. Innerhalb der Versuchsgruppen wurde, soweit möglich, ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis (1:1) berücksichtigt. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen (Temperatur 20-24°C, Ø 22°C; relative Luftfeuchtigkeit 50-60%) in Makrolonkäfigen Typ 2 long mit maximal vier Tieren pro Käfig gehalten. Der Lichtzyklus betrug 12 Stunden Hell- und 12 Stunden Dunkelphase.

2.2.2. Inhibitor-Injektion und LPS-Inhalation

Die selektive bzw. kombinierte Inhibition von ADAM10 und ADAM17 erfolgte intraperitoneal mittels der in Tabelle 2 aufgeführten Inhibitoren. Eine Stunde nach Injektion wurde eine pulmonale Inflammation durch Inhalation von vernebeltem Lipopolysaccharid (LPS; Serotyp *Salmonella enteritidis*) induziert.

Tabelle 2: Verwendete ADAM10- und ADAM17-Inhibitoren

Substanz	Zielstruktur	Dosis ($\mu\text{g/g KG}$)	Applikations- volumen (μl)
GI254023X	ADAM10 Inhibitor	100 μg	200 μl
TAPI-1	ADAM17/TACE Inhibitor	5 μg	200 μl
GW280264X	ADAM10 und -17/TACE Inhibitor	30 μg	200 μl

Die 30-minütige Exposition erfolgte unter einem Abzug in einer zylindrischen Kunststoffkammer (20 cm Länge, 9 cm Durchmesser) mit jeweils vier bis sechs Tieren. Der Aufbau umfasste eine rechtsseitige Verbindung zur Wasserstrahlpumpe sowie eine linksseitige Verbindung zum Vaporisator mittels Beatmungsschlauch, wodurch ein kontinuierlicher Luftstrom gewährleistet wurde (Vgl. Abbildung 6). LPS war in 7,5 ml NaCl gelöst (Endkonzentration von 0,5 mg/ml). Kontrolltiere inhalierten entsprechend 7,5 ml 0,9-prozentige NaCl-Lösung.

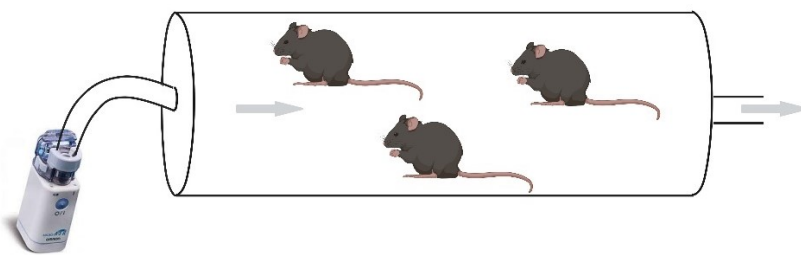


Abbildung 6: Modell der LPS-Inhalation.

Ein Vernebler (links) wurde an einer Plastikröhre angeschlossen, in welcher sich vier bis sechs Mäuse befanden. Durch die Verbindung zur Wasserstrahlpumpe (rechts) wurde ein Vakuum erzeugt, sodass das Lipopolysaccharid (LPS) des Serotyps *Salmonella enteritidis* kontinuierlich von den Mäusen eingeatmet werden konnte. Eigene Darstellung.

2.2.3. Probenentnahme

Die durch die LPS-Inhalation induzierte Migration von PMNs kann frühestens nach einer Stunde transepithelial bzw. nach zwei Stunden transendothelial nachgewiesen werden. Der Peak der Migration wird nach 24 Stunden erreicht (Reutershan et al., 2005). Daher wurden die durchflusszytometrischen Untersuchungen zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Die von uns gewählten Zeitpunkte für die jeweiligen Analysen wurden anhand von Vorversuchen der Arbeitsgruppe bestimmt. Für die durchflusszytometrische Analyse wurde ein Intervall von 24 Stunden zwischen Injektion und Operation gewählt. Die Untersuchungen mittels ELISA, MPO und BCA erfolgten hingegen bereits vier Stunden nach der

Verabreichung, da die entsprechenden Botenstoffe (Chemo- und Zytokine) vor der Migration freigesetzt werden (Vgl. Abbildung 7).

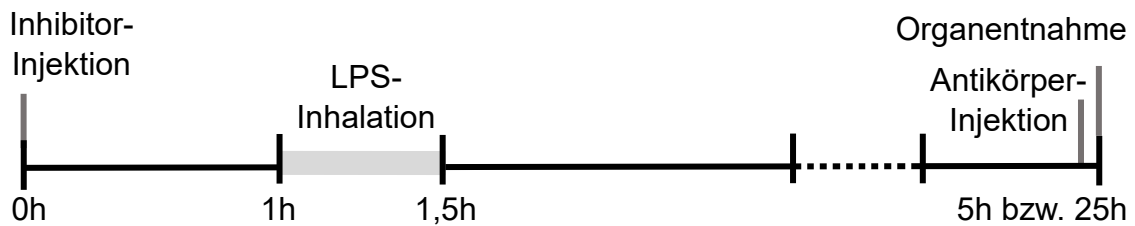


Abbildung 7: Zeitlicher Versuchsablauf.

Zu Beginn werden die jeweiligen ADAM10 bzw. ADAM17-Inhibitoren GI254023X (ADAM10), TAPI-1 (ADAM17) oder GW280264X (ADAM10/17) intraperitoneal injiziert. Nach einer Stunde wird mit der halbstündigen LPS-Inhalation begonnen. Je nach Versuch wurde der Antikörper anti-mouse Ly-6G vier bzw. 24 Stunden nach Inhalationsbeginn über die Schwanzvene intravenös injiziert, um unmittelbar im Anschluss mit der Organentnahme fortzufahren. LPS = Lipopolysaccharid. Eigene Darstellung.

Zur späteren Unterscheidung intravaskulärer bzw. interstitiell lokalisierter PMNs wurde der im Verhältnis 1:25 in NaCl 0,9% verdünnte, Allophycocyanin/Cyanin-7-(APC/Cy7)markierte Antikörper anti-mouse Ly-6G (engl. *lymphocyte antigen 6 complex, locus G*) über die Schwanzvene injiziert. Je Maus wurde hierbei ein Gesamtvolumen von 250 µl vor der Organentnahme verabreicht. Der Anti-Ly-6G-Antikörper band dabei an die erreichbaren PMNs und ermöglichte die spezifische Markierung intravaskulärer sowie bereits an der Lunge anhaftender PMNs kurz vor der pulmonalen Diapedese. Anschließend wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion narkotisiert. Das Narkotikum Ketamin und das Sedativum und Muskelrelaxans Xylazin (Rompun®) wurden, wie in Tabelle 3 dargestellt, in NaCl verdünnt und anschließend mit einem Volumen von 300-400 µl injiziert.

Tabelle 3: Anästhetika Zusammensetzung für 10 ml

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

Nach Einsetzen des Anästhesiestadiums der chirurgischen Toleranz, welches sich durch Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes (ZZR) kontrollieren ließ, wurde das Versuchstier in Rückenlage auf einer Korkplatte an den Pfoten und an

den oberen Schneidezähnen, zur Reklination des Kopfes, fixiert. Anschließend wurde das Fell mit Paraffinöl benetzt und mit der Abpräparation der Haut begonnen. Durch Inzision des Diaphragmas wurde ein Pneumothorax induziert, um die Verletzungsgefahr von Lungengewebe zu verringern. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Thorax mittels lateraler Durchtrennung der Rippen, sowie deren kraniale Fixierung. Für die Probengewinnung des Blutes wurde nach erfolgtem Trendelenburg-Manöver¹ eine Punktion des rechten Ventrikels zur Entnahme des venösen Blutes durchgeführt. Das darauffolgende Durchtrennen der abdominalen V. cava caudalis, sowie die langsame Spülung mittels 3 ml PBS⁻ über den rechten Ventrikel, führten zur Ausblutung und damit zur Tötung der Maus. Zusätzlich diente die Spülung der Entfernung frei zirkulierender PMNs aus dem pulmonalen Gefäßbett. PMNs, die trotz der Spülung in der Lunge verblieben, wurden als am pulmonalen Gefäßendothel adhärierend interpretiert. Diese Zellen befinden sich im frühen Stadium der Transmigration und spiegeln die endotheliale Adhäsionsphase vor dem Übertritt ins Interstitium und den Alveolarraum wider.

Zur Gewinnung der BAL wurde die Trachea stumpf freipräpariert, sodass mittels Tracheotomie, Intubation und der Spülung mit 2 ml PBS⁻ bronchoalveoläre Flüssigkeit gesammelt und bis zur Beendigung des Versuches auf Eis gelagert werden konnte. Für die Gewinnung des Lungengewebes wurde das Herz-Lungen-Paket entnommen. Das Herz, die Trachea und Lymphknoten wurden entfernt und die Lungenlappen abpräpariert. Rechte Ober- und Unterlappen wurden in flüssigem Stickstoff und anschließend in -80°C eingefroren. Der restliche Teil der Lunge, die linken Lungenflügel sowie der rechte Mittellappen, wurden in einer Petrischale mechanisch zerkleinert und mit 2,5ml Enzymlösung enzymatisch verdaut. Dessen Zusammensetzung kann in Tabelle 4 nachvollzogen werden.

Die in einer Dunkelkammer befindlichen Lungenproben wurden vor der Weiterverarbeitung für eine halbe Stunde bei 37°C in einen Thermoschüttler inkubiert.

¹ Die Maus wurde für einige Sekunden schräg kopfüber gehalten

Nach Beendigung des Tierversuches erfolgte zur Gewinnung der Zellen aus den verschiedenen Organproben die Weiterverarbeitung von BAL, Blut und Lunge.

Tabelle 4: Enzymgemisch Zusammensetzung pro Maus

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

2.2.4. Probenverarbeitung

Im Blut wurde die in 500 µl befindliche Gesamtzahl der Leukozyten bestimmt. Hierfür wurden je 10 µl einer Probe zu 90 µl Türk'scher Lösung pipettiert und mittels Neubaur-Zählkammer gezählt. Durch Zentrifugation der entnommenen BAL bei 1300 *revolutions per minute* (rpm), 10 min, 4°C, und der Abnahme des Überstandes für spätere Versuche², konnten die darin befindlichen Zellen mit Färbepuffer resuspendiert werden. Die Zusammensetzung des Färbepuffers kann im Abschnitt 6.3.5. nachvollzogen werden. LPS-stimulierte bzw. nicht stimulierte Proben wurden auf ein Endvolumen von 500 µl bzw. 330 µl resuspendiert. Anschließend konnte die Anzahl der in der BAL befindlichen Leukozyten, analog zur Zellzählung im Blut, bestimmt werden. Nach erfolgter Inkubation der Lungen-Enzymlyse wurde diese mithilfe des Konus einer 5-ml-Spritze durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100µm gepresst und mit 15-20 ml BPS⁻ gespült. Nach der Zentrifugation der Lungenlösung (1300rpm, 10 min, 4°C) und dem Verwurf des Überstandes, wurden die Zellen mit 2,5 ml Organ-Lyse resuspendiert. Die Zusammensetzung der Organ-Lyse kann im Kapitel 6.3.5. nachvollzogen werden. Gestoppt wurde die Lyse, nach einer zehnminütigen Inkubation bei 4°C im Dunkeln, durch Zugabe von 20 ml Färbepuffer. Durch erneute Zentrifugation unter gleichen Bedingungen, wurde der Überstand erneut verworfen und das entstandene Zellpellet mit Färbepuffer auf ein Endvolumen von 2 ml bei LPS-stimulierten und 1 ml bei nicht LPS stimulierten Proben resuspendiert. Es folgte

² Der Überstand der BAL wurde für weitere Analysen mittels ELISA (siehe Kapitel 2.5.), MPO (siehe Kapitel 2.6.) und BCA (siehe Kapitel 2.7.) verwendet und bei -80°C eingefroren.

die Bestimmung der Gesamt-Leukozytenzahl der Lungenproben analog zur manuellen Zellzählung bei den Proben von Blut und BAL. Für die Analyse des Probenmaterials mittels Durchflusszytometrie (FACS, engl. *Fluorescence Activated Cell Sorting*) wurden die Zellen im Folgenden gefärbt.

2.2.5. Probenvorbereitung für die FACS-Analyse

Nach der Gesamtzellzahlbestimmung erfolgte die Färbung der Zellen für die abschließende durchflusszytometrische Analyse (siehe Kapitel 2.3.). Die verwendeten Fluoreszenzantikörper wurden aufgrund der begrenzten Kapazitäten des FACS-Gerätes, sowie zur Vermeidung von Überlappungen der Fluoreszenzspektren, in fünf Antikörper-Mixe unterteilt und unter Lichtschutz in Färbepuffer verdünnt (vgl. Tabelle 5-7). Diese dienten zur Zellidentifizierung und zur Quantifizierung der Oberflächenproteinexpression von PMNs (vgl. Tabelle 5), Thrombozyten (vgl. Tabelle 6) und Endothelzellen (vgl. Tabelle 7).

Für jedes Kompartiment wurde neben einem Röhrchen für die spätere ungefärbte Kontrolle ohne Antikörper (engl. *unstained*), je ein FACS-Röhrchen pro Probe und Antikörpermix bereitgestellt. In diesen wurde 50 µl des jeweiligen Mixes, bzw. des Färbepuffers für die Kontrolle, vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 25 µl des Blutes bzw. 100 µl der jeweiligen BAL- und Lungenzellsuspension hinzu pipettiert und bei 4°C für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die Blutproben wurden zur vollständigen Lyse der Erythrozyten nach 20 Minuten der Inkubationszeit mit 1 ml Erythrozyten-Lyse vermengt. Nach abgelaufener Inkubationszeit und der Hinzugabe von Färbepuffer auf ein Gesamtvolumen von 2 ml erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation der Proben bei 4°C und 1300 rpm. Nach Verwurf des Überstandes wurden alle Zellsuspensionen erneut mit Färbepuffer vermengt, kurz auf einem Vortexmischer vortexiert und unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Bei den Blutproben wurde dieser Schritt ein drittes Mal wiederholt, da insbesondere dort auch noch nach zwei Reinigungsschritten verbliebene Zellen des Überstandes die Analyseergebnisse verfälschen würden. Nach Abschluss des letzten Waschschruttes wurden die Proben mit 400 µl Zell-Fixierlösung fixiert und lichtgeschützt bei 4°C gelagert. Die Analysen wurden spätestens 24h nach Abschluss der Fixierung durchgeführt.

2.3. Durchflusszytometrie

2.3.1. Prinzip

Die Durchflusszytometrie wurde zur Identifizierung und Quantifizierung spezifischer Zellpopulationen eingesetzt. Die Analyse erfolgte dabei mittels FACS-Gerät (engl. „*Fluorescence Activated Cell Scanning*“), ohne anschließende Sortierung. Einzelne Zellen wurden in einem Hüllstrom hydrodynamisch fokussiert, durch Laserstrahlen angeregt und anhand von Streulicht (FSC, engl. „*forward scatter channel*“, SSC, engl. „*side scatter channel*“) sowie Fluoreszenzsignalen detektiert. Durch das gegenseitige Auftragen beider Größen, lassen sich einzelne Zellpopulationen, wie beispielsweise Lymphozyten und Monozyten, voneinander abgrenzen (vgl. Abbildung 8).

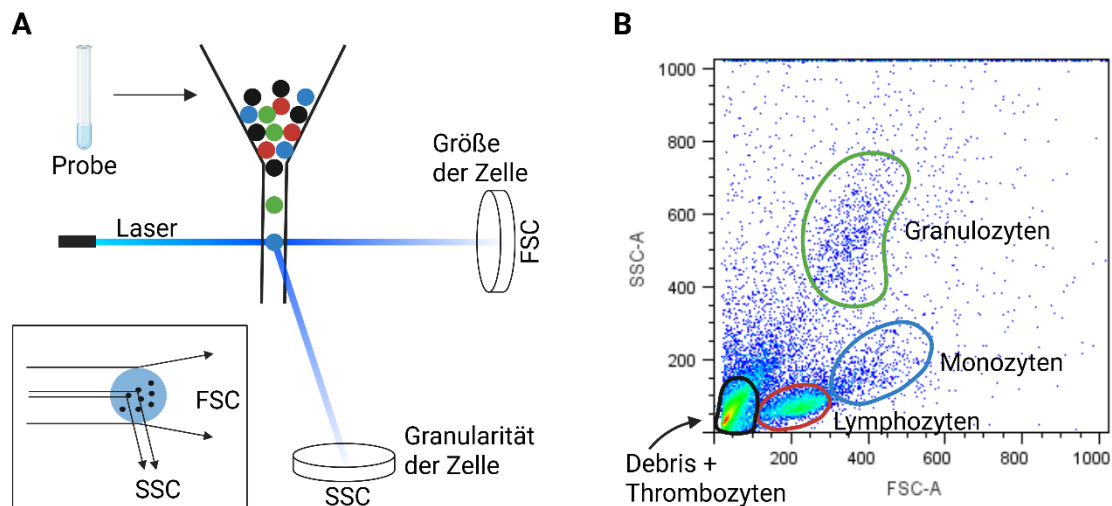


Abbildung 8: Prinzip der FACS-Analyse

A) Schematische Darstellung der Detektion von Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) mittels Laserstreulicht in der Durchflusszytometrie. B) Beispielhafte FACS-Analyse einer Lungenzellprobe mit Darstellung unterschiedlicher Zellpopulationen im FSC-SSC-Dot Plot. (ein Punkt = eine Zelle). FSC = *forward scatter channel*; SSC = *side scatter channel*, PMN = neutrophile Granulozyten. Eigene Darstellung.

Die Fluoreszenzresultate basierten auf Oberflächenmolekülen, die mit monoklonalen Antikörpern markiert wurden. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI, engl.: „*Mean Fluorescence Intensity*“) diente als Maß für die relative Molekülzahl. Bei gewünschter hoher Sensitivität sollten keine Farben kombiniert werden, die starke spektrale Überlappungen aufweisen.

Einzelfärbungen der verwendeten Fluorochrome wurden durchgeführt, um spektrale Überlappungen zu kompensieren. Dies erfolgt durch Subtraktion der

Fluoreszenz-Emission zweier sich überlappender Farbstoffe (McKinnon, 2018, Cossarizza et al., 2019). Hierfür werden zuvor negative und positive Bereiche aller beteiligten Fluoreszenzspektren bestimmt. Die Analyse der Einzelfärbungen, mit der jeweils nur ein Antikörper verwendet wird, erfolgt zu Beginn des Experiments.

In dieser Arbeit diente die Durchflusszytometrie der Analyse von PMNs und Thrombozyten entlang ihrer Migration (intravaskulär, interstitiell, intraalveolär) sowie von Endothelzellen. Zellspezifische Oberflächenmoleküle wurden über das MFI quantifiziert.

2.3.2. Materialien

Für die FACS-Analyse wurde das Gerät FACSCanto™ II von BD Bioscience verwendet. Die Optik besteht aus einem violetten (405 nm, 30mW solid state), einem blauen (488 nm, 29 mW solid state) und einem roten (633 nm, 17 mW HeNe) Laser, deren Lichtstreuung und Fluoreszenzsignal nach Beleuchtung der Zellen durch die spektralen Filter zu den Detektoren geleitet werden (Bioscience, 2012). Aufgenommen wurde mit Hilfe der Software BD FACSDiva. Anschließend erfolgte die Darstellung und das Gating, d.h. die Auswahl definierter Zellpopulationen anhand von Streu- und Fluoreszenzparametern, mittels Flow Jo 7.2.5. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte durch GraphPad Prism 9.

Wie bereits in Kapitel 2.2.5. bei der Probenvorbereitung zur FACS-Analyse erwähnt, wurden die verwendeten konjugierten monoklonalen Antikörper zur Fluoreszenz-markierung in fünf Antikörper-Mixe unterteilt (siehe Tabelle 5-7).

CD45 (engl.: *Cluster of Differentiation*) wird auf Leukozyten exprimiert und daher als Marker für diese Population eingesetzt. Für die spezifische Detektion von PMNs enthielten die Mixe aus Tabelle 5 den Antikörper gegen „*Lymphocyte antigen 6 complex, locus G*“ (kurz: Ly-6G). Der Antikörper gegen CD41 in Tabelle 6 diente der Detektion von Thrombozyten.

Tabelle 5: AK-Mix 1 (links) und 2 (rechts): PMNs. Zusammensetzung FACS-Röhrchen. PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, PE/Cyanine7 = Phycoerythrin/Cyanine7, APC = Allophycocyanin, PE = Phycoerythrin, FITC = Fluorescein isothiocyanate

Antikörper	Fluorchrom	Menge	Antikörper	Fluorchrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl	CD45	PerCP	1 µl
Ly-6G	PE/Cyanine7	1 µl	Ly-6G	PE/Cyanine7	1 µl
CD62L	Pacific Blue	1 µl	CD11b	Pacific Blue	1 µl
LFA-1	APC	1 µl	ADAM10	APC	1 µl
CD162	PE	1 µl	ADAM17	PE	0,5 µl
CD44	FITC	1 µl			
Färbepuffer		44 µl	Färbepuffer		45,5 µl

Tabelle 6: AK-Mix 3: Thrombozyten. Zusammensetzung eines FACS-Röhrchens. PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, PE/Cyanine7 = Phycoerythrin/Cyanine7, APC = Allophycocyanin, PE = Phycoerythrin, FITC = Fluorescein isothiocyanate

Antikörper	Fluorchrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl
CD62P	PE/Cyanine7	1 µl
CD41	Pacific Blue	1 µl
ADAM10	APC	1 µl
ADAM17	PE	0,5 µl
CD44	FITC	1 µl
Färbepuffer		44,5 µl

Tabelle 7: AK-Mix 4 (links) und 5 (rechts): Endothel. Zusammensetzung FACS-Röhrchen. PerCP = Peridinin-Chlorophyll-Protein, PE/Cyanine7 = Phycoerythrin/Cyanine7, APC = Allophycocyanin, PE = Phycoerythrin, FITC = Fluorescein isothiocyanate

Antikörper	Fluorchrom	Menge	Antikörper	Fluorchrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl	CD45	PerCP	1 µl
CD144	PE/Cyanine7	1 µl			
Zombi Violet	Pacific Blue	1 µl	CD54	Pacific Blue	1 µl
CD102	APC	1 µl	ADAM10	APC	1 µl
CD162	PE	1 µl	ADAM17	PE	0,5 µl
CD31	FITC	1 µl	CD31	FITC	1 µl
Färbepuffer		44 µl	Färbepuffer		45,5 µl

Für die Untersuchung von Endothelzellen wurden zunächst tote Zellen durch den Amin-reaktiven Fluoreszenzfarbstoff Zombie Violet detektiert und für die weitere Analyse ausgeschlossen. Nach zusätzlicher Selektion CD45-negativer Zellen, zum Ausschluss von Leukozyten, wurden Endothelzellen durch ihre spezifische Bindung des Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmoleküls CD31 (engl.: „*Platelet And Endothelial Cell Adhesion Molecule 1*“, kurz: PECAM-1) ermittelt (siehe Tabelle 7).

Die weiteren Fluoreszenzantikörper der Mixe dienten der Bestimmung von relevanten Zellstrukturen und deren MFI. Genauer konnte die Expression des Leukozytenfunktions-assoziierten Antigens (engl. „*leucocyte function associated molecule-1*“ kurz: LFA-1), sowie die Zelladhäsionsmoleküle Leukozyten-Selektin (kurz: L-Selektin (CD62L)) und das P-Selektin-bindende Glykoprotein (engl.: „*Platelet-selectin glycoprotein ligand-1*“, kurz: PSGL-1 (CD162)) auf den Oberflächen der PMNs gemessen werden.

Auch der Hyaluronsäure-Rezeptor CD44, ein Vertreter der „*Homing-associated Cell Adhesion Molecules*“ (kurz: H-CAM), das Oberflächenprotein Integrin α -M (CD11b), sowie die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 wurden auf PMNs quantifiziert (siehe Tabelle 5).

Auf den Thrombozyten wurde die Expression des Thrombozyten-Selektin (engl. „*platelets*“, kurz: P-Selektin), sowie ebenfalls CD44, ADAM10 und ADAM17 ermittelt (siehe Tabelle 6). Analog dazu wurde auf den Endothelzellen die Expression der intrazellulären Adhäsionsmoleküle 1 (engl.: „*intracellular adhesion molecule 1*“, kurz: ICAM-1 (CD54)) und 2 (engl. „*intracellular adhesion molecule 2*“, kurz: ICAM-2 (CD102)), das vaskulär-endotheliale Cadherin (engl. „*vascular endothelial cadherin*“, kurz: VE-Cadherin (CD144)), sowie erneut PSGL-1, ADAM10 und ADAM17 untersucht (siehe Tabelle 7).

2.3.3. Auswertung

Für die Messung am FACSCanto™ II wurde zunächst ein „Cytometer Setup“, mit Hilfe von *Cytometer Setup and Tracking Beads*, für die Baseline-Laserkalibrierung durchgeführt. Wie bereits in 2.3.1. erwähnt, erfolgte bei der ersten FACS-

Analyse zunächst die Auswertung der Einzelfärbungen zur Berechnung der Kompensation für alle folgenden Analysen.

Für die Darstellung wurden Punktdiagramme (engl. *Dotplots*) gewählt, wobei ein Punkt jeweils einer von der Laserquelle erfassten Zelle entsprach. Für die Auswertung wurden die Zellpopulationen in den jeweiligen Fluoreszenzfärbungen nach dem Prinzip des Gatings analysiert, d.h. positiv bzw. negativ gefärbte Zellen wurden zur weiteren Analyse in Subpopulationen differenziert.

Mithilfe einer Lungenprobe soll im Folgenden die Auswertung exemplarisch veranschaulicht werden. Die Analyse von PMNs und Thrombozyten wurden äquivalent bei den Blut- und BAL-Proben durchgeführt. Die Identifizierung der Endothelzellen erfolgte ausschließlich anhand der Lungenproben.

2.3.4. Gating-Protokolle zur Identifikation spezifischer Zellpopulationen

In der Darstellung des FSC-SSC-Dot-Plot-Diagramms wurden Thrombozyten und Debris durch deren spezifische Granularität und Größe erfasst und ausgeschlossen (Abbildung 9: A). Die ausgewählten Zellen wurden zur genauen Identifizierung von Leukozyten in Peridinin-Chlorophyll-Protein/Cyanine5.5 (kurz: PerCP/Cy5.5) markierte CD45-positive Zellen differenziert (B).

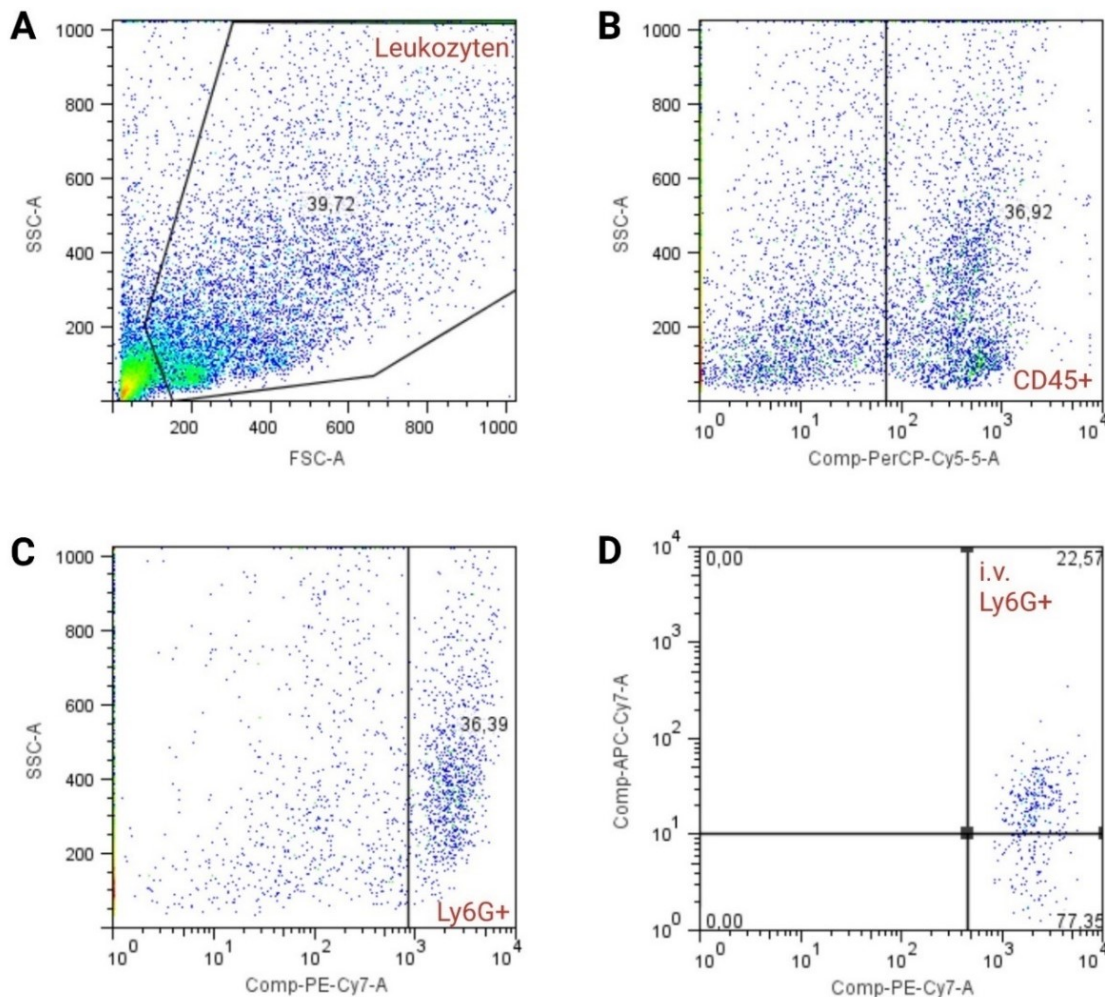


Abbildung 9: FACS-Leukozyten-Gating einer Lungenprobe

A) Leukozyten-Gating im FSC-SSC-Diagramm B) Gating CD45+ positiver Zellen im PerCP/Cy5.5-SSC-Diagramm C) Gating Ly-6G+ positiver Zellen im PE/Cy7-SSC-Diagramm D) Gating Ly-6G+ positiver Zellen im PE/Cy7-APC/ Cy7-Diagramm. APC/ Cy7 markiert die intravaskulär gelegenen Ly-6G+ positiven Zellen, welche unmittelbar vor der Probenentnahme markiert wurden.

Das erneute Gating dieser Population in Phycoerythrin/Cyanine7 (kurz: PE/Cy7) markierte Ly-6G-positive Zellen identifizierte die PMNs (C). Bei den Lungenproben erfolgte zusätzlich die Differenzierung von durch PE/Cy7, als auch

Allophycocyanin/Cyanine7 (kurz: APC/Cy7) markierten PMNs im PE/Cy7-APC/Cy7-Diagramm. Aufgrund der präoperativen Injektion des Ly-6G-Antikörpers wurde in intravasale bzw. interstitielle PMNs unterteilt (D).

Für das Gating der Thrombozyten im dritten Antikörpermix wurde zunächst die eine Population mit enthaltenen Thrombozyten und Debris aus der Gesamtpopulation durch deren spezifische Granularität und Größe erfasst (Abbildung 10: A). In dieser Subpopulation wurden mithilfe der PerCP markierten CD45-negativen Zellen die degradierten Leukozyten ausgeschlossen (B).

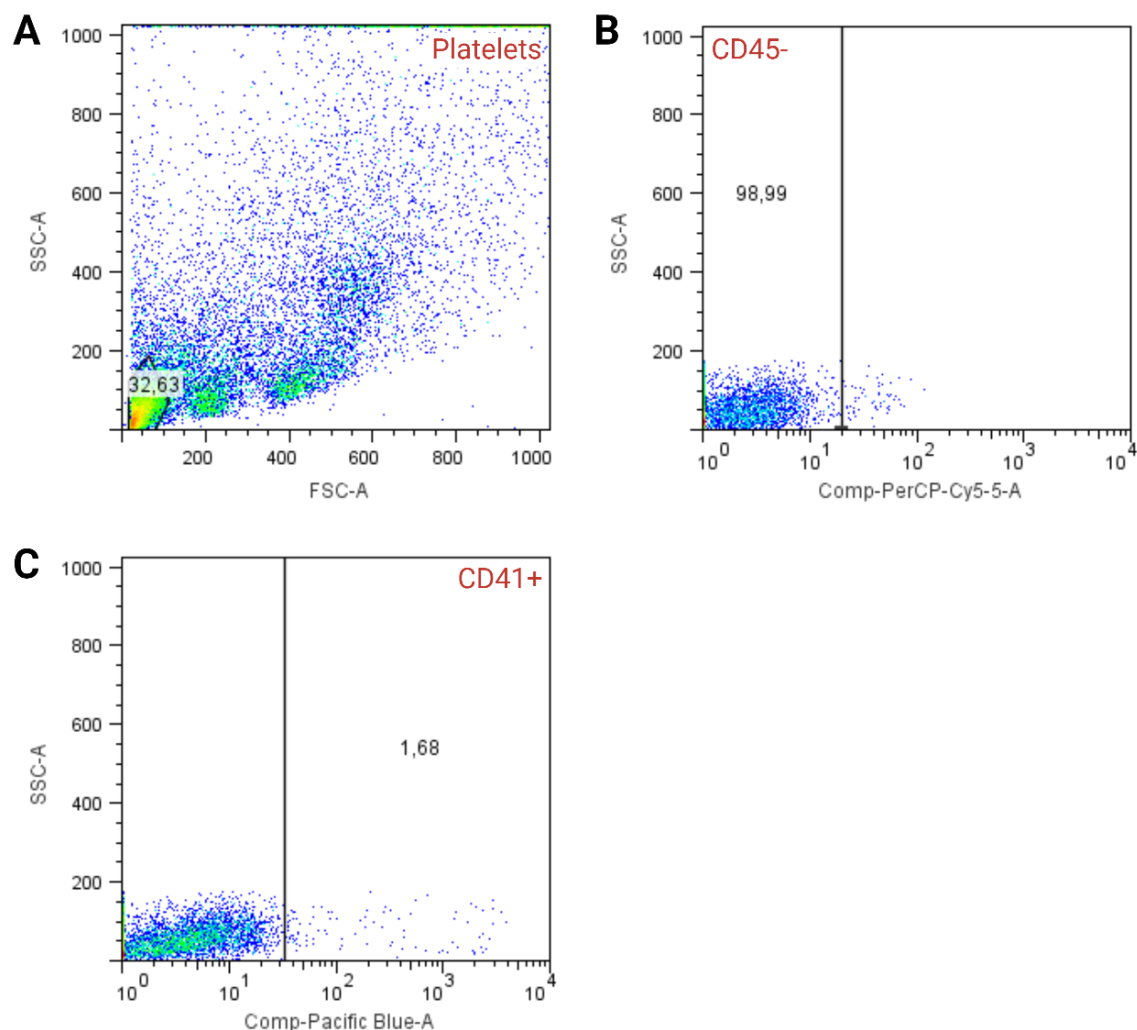


Abbildung 10: FACS-Thrombozyten-Gating einer Lungenprobe

A Gating der Debris- und Thrombozyten-Population im FSC-SSC-Diagramm. B Gating der CD45- negativen Zellen im PerCP/Cy5.5-SSC-Diagramm. C Gating der CD41+ positiven Zellen im Pacific Blue-SSC-Diagramm.

Mittels der Pacific Blue wurden spezifisch die CD41-positiven Thrombozyten im letzten Schritt von anderen Zellpopulation getrennt erfasst (C). Da wir die für die

Berechnung der absoluten Thrombozytenzahl notwendige manuelle Zählung der Thrombozyten nicht vorweisen konnten, wurde die Annäherung an die absolute Thrombozytenzahl durch Multiplikation der absoluten Zellzahl der jeweiligen Probe mit dem prozentualen Anteil der drei gezeigten Gates berechnet.

Neben der Analyse der Thrombozyten, wurde bei den Blutproben des dritten Antikörpermixes nach den Komplexen aus aktivierten Neutrophilen und Thrombozyten (PNC) gated. Dabei wurde analog zur durchflusszytometrischen Analyse von Nagasawa et al. (2013) zunächst in der Darstellung des PerCP/Cy5.5.-SSC-Diagramms die grobe CD45+ Neutrophilen-Population aus der Gesamtpopulation ausgewählt (Abbildung 11: A). Um spezifisch die PNCs zu erfassen, wurde anschließend nach CD41-positiven Zellen in der Neutrophilen-Subpopulation im Pacific Blue-SSC-Diagramm gated (B).

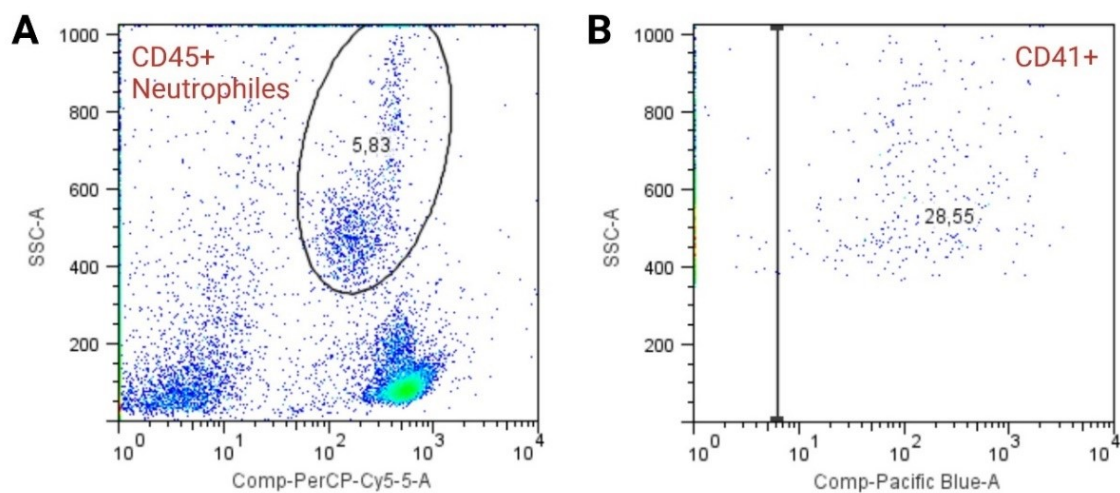


Abbildung 11: FACS-PNC-Gating einer Blutprobe

A) Gating der CD45+ positiven Neutrophilen-Population im PerCP-SSC-Diagramm. B) Gating der CD41+ positiven Neutrophilen im Pacific Blue-SSC-Diagramm.

Zur Analyse der Endothelzellen wurden diese im vierten und fünften Antikörpermix, mittels spezifischer CD31-Bindung identifiziert. Analog zum groben Zellauswahlverfahren der Leukozyten-Population in Kapitel 2.3.4. wurde innerhalb der Gesamtpopulation nach Zellen mit spezifischer Granularität und Größe selektiert (Abbildung 12: A). Durch die darauffolgende Differenzierung in Zombie Violet-negative Zellen wurden tote Zellpopulationen aus der Analyse ausgeschlossen (B). Das abschließende Kreuzgate ermöglichte die Identifikation CD45-negativer und CD31-positiver Endothelzellen (C).

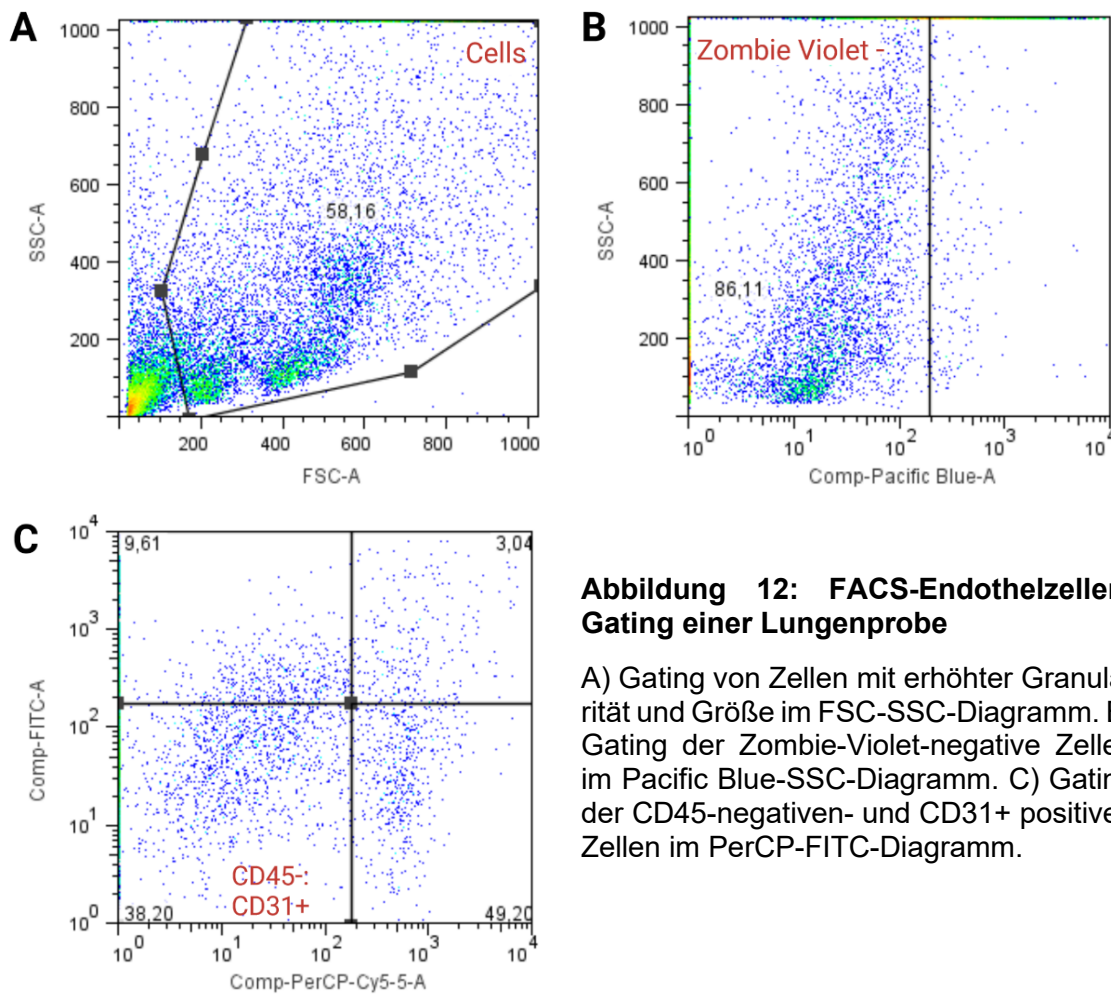


Abbildung 12: FACS-Endothelzellen-Gating einer Lungenprobe

A) Gating von Zellen mit erhöhter Granularität und Größe im FSC-SSC-Diagramm. B) Gating der Zombie-Violet-negative Zellen im Pacific Blue-SSC-Diagramm. C) Gating der CD45-negativen- und CD31+ positiven Zellen im PerCP-FITC-Diagramm.

2.4. Immunhistochemie

2.4.1. Vorbehandlung und Probengewinnung

Analog zur Vorbehandlung in Kapitel 2.2.2., wurde den Tieren ADAM-Proteasen-Inhibitoren verabreicht und eine LPS-Inhalation durchgeführt. 24 Stunden nach Inhalationsbeginn, wurden die Proben zur immunhistochemischen Untersuchung der Lungen gewonnen.

Die Sedierung und das operative Vorgehen für die Eröffnung des Thorax erfolgte analog des *in vivo* Transmigrationsversuchs (siehe Kapitel 2.2.3). Vor der Probenentnahme wurde die V. cava caudalis durchtrennt und der Kreislauf mit 3 ml PBS⁻ über den rechten Ventrikel gespült, was zur Ausblutung und Tötung der Tiere führte. Nach erfolgter Intubation (analog zur Entnahme von BAL in Kapitel 2.2.3) wurden die Lungen über den Tubus für zehn Minuten mit Formalin durchspült und anschließend entnommen. Die Lungenflügel wurden getrennt

voneinander in Einbettkassetten überführt. Zur Gewebefixierung wurden die Kassetten über Nacht in 4%igem Formalin inkubiert.

2.4.2. Histologische Aufbereitung

Für die histologische Untersuchung von Gewebeproben durchlaufen diese generell die Schritte der Fixierung, der Einbettung, sowie dem Erstellen von Schnitten und der Färbung (Lüllmann-Rauch and Asan, 2015). Wie in Kapitel 2.4.1. beschrieben, wurden die Proben durch Einlegen in Formalin bereits am Vortag fixiert. Vor dem Einbetten wurden die Kassetten für 18 Stunden in einem Einbettkarussell durch eine aufsteigende Ethanolreihe (50-100%) entwässert. Anschließend wurden die Ethanolreste mittels des Intermediums Xylol verdrängt und das Gewebe im Gewebeblock durch Paraffin infiltriert. Die Konsistenz des ausgehärteten Paraffinblocks ermöglichte mithilfe eines Rotationsmikrotoms die Anfertigung 3 µm dicker Schnitte. Nach dem Überführen auf Objektträger (OT) wurden diese für mehrere Stunden auf einer Wärmeplatte getrocknet.

2.4.3. Immunhistochemische Färbung neutrophiler Granulozyten

Für die immunhistochemische PMN-Färbung wurden die OT zunächst entparaffiniert und rehydriert. Hierzu wurden die Schnitte dreimal jeweils 7 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in Xylol inkubiert, gefolgt von einer Rehydrierung in absteigenden Ethanollösungen: zweimal für jeweils 5 Minuten in 100% Ethanol, zweimal für jeweils 5 Minuten in 95% Ethanol und einmal für 5 Minuten in 50% Ethanol. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in Aqua dest. gespült.

Zur Blockade der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte mit 200 µl Methanol und 3 µl 30%igem Wasserstoffperoxid (H_2O_2) bedeckt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Spülung mit Aqua dest. bei RT. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte vollständig mit Antigen Unmasking Solution bedeckt und in der Mikrowelle bei 600 Watt für 10 Minuten erhitzt. Danach kühlten sie 60 Minuten bei RT in derselben Lösung ab. Anschließend wurden die OT mit einem Pap Pen (lipophiler Fettstift) umrandet, die markierte Fläche mit ca. 200 µl PBS⁻ gefüllt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Dieses Volumen diente als Referenz für alle folgenden Reagenzien.

Zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen erfolgte eine 60-minütige Inkubation in einer Avidin-Blocking-Lösung. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in PBS⁻ bei RT gespült. Der Primärantikörper Anti-Ly-6G (Rat-anti-Mouse) wurde in einer Biotin-Blocking-Lösung verdünnt, bestehend aus 1 ml 1 % BSA in PBS⁻, 100 µl Normalserum (Rabbit), vier Tropfen Biotin-Blocking-Solution und 2 µl Primärantikörper. Die Lösung wurde gründlich gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Für die Positivkontrolle wurde die Lösung mit 1 µl Normal-IgG Normal Rat IgG statt des spezifischen Antikörpers versetzt. Die Negativkontrolle wurde ohne Antikörperzusatz inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der überschüssige Primärantikörper abgegossen. Nach einer fünfminütigen Spülung in 1 % BSA in PBS⁻ erfolgte eine 60-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper Rabbit-anti-Rat IgG (1:100 verdünnt in 1 ml 1 % BSA in PBS⁻, 100 µl Normalserum (Rabbit) und 10 µl Sekundärantikörper), lichtgeschützt bei RT.

Nach einer fünfminütigen Spülung in PBS⁻ wurde die ABC-Lösung auf dem VECTASTAIN® Elite ABC Kit (HRP) aufgetragen (1 ml PBS⁻ + 20 µl Solution A + 20 µl Solution B, mindestens 30 Minuten vor Anwendung unter kontinuierlichem Überkopf-Wippen aktiviert). Die Inkubation erfolgte 30 Minuten lichtgeschützt bei RT. Eine kleine Menge (~100 µl) wurde zur Funktionskontrolle separat aufbewahrt.

Nach der Spülung wurde das DAB-Substrat (3,3'-Diaminobenzidin) aus dem entsprechenden Kit angesetzt (5 ml Aqua dest., 2 Tropfen Pufferlösung, 4 Tropfen DAP-Lösung, 2 Tropfen H₂O₂). Vorab wurde ein Funktionstest mit ca. 100 µl der aktivierten ABC-Lösung durchgeführt: Eine sofortige Braunfärbung zeigte die Reaktionsfähigkeit an. Falls erforderlich, wurden weitere 5 µl H₂O₂ zugegeben.

Die DAB-Lösung wurde anschließend für 4 Minuten bei RT auf die Schnitte aufgetragen, gefolgt von einer fünfminütigen Spülung in PBS⁻. Durch die Oxidation des DAB-Substrats mittels der an Biotin gebundenen Meerrettich-Peroxidase (HRP) entsteht ein bräunlicher Farbstoff, der die PMNs spezifisch markiert (Abbildung 13).

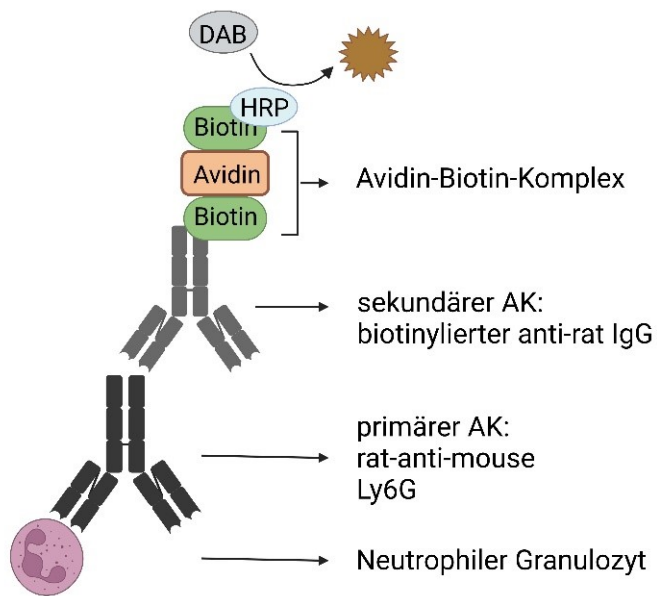


Abbildung 13: immunhistochemische PMN-Färbung

Skizzierte Darstellung des Enzym-Antikörper-Komplexes der immunhistochemischen Färbung von neutrophilen Granulozyten. Eigene Darstellung. (DAB = 3,3'-Diaminobenzidin, HRP = Meerrettich-Peroxidase (engl. *horseradish-peroxidase*), AK = Antikörper)

Vor der Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte eine Spülung: 5 Minuten in Aqua dest. bei RT, gefolgt von dreimal jeweils 5 Minuten in PBS⁻ bei RT. Die Gegenfärbung erfolgte durch eine 3-sekündige Inkubation in 1:1 verdünntem, filtriertem Mayers Hämalaun. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten in fließendem Wasser gebläut. Zur Dehydrierung wurden die OT durch aufsteigende Ethanole (50-100%) und anschließend in Xylol überführt und danach mit Eukitt eingebettet.

Nach 24-stündiger Trocknung wurden die Präparate mit dem Inversmikroskop (Axiovision SE64 REL 4.9) analysiert. Die Bestimmung der Septendicke erfolgte mittels ImageJ (Version 1.53k).

2.5. Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung diente der Untersuchung der Expression von Occludin, Zonula occludens (kurz: ZO-1), ICAM-1 und JAM-A am Lungenepithel bzw. -endothel. Aufgrund der begrenzten Anzahl von Lasern, wurden in einer

Färbung jeweils zwei Adhäsionsmoleküle parallel gefärbt, sodass vier Färbungen notwendig waren. Hierfür wurden die Paraffinschnitte aus Kapitel 3.2.2 verwendet. Die Entparaffinierung und Demaskierung der OT erfolgte analog zur immunhistochemischen Färbung in Kapitel 3.2.3.

Nach der einstündigen Abkühlung der Proben wurden diese für zehn Minuten in einer 4%igen, phosphatgepufferten Formaldehyd-Lösung fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellwände für intrazelluläre Färbungen wurden die Proben anschließend für weitere fünf Minuten in Triton® X-100 0,1% in PBS⁻ inkubiert. Das Blocken unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch das Auftragen einer 5%igen BSA-Lösung für eine Stunde. Anschließend wurden die ersten primären Antikörper für zwölf Stunden bei 4°C inkubiert. Die, je nach Färbung, verwendeten Antikörper können in Tabelle 8 nachvollzogen werden. Am nächsten Tag wurde die Färbung mit dem Auftragen des ersten sekundären Antikörpers und dessen einstündige Inkubation fortgesetzt (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Erster Primärer- und Sekundärer Antikörper der Immunfluoreszenzfärbung

Färbung Nr.	1. Primärer-AK (Host)	1. Sekundärer-AK (Färbung)
1 und 2	Occludin (mouse)	goat-anti-mouse (Alexa 594)
	ZO-1 (rabbit)	goat-anti-rabbit (Alexa 488)
3 und 4	ICAM-1 (goat)	donkey-anti-goat, (Alexa 594)
	JAM-A (mouse)	donkey-anti-mouse (Alexa 488)

Analog zu dieser Vorgehensweise wurde nochmals mit 5%igem BSA geblockt und nacheinander die zweiten primären und sekundären Antikörper für jeweils eine Stunde lichtgeschützt inkubiert (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Zweiter Primärer- und Sekundärer Antikörper der Immunfluoreszenzfärbung

Färbung Nr.	2. Primärer AK (Host)	2. Sekundärer AK (Färbung)
1	vWF (sheep)	donkey-anti-sheep (Alexa 647)
2	Cytokeratin (mouse)	Rabbit-anti-mouse (Alexa 633)
3	vWF (rabbit)	Goat-anti-rabbit (Alexa 647)
4	Cytokeratin (mouse)	Rabbit-anti-mouse (Alexa 633)

Vor der Eindeckung wurden die Zellkerne mit DAPI A 405 für fünf Minuten angefärbt. Die Schnitte konnten über Nacht bei 4°C ausgehärtet und am nächsten Tag unter dem konfokalen Lasermikroskop Stellaris 8 von Leica analysiert werden. Die Intensitätsbestimmung wurde mithilfe des Bildbearbeitungsprogramm „ImageJ 1.53k“ durchgeführt.

2.6. *In vivo* Ventilationsversuch steriler pulmonaler Inflammation

2.6.1. Ventilation

Ziel des Versuchs war die Untersuchung histologischer Veränderungen im Rahmen einer ventilationsassoziierten, sterilen Lungenschädigung (VILI). Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, erhielten die Versuchstiere eine Stunde vor Versuchsbeginn die jeweiligen ADAM-Protease-Inhibitoren.

Vor Versuchsbeginn wurden die Beatmungsgeräte und Wärmeplatten (37°C) eingeschaltet. Die Narkose erfolgte intraperitoneal entsprechend Kapitel 2.2.3 und Tabelle 3.

Nach Erreichen der chirurgischen Toleranz wurden die Tiere in Rückenlage auf der Wärmeplatte positioniert. Das Fell im Halsbereich wurde mit Paraffinöl benetzt, anschließend erfolgte eine minimale Inzision zur Trachealfreilegung unter Schonung von Gewebe und Flüssigkeitshaushalt. Nach der Intubation mittels Tracheotomie und Kanülierung, erfolgte der Anschluss an das Beatmungsgerät mit folgenden Parametern: ein PEEP von 2 bzw. 4 cmH₂O (geräteabhängig), ein inspiratorisches Druckniveau von 15 cmH₂O (Normaldruck) bzw. 45 cmH₂O (Überdruck) sowie eine konstante Atemfrequenz von 85 Atemzügen pro Minute.

Die Beatmung erfolgte über sechs Stunden bei konstanter Narkosetiefe sowie kontinuierlicher Flüssigkeits- und Wärmezufuhr. Jeweils zwei Tiere wurden dem Normaldruck- (15 mBar) bzw. Überdruckprotokoll (45 mBar) zugeordnet.

2.6.2. Probenentnahme

Nach der sechstündigen Beatmung und Sedierung wurden die Beatmungsschläuche entfernt. Es folgte die abdominale Abpräparation bis zur V. cava caudalis, die Eröffnung der Bauchvene und des Diaphragmas sowie die Öffnung des

Thorax. Über den rechten Ventrikel wurde 3 ml PBS⁻ injiziert, um das Herzkreislaufsystem zu spülen und den Tod des Tieres herbeizuführen.

Die Organentnahme und Probenverarbeitung erfolgte wie in Kapitel 2.4.1 beschrieben. Histologische Schnitte und immunhistochemische Färbungen wurden gemäß Kapitel 2.4.3 und 2.4.4 durchgeführt.

2.7. ELISA

Zur Quantifizierung von Zytokinen in der BAL wurden sogenannte Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) durchgeführt. Hierfür wurde der zuvor bei -80 °C eingefrorene Überstand der im *in vivo* Transmigrationsversuch gewonnenen BAL-Proben (siehe Kapitel 2.2.4) verwendet. Die spezifischen Antikörper-Kits zur Detektion von TNF- α , IL-6, CXCL1/KC und CXCL2/MIP-2 stammten von R&D Systems (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: ELISA Antikörper

Antikörper	Firma
Mouse TNF- α	R&D Systems
Mouse IL6	R&D Systems
Mouse CXCL1/KC	R&D Systems
Mouse CXCL2/MIP-2	R&D Systems

Zu Beginn wurden 96-Well-Platten mit jeweils 100 μ l des entsprechenden Capture-Antikörpers befüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dieser Antikörper band über sein Fc-Fragment an die Oberfläche der Wells. Zwischen allen weiteren Inkubationsschritten wurden die Wells jeweils dreimal mit 300 μ l Waschpuffer (0,05 % Tween-20 in PBS⁻) gewaschen. Am nächsten Tag erfolgte die Blockierung freier Bindungsstellen durch Inkubation mit je 150 μ l Reagent Diluent (1 % BSA in PBS⁻) für eine Stunde bei RT.

Währenddessen wurde eine Standardreihe mithilfe des jeweiligen rekombinanten Maus-Zytokinstandards angelegt. Anschließend wurden jeweils 100 μ l der BAL-Proben oder Standards in die vorbereiteten Wells pipettiert und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Danach wurde jeweils 100 μ l eines biotinylierten Detektionsantikörpers zugegeben und ebenfalls für zwei Stunden inkubiert.

Anschließend erfolgte die lichtgeschützte Zugabe von Streptavidin-konjugierter Meerrettich-Peroxidase (HRP) für 20 Minuten. Nach erneutem Waschen wurde zur Farbreaktion ein 1:1-Gemisch aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid (je 100 µl pro Well) auf die Platte pipettiert und für weitere 20 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Die enzymatische Umsetzung des Substrats führte zur Ausbildung einer türkisen Farbreaktion. Vor der Messung wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 2N Schwefelsäure gestoppt, wodurch sich die Lösung gelb verfärbte.

Die optische Dichte wurde mithilfe eines Mikroplattenlesegeräts (TECAN Infinite M200 Pro) bei einer Wellenlänge von 450 nm mit Referenzmessung bei 540 nm ausgelesen. Die Auswertung der Zytokinkonzentrationen erfolgte anhand der Standardkurven über Regressionsanalysen in GraphPad Prism 9.

Die schematische Darstellung des zugrunde liegenden Antikörper-Antigen-Enzym-Komplexes ist in Abbildung 14A dargestellt. Der grundlegende Aufbau eines Antikörpers mit zwei schweren (blau) und zwei leichten (grün) Ketten, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, ist in Abbildung 14B illustriert.

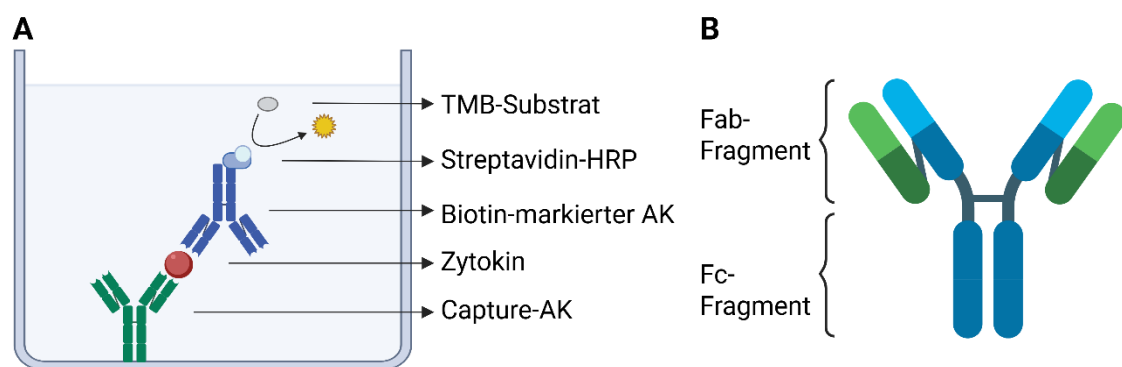
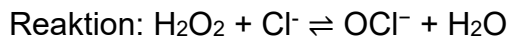


Abbildung 14: Sandwich-ELISA

A Skizzierte Darstellung des Antikörper-Antigen-Enzym-Komplex eines Sandwich-ELISA für die Detektion von Zytokinen. **B** Skizzierte Darstellung des Antikörper-Aufbaus. Bestehend aus jeweils zwei schweren (blau) und leichten (grün) Ketten, welche durch Disulfidbrücken verbunden sind. Eigene Darstellung. (TMB = Tetramethylbenzidin; HRP = Meerrettich-Peroxidase; AK = Antikörper, Fc-Fragment = engl. crystallisable fragment, Fab-Fragment = Fragment-antigen-binding-Fragment).

2.8. MPO: Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Häm-Protein und Enzym, welches charakteristisch innerhalb des Phagosomlumens von PMNs zu finden ist. Ihre Aufgabe ist die Katalyse der Bildung von Hypochlorit-Ionen aus Wasserstoffperoxid in folgendem Reaktionsablauf:



Die dabei entstandene reaktive Sauerstoffspezies (engl.: *reaktive oxygen species*, kurz: ROS) wirkt bei der Bekämpfung von Bakterien mikrobizid (Peter C. et al., 2014).

Der Nachweis von MPO-Aktivität aus den Überständen der BAL nach vier bzw. 24 Stunden LPS-Inhalation dient daher dem indirekten Nachweis von aktiven PMNs. Durch die Zugabe von ABTS (2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)) und Wasserstoffperoxid, gelöst in Citratpuffer und Aqua dest, kann auf den Anteil an aktiven PMNs geschlossen werden. Für den Nachweis wurden zu jeweils 50 µl Probe und Citratpuffer 100 µl ABTS pro Well pipettiert und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss konnte die Farbreaktion mittels eines TECAN Microplate Readers (Infinite M200 Pro), bei 405 nm photometrisch gemessen werden. Die Ergebnisse wurden mithilfe von GraphPad Prism 9 statistisch ausgewertet.

2.9. BCA: Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der BAL-Überständen, wurde auf das Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit von Thermo Scientific zurückgegriffen. Durch die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ durch Proteine in einer basischen Umgebung, können diese Kupferkationen mit BCA einen Komplex bilden, welcher durch seine violette Farbe photometrisch bei 562 nm nachgewiesen werden kann (Scientific, 2020).

Für die photometrische Messung wurden jeweils 25 µl einer Probe mit 200 µl BCA für 30 Minuten bei 27°C inkubiert und anschließend mit dem TECAN Microplate Reader (Infinite M200 Pro) bei 562 nm gemessen. Die Ergebnisse wurden mithilfe von GraphPad Prism 9 statistisch ausgewertet.

2.10. Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mithilfe der Software Graph Pad Prism 9 durchgeführt, auf Normalverteilung überprüft und Ausreißer mit Hilfe des Programmes objektiv aus der Analyse entfernt. Bei Gruppen mit Normalverteilung wurden unifaktorielle Varianzanalysen (engl.: *one-way Analysis of Variance* (ANOVA)) und der Bonferroni post Test zum Vergleich mehrerer Populationen verwendet. Bei nicht-normalverteilten Werten wurde der Kruskal-Wallis-Test herangezogen. Der Berechnung der P-Werte wurde ein Konfidenzintervall von 95% vorausgesetzt. In folgender Tabelle finden Sie die Nomenklatur der durch Asteriske gekennzeichneten Signifikanzen.

Tabelle 11: Legende der Asteriske

Symbol	P-Werte
*	$P \leq 0,05$
**	$P \leq 0,01$
***	$P \leq 0,001$
****	$P \leq 0,0001$

Für die graphische Darstellung der Messwerte in den Diagrammen wurden Mittelwert $\pm$ Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

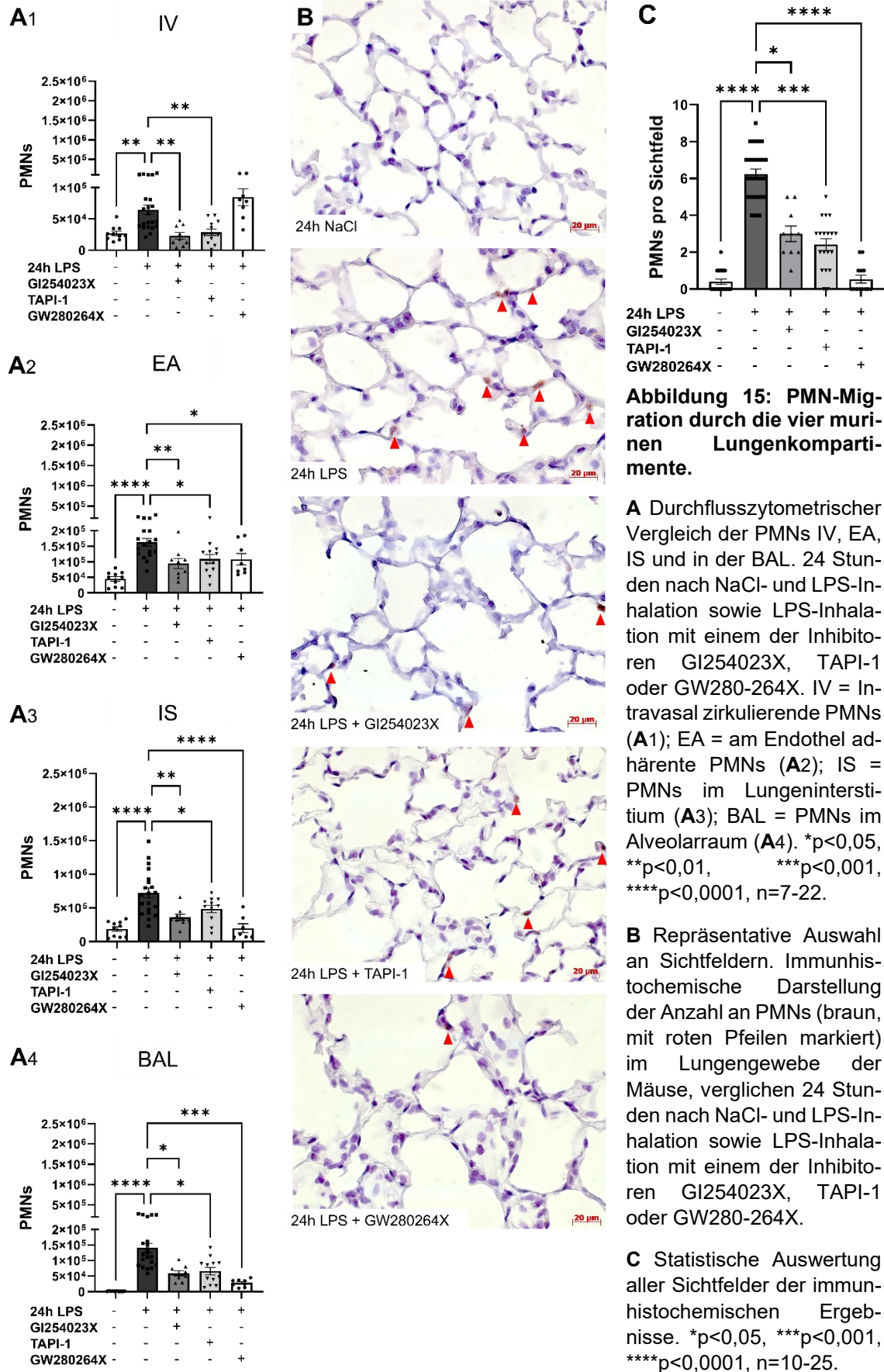
3. Ergebnisse

3.1. Pharmakologische Hemmung von ADAM10 und ADAM17 reduziert die pulmonale PMN-Migration

Die Rekrutierung von PMNs stellt einen wesentlichen Schritt in der akuten Inflammation dar und wurde in dieser Studie im Kontext einer LPS-induzierten pulmonalen Entzündung untersucht. Hierzu wurde die Anzahl der PMNs in vier definierten Kompartimenten - intravasal (IV), am Endothel adhären (EA), im Lungeninterstitium (IS) sowie in der bronchoalveolären Lavage (BAL) - 24 Stunden nach LPS-Inhalation quantifiziert. PMNs, die nach intravasaler Spülung weiterhin in der Lunge detektiert wurden, wurden dabei als am pulmonalen Gefäßendothel adhären (EA) klassifiziert. Diese Zellen befinden sich im Übergangsstadium zwischen Zirkulation und Gewebemigration und spiegeln einen frühen Schritt der Transmigration wider.

In Abbildung 15 A1-4 wurde die PMN-Akkumulation in den genannten Kompartimenten unter Verwendung von LPS-Inhalation und zusätzlicher Inhibitor-Injektion verglichen. Nach LPS-Induktion war ein signifikanter Anstieg der PMN-Zahlen in allen Kompartimenten zu beobachten. In den Gruppen, die mit den spezifischen ADAM10- oder ADAM17-Inhibitoren behandelt wurden, war eine signifikante Reduktion der PMN-Zahl im Vergleich zur LPS- Gruppe zu verzeichnen. Die kombinierte Hemmung beider ADAMs zeigte einen additiven negativen Einfluss auf den PMN-Einstrom im Lungeninterstitium und im Alveolarraum. Die Zahl der intravasal zirkulierenden PMNs wurde durch die kombinierte Hemmung jedoch nicht beeinflusst.

Die histologischen Ergebnisse in Abbildung 15 B bestätigten eine reduzierte PMN-Migration nach ADAM10- oder ADAM17-Inhibition. Die PMNs im Lungengewebe erscheinen nach Färbung braun (siehe rote Pfeile). Abbildung 15 C zeigt die statistische Auswertung der PMN-Akkumulation basierend auf durchschnittlich 17 Sichtfeldern pro Gruppe. Es wurde eine signifikante Zunahme der PMN-Akkumulation 24 Stunden nach LPS-Inhalation festgestellt. Eine signifikante Reduktion der PMN-Zahl war in allen Gruppen mit ADAM-Inhibition zu verzeichnen, wobei die kombinierte Hemmung den stärksten Effekt zeigte.



3.1.1. Einfluss der ADAM-Inhibitionen auf die Thrombozyten-Neutrophilen-Interaktion während der PMN-Migration

Während der PMN-Migration wurden zirkulierende Zellkomplexe aus PMNs und Thrombozyten (PNC) beobachtet. Um den Einfluss der ADAM10- und ADAM17-Hemmung auf diese Interaktion zu analysieren, wurden die Thrombozytenzahlen in den Blutgefäßen, im Lungengewebe und in der BAL bestimmt (Abbildung 16 A-C). Zusätzlich wurde die Anzahl intravasal zirkulierender PNCs quantifiziert (Abbildung 17).

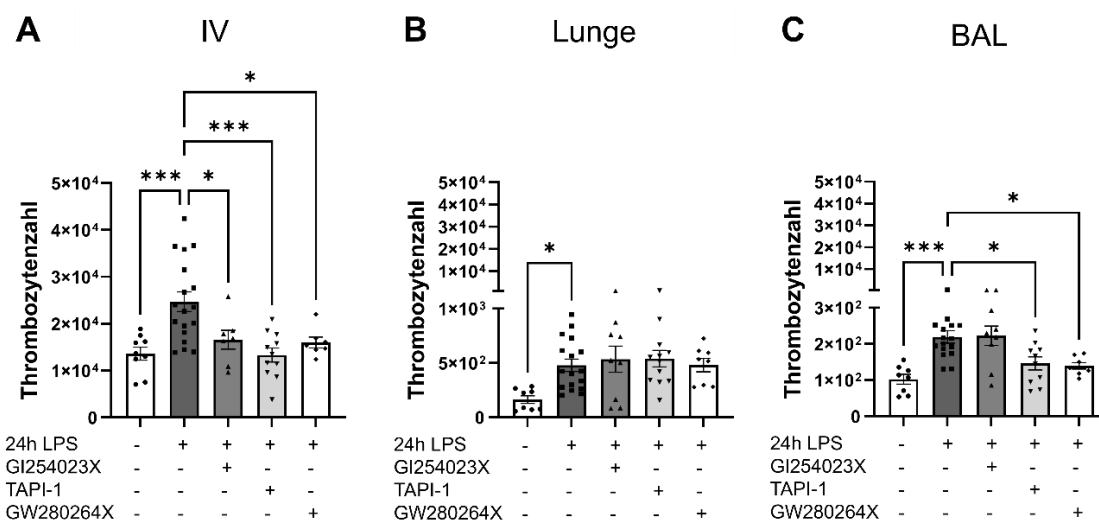


Abbildung 16: Thrombozyten-Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Thrombozytenzahl in den vier Kompartimenten im Vergleich. 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. IV = Intravasal zirkulierende Thrombozyten (A); Lunge = Thrombozyten im Lungeninterstitium (B); BAL = Thrombozyten im Alveolarraum (C). *p<0,05, ***p<0,001, n=7-18.

Nach LPS-Inhalation wurde intravasal eine signifikante Erhöhung der Thrombozytenzahl festgestellt. Bei vorheriger Hemmung der ADAM-Proteasen reduzierte sich die Anzahl in allen Gruppen im Blut signifikant (A). Im Lungeninterstitium wurde eine signifikante Erhöhung nur durch reine LPS-Stimulation nachgewiesen (B). In der BAL war die Thrombozytenzahl ebenfalls durch LPS-Inhalation erhöht. Die Hemmung der ADAM-Proteasen führte dort zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenzahl, besonders durch die Inhibition von ADAM17 und kombinierte Inhibition beider Proteasen. Die Hemmung von ADAM10 hingegen

hatte keinen messbaren Einfluss auf die Thrombozytenzahl (C). Dies lässt vermuten, dass beide ADAM-Proteasen die intravasale Thrombozytenzahl regulieren, wohingegen in der Lunge dies nur noch für ADAM17 zutrifft.

Die LPS-Inhalation führte zu einer signifikanten Erhöhung intravasal aggregierter PNCs. In allen Vergleichsgruppen mit Inhibitor-Injektion war diese Erhöhung signifikant reduziert (Abbildung 17). Dies zeigt, dass die Inhibition der ADAM-Proteasen, die durch LPS induzierte Erhöhung intravasal aggregierter PNCs signifikant vermindert und somit ADAM-Proteasen eine wichtige Rolle bei der Bildung von PNCs spielen.

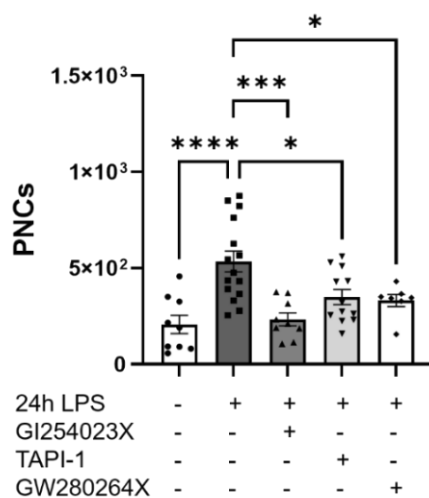


Abbildung 17: Intravasal zirkulierende PNCs im murinen Blut.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Thrombozyten-Neutrophilen-Komplexe (PNC) im murinen Blut, verglichen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. *p<0,05, ***p<0,001, ****p<0,0001, n=7-15.

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Analyse wurde die Expression von PSGL-1 (CD162) und L-Selektin (CD62L) auf der Oberfläche von PMNs sowie von P-Selektin (CD62P) auf Thrombozyten untersucht.

Die CD162-Expression auf der PMN-Oberfläche während ihrer Migration ist in Abbildung 18 dargestellt. Nach LPS-Stimulation nahm die Expression intravasal signifikant ab. Eine vorherige spezifische Inhibition von ADAM10 oder ADAM17 führte im Vergleich zur alleinigen LPS-Stimulation zu einer erhöhten Expression. Die kombinierte Hemmung beider Proteasen bewirkte hingegen keinen zusätzlichen Effekt (A).

Adhärenzte PMNs am Endothel zeigten weder unter LPS-Stimulation noch nach Inhibition der ADAM-Proteasen Veränderungen in der CD162-Expression (B). Im Lungeninterstitium wurde ebenfalls eine Abnahme der Expression nach LPS-

Stimulation festgestellt, die durch gleichzeitige Hemmung von ADAM10 und -17 signifikant aufgehoben wurde. Die Einzelinhibition hatte hingegen keinen Einfluss (C). In BAL-Proben war die CD162-Expression bei PMNs während der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation deutlich reduziert. Eine vorherige Hemmung von ADAM10 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Expression, während die Inhibition von ADAM17 sowie die kombinierte Hemmung beider Proteasen keinen Effekt zeigte (D).

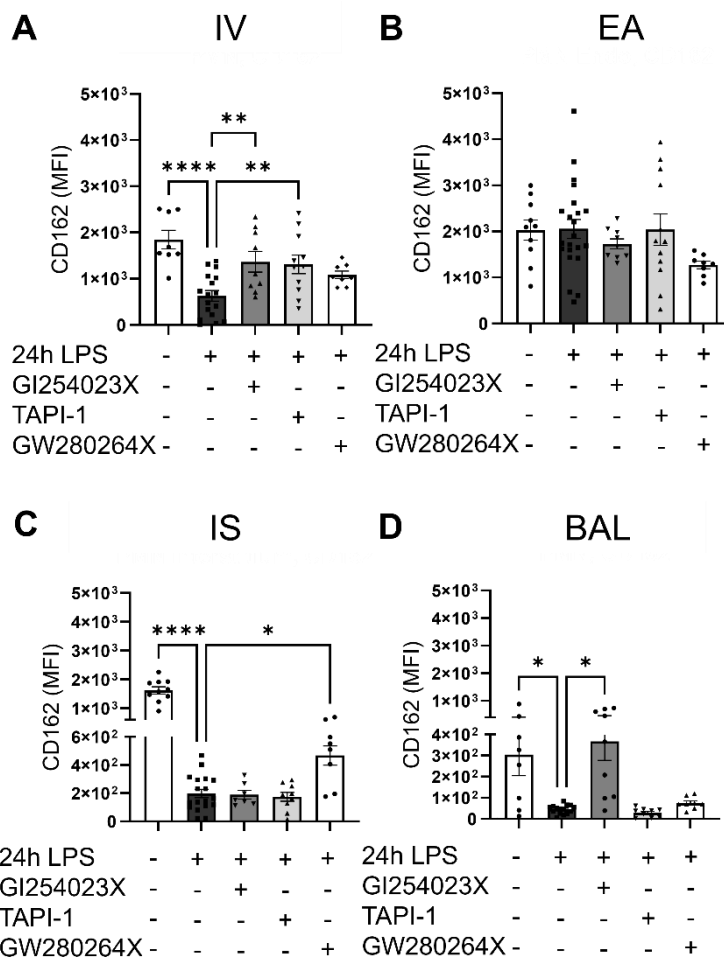


Abbildung 18: CD162-Expression auf PMNs während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD162 auf PMNs während der Migration durch die vier Kompartimente, verglichen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (A); EA = am Endothel adhäre PMNs (B); IS = PMNs im Lungeninterstitium (C); BAL = PMNs im Alveolarraum (D). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, n=8-22.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Proteasen ADAM10 und ADAM17 eine wichtige Rolle bei der LPS-induzierten Reduktion von CD162 in der

Mikrozirkulation und im Lungeninterstitium spielen. In der BAL-Probe wurde dies nur nach Hemmung von ADAM10 beobachtet.

Zusätzlich zur Untersuchung der CD162-Expression auf PMNs wurde diese auch auf Endothelzellen analysiert. Aufgrund des Umfangs dieser medizinischen Doktorarbeit werden die entsprechenden Ergebnisse nicht im Hauptteil behandelt. Weitere Informationen sind in Kapitel 6.1. im Anhang zu finden.

In Abbildung 19 wird der Einfluss der ADAM-Inhibitoren auf die CD62L-Expression auf der PMN-Oberfläche in den vier Kompartimenten während der Migration dargestellt.

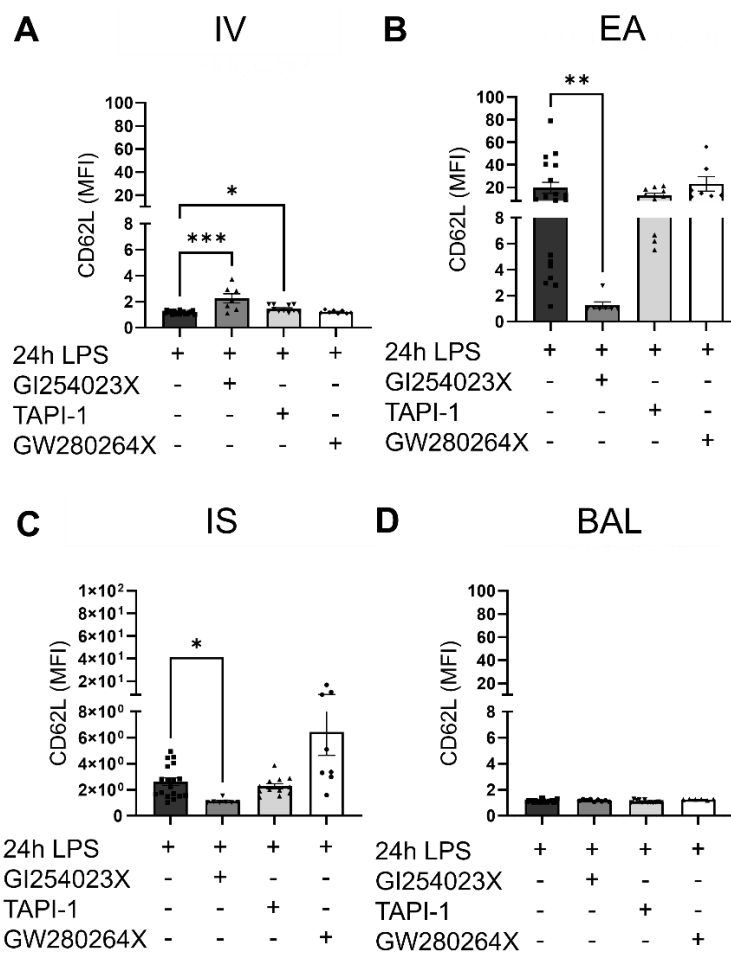


Abbildung 19: CD62L-Expression auf PMNs während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD62L auf PMNs während der Migration durch die vier Kompartimente, verglichen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (A); EA = am Endothel adhäre PMNs (B); IS = PMNs im Lungeninterstitium (C); BAL = PMNs im Alveolarraum (D). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, n=6-21.

Intravasal führte die Inhibition von ADAM10 oder ADAM17 zu einer signifikanten Steigerung der Expression im Vergleich zur alleinigen LPS-Inhalation (A). An Endothel adhären reduzierte sich die CD62L-Expression nach Gabe des ADAM10-42 Inhibitors. Die Hemmung von ADAM17 oder beider Proteasen hatte keinen Einfluss (B).

Dieses Muster zeigte sich auch im Lungeninterstitium (C). In der BAL wurde keine Veränderung der CD62L-Expression festgestellt (D). Nach ADAM10-Inhibition war die CD62L-Expression auf intravasalen PMNs erhöht, während sie im Lungengewebe stark reduziert war, was auf eine Anreicherung CD62L-exprimierender PMNs im Gefäßraum hinweist.

Bei der CD62P-Expression auf der Oberfläche von Thrombozyten ließen sich in den vier Kompartimenten, bis auf eine Expressionssteigerung auf Thrombozyten im Lungengewebe nach vorheriger ADAM17-Inhibition, keine weiteren signifikanten Unterschiede erkennen (Abbildung 20: A-C).

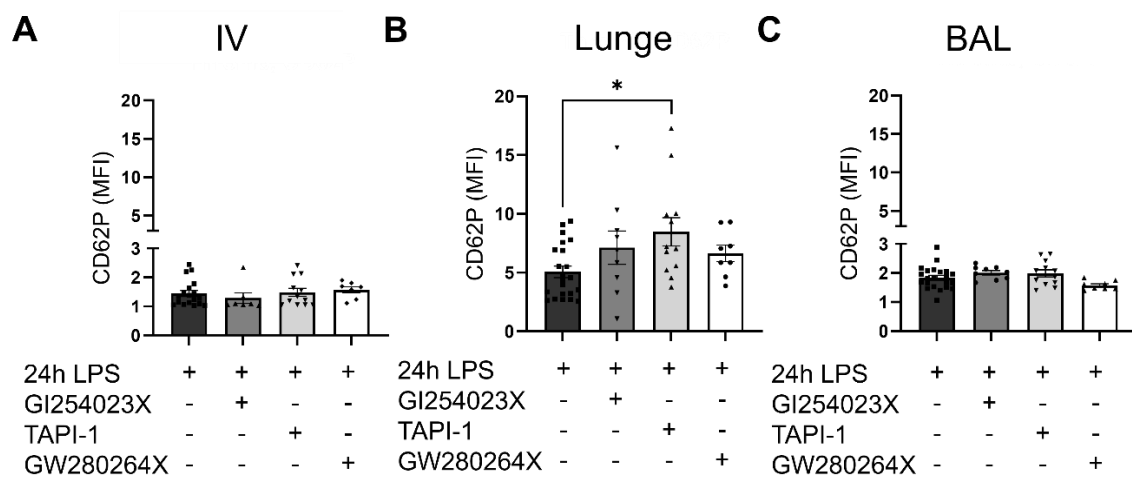


Abbildung 20: CD62P-Expression auf Thrombozyten während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD62P auf Thrombozyten während der Migration durch die vier Kompartimente, verglichen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (**A**); Lunge = PMNs am Gefäßendothel der Lunge anhaftend und im Lungeninterstitium (**B**); BAL = PMNs im Alveolarraum (**C**). * $p < 0,05$, $n = 7-22$.

3.1.2. Einfluss der ADAM-Inhibition auf die Expression relevanter Adhäsionsmoleküle in der Adhäsionskaskade von PMNs

Um die Rolle von ADAM10 und ADAM17 in der Regulation der Integrin- und CAM-Expression, während der PMN-Migration zu untersuchen, wurden Expressionsveränderungen der relevanten Adhäsionsmoleküle unter Bedingungen der Proteasen-Inhibition und LPS-induzierten Inflammation analysiert. Besonderes Augenmerk lag dabei auf den Integrinen LFA-1 und Mac-1 sowie ihren Bindungspartnern ICAM-1 und ICAM-2.

In Abbildung 21 ist die LFA-1-Expression auf PMNs in den vier Lungenkompartimenten dargestellt. Zirkulierende PMNs zeigten nach LPS-Inhalation eine erhöhte LFA-1-Expression, die durch ADAM17-Inhibitorin signifikant abgeschwächt wurde, während die Hemmung von ADAM10 oder beider Proteasen keinen Effekt hatte (A).

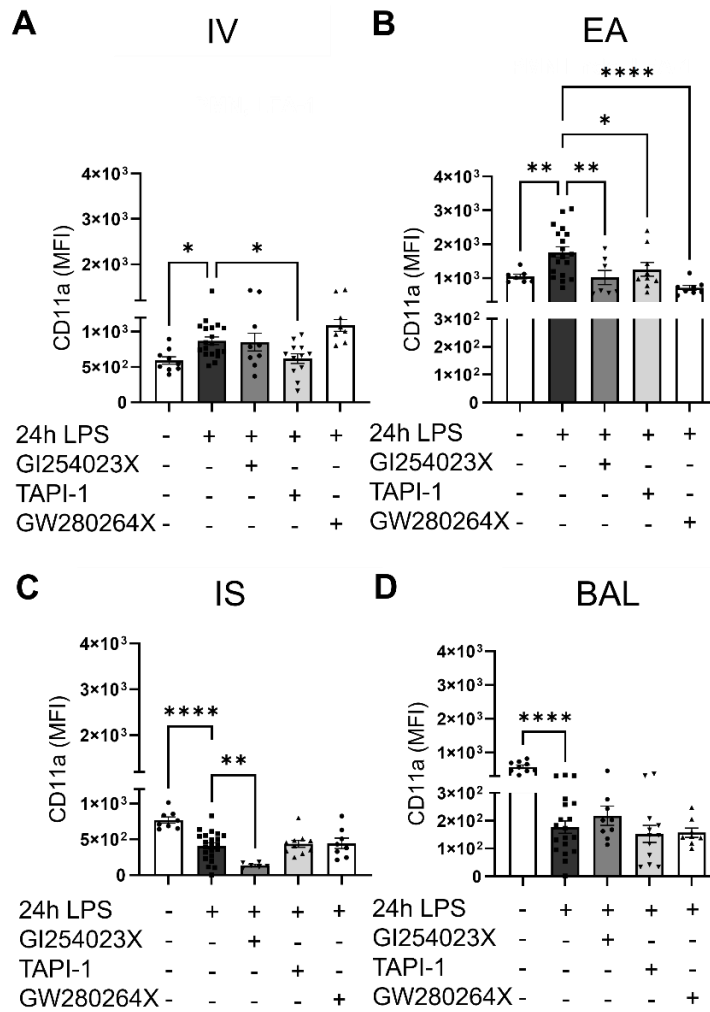


Abbildung 21: LFA-1 -Expression auf PMNs während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von LFA-1 auf PMNs während der Migration durch die vier Kompartimente im Vergleich. 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (A); EA = am Endothel adhären PMNs (B); IS = PMNs im Lungeninterstitium (C); BAL = PMNs im Alveolarraum (D). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, n=7-22.

Auch bei den endotheladhären PMNs war LFA-1 durch LPS erhöht, hier senkten alle Inhibitoren die Expression (B). Im Interstitium war LFA-1 nach LPS reduziert, wobei sich dieser Effekt unter ADAM10-Hemmung noch verstärkte. Die Hemmung von ADAM17 oder beider Proteasen hatte keinen Einfluss (C). In der BAL zeigte sich nach LPS-Stimulation eine verminderte LFA-1-Expression, unbeeinflusst von der Proteaseninhibition 44 (D). Insgesamt moduliert LPS die LFA-1-Expression gewebespezifisch: erhöht intravasal und endothelial, vermindert

interstitiell – mit Inhibitionseffekten, die sich auf die frühen Migrationsschritte beschränken.

Die Mac-1-Expression auf zirkulierenden PMNs war nach LPS-Inhalation erhöht und wurde durch eine ADAM10-Inhibition reduziert. Eine Hemmung von ADAM17 zeigte keinen Effekt, während die kombinierte Inhibition beider Proteasen zu einer verstärkten Mac-1-Expression führte (Abbildung 22: A). Bei am Endothel adhären PMNs wurden keine Veränderungen der Mac-1-Expression festgestellt (B). Im Lungeninterstitium führte die LPS-Inhalation ebenfalls zu einem Anstieg der Expression, der durch die Hemmung von ADAM10 oder die kombinierte Inhibition abgeschwächt wurde. Die ADAM17-Hemmung hatte auch hier keinen Einfluss (C). In der BAL stieg die Mac-1-Expression unter LPS-Stimulation an, bleibt jedoch durch die Inhibition der ADAM-Proteasen unbeeinflusst (D).

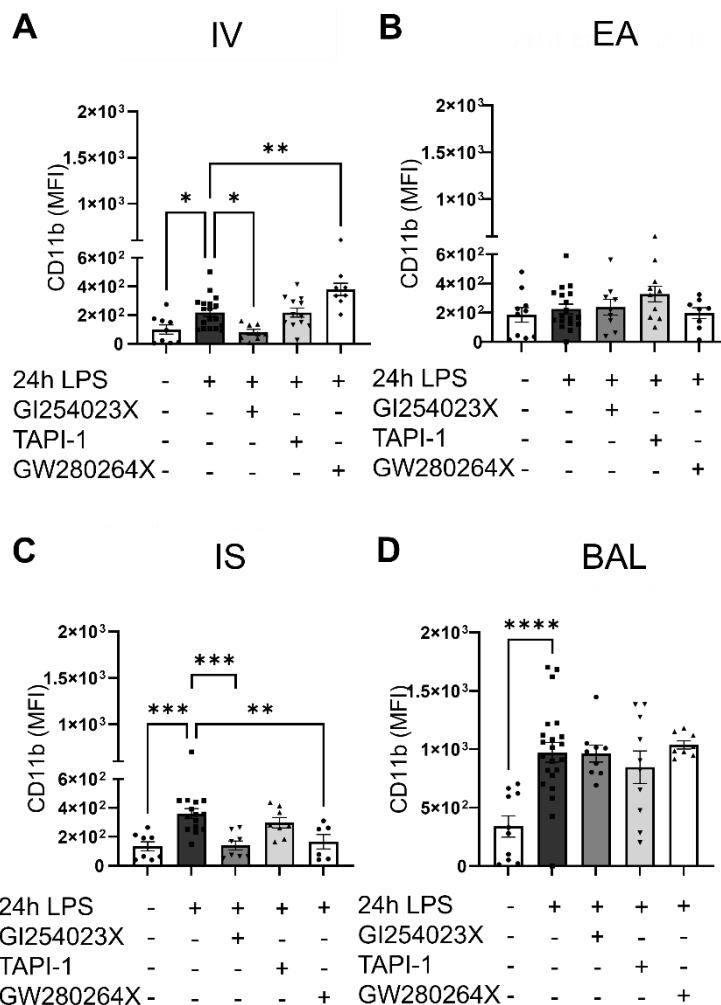


Abbildung 22: CD11b (Mac-1) -Expression auf PMNs während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD11b (Integrin α M) auf PMNs während der Migration durch die vier Kompartimente im Vergleich. 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (A); EA = am Endothel adhären PMNs (B); IS = PMNs im Lungeninterstitium (C); BAL = PMNs im Alveolarraum (D). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n = 6-22$.

Abbildung 23 zeigt die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (CD54) und ICAM-2 (CD102) auf Endothelzellen nach LPS-Inhalation. Beide Moleküle wiesen eine signifikante Expressionssteigerung auf, die durch eine selektive und kombinierte Inhibition beider Proteasen deutlich reduziert wurde (CD54: A, CD102: B). Die Ergebnisse belegen, dass die Hemmung dieser Proteasen mit einer verringerten Expression beider Moleküle auf Endothelzellen einhergeht.

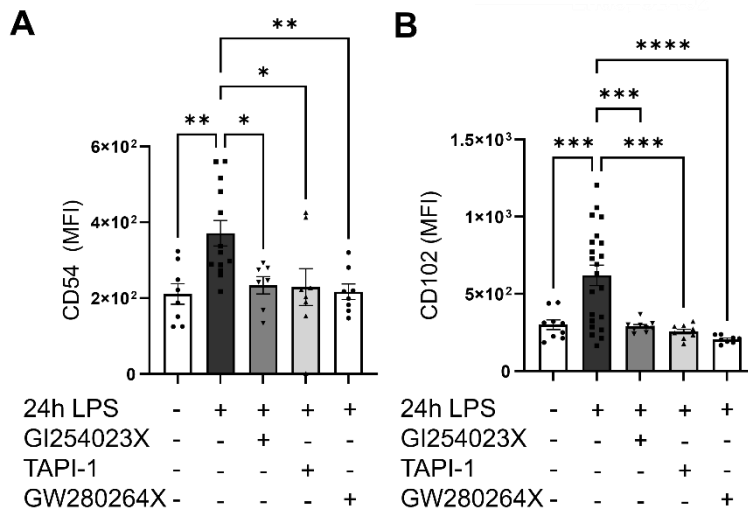


Abbildung 23: CD54 (ICAM-1) und CD102 (ICAM-2) -Expression auf Endothelzellen der murinen Lunge.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD54 (ICAM-1) (**A**) und CD102 (ICAM-2) (**B**) auf murinen Endothelzellen der , verglichen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 7-22$.

CD44 (HCAM) ist ein Zelloberflächenmolekül, dessen Expression auf PMNs in dieser Untersuchung im Rahmen einer LPS-induzierten pulmonalen Inflammation analysiert wurde. Dabei wurde geprüft, ob die pharmakologische Hemmung von ADAM10 und ADAM17 einen Einfluss auf die Oberflächenexpression von CD44 auf PMNs hat.

Abbildung 24 stellt die MFI-Ergebnisse von CD44 auf PMNs in vier Kompartimenten während der TEM nach LPS-Inhalation dar. Zirkulierende PMNs wiesen eine erhöhte CD44-Expression auf, die durch die spezifische und kombinierte Hemmung der Proteasen ADAM10 und 17 signifikant reduziert wurde (A). Bei am Endothel haftenden PMNs führte die ADAM10-Hemmung zu einer weiteren Reduktion der Expression, während die Inhibition von ADAM17 oder beider Proteasen

keine Wirkung zeigte (B). Im Interstitium zeigte sich hingegen keine Veränderung der CD44-Expression auf PMNs (C). In der BAL stieg die CD44-Oberflächenexpression auf PMNs nach LPS-Inhalation an. Die Inhibition von ADAM10- oder beider Proteasen reduzierte die Expression deutlich, während die Inhibition von ADAM17 keinen Effekt zeigte (D)

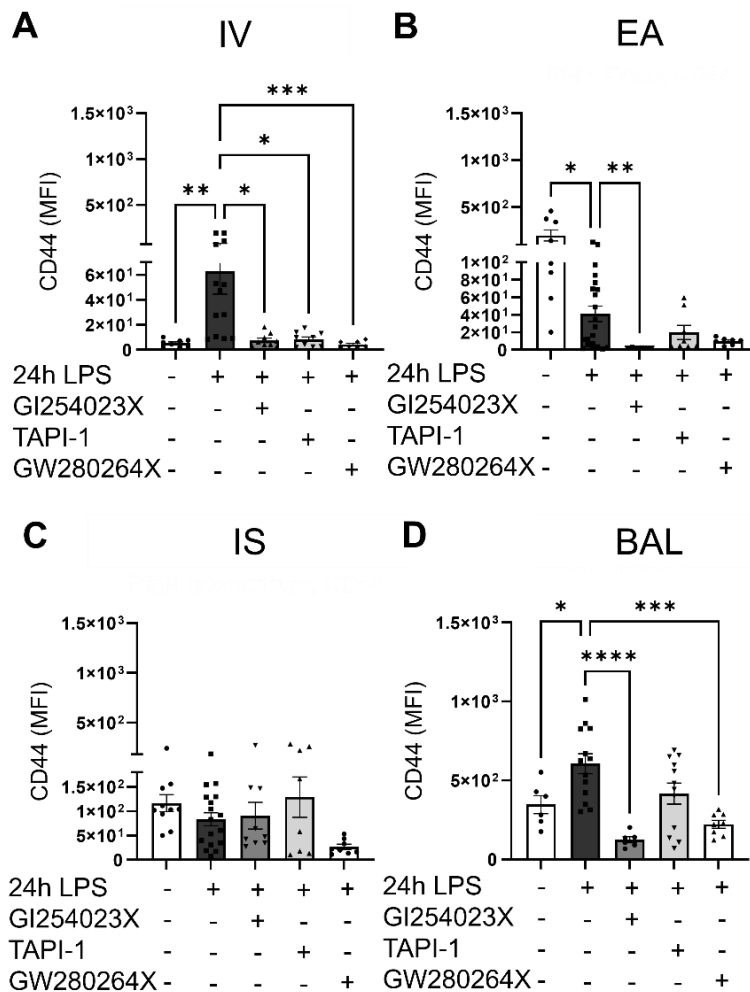


Abbildung 24: CD44 (HCAM)-Expression auf PMNs während der Migration durch die vier murinen Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD44 (HCAM) auf PMNs während der Migration durch die vier Kompartimente im Vergleich. 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (A); EA = am Endothel adhärenente PMNs (B); IS = PMNs im Lungeninterstitium (C); BAL = PMNs im Alveolarraum (D). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n = 6-21$.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die CD44-Expression auf PMNs in der Lunge vorwiegend durch die ADAM10-Hemmung reguliert wird. Bei intravasal zirkulierenden PMNs führte auch die Inhibition von ADAM17 zu einer entsprechenden Reduktion.

3.1.3. MPO-Aktivität als Marker für die Neutrophilenaktivierung

Ein Ansatz zur Untersuchung der PMN-Aktivität in der BAL besteht in der Messung der MPO-Konzentration. Als Indikator für die Aktivität neutrophiler

Granulozyten wurde die MPO-Menge im BAL-Überstand vier (A) und 24 Stunden (B) nach LPS-Inhalation bestimmt und statistisch ausgewertet (Abbildung 25).

Nach vier Stunden wurde ein signifikanter Anstieg der MPO-Freisetzung beobachtet, der durch die Inhibition von ADAM10 signifikant reduziert wurde. Weder die Hemmung von ADAM17 noch die kombinierte Inhibition zeigten zu diesem Zeitpunkt einen Einfluss auf die MPO-Aktivität (A). Nach 24 Stunden war die MPO-Konzentration weiterhin signifikant erhöht. Sowohl die Hemmung von ADAM10 als auch die kombinierte Inhibition führten im Vergleich zur reinen LPS-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion, während die alleinige ADAM17-Inhibition erneut zu keiner Veränderung führte (B). Diese Ergebnisse sprechen für eine erhöhte Anwesenheit und Aktivität von PMNs nach LPS-Inhalation, die durch ADAM10-Hemmung – und nach 24 Stunden auch durch die kombinierte Inhibition – deutlich abgeschwächt wurde.

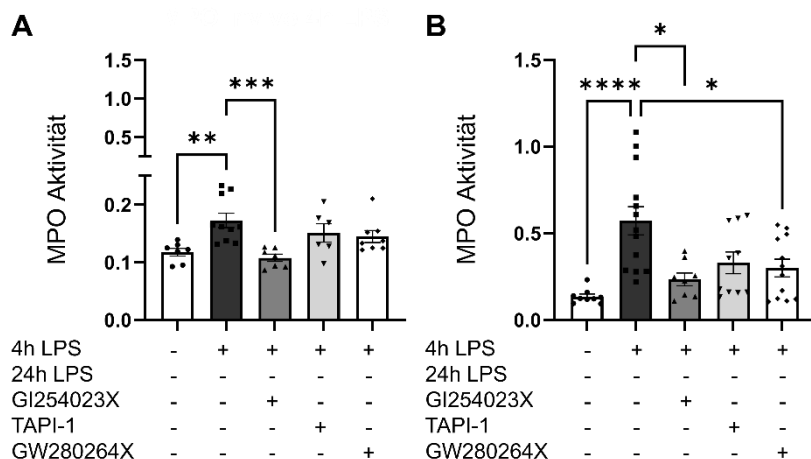


Abbildung 25: Bestimmung der MPO-Aktivität in der BAL muriner Lungen.

MPO-Aktivität in der BAL vergleichend zwischen null, vier (A) bzw. 24 (B) Stunden nach LPS-Inhalation und LPS-Inhalation mit jeweils einem der drei Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 und GW280264X. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n = 7-13$.

3.2. Auswirkung der ADAM10- und ADAM17-Hemmung auf die Lungenbarriere nach LPS-induzierter Entzündung

Im Rahmen der LPS-induzierten pulmonalen Entzündung wurde die strukturelle Integrität der Lungenbarriere untersucht. Hierzu wurden histologische Veränderungen analysiert, einschließlich der Septendicke als potenzieller Hinweis auf Barriereveränderungen. Zusätzlich wurden Adhäsions- und Tight-Junction-Proteine (Occludin, ZO-1, ICAM-1, JAM-A, VE-Cadherin) hinsichtlich ihrer

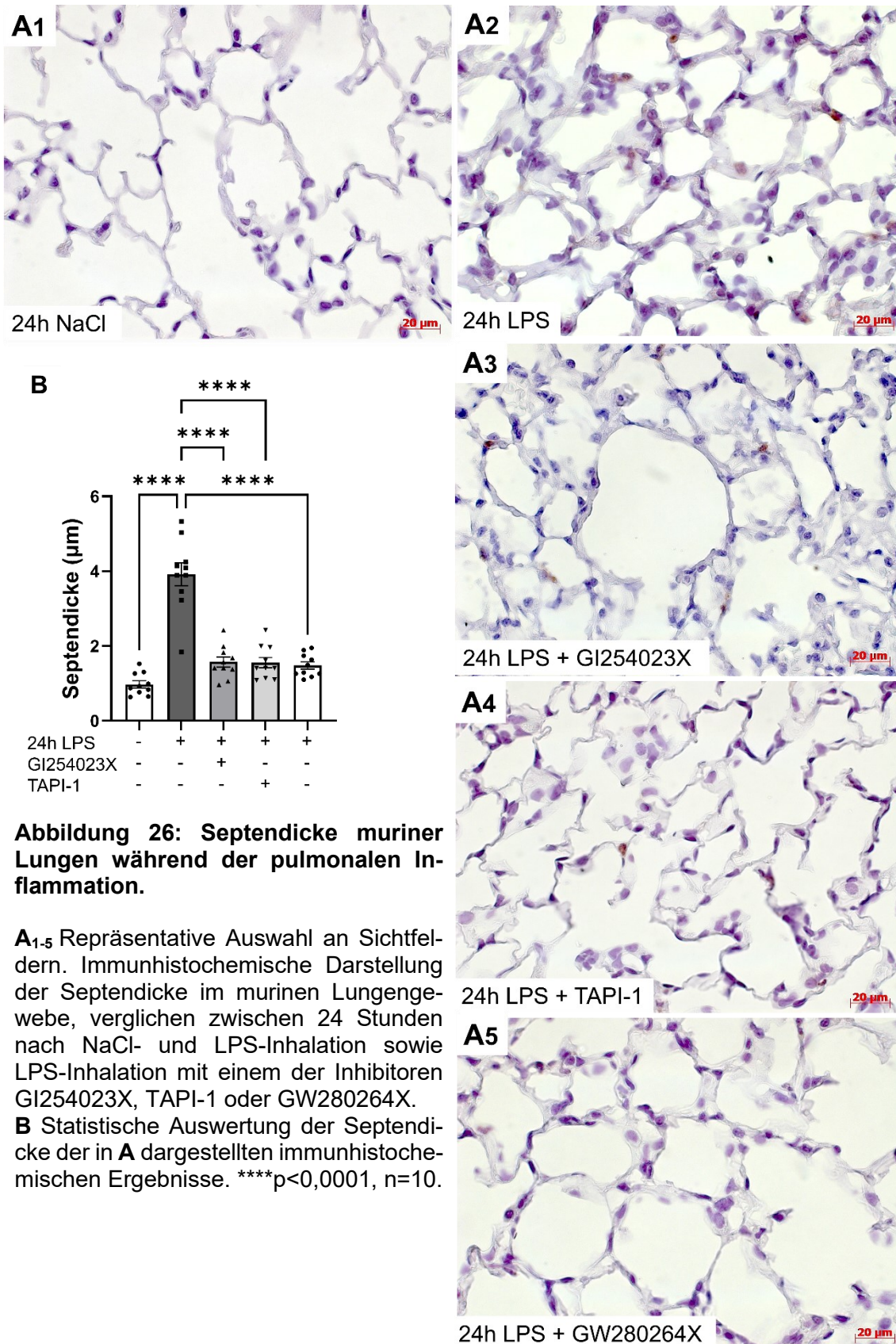
Expression und Verteilung in Lungengewebebeobachtungen ausgewertet. Zur funktionellen Beurteilung der Permeabilität wurde außerdem die Gesamtproteinkonzentration in der BAL bestimmt.

Mäuselungen wurden histologisch untersucht, um die Auswirkungen der LPS-Stimulation und Proteaseninhibition zu beurteilen. Abbildung 26 zeigt repräsentative Aufnahmen der Versuchsgruppen (A1-5) sowie die statistische Auswertung der Septendicke (B). Nach LPS-Inhalation wurde eine signifikante Septenverdickung festgestellt, die durch spezifische oder kombinierte Inhibition von ADAM10 und ADAM17 Proteasen signifikant reduziert wurde.

Intakte Tight Junctions wurden in dieser Untersuchung als Marker für die Barriereintegrität der Lunge herangezogen. Die Expression und Verteilung der Tight Junction-Proteine Zonula occludens-1 (ZO-1), Occludin, JAM-A und ICAM-1 (CD54) wurden mittels Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Dabei wurde der Einfluss einer ADAM10- bzw. ADAM17-Hemmung auf die Intensität dieser Marker in der Lungenstruktur erfasst.

Zur Differenzierung zwischen epithelialem und endothelialem Gewebe wurden zusätzlich der von-Willebrand-Faktor und Cytokeratin angefärbt. Da die beobachteten Veränderungen an beiden Gewebetypen weitgehend übereinstimmen, werden in Abbildung 27 und 28 stellvertretend die Ergebnisse aus dem Endothel dargestellt. Die entsprechenden Resultate für das Epithel sind zur ergänzenden Betrachtung im Anhang (Kapitel 6.1) enthalten.

Es ließ sich eine signifikante Intensitätsminderung von Occludin und ZO-1 nach erfolgter LPS-Inhalation messen. Bei vorheriger Injektion von GI254023X, TAPI-1 bzw. GW280264X zeigten sich im Vergleich zur reinen LPS-Behandlung signifikant höhere Intensitäten (siehe Abbildung 27). Am Endothel wurde durch die LPS-Inhalation eine signifikante Erhöhung von ICAM-1 und JAM-A festgestellt (Abbildung 28). Die vorherige Injektion der Inhibitoren von ADAM10 bzw. ADAM17 reduzierte diese Intensitätserhöhung in fast allen Vergleichsgruppen signifikant. Ausschließlich die Inhibition von ADAM17 mittels TAPI-1-Injektion ergab bei der Intensität von JAM-A am Epithel keine signifikante Veränderung.



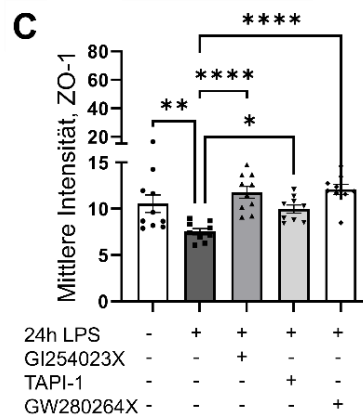
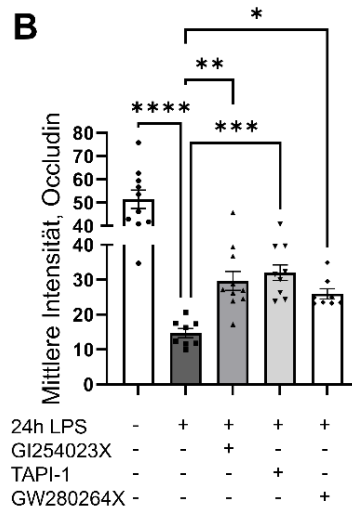
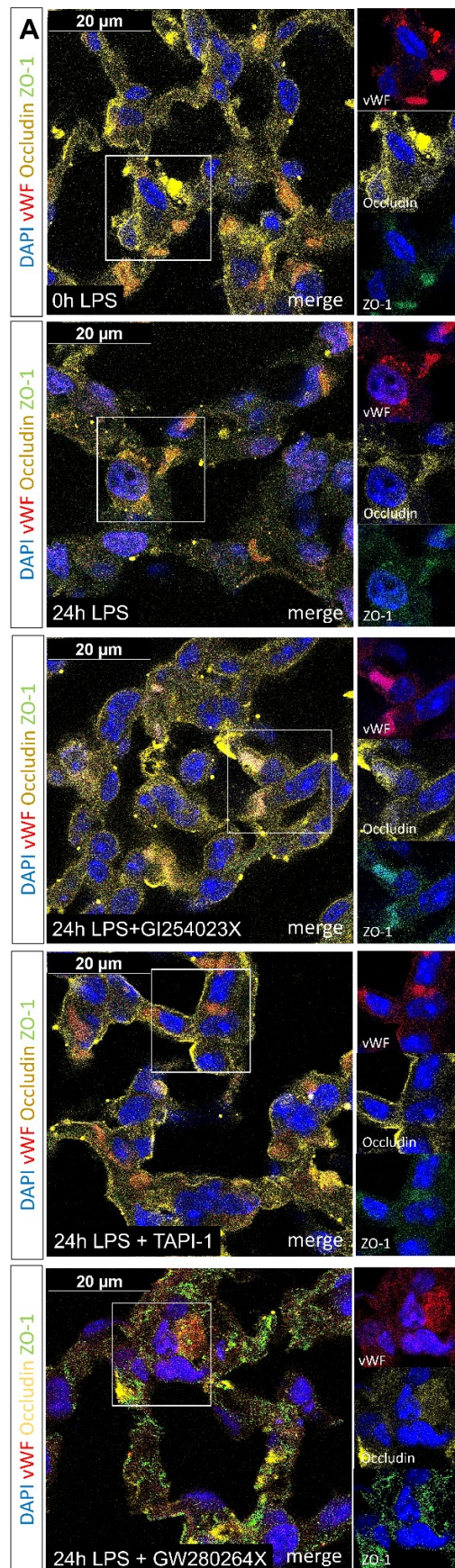


Abbildung 27: Occludin und ZO-1 - Intensität am murinen Lungenendothel während der pulmonalen Inflammation.

A Immunfluoreszenz-Aufnahmen des murinen Lungenendothels. Dargestellt sind mit DAPI gefärbte Zellkerne (blau), der von-Willebrand-Faktor (rot), Occludin (gelb) und Zonula Occludens (ZO-1, grün), verglichen zwischen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X.

B Statistische Auswertung der mittleren Intensität von Occludin (gelb) anhand der Aufnahmen aus **A**. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n = 8-10$.

C Statistische Auswertung der mittleren Intensität von ZO-1 (grün) anhand der Aufnahmen aus **A**. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, $n = 8-10$.

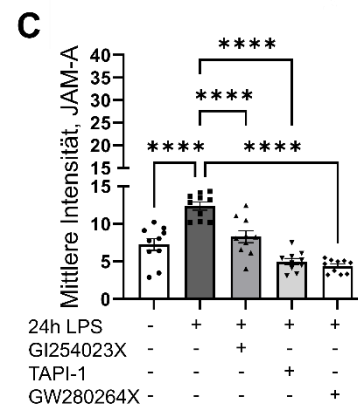
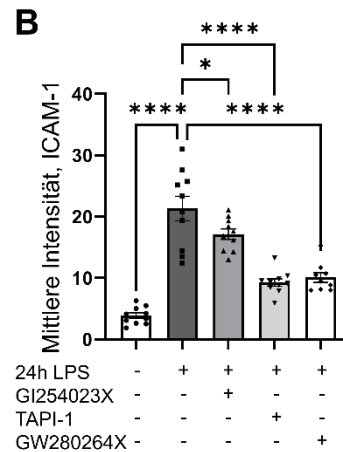
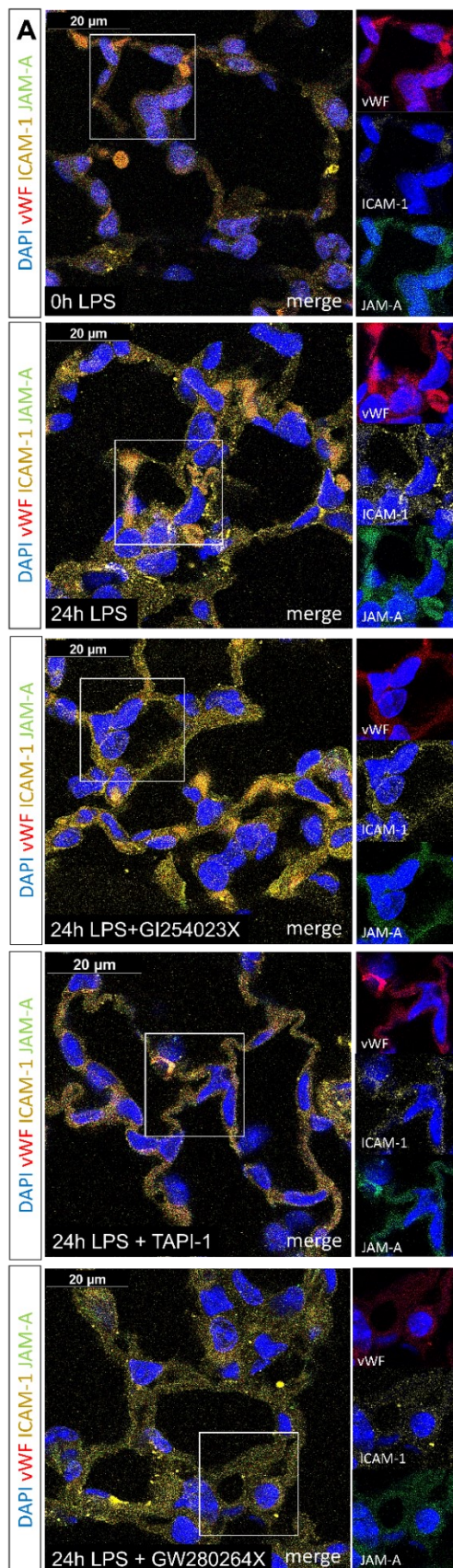


Abbildung 28: ICAM-1 und JAM-A - Intensität am murinen Lungenendothel während der pulmonalen Inflammation.

A Immunfluoreszenz-Aufnahmen des murinen Lungenendothels. Dargestellt sind mit DAPI gefärbte Zellkerne (blau), der von-Willebrand-Faktor (rot), ICAM-1 (gelb) und JAM-A (grün), verglichen zwischen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280264X.

B Statistische Auswertung der mittleren Intensität von ICAM-1 (gelb) anhand der Aufnahmen aus **A**. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, $n = 10$.

C Statistische Auswertung der mittleren Intensität von JAM-A (grün) anhand der Aufnahmen aus **A**. **** $p < 0,0001$, $n = 10$.

Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl die spezifische als auch die kombinierte Inhibition von ADAM10 und ADAM17 - mit Ausnahme der spezifischen ADAM17-Inhibition bei JAM-A am Epithel - zu einer erhöhten Intensität der Transmembranproteine ZO-1 und Occludin und zu einer reduzierten Expression der Adhäsionsmoleküle JAM-A und ICAM-1 führt.

Neben den genannten Transmembranproteinen wurde auch die Expression von VE-Cadherin (CD144) untersucht - einem zelladhäsiven Glykoprotein, das eine wesentliche Rolle bei der Zell-Zell-Adhäsion und dem Erhalt der Endothelzellbarriere spielt. Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte die Gesamtexpression von VE-Cadherin auf der Oberfläche von Endothelzellen. Da ein Antikörper verwendet wurde, der gegen die extrazelluläre Domäne des Proteins gerichtet war und keine Unterscheidung zwischen gespaltenem und intaktem VE-Cadherin zuließ, konnte zwischen diesen Formen nicht differenziert werden.

Die durchflusszytometrische Analyse der CD144-Expression auf Endothelzellen ergab nach erfolgter LPS-Inhalation eine signifikante Zunahme der Expression. In allen Gruppen mit vorheriger Inhibitor-Injektion wurde eine signifikante Reduktion der Expression nach LPS-Inhalation festgestellt (Abbildung 29).

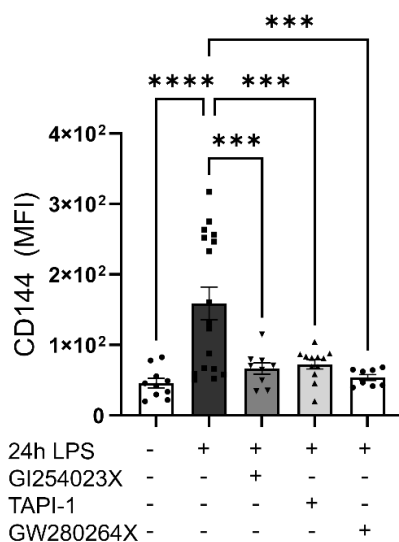


Abbildung 29: CD144 -Expression auf Endothelzellen der murinen Lunge.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD144 auf Endothelzellen der murinen Lunge, verglichen zwischen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280264X. ***p<0,001, ****p<0,0001, n=8-17.

Die in Abbildung 30 dargestellte Analyse der Gesamtproteinausschüttung in die BAL dient als Marker für die Permeabilität der alveolokapillären Barriere. Ein vermehrter Proteinnachweis weist auf eine verstärkte Gefäßleckage hin, wie sie typischerweise im Rahmen einer ARDS-assoziierten Endothelschädigung auftritt.

Vier und 24 Stunden nach der LPS-Behandlung war die Proteinkonzentration in der BAL signifikant erhöht, was mit einer gestörten Barrierefunktion übereinstimmt. Die Hemmung von ADAM10 führte nach vier Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression im Vergleich zur unbehandelten LPS-Gruppe (A). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen wurden nicht festgestellt.

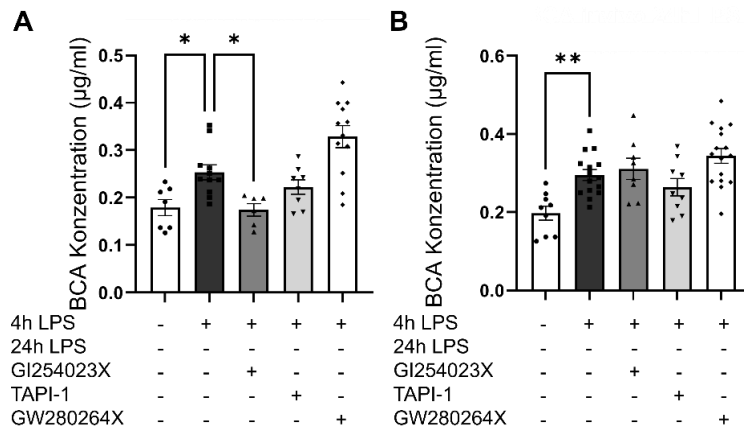


Abbildung 30: Bestimmung der Proteinkonzentration in der BAL muriner Lungen. Proteinbestimmung in der BAL mittels Bicinchoninsäure-Assay (BCA) vergleichend zwischen null, vier (A) bzw. 24 (B) Stunden nach LPS-Inhalation und LPS-Inhalation mit jeweils einem der drei Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 und GW280264X. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $n = 6-16$.

3.3. Proteaseninhibition und ihre Effekte auf proinflammatorische Mediatoren der Immunzell-Rekrutierung und -Aktivierung in der pulmonalen Inflammation

Die Untersuchung der Immunzellrekrutierung und -aktivierung in der pulmonalen Entzündung umfasst die Chemokin-vermittelte Signalgebung sowie die Expression von proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- α und IL-6.

Die Konzentration von TNF- α und IL-6 sowie der CXC-Chemokine CXCL1 (KC) und CXCL2 (MIP-2) im BAL-Überstand wurden vier Stunden nach LPS-Inhalation mittels ELISA bestimmt (Abbildung 31). Alle vier Moleküle waren in der LPS-behandelten Gruppe signifikant erhöht. Die Inhibition von ADAM10 sowie die kombinierte Hemmung von ADAM10/17 führten zu einer signifikanten Reduktion von CXCL1, während ADAM17 allein keinen Effekt hatte (A). CXCL2 war in allen Inhibitor-Gruppen signifikant reduziert, am stärksten bei der ADAM10-Hemmung

(B). Auch TNF- α und IL-6 waren nach Hemmung von ADAM10, ADAM17 oder beider Proteasen im Vergleich zur LPS-Gruppe signifikant reduziert (C + D).

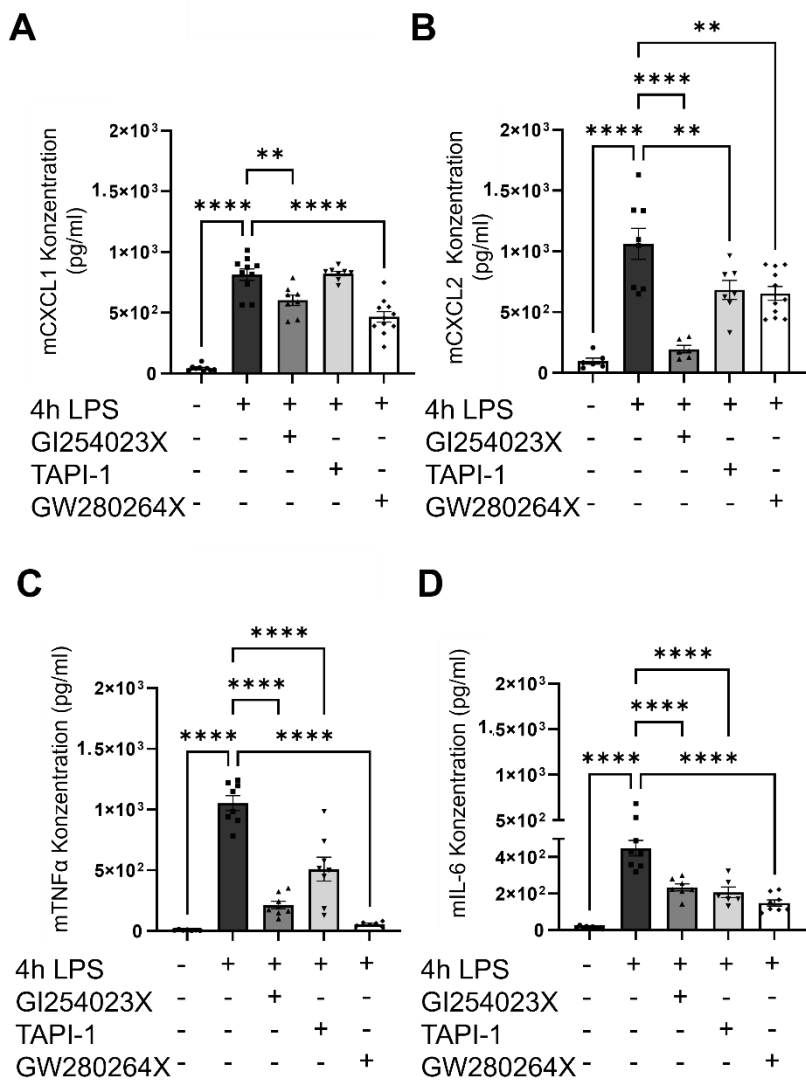


Abbildung 31: Konzentration der Chemokine CXCL1 und CXCL2 sowie der Zytokine TNF- α und IL-6 in der BAL muriner Lungen.

Konzentrationsbestimmung von (A) mCXCL1 (B) mCXCL2 (C) mTNF- α und (D) mL-6 in der BAL muriner Lungen vier Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation in Kombination mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. **p<0,01, ****p<0,0001, n=6-10.

3.4. Gegenseitige Regulation der Sheddaseexpression von ADAM10 und ADAM17 durch deren Hemmung

Um den Einfluss der Inhibition von ADAM10 und ADAM17 auf deren eigene Expression auf PMNs, Thrombozyten und Endothelzellen während der Migration zu untersuchen, wurde die Oberflächenexpression analysiert. Signifikante Anstiege der ADAM10-Expression im Lungeninterstitium wurden nach Inhibition von ADAM10 sowie nach kombinierter Proteaseninhibition festgestellt. Intravasal, am Endothel anhaftend und in der BAL wurden keine Unterschiede in der Expression nach Inhibition von ADAM10 oder ADAM17 beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigte sich im Lungeninterstitium nach ADAM10-Hemmung eine erhöhte ADAM10- Expression auf PMNs (Abbildung 32).

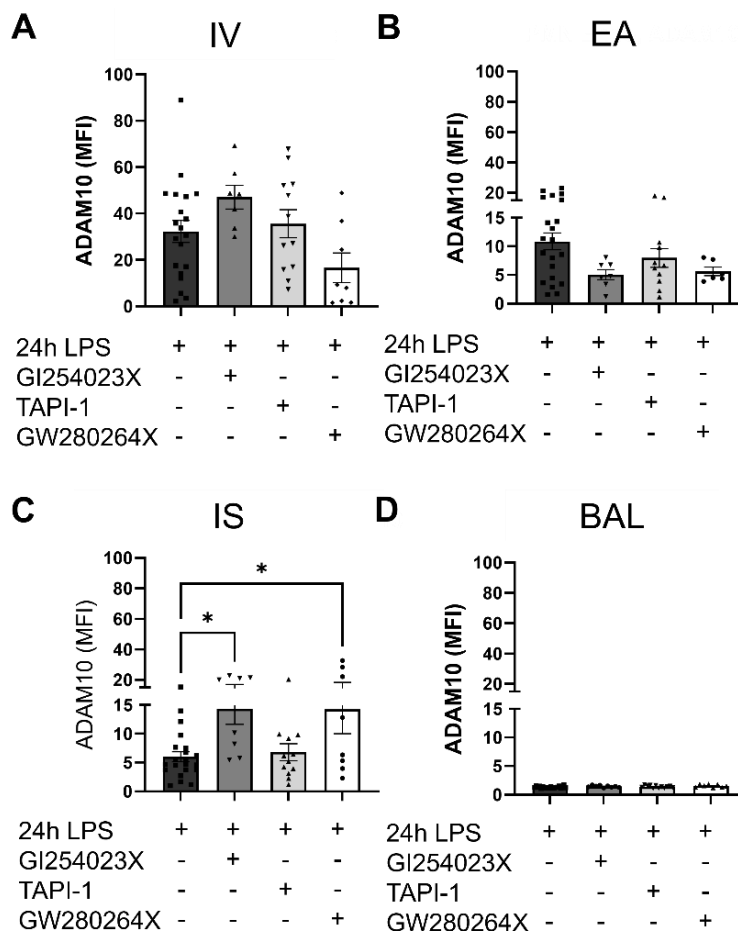


Abbildung 32: ADAM10 - Expression auf PMNs während der Migration durch die vier Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von ADAM10 auf PMNs während ihrer Migration durch die vier Kompartimente. Vergleichsgruppen mit LPS-Inhalation und vorheriger ADAM-Inhibition unter Verwendung eines der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 und GW280264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (**A**); EA = am Endothel adhäre PMNs (**B**); IS = PMNs im Lungeninterstitium (**C**); BAL = PMNs im Alveolarraum (**D**). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, $n = 7-21$.

In Abbildung 33 wird dargestellt, dass die kombinierte Proteasen-Inhibition zu einer verringerten Oberflächenexpression von ADAM17 auf intravasal zirkulierenden PMNs führt (A). PMNs, die am Lungenendothel anhafteten (B) und im Interstitium lokalisiert waren (C), wiesen in allen Vergleichsgruppen mit Proteasen-inhibition eine reduzierte ADAM17-Expression auf. In der BAL waren keine Effekte durch die Hemmung der Proteasen erkennbar (D). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Inhibition von ADAM10 und ADAM17 24 Stunden nach LPS-Inhalation zu einer verringerten Oberflächenexpression von ADAM17 auf PMNs am Endothel und im Lungeninterstitium führt.

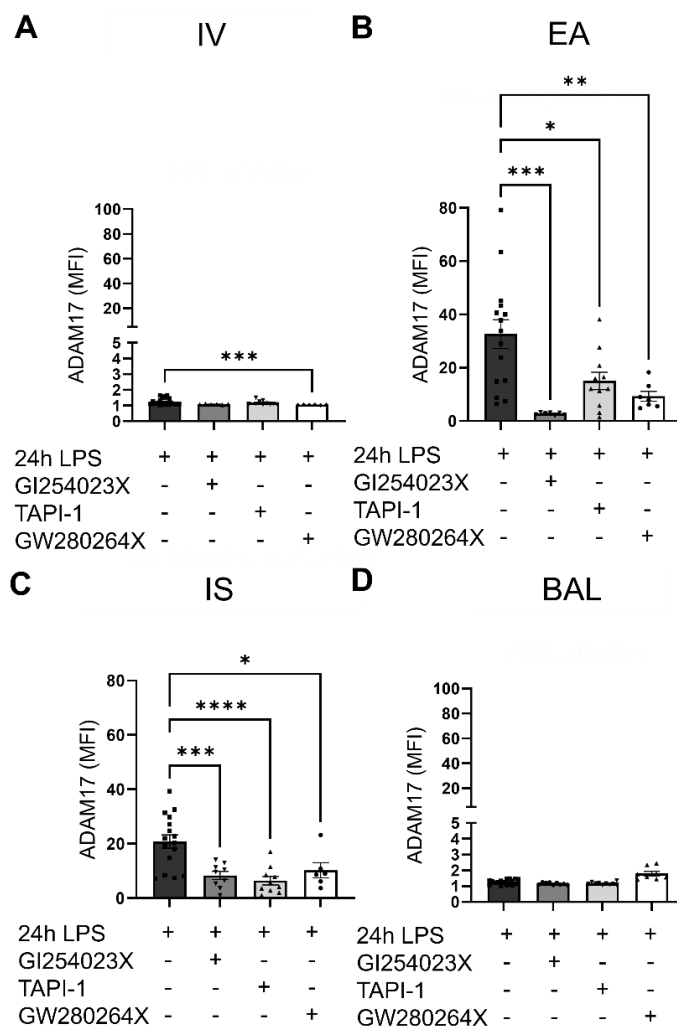


Abbildung 33: ADAM17-Expression auf PMNs während der Migration durch die vier Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von ADAM10 auf PMNs während ihrer Migration durch die vier Kompartimente. Vergleichsgruppen mit LPS-Inhalation und vorheriger ADAM-Inhibition unter Verwendung eines der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 und GW280264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (A); EA = am Endothel adhäre PMNs (B); IS = PMNs im Lungeninterstitium (C); BAL = PMNs im Alveolarraum (D). *p<0,05, **p<0,01, ****p<0,0001, n=6-19.

Abbildung 34 stellt die Expression von ADAM10 auf Thrombozyten intravasal, in der Lunge und in der BAL getrennt dar. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen festgestellt. Generell ergab sich keine starke Expression der Protease auf den Thrombozyten.

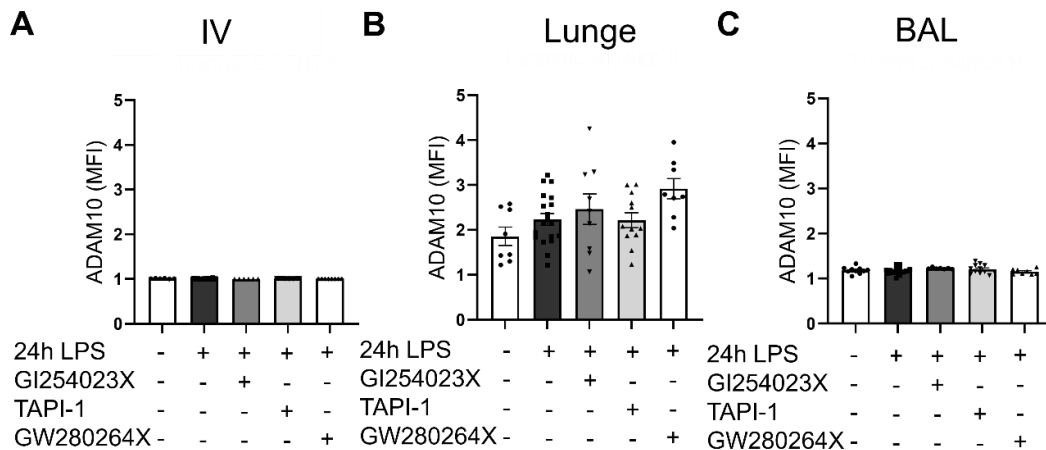


Abbildung 34: ADAM10 -Expression auf Thrombozyten während der Migration durch drei murine Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von ADAM10 auf Thrombozyten während der Migration durch die drei Kompartimente, verglichen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (**A**); Lunge = PMNs am Lungenendothel anhaftend und im Lungeninterstitium (**B**); BAL = PMNs im Alveolarraum (**C**). n=6-22.

Bei der Betrachtung der ADAM17-Expression auf Thrombozyten in Abbildung 35 zeigte sich intravasal keine Expressionsänderung durch LPS-Inhalation oder Proteasen-Inhibition (A). In der Lunge wurde jedoch eine signifikante Veränderung der ADAM17-Expression zwischen allen Vergleichsgruppen beobachtet (B). Nach LPS-Inhalation erhöhte sich diese deutlich. Vorherige Verabreichung von ADAM10 bzw. -17 Inhibitoren führte zu einer signifikanten Reduktion der Expression auf Thrombozyten. In der BAL wurde ein signifikanter Anstieg nach LPS-Inhalation und eine signifikante Reduktion bei kombinierter Inhibition beider Proteasen, im Vergleich zur reinen Inhalation, festgestellt (C). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 im Lungengewebe die ADAM17-Expression auf Thrombozyten reduziert. Diese Wirkung zeigt sich in der BAL nur bei kombinierter Hemmung als signifikant.

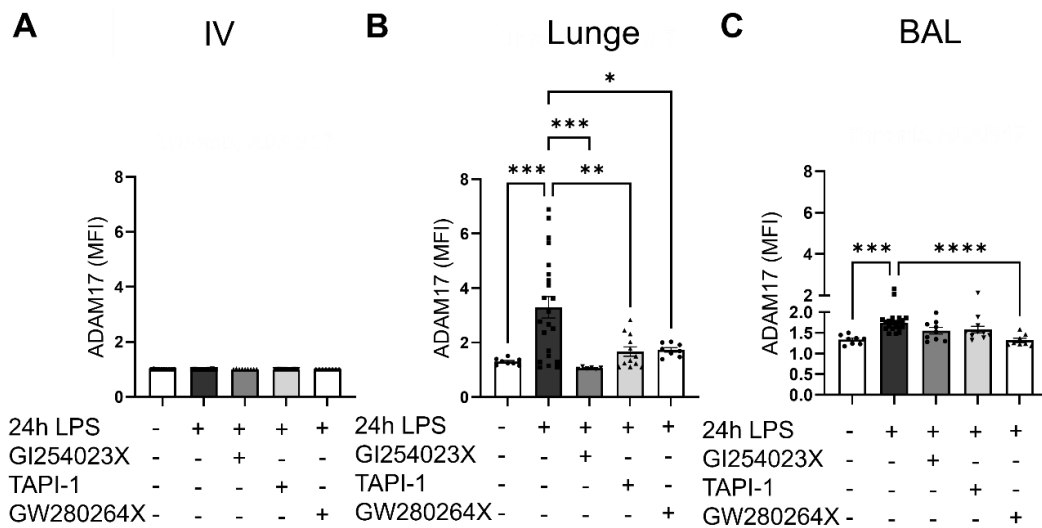


Abbildung 35: ADAM17-Expression auf Thrombozyten während der Migration durch drei murine Lungenkompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von ADAM17 auf Thrombozyten während der Migration durch drei Kompartimente, verglichen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (A); Lunge = PMNs am Lungenendothel anhaftend und im Lungeninterstitium (B); BAL = PMNs im Alveolarraum (C). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 6-22$.

Abbildung 36 veranschaulicht die Oberflächenexpression von ADAM10 (A) bzw. 17 (B) auf den Endothelzellen. Nach erfolgter LPS-Inhalation stieg die ADAM10-Expression signifikant an, während eine vorherige spezifische Inhibition von ADAM10 oder ADAM17 zu einer Reduktion führte.

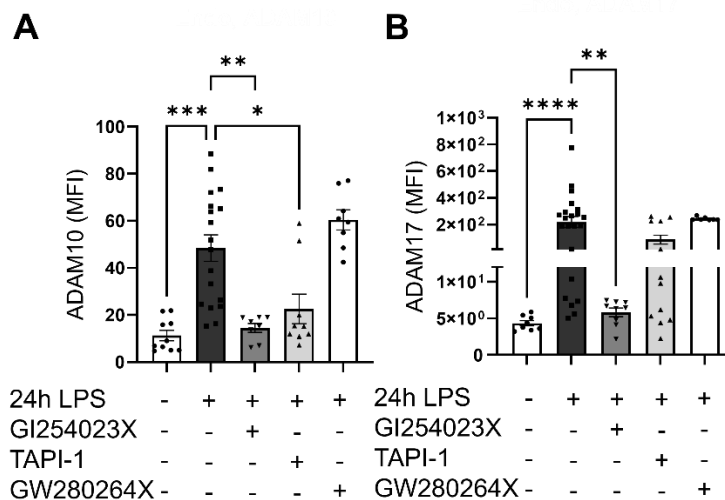


Abbildung 36: ADAM10 und -17-Expression auf Endothelzellen der murinen Lunge.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression der Metalloproteasen ADAM10 (A) und ADAM17 (B) auf Endothelzellen der Lunge, verglichen zwischen 24 Stunden nach NaCl- und LPS-Inhalation sowie LPS-Inhalation mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n = 7-22$.

Ähnlich erhöhte sich die ADAM17-Expression nach LPS-Inhalation deutlich und verringerte sich durch vorherige Hemmung von ADAM10. Die ADAM17 Inhibition hatte jedoch keinen Effekt gezeigt. Effekte durch eine kombinierte Hemmung durch GW280264X wurden nicht beobachtet.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die ADAM10-Expression auf Endothelzellen durch die Hemmung beider Proteasen reduziert wird, während die Expression von ADAM17 hauptsächlich durch die Inhibition von ADAM10 beeinflusst wird. Dies könnte auf mögliche komplexe Wechselwirkungen hinweisen, die weiter untersucht werden müssten. Das durch vorherige Inhibition von ADAM10 eine Verringerung der ADAM17-Expression beobachtet wurde, könnte auf indirekte oder regulatorische Mechanismen hinweisen, die die Expression von ADAM17 beeinflussen. Insgesamt legen die Ergebnisse nahe, dass die Interaktionen zwischen ADAM10 und ADAM17 komplexer sind als bisher angenommen.

3.5. Neutrophileninfiltration bei ventilationsinduzierter Inflammation unter ADAM-Inhibition

Das ARDS weist neben der bakteriell verursachten, pulmonalen Inflammation weitere bedeutende Ätiologien auf. Um ein weiteres wichtiges Gebiet der ARDS-Pathogenese zu erforschen, wurde die sterile Induktion einer beatmungsbedingten pulmonalen Inflammation durch Überdruckbeatmung genauer untersucht. Nach der Beatmung wurden die PMNs im Lungengewebe der Versuchstiere immunhistochemisch gefärbt und ihre Anzahl ausgewertet.

Die repräsentative Auswahl an Sichtfeldern in Abbildung 37 (A) weist auf eine ausgeprägte Veränderung der PMN-Zahl durch die Beatmung hin. Die statistische Auswertung aller erfassten Sichtfelder bestätigte diesen Befund (B). Die sechsstündige Überdruckbeatmung führte zu einer signifikanten Erhöhung der PMN-Zahl.

Die vorherige Hemmung von ADAM10, ADAM17 oder beider Proteasen verringerte die PMN-Zahl im Vergleich zur alleinigen Beatmung deutlich und schwächte somit die beatmungsinduzierte PMN-Migration in die Lunge signifikant ab.

Neben der PMN-Zahl wurde nach der sechsstündigen Überdruckbeatmung und der immunhistochemischen Aufbereitung des Lungengewebes auch die Septendicke gemessen und verglichen, um Unterschiede in den entzündungsbedingten Gewebeveränderungen zu identifizieren.

In Abbildung 38 (A) werden exemplarische Sichtfelder dargestellt, anhand welcher die Septendicke in (B) statistisch ausgewertet wurde. Nach Überdruckbeatmung wurde eine signifikante Verdickung der Septen von durchschnittlich 1,0574 μm auf 2,855 μm festgestellt. Durch die vorherige Inhibition von ADAM10 bzw. ADAM17 mittels GI254023X, TAPI-1 oder GW280264X konnte die Septendicke im Vergleich zur reinen Überdruckbeatmung wiederum signifikant reduziert werden. Die durchschnittliche Septendicke betrug dabei: GI254023X: 1,207 μm ; TAPI-1: 1,5023 μm ; GW280264X: 1,0002 μm .

Daraus lässt sich schließen, dass die signifikante Verdickung der Septen bei beatmungsinduzierter pulmonaler Inflammation durch die vorherige Inhibition von ADAM10 bzw. -17 signifikant reduziert wurde.

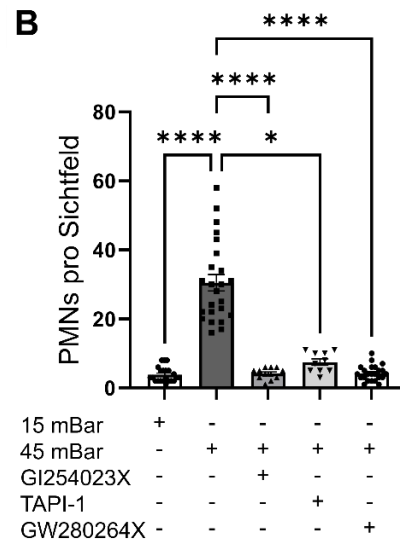
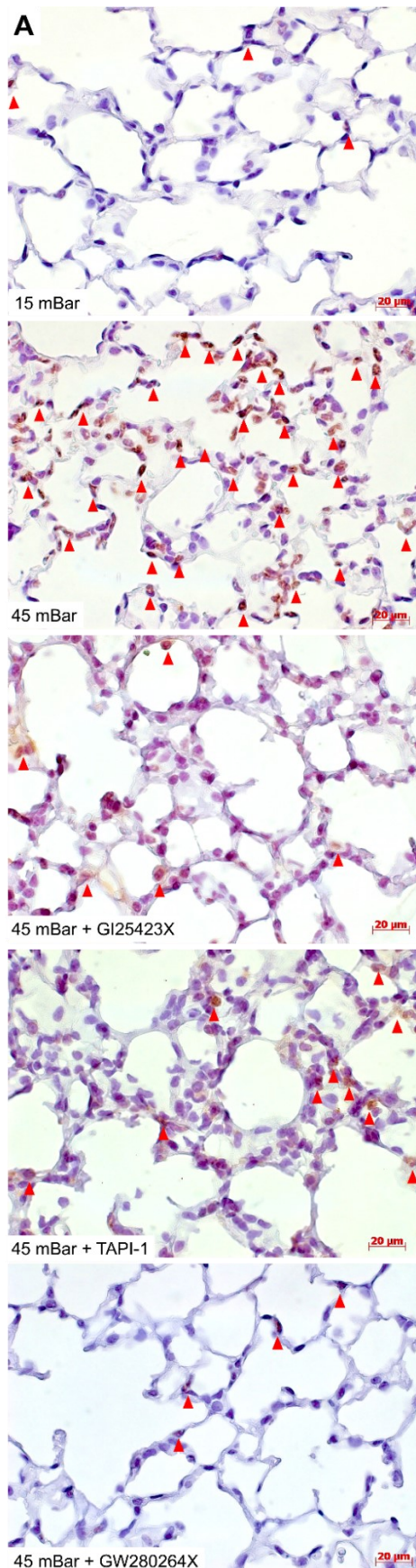


Abbildung 37: PMN-Migration in der murinen Lunge unter Normal- und Überdruckbeatmung.

A Repräsentative Auswahl an Sichtfeldern. Immunhistochemische Darstellung der Anzahl an PMNs (braun) im Lungengewebe der Mäuse, verglichen zwischen Normal- (15mBar) bzw. Überdruckbeatmung (45mBar) sowie Überdruckbeatmung mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW28-0264X.

B Statistische Auswertung der immunhistochemischen Darstellung der PMN-Zahl im Lungengewebe der Mäuse, verglichen zwischen Normal- (15mBar) und Überdruckbeatmung (45mBar) sowie Überdruckbeatmung mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280-264X. * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$, $n = 10-24$

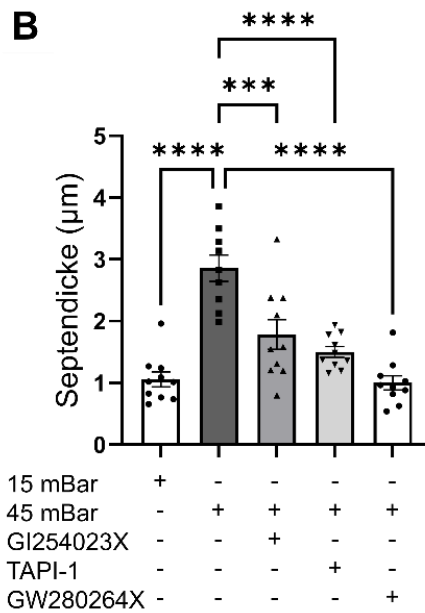
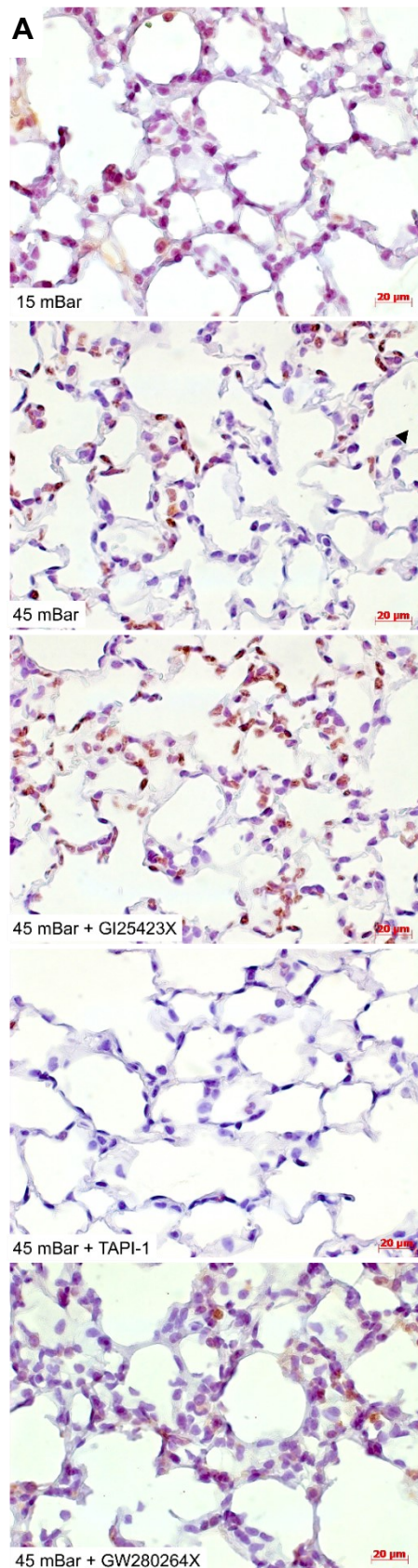


Abbildung 38: Septendicke im VILI-Versuch

A Repräsentative Auswahl an Sichtfeldern. Immunhistochemische Darstellung der Septendicke im Lungengewebe der Mäuse, verglichen zwischen Normal- (15mBar) und Überdruckbeatmung (45mBar) sowie Überdruckbeatmung mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280264X. Braunfärbung der neutrophilen Granulozyten (PMNs).

B Statistische Auswertung der immunhistochemischen Darstellung der Septendicke im Lungengewebe der Mäuse, verglichen zwischen Normal- (15mBar) und Überdruckbeatmung (45mBar) sowie Überdruckbeatmung mit einem der Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 oder GW280264X. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n = 9-10$.

4. Diskussion

4.1. Reduzierte PMN-Migration durch pharmakologische ADAM10/17-Hemmung

Die PMN-Rekrutierung an den Entzündungsort stellt die erste zelluläre Immunreaktion auf eine akute Inflammation dar und korreliert direkt mit der Krankheitsaktivität und dem Ausmaß der Gewebeschädigung (Bian et al., 2012, Phillipson and Kubes, 2011). Dies ist besonders relevant im Kontext des ARDS, da es durch eine massive Rekrutierung von PMNs in das Lungeninterstitium und den Alveolarraum gekennzeichnet ist (Ferguson et al., 2012, Konrad et al., 2019, Matthay et al., 2019). Diese Migration trägt wesentlich zur Gewebeschädigung und zur Pathophysiologie der Erkrankung bei. Eine zunehmende Zahl an Studien zeigt, dass Enzyme der ADAM-Familie eine zentrale Rolle in der Regulation dieser Prozesse spielen, indem sie die Interaktion zwischen PMNs und Endothelzellen modulieren (Edwards et al., 2008, Dreymueller et al., 2012). Insbesondere ADAM10 und ADAM17 werden als Schlüsselmoleküle identifiziert, die zur Regulation der endothelialen Permeabilität, Leukozytenmigration und der Produktion proinflammatorischer Mediatoren beitragen (Dreymueller et al., 2015). Diese Mechanismen sind entscheidend für die Steuerung der Immunantwort und beeinflussen die Krankheitsprogression maßgeblich.

Wie bereits in den Ergebnissen dargestellt, führte die pharmakologische Hemmung von ADAM10 und ADAM17 – sowohl einzeln als auch in Kombination – zu einer signifikanten Reduktion der PMN-Migration in das Lungengewebe. Während die LPS-induzierte Lungenentzündung in allen untersuchten Kompartimenten mit einem deutlichen Anstieg der PMN-Anzahl einherging, wurde dieser Anstieg durch die selektive sowie kombinierte Hemmung ADAM10/17 signifikant abgeschwächt. Eine Reduktion ausschließlich intravasaler PMNs wurde dabei nur bei selektiver Hemmung von ADAM10 oder ADAM17 beobachtet. Die immunhistochemischen Analysen bestätigten diese Befunde und zeigten 24 Stunden nach LPS-Inhalation eine verminderte PMN-Infiltration in das Lungengewebe bei den mit Proteaseinhibitoren behandelten Tieren.

Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit bestehenden Untersuchungen zur Pathogenese der pulmonalen Inflammation. So konnten Downey *et al.* und Soethout *et al.* die zentrale Rolle neutrophiler Granulozyten bei der Entstehung von Lungenentzündungen belegen (Downey *et al.*, 1993, Soethout *et al.*, 2002). Auch Konrad *et al.* beschrieben, dass die Rekrutierung von PMNs in das Lungeninterstitium und den Alveolarraum nach LPS-Inhalation innerhalb von 24 Stunden ihren Höhepunkt erreicht – ein Zeitraum, der auch der vorliegenden Untersuchung zugrunde liegt und die zentrale Rolle dieser Zellen in der akuten Entzündungsreaktion unterstreicht (Konrad *et al.*, 2019).

Im Vergleich zur Studie von Arndt *et al.*, die den Einfluss von ADAM17 auf die PMN-Migration in die Lunge untersuchte, zeigten sich sowohl Parallelen als auch Unterschiede (Arndt *et al.*, 2011). Während Arndt *et al.* nach LPS-Exposition in ADAM17-defizienten Mäusen initial (nach zwei Stunden) eine erhöhte Anzahl alveolärer PMNs feststellten, die im weiteren Verlauf (nach acht Stunden) deutlich zurückging, beobachteten wir in unserem Modell über den Untersuchungszeitraum von 24 Stunden eine reduzierte PMN-Migration. Diese Abweichung ließe sich durch die unterschiedlichen Analysezeitpunkte, vor allem aber durch die Methodik erklären. Während Arndt *et al.* genetische Knock-out-Modelle verwendeten, kam in unserer Arbeit eine akute pharmakologische Hemmung der Proteasen in Wildtyp-Tieren zum Einsatz. Dabei werden genetische Modifikationen häufig von kompensatorischen Anpassungsprozessen begleitet, während die pharmakologische Inhibition einen unmittelbaren, möglicherweise klinisch relevanteren Eingriff in die Entzündungskaskade darstellt (El-Brolosy and Stainier, 2017).

Weitere Hinweise auf die Bedeutung von ADAM10 lieferte die Studie von Pruessmeyer *et al.*, in der gezeigt wurde, dass ADAM10-defiziente Mäuse eine anhaltend verminderte Migration von PMNs und Monozyten in die alveolären Räume aufwiesen, während in ADAM17-defizienten Tieren die Rekrutierung nur transient verändert war (Pruessmeyer *et al.*, 2014). Dies unterstreicht die besondere Rolle von ADAM10 in der frühen Phase der Immunantwort auf die pulmonale Inflammation.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass die Inhibition von ADAM10 und ADAM17 die PMN-Migration in das Lungengewebe signifikant hemmt. Dies bestätigt die funktionelle Relevanz dieser Proteasen in der Regulation der akuten pulmonalen Immunantwort und weist auf ihr Potenzial als therapeutische Zielstrukturen hin. Im folgenden Abschnitt werden die molekularen Mechanismen und Mediatoren analysiert, die durch die Proteasenhemmung verändert wurden und möglicherweise für die reduzierte PMN-Migration verantwortlich sind.

4.2. Direkte Auslöser der gehemmten PMN-Migration

4.2.1. Hemmung der PMN-Aktivierung und -Rekrutierung: Die Rolle von Chemokinen und Zytokinen

Die Migration von PMNs in entzündliches Gewebe wird durch Chemokine gesteuert, die sowohl die Aktivierung als auch die gerichtete Wanderung der PMNs regulieren und damit eine zentrale Rolle in der Immunantwort spielen (De Filippo et al., 2013). Die proteolytische Verarbeitung von Chemokinrezeptoren, sowie die Freisetzung und Modulation von Chemokinen werden unter anderem durch ADAM-Proteasen beeinflusst (Hundhausen et al., 2007, Mishra et al., 2015, Pruessmeyer et al., 2014). Daher könnte die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 direkte Auswirkungen auf die PMN-Rekrutierung haben, indem sie die Verfügbarkeit oder Funktion relevanter Chemokine verändert.

Um diesen Mechanismus näher zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Studie die MPO-Aktivität als Marker für die PMN-Aktivierung analysiert. Myeloperoxidase ist ein Enzym, das hauptsächlich in Neutrophilen vorkommt und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies katalysiert, die für die mikrobielle Abtötung von pathogenen Mikroorganismen durch PMNs essenziell sind. Darüber hinaus ist MPO an Gewebeschäden und entzündlichen Prozessen beteiligt (Aratani, 2018). Die Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung der MPO-Aktivität in der BAL sowohl vier als auch 24 Stunden nach LPS-Inhalation, was mit den Befunden von Jeyaseelan *et al.* übereinstimmen würde (Jeyaseelan *et al.*, 2004).

Die Hemmung von ADAM10 reduzierte die MPO-Aktivität signifikant, während die Hemmung von ADAM17 keine Effekte zeigte. Erst die kombinierte Hemmung beider Proteasen führte nach 24 Stunden zu einer Reduktion der MPO-Aktivität.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ADAM10 spezifische Substrate oder Signalwege reguliert, die direkt mit der MPO-Aktivität in Neutrophilen verknüpft sind. Angesichts der bisher begrenzten Datenlage zu ADAM10 und der Regulation der MPO-Aktivität, stellen diese Befunde einen möglichen neuen Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen dar.

Darüber hinaus wurde nach Hemmung von ADAM10 und ADAM17 eine signifikante Reduktion der Zytokine TNF- α und IL-6 beobachtet. Die zentrale Rolle von ADAM10 und ADAM17 bei der proteolytischen Prozessierung von TNF- α und IL-6 wurde bereits in mehreren Studien ausreichend belegt (Zunke and Rose-John, 2017, Edwards *et al.*, 2008, Liao *et al.*, 2023). Die Ergebnisse dieser Studien identifizierten ADAM17 als zentrale Protease für die Spaltung von TNF- α und zeigten zudem, dass ADAM10 ebenfalls an diesem Prozess beteiligt ist (Hikita *et al.*, 2009, Zunke and Rose-John, 2017). Unsere Befunde stehen mit diesen Beobachtungen im Einklang. Ebenso hängt die IL-6-Trans-Signalgebung von der Freisetzung des löslichen IL-6-Rezeptors ab, die wiederum durch ADAM10 und ADAM17 vermittelt wird (Yan *et al.*, 2016). In unseren Experimenten zeigte sich eine signifikante Reduktion der IL-6-Konzentration nach Hemmung beider Proteasen, was die Rolle der Proteasen in der Entzündungsreaktion unterstreicht.

Hinsichtlich der Chemokine CXCL1 und CXCL2 deckt sich die in unserer Studie nachgewiesene Expressionssteigerung der Chemokine mit den Ergebnissen von Jeyaseelan *et al.*, die eine signifikante Erhöhung der CXCL1- und CXCL2-Expression nach LPS-Stimulation in der BAL muriner Lungen zeigten (Jeyaseelan *et al.*, 2004). In einem Mausmodell der *Streptococcus pneumoniae*-induzierten Lungenentzündung förderte CXCL1 den PMN-Zustrom ins entzündete Gewebe, wobei CXCL1-defiziente Mäuse eine signifikant reduzierte PMN-Anzahl in der BAL aufwiesen (Paudel *et al.*, 2019). Auch in Peritonitis-Modellen trugen CXCL1 und CXCL2 zur PMN-Rekrutierung bei (De Filippo *et al.*, 2013, Lentini *et al.*, 2020).

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der Freisetzung von CXCL1 durch die Inhibition von ADAM10, während sowohl die alleinige Hemmung von ADAM10 oder ADAM17 eine Reduktion von CXCL2 bewirkte. Diese Erkenntnisse decken

sich mit den Ergebnissen von Pruessmeyer *et al.*, die eine reduzierte CXCL-1-Freisetzung nach ADAM10-Hemmung beobachteten, während die Inhibition von ADAM17 keine Effekte hatte (Pruessmeyer et al., 2014). Ein direkter Einfluss von ADAM10/17 auf die Regulation von CXCL2 ist bislang nur unzureichend untersucht. Studien deuten allenfalls auf indirekte Zusammenhänge über inflammatorische Signalwege wie TNF- α hin.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass ADAM10 eine zentrale Rolle in der Regulation der PMN-Aktivierung und -Migration spielt, während ADAM17 eine eher ergänzende Funktion einnimmt. Die signifikante Reduktion der MPO-Aktivität sowie der Chemokine CXCL1 und CXCL2 nach ADAM10-Hemmung unterstreicht den direkten Einfluss von ADAM10 auf die PMN-Rekrutierung. Zusätzlich verstärkt die gleichzeitige Hemmung proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-6 die Annahme, dass über ADAM10/17 vermittelte Signalwege nicht nur die Migration, sondern auch die Aktivierung von PMNs modulieren. Die Zytokinhemmung könnte dabei sowohl Folge einer reduzierten Immunzellaktivierung als auch ein eigenständiger Mechanismus sein, der die Entzündungsantwort zusätzlich abschwächt. Insgesamt legen diese Daten nahe, dass insbesondere ADAM10 als zentraler Regulator der frühen Immunantwort fungiert und somit ein potenzielles therapeutisches Ziel darstellt.

Die veränderte Freisetzung von Chemokinen und Zytokinen nach ADAM10/17-Hemmung könnte auch Auswirkungen auf die Expression von Adhäsionsmolekülen und die transendotheliale Migration von PMNs haben. Der folgende Abschnitt beleuchtet, inwiefern diese Mechanismen durch die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 beeinflusst werden.

4.2.2. Reduzierte Expression von Adhäsionsmolekülen und verminderte transendotheliale Migration

Nachdem zuvor die generelle Migration von PMNs im Entzündungskontext untersucht wurde, richtet sich der Fokus nun spezifisch auf die transendotheliale Migration (TEM). Dieser mehrstufige Prozess, bei dem PMNs die Endothelbarriere überwinden, um ins Gewebe zu gelangen, wird durch fein abgestimmte Interaktionen zwischen Adhäsionsmolekülen und Signalwegen gesteuert. Zunächst

heften sich die zirkulierenden PMNs an das Gefäßendothel der Lunge an und rollen mit abnehmender Geschwindigkeit über dessen Oberfläche. Anschließend erfolgt die feste Adhäsion und das Kriechen der Zellen, bevor sie schließlich para- oder transzellulär durch das Endothel migrieren (vgl. Abbildung 39) (Ley *et al.*, 2007, Vestweber, 2015).

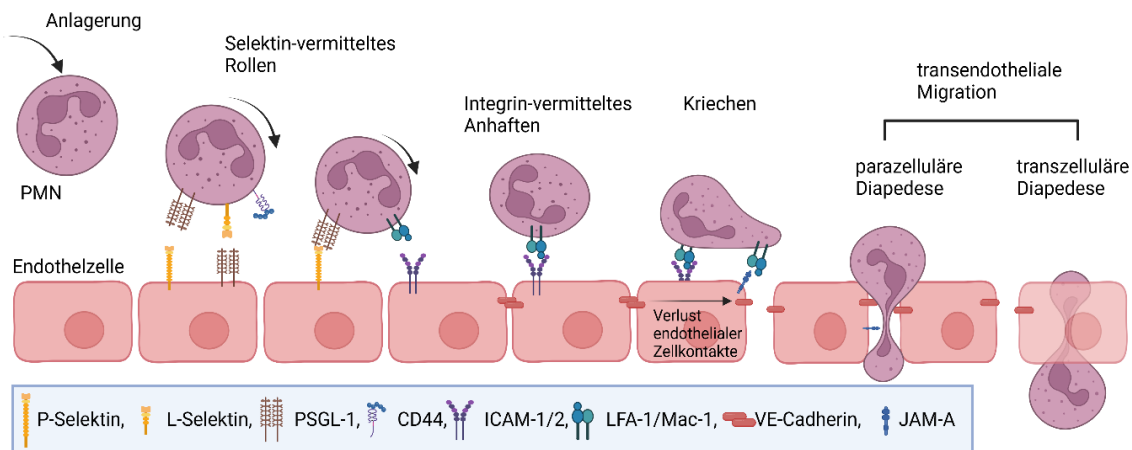


Abbildung 39: Die Migrationskaskade der PMNs.

Schematische Darstellung der mehrstufigen Adhäsionskaskade und einer Auswahl an Adhäsionsmolekülen, welche bei der Regulation der einzelnen Schritte beteiligt sind. Zunächst lagern sich die in den Blutgefäßen zirkulierenden PMNs an den Endothelzellen an, wobei sie in ein größtenteils Selektin-vermitteltes Rollen übergehen, welches sich stets verlangsamt. Anschließend ermöglichen unter anderem Integrine das Anhaften an das Gefäßendothel. Nachdem die PMNs im nächsten Schritt über die Zellbarriere kriechen, transmigrieren sie entweder parazellulär oder transzellulär in das Gewebe. Dabei findet die parazelluläre Diapedese, welche durch den Verlust endothelialer Zellkontakte ermöglicht wird, deutlich häufiger statt. PMN = polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt, PSGL-1 = P-Selektin Glykoprotein Ligand-1; ICAM-1/2 = Intercellular Adhesion Molecule-1/2; LFA-1 = Lymphogen-Associated Antigen-1 (CD11a/CD18); Mac-1 = Macrophage-1-Antigen (CD11b/CD18); VE-Cadherin = Vaskuläres Endothel-Cadherin; JAM-A = Junctional Adhesion Molecule-A; Diese Abbildung wurde in Anlehnung an Abbildungen aus Ley *et al.* 2007, Mishra *et al.* 2017 und Vestweber *et al.* 2015 (Ley *et al.*, 2007, Mishra *et al.*, 2017, Vestweber, 2015) erstellt, wurde jedoch angepasst und modifiziert, um den Fokus auf die in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküle zu legen.

Ein entscheidender Mechanismus in dieser Regulation ist die Ektodomänenspaltung durch ADAM10 und ADAM17 (Lerman and Kim, 2015, Mishra *et al.*, 2017). Das Anheften und Rollen von PMNs wird hauptsächlich durch die Interaktion von P- und L-Selektinen mit PSGL-1 vermittelt. Danach unterstützen β 2-Integrine diesen Prozess, indem Selektin-aktivierte PMNs über LFA-1 an ICAM-1 binden, was die Adhäsion verstärkt und die Geschwindigkeit der PMNs reduziert, bis sie schließlich anhaften (Ley *et al.*, 2007, Vestweber, 2015, Weber and Springer,

1997). Die Bindung der β 2-Integrine LFA-1 und Mac-1 an ICAM-1 oder ICAM-2 spielt ebenfalls eine zentrale Rolle in der darauffolgenden Kriechbewegung (Sreeramkumar *et al.*, 2014, Phillipson *et al.*, 2006, Mishra *et al.*, 2017).

Integrine wie LFA-1 (CD11a/CD18) und Mac-1 (CD11b/CD18) spielen eine zentrale Rolle, indem sie Bindungen an Adhäsionsmoleküle der ICAM- und JAM-Familie vermitteln und so Adhäsion, Rollen, Kriechen sowie die finale Transmigration ermöglichen (Filippi, 2019, Hyun *et al.*, 2019, Konrad *et al.*, 2019, Li *et al.*, 2018). LFA-1 ist dabei primär bei der initialen Adhäsion an das Endothel aktiv, während Mac-1 eine zentrale Rolle beim intraluminalen Kriechen spielt (Phillipson *et al.*, 2006).

Unsere Daten zeigten einen Anstieg der LFA-1-Expression im Blut und an am Endothel haftenden PMNs nach LPS-Stimulation, der nach erfolgter Transmigration wieder abfiel. Diese Ergebnisse weisen auf einen aktiven Verbrauch von LFA-1 während der TEM hin, ein Phänomen, das auch Konrad *et al.* beschrieben (Konrad *et al.*, 2019). Andrew *et al.* bestätigten die zentrale Rolle von LFA-1 mithilfe von LFA-1-defizienten Mäusen, deren PMNs die endotheliale Barriere nicht überwinden konnten (Andrew *et al.*, 1998). Die Inhibition von ADAM17 reduzierte die LFA-1-Expression intravasal, wohingegen ADAM10 die Expression nach der Barriereüberquerung verringerte. Am Endothel haftende PMNs zeigten sowohl bei ADAM10- als auch bei ADAM17-Hemmung eine signifikante Reduktion.

Die Expression von Mac-1 nahm nach LPS-Stimulation intravasal und nach erfolgter Migration ins Interstitium und in der BAL signifikant zu. Die Hemmung von ADAM10 ergab sowohl intravasal als auch interstitiell eine Reduktion der Mac-1-Expression, was auf dessen zentrale Rolle hinweist. ADAM17 zeigte hingegen keine spezifischen Effekte. Die Schlüsselrolle von ADAM10 bei der Mac-1-Regulation wurde bislang während der TEM nicht umfassend untersucht. Allerdings deuten die bekannten Funktionen von ADAM10 in der Zelladhäsion und Migration auf einen möglichen Zusammenhang hin (Pruessmeyer *et al.*, 2014). Tsubota *et al.* zeigten, dass sowohl ADAM10 als auch ADAM17 an der Abspaltung von Mac-1 auf Monozyten beteiligt sind (Tsubota *et al.*, 2013). Da sich diese Ergebnisse auf Monozyten beziehen, ist jedoch weitere Forschung erforderlich, um die

spezifische Rolle von ADAM10 und ADAM17 bei der Mac-1-Expression auf PMNs zu klären.

Neben den Integrinen ist CD44 (HSCAM) ein wichtiges Adhäsionsmolekül für PMNs, insbesondere im Hinblick auf die Interaktion mit der extrazellulären Matrix. Es fungiert als primärer Rezeptor für Hyaluronsäure (HA) und ist an verschiedenen Schritten der PMN-Migration beteiligt, darunter auch das Rollen entlang des Endothels (Khan et al., 2004). CD44 gilt zudem als bekanntes Substrat von ADAM17, wodurch eine proteolytische Modulation seiner Zelloberflächenexpression möglich ist (Tang et al., 2011). In dieser Studie wurde eine signifikante Hochregulation von CD44 auf der PMN-Oberfläche nach LPS-Inhalation festgestellt, was mit früheren Beobachtungen übereinstimmt (Stamenkovic and Yu, 2009, Lambrecht et al., 2018, Konrad et al., 2019). Es zeigte sich, dass spezifisch ADAM10 am Lungenendothel und in der BAL die CD44-Expression signifikant reduzierte, während intravasal beide ADAM-Proteasen zur Modulation beitragen. Stamenkovic *et al.* belegten, dass die Abspaltung von CD44 auf der PMN-Oberfläche für deren Migration erforderlich ist, wobei diese ausschließlich von ADAM10 vermittelt wird (Stamenkovic and Yu, 2009).

Die intravasale Modulation durch ADAM17 steht teilweise im Widerspruch zu Studien, die ADAM17 keinen Einfluss auf die CD44-Expression zuschreiben (Anderegge et al., 2009, Tang et al., 2011). Allerdings fehlen bislang umfassende Studien, die das CD44-Shedding spezifisch auf PMNs untersuchen, sodass der direkte Vergleich zwischen verschiedenen Zelltypen und experimentellen Ansätzen erschwert wird. Unser *in vivo* Modell zeigte eine gewebespezifische Regulation, bei der ADAM10 außerhalb der Blutbahn dominierte. Unsere Befunde unterstreichen, dass das Shedding von CD44 nicht universell durch eine einzelne Protease reguliert wird, sondern kontextabhängig zwischen intravasalen und extravasalen Kompartimenten variiert.

Parallel zu den Expressionsänderungen bei den Integrinen zeigten auch die zellulären Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 auf der Endotheloberfläche eine entscheidende Rolle in der Regulation der TEM von PMNs. ICAM-1 (CD54) und ICAM-2 (CD102) auf Endothelzellen interagieren mit den Integrinen LFA-1 und

Mac-1 auf der Oberfläche von PMNs und sind somit entscheidend für die Transmigration dieser Zellen (Shaw *et al.*, 2004, Gorina *et al.*, 2014). ICAM-1 ist dabei besonders für die Adhäsion und Transmigration der PMNs durch das Endothel verantwortlich, während ICAM-2 eine Rolle beim intravaskulären Kriechen und der interstitiellen Migration spielt (Chong *et al.*, 2021). Unsere Ergebnisse zeigten eine signifikante Erhöhung der Expression von ICAM-1 und ICAM-2 auf dem Endothel nach LPS-Inhalation, was eine verstärkte Aktivierung und Rekrutierung von PMNs im entzündeten Lungengewebe bedingen kann. Diese Beobachtungen stimmen mit diversen Studien überein, die eine Hochregulation von ICAM-1 und ICAM-2 unter entzündlichen Bedingungen dokumentierten (Choi *et al.*, 2007, Sadowska *et al.*, 2004).

Ein wichtiger Mechanismus in der Regulation von ICAM-1 ist die proteolytische Spaltung durch ADAM-Proteasen. Wie Tsakadze *et al.* zeigten, fördert ADAM17 die Ektodomänenspaltung von ICAM-1 auf Endothelzellen, was die Adhäsion und Migration von Leukozyten erleichtert (Tsakadze *et al.*, 2006). Auch unsere Studie bestätigt diese Erkenntnis, da die Hemmung von ADAM17 zu einer signifikanten Reduktion der ICAM-1-Expression führte. Darüber hinaus identifizierten Morsing *et al.* ADAM10 als einen weiteren Schlüsselfaktor in der Modulation der ICAM-1-Spaltung, wodurch die transendotheliale Migration von PMNs unterstützt wurde (Morsing *et al.*, 2021). Unsere Ergebnisse untermauern diese Befunde und zeigen, dass auch ADAM10 eine zentrale Rolle bei der Regulation der ICAM-1-Expression und der PMN-Migration spielt.

Zusammenfassend unterstreichen die vorliegenden Befunde die komplementären Rollen von ADAM10 und ADAM17 in der Regulation der TEM während der Migration von PMNs. Beide Proteasen beeinflussen die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und ICAM-2 auf Endothelzellen. ADAM17 beeinflusst primär intravasal die LFA-1-Expression, während ADAM10 nach der Barrierenüberquerung die LFA-1-Expression reduziert und im interstitiellen Raum die Mac-1-Expression steuert. ADAM10 spielt zudem eine zentrale Rolle bei der Regulation von CD44 auf PMNs, während ADAM17 ausschließlich intravasal die CD44-Expression moduliert. Durch diese Effekte steuern ADAM10 und ADAM17

entscheidende Schritte der neutrophilen Adhäsion und Migration durch das Endothel und das interstitielle Gewebe.

Nach der detaillierten Analyse der direkten zellulären Interaktion während der TEM, widmet sich der folgende Abschnitt nun den indirekten Faktoren, die die PMN-Migration beeinflussen.

4.3. Indirekte Auslöser der gehemmten PMN-Migration

4.3.1. Verbesserte Endothelfunktion und Stabilisierung der Lungenbarriere

Nach der Betrachtung direkter Mechanismen der PMN-Migration wurde untersucht, inwiefern indirekte Faktoren – insbesondere die Endothelfunktion und die Barriereintegrität – eine Rolle in der gehemmten Migration spielen. Eine gestörte Barrierefunktion ist ein zentrales Merkmal des ARDS und trägt maßgeblich zu pulmonalen Komplikationen bei (Su et al., 2024). Matute-Bello *et al.* sowie Guo *et al.*, beschrieben ebenfalls eine Verdickung der Alveolarsepten, entzündliche Zellinfiltrate und eine gesteigerte Gefäßpermeabilität bzw. interstitielle Ödeme nach LPS-Inhalation (Matute-Bello *et al.*, 2008, Guo *et al.*, 2012).

Unsere Daten zeigen, dass die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 eine protektive Wirkung auf die Lungenstruktur nach LPS-induzierter Schädigung hat. Die Reduktion der Septenverdickung, die Stabilisierung der Tight-Junction-Proteine ZO-1 und Occludin, sowie die modulierte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, JAM-A und VE-Cadherin deuten auf eine gestärkte Barrierefunktion hin.

Ein weiterer zentraler Marker der Barriereintegrität ist der erhöhte Proteingehalt in der BAL. Vier und 24 Stunden nach LPS-Stimulation zeigte sich eine signifikante Zunahme der Gesamtproteinmenge, was auf eine gesteigerte vaskuläre Permeabilität hinweist. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen von Guo et al. überein, die einen anhaltend erhöhten Proteingehalt noch nach drei Tagen beschrieben (Guo et al., 2012). Die Hemmung von ADAM10 führte bereits vier Stunden nach LPS-Inhalation zu einer signifikanten Reduktion der Proteinmenge, während dieser Effekt nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar war. Weder die Hemmung von ADAM17 noch die kombinierte Inhibition beider Proteasen beeinflusste den Proteingehalt zu diesen Zeitpunkten. Diese

Beobachtungen stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen von Pruessmeyer *et al.*, die eine verstärkte Ödembildung und einen erhöhten Proteinfluss bei ADAM17-Knockout-Mäusen nach 24-stündiger LPS-Exposition beschrieben (Pruessmeyer *et al.*, 2014). Dies korrelierte mit einer verstärkten Gewebeeinfiltration und alveolären Leukozytenrekrutierung in diesen Mäusen, während ADAM10-Knockout-Mäuse keine Veränderung in der Ödembildung aufwiesen. Diese Diskrepanz könnte auf experimentelle Unterschiede, wie das verwendete Mausmodell oder die Zeitpunkte der Messungen, zurückzuführen sein.

Um die strukturellen Auswirkungen der Proteasenhemmung auf die Lungenbarriere detaillierter zu untersuchen, analysierten wir die Expression der Tight-Junction-Proteine ZO-1 und Occludin. LPS führte zu einer deutlichen Reduktion beider Proteine, ein Effekt, der durch die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 signifikant abgeschwächt wurde. Dies unterstreicht die wesentliche Rolle dieser Proteasen in der Regulation der Lungenbarriere und steht im Einklang mit Studien, die über eine Reduktion von Occludin und ZO-1 nach entzündlichem Stimulus berichten (Han *et al.*, 2004, Herrero *et al.*, 2019). Becker *et al.* belegten die regulierende Funktion von ADAM10 auf ZO-1 und Occludin und betonten das therapeutische Potenzial einer ADAM-10-Inhibition zur Stabilisierung der Barriereintegrität bei ARDS und Sepsis (Becker *et al.*, 2018). Dies deutet darauf hin, dass ADAM-Proteasen nicht nur an der Barriereöffnung beteiligt sind, sondern möglicherweise auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte spielen. Eine gezielte Hemmung von ADAM10 und ADAM17 könnte somit zur Stabilisierung der Endothelbarriere beitragen.

Neben Tight-Junction-Proteinen spielen Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle in der Regulation der Endothelbarriere. Daher erweiterten wir die zuvor beschriebenen FACS-Ergebnisse der ICAM-1-Expression auf Endothelzellen um Immunfluoreszenz-Analysen von ICAM-1 und JAM-A im Lungenendothel und -epithel. Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 die LPS-induzierte Expression von ICAM-1 signifikant reduzierte. Da ICAM-1 maßgeblich an der PMN-Transmigration und der Regulation der kapillären Permeabilität beteiligt ist, könnte diese Reduktion eine protektive Wirkung auf die Endothelbarriere haben und entzündungsbedingte Gewebeschäden begrenzen. Eine

verstärkte ICAM-1-Expression wird mit Multiorganversagen bei Sepsis in Verbindung gebracht, während ICAM-1-Knockout-Mäuse geringere Mortalitätsraten und reduzierte Organschäden aufweisen (van Griensven *et al.*, 2006, Amalakuhan *et al.*, 2016). Unsere Ergebnisse bestärken diese Zusammenhänge und stehen im Einklang mit Studien zur ICAM-1-Expression während einer PMN-Transmigration bei entzündlichen Prozessen (Konrad *et al.*, 2019, Ngamsri *et al.*, 2022). Wie bereits erwähnt, gilt ADAM17 als zentraler Mediator der ICAM-1-Spaltung (Tsakadze *et al.*, 2006). Dennoch wird auch ADAM10 eine Rolle in der Regulation zugeschrieben – eine Hierarchie, die wir in unseren Ergebnissen ebenfalls beobachten konnten, wobei die Hemmung von ADAM17 mit einer stärkeren Signifikanz zu einer Reduktion führte als die Hemmung von ADAM10 (Morsing *et al.*, 2021). Der dominierende Einfluss von ADAM17 könnte darauf hindeuten, dass ADAM10 indirekt in die ICAM-1-Regulation involviert ist – möglicherweise durch die Beeinflussung anderer proinflammatorischer Signalwege oder durch Interaktionen mit ADAM17.

Im Gegensatz zu ICAM-1 zeigte JAM-A nach LPS-Inhalation eine verstärkte junctionale Expression. Dies könnte eine adaptive Barriereantwort des Gewebes auf die entzündliche Schädigung widerspiegeln. Die Hemmung von ADAM-Proteasen führte zu einer signifikanten Reduktion der JAM-A-Expression. Da JAM-A eine duale Funktion hat – sowohl als Adhäsionsmolekül als auch als Modulator der Barrierefunktion – könnte dieser Befund auf eine bislang wenig beachtete Rolle von ADAM10 und ADAM17 in der Regulation von Zell-Zell-Kontakten hinweisen. Dies deckt sich mit Studien, die ADAM10 und ADAM17 in der Freisetzung von löslichem JAM-A involvierten (Koenen *et al.*, 2009, Dreytmueller *et al.*, 2012). *In vitro* wurde zudem gezeigt, dass mechanischer Stress die ADAM10/17-abhängige Freisetzung von JAM-A förderte, was zu einer Reduktion der Zellkontakte führte (Grannemann *et al.*, 2023). Die funktionellen Implikationen dieser Veränderungen sind nicht abschließend geklärt. Während eine verstärkte JAM-A-Expression potenziell zur Barriereerhaltung beitragen könnte, ist unklar, ob ihre Reduktion unter ADAM-Hemmung vorteilhaft oder nachteilig für die Gewebeintegrität ist. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu klären, ob die

Regulation von JAM-A durch ADAM-Proteasen eher eine direkte oder eine kompensatorische Antwort auf die Entzündungsreaktion darstellt.

Ein weiterer relevanter Marker für die Endothelbarriere ist VE-Cadherin, dessen proteolytische Spaltung als Indikator für Endothelzellaktivierung und Barrierschädigung gilt (Vestweber et al., 2009, Flemming et al., 2015, Liao et al., 2023). Unsere Ergebnisse zeigten, dass die LPS-Inhalation zu einer erhöhten VE-Cadherin-Expression führte, die durch die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 reduziert wurde. Dies könnte auf eine verstärkte Zellaktivierung und eine damit verbundene protektive Hochregulation von VE-Cadherin in der frühen Entzündungsphase hinweisen. Donners *et al.* zeigten, dass insbesondere ADAM10 die VE-Cadherin-Spaltung förderte und die Kapillarleckage verstärkte (Donners et al., 2010). In Übereinstimmung damit reduzierten Schulz *et al.* durch die Hemmung von ADAM10 sowohl die Freisetzung löslicher Ektodomänen als auch den endothelialen Barrierschaden, während Flemming *et al.* in Sepsismodellen die entzündungsbedingten Barriere-defizite durch ADAM10-Inhibition abschwächten (Schulz et al., 2008, Flemming et al., 2015). Unsere Daten legen nahe, dass auch ADAM17 in diesen Mechanismus involviert sein könnte. Dies erweitert das bisherige Verständnis der Rolle von ADAM-Proteasen in der VE-Cadherin-Regulation und bedarf weiterer Untersuchungen.

Zusammenfassend belegen unsere Ergebnisse, dass ADAM10 und ADAM17 eine zentrale Rolle in der Regulation der Lungenbarriere spielen. Ihre Hemmung reduzierte die LPS-induzierte Permeabilitätssteigerung, stabilisierte die Expression von Tight-Junction-Proteinen und modulierte die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und JAM-A. Diese Befunde unterstreichen das Potenzial einer gezielten ADAM-Inhibition zur Begrenzung entzündungsbedingter Gewebeschäden. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die Mechanismen dieser protektiven Effekte genauer zu charakterisieren und mögliche therapeutische Strategien abzuleiten.

Während diese Beobachtungen die strukturelle Integrität der Lungenbarriere betreffen, stellt sich im nächsten Schritt die Frage, wie diese Veränderungen auf zellulärer Ebene zur indirekten Modulation der Entzündungsantwort beitragen.

Der folgende Abschnitt widmet sich daher der Rolle der ADAM-Proteasen in der Interaktion von PMNs und Thrombozyten, sowie der Bildung von PNCs.

4.3.2. Reduktion der Thrombozyten-Neutrophilen-Interaktion und PNC-Bildung

Nachdem im vorangegangenen Abschnitt die Rolle von ADAM10 und ADAM17 in der Regulation der PMN-Migration thematisiert wurde, richtet sich der Fokus nun auf die spezifische Interaktion zwischen Thrombozyten und PMNs sowie deren Komplexbildung – ein zentrales Element der akuten inflammatorischen Antwort bei Lungenverletzungen.

Thrombozyten sind nicht nur an der primären Hämostase beteiligt, sondern übernehmen auch wichtige Funktionen bei der Immunantwort und der Rekrutierung von Neutrophilen (Rossaint *et al.*, 2018). Bei einer akuten Lungenverletzung wurden ihre Sequestrierung, Aktivierung und intraalveoläre Akkumulation als zentrale Mechanismen identifiziert (Ortiz-Muñoz *et al.*, 2014). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 eine entscheidende Rolle bei der Regulation dieser Prozesse spielen.

In Anlehnung an Cleary *et al.* bestätigte unser Modell die LPS-induzierte Rekrutierung von Thrombozyten in die Lunge und in die BAL innerhalb von 24 Stunden (Cleary *et al.*, 2020). Die Hemmung von ADAM10 und insbesondere ADAM17 reduzierte die Thrombozytenzahlen in diesen Kompartimenten signifikant. Somit deutet unsere Arbeit erstmals darauf hin, dass ADAM17 eine Schlüsselfunktion in der Thrombozytenrekrutierung in das Lungengewebe einnimmt.

Darüber hinaus beeinflusste die Hemmung beider ADAM-Proteasen auch die Bildung von PNCs, welche in der Pathophysiologie des ARDS eine wesentliche Rolle spielen. Während LPS die PNC-Zahl erwartungsgemäß erhöhte, reduzierte die Inhibition von ADAM10, ADAM17 oder beider Proteasen diese signifikant.

Die Aktivierung von Endothelzellen begünstigt die Bildung von PNCs, ein charakteristisches Merkmal des ARDS. Diese Komplexe erhöhen synergistisch die Gefäßpermeabilität, insbesondere in der pulmonalen Mikrozirkulation, wo sie nach akuter Lungenverletzung im Blut und den Alveolarkompartimenten zunehmen (Matthay *et al.*, 2019, Ortiz-Muñoz *et al.*, 2014). ADAM10 und ADAM17 regulieren

diese Prozesse durch das Shedding von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und proinflammatorischen Mediatoren wie TNF- α , die die Interaktion zwischen Thrombozyten und Neutrophilen fördern.

Ein Anstieg der PNC-Zahlen wurde auch bei Bakteriämie und Sepsis beobachtet, wobei bei schwerer Sepsis mit Multiorganversagen eine Reduktion der PNCs auf eine Erschöpfung der Immunantwort hinwies (Johansson *et al.*, 2011, Gawaz *et al.*, 1997). Tiermodelle zeigten, dass ADAM17 durch die Spaltung des membranständigen CX3CL1 dessen Verfügbarkeit für CX3CR1-vermittelte Signale reduzierte. Diese verringerte CX3CL1/CX3CR1-Achsenaktivität fördert wiederum die Bildung von PNCs und verstärkt entzündliche Reaktionen, wie bei akuter Peritonitis beobachtet (Ngamsri *et al.*, 2021). Analog wird bei myokardialer Schädigung infolge eines Myokardinfarkts eine erhöhte PNC-Bildung beobachtet, die die Migration von PMNs in geschädigtes Gewebe fördert und somit die entzündliche Antwort verstärkt (Köhler *et al.*, 2020).

Regulation relevanter Selektine im Rahmen der Neutrophilen-Thrombozyten-Interaktion

Zur Untersuchung des Einflusses von ADAM10 und ADAM17 auf die PMN-Thrombozyten-Interaktion wurden Selektin-abhängige Bindungen (P-Selektin/PSGL-1, PSGL-1/L-Selektin) analysiert (Abbildung 40). Diese Mechanismen spielen eine zentrale Rolle bei der Neutrophilenrekrutierung, wie bereits in früheren Studien beschrieben (Page and Pitchford, 2013, Zarbock *et al.*, 2007).

Unsere Ergebnisse zeigen eine gewebespezifische Regulation von L-Selektin, P-Selektin und PSGL-1 während der LPS-induzierten Entzündung, was auf eine komplexe Steuerung hinweist. Während ADAM17 bekanntermaßen L-Selektin in der Zelladhäsion moduliert (Tang *et al.*, 2011, Mishra *et al.*, 2017), deuten unsere Daten darauf hin, dass zusätzliche Mechanismen zur Regulation der Selektine beitragen.

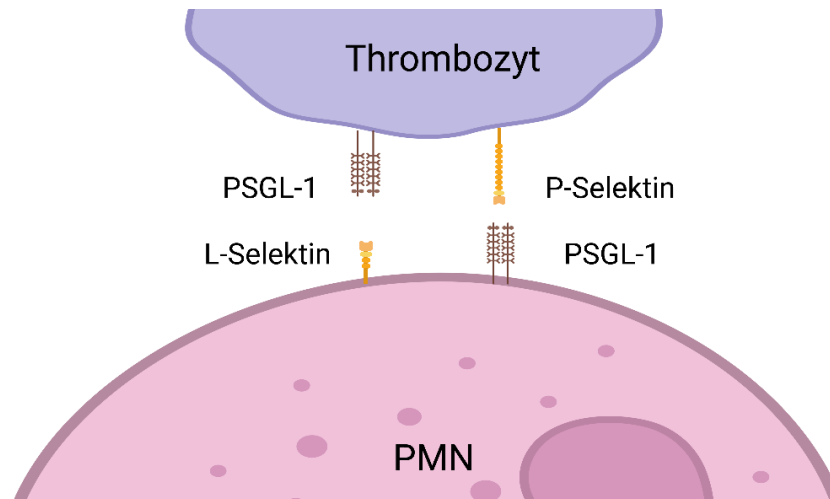


Abbildung 40: Interaktion zwischen Thrombozyt und PMN auf molekularer Ebene.

Interaktion zwischen Thrombozyt und PMN auf molekularer Ebene. Schematische Darstellung der Interaktion eines Thrombozyten mit einem PMN mittels P-Selektin und PSGL-1. Diese Wechselwirkung vermittelt das Rollen von Neutrophilen auf aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen in der Mikrozirkulation. PSGL-1 auf Neutrophilen bindet mit hoher Affinität an das von aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen exprimierte P-Selektin, was für die Aktivierung und das Rollen der PMNs entscheidend ist. PMNs exprimieren wiederum L-Selektin, das an das PSGL-1 der Thrombozyten bindet. PMN = polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt; PSGL-1 = P-Selektin Glykoprotein Ligand-1; Eigene Darstellung angelehnt an Moore *et al* und McEver *et al*. (Moore *et al*, 1995, McEver, 2015).

PSGL-1 spielt eine zentrale Rolle in der Interaktion zwischen PMNs und Thrombozyten, indem es sowohl P-Selektin auf Thrombozyten als auch L-Selektin auf Neutrophilen bindet (Ley *et al*, 2007). In dieser Studie wurde gezeigt, dass die CD162-Expression (PSGL-1) auf PMNs nach LPS-Stimulation intravasal signifikant reduziert war. Eine Hemmung von ADAM10 oder ADAM17 führte zu einer erhöhten PSGL-1-Expression, während die kombinierte Hemmung beider Proteasen keinen zusätzlichen Effekt zeigte. Dies könnte darauf hindeuten, dass sowohl ADAM10 als auch ADAM17 zur proteolytischen Spaltung von PSGL-1 beitragen, jedoch keine additive Wirkung haben. Auffällig war zudem, dass sich in den adhären PMNs am Endothel keine Unterschiede in der PSGL-1-Expression zeigten, was auf eine Gewebespezifität der Regulation hindeutet. Im Lungenginterstitium wurde eine signifikante Erhöhung der Expression nach kombinierter Hemmung von ADAM10 und ADAM17 beobachtet, während die Einzelinhibition keinen Effekt hatte. Dies deutet auf ein differenziertes Regulationsmuster in den verschiedenen Lungenkompartimenten hin.

L-Selektin ist ein Schlüsselmolekül der Leukozytenadhäsion und wird durch ADAM17 von der Oberfläche der PMNs gespalten (Tang *et al.*, 2011). Unsere Durchflusszytometrie zeigte, dass eine Hemmung von ADAM10 oder ADAM17 intravasal zu einer signifikanten Steigerung der L-Selektin-Expression führte. Während im Lungeninterstitium und bei am Endothel adhären PMNs nach ADAM10-Inhibition eine Reduktion der Expression beobachtet wurde. Dies deutet darauf hin, dass ADAM10 in späteren Migrationsschritten eine Rolle spielt.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine erhöhte L-Selektin-Expression auf intravasalen PMNs mit einer reduzierten Migration einhergeht. Diese Beobachtung wird von Rahman *et al.* unterstützt, die L-Selektin als entscheidend für die transendotheliale Migration beschrieben und eine persistente Expression mit einer Hemmung dieses Prozesses in Verbindung brachten (Rahman *et al.*, 2021). Cappenberg *et al.* berichteten, dass die Blockade des L-Selektin-Sheddings die bakterielle Clearance in der Lunge beeinträchtigte, was auf eine eingeschränkte Migration und Funktion der Neutrophilen hinweist (Cappenberg *et al.*, 2019). Ebenso zeigten Venturi *et al.*, dass das Shedding von L-Selektin die Leukozytenmigration regulierte und eine reduzierte Abspaltung die intravasale Retention verstärken könnte, was mit unseren Ergebnissen konsistent ist (Venturi *et al.*, 2003).

Unsere Daten stützen daher die Hypothese, dass eine erhöhte L-Selektin-Expression die Migration hemmen könnte. Die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 scheint entscheidend für die Regulation des L-Selektin-Sheddings und die Steuerung der Leukozytenmigration zu sein. Weitere funktionelle Analysen sind nötig, um diesen Zusammenhang experimentell zu bestätigen.

Im Gegensatz zu den deutlichen Effekten auf PSGL-1 und L-Selektin war die Expression von P-Selektin auf Thrombozyten weitgehend unbeeinflusst durch die Hemmung von ADAM10 und ADAM17. Lediglich im Lungengewebe wurde eine Erhöhung der CD62P-Expression nach ADAM17-Inhibition festgestellt. Dies könnte darauf hinweisen, dass ADAM17 eine spezifische Rolle in der Modulation von P-Selektin auf Thrombozyten in bestimmten Geweben spielt. Vergleichbare Literatur gibt es hierzu nicht.

Die Regulation von PSGL-1, L-Selektin und P-Selektin durch ADAM10 und ADAM17 ist komplex und kontextabhängig. Die Daten deuten darauf hin, dass beide Proteasen unterschiedliche Phasen der PMN-Migration beeinflussen. Insbesondere variieren ihre Effekte je nach intravasaler, adhärenter oder interstitieller Lokalisation der PMNs. Die in Abbildung 40 dargestellten Interaktionen zwischen Thrombozyten und PMNs unterstreichen die Bedeutung von P-Selektin und PSGL-1 für die PMN-Migration. Die proteolytische Modifikation dieser Moleküle könnte entzündliche Prozesse beeinflussen und potenziell therapeutisch genutzt werden.

4.4. Translationale Bedeutung und weiterführende Forschung

4.4.1. Zellspezifische Effekte und Interaktionen von ADAM10 und ADAM17

Die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 sind bekannte Mediatoren der Entzündungsantwort, insbesondere im pulmonalen Kontext. Mehrere Studien lieferten bereits Hinweise auf eine Beteiligung beider Proteasen an der Regulation von Immunzellfunktionen sowie der Integrität der Endothelbarriere (Dreymueller et al., 2012, Dreymueller et al., 2015, Grannemann et al., 2023). Der genaue zelltypspezifische Einfluss und das Zusammenspiel dieser beiden Proteasen im akuten inflammatorischen Geschehen der Lunge blieben jedoch bisher unzureichend verstanden.

Unsere Untersuchungen zeigten eine komplexe Wechselwirkung zwischen ADAM10 und ADAM17, die je nach Zelltyp variierte. So führte die Hemmung von ADAM10 24 Stunden nach LPS-Inhalation zu einer erhöhten ADAM10-Expression auf PMNs – möglicherweise als kompensatorische Reaktion. Gleichzeitig reduzierte die Hemmung von ADAM10, ADAM17 sowie deren Kombination die ADAM17-Expression auf PMNs, was auf eine wechselseitige Beeinflussung hindeutet.

In Endothelzellen wurde nach LPS-Inhalation eine erhöhte Expression beider Proteasen beobachtet, während deren Inhibition – insbesondere von ADAM10 – zu einer Reduktion der ADAM17-Expression führte. Im Gegensatz dazu zeigten

Thrombozyten nur eine geringe ADAM10-Expression, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies weist auf eine untergeordnete Rolle dieser Protease in Thrombozyten hin.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Arbeit von Dreymueller *et al.*, die eine verstärkte Expression beider Proteasen in mikrovaskulären Endothelzellen nach LPS-Stimulation beschrieben (Dreymueller *et al.*, 2012). Auch frühere Studien wie von van Tetering *et al.* und Maretzky *et al.* identifizierten ADAM10 als zentralen Regulator zellulärer Signalwege (van Tetering *et al.*, 2009, Maretzky *et al.*, 2005). Unsere Daten erweitern dieses Bild, indem sie eine regulatorische Rolle von ADAM10 auch in der Steuerung der ADAM17-Expression in bestimmten Zelltypen nahelegen.

Insgesamt deuten unsere Ergebnisse auf eine zelltypspezifische Regulation und eine funktionelle Interaktion zwischen ADAM10 und ADAM17 hin, insbesondere in PMNs und Endothelzellen. Diese wechselseitige Beeinflussung könnte therapeutisch nutzbar sein, um gezielt Entzündungsprozesse bei akuten Lungenerkrankungen wie dem ARDS zu modulieren.

Im folgenden Abschnitt analysieren wir daher, inwiefern diese zellulären Effekte in funktionelle Konsequenzen auf die pulmonale Entzündung übergehen – insbesondere mit Blick auf synergistische und differenzierte Effekte der Proteasenhemmung.

4.4.2. Funktionelle Unterschiede und Synergien in der pulmonalen Entzündungsantwort

Die zellspezifische Expression von ADAM10 und ADAM17 weist auf eine differenzielle Beteiligung beider Proteasen an der Regulation der akuten pulmonalen Entzündungsantwort hin. Unsere Untersuchungen belegen, dass deren pharmakologische Inhibition protektive Effekte vermittelt - darunter eine Stabilisierung der Endothelbarriere, reduzierte PMN-Transmigration sowie eine verminderte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren. Diese Effekte traten sowohl bei isolierter als auch bei kombinierter Hemmung auf, wobei letztere häufig eine

Verstärkung der protektiven Wirkungen zur Folge hatte. Dies deutet auf additive oder synergistische Mechanismen hin.

Abbildung 41 veranschaulicht diese funktionellen Unterschiede und Überlappungen schematisch. Besonders hervorzuheben ist Panel D, das ausschließlich Veränderungen zeigt, die bei Inhibition beider Proteasen unabhängig voneinander beobachtet wurden – ein Hinweis auf synergistische Funktionen.

Neben diesen Überschneidungen zeigten sich jedoch deutliche funktionelle Unterschiede. So induzierte ADAM10 spezifische Effekte auf die Expression von L-Selektin, Mac-1 und CD44 auf PMN, während diese Marker unter ADAM17-Hemmung unverändert bleiben. Im Gegensatz dazu war ADAM17 stärker an der Thrombozytenrekrutierung beteiligt und zeigte kaum Einfluss auf Integrin-assoziierte Moleküle der PMNs (C). Auch die Chemokinfreisetzung unterschied sich: Während ADAM10 primär die Freisetzung von CXCL1 regulierte, beeinflussten beide Proteasen die Expression von CXCL2.

Ein weiterer interessanter Befund ist die asymmetrische Regulation zwischen den Proteasen: ADAM10 beeinflusste die Expression von ADAM17 in neutrophilen und endothelialen Zellen, während umgekehrt kein Effekt nachweisbar war. Dies deutet auf eine hierarchische Beziehung hin, die möglicherweise auf transkriptioneller oder posttranslationaler Ebene vermittelt wird.

Diese funktionellen Unterschiede könnten erklären, warum die MPO-Aktivität ausschließlich durch die Hemmung von ADAM10 und nicht durch die Hemmung von ADAM17 reduziert wurde. Dies legt nahe, dass ADAM17 in diesem Prozess keine primär steuernde, sondern eher eine indirekte oder unterstützende Rolle spielt. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit einer Studie, die ADAM10 als zentralen Regulator der Leukozytenmigration und -aktivierung identifizierte, während ADAM17 eher unterstützende Funktionen in der Frühphase der Entzündungsantwort übernahm (Pruessmeyer *et al.*, 2014).

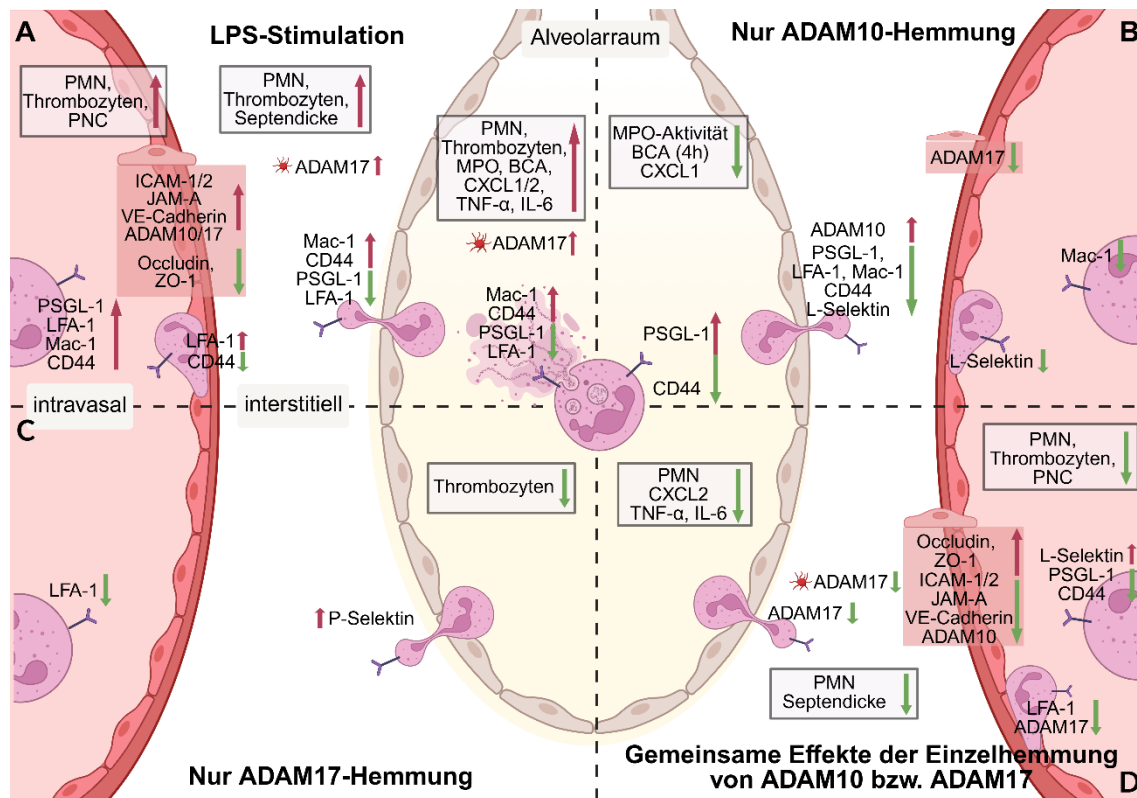


Abbildung 41: Funktionelle Unterschiede und gemeinsame Effekte der ADAM10- und ADAM17-Hemmung auf die pulmonale Entzündungsantwort

Schematische Darstellung der durch Lipopolysaccharid (LPS) induzierten inflammatorischen Prozesse (A) sowie der spezifischen Effekte einer ADAM10-Hemmung (B) und ADAM17-Hemmung (C). Panel D zeigt ausschließlich Veränderungen, die sowohl bei Hemmung von ADAM10 als auch von ADAM17 jeweils einzeln beobachtet wurden. Eine kombinierte Hemmung ist nicht dargestellt. Intravasale, interstitielle und alveoläre Effekte sind räumlich differenziert. In allen Panels sind polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) exemplarisch entlang aller transmigratorischen Schritte abgebildet. Gezeigt werden jeweils die untersuchten Oberflächenmoleküle auf PMN sowie die Expression inflammatorisch relevanter Moleküle auf Endothelzellen (roter Kasten). Farbcodierte Pfeile kennzeichnen die Richtung der Veränderung (↑ Zunahme, ↓ Abnahme). PNC = Plättchen-Neutrophilen-Komplexe; ICAM = *intercellular adhesion molecule*; JAM-A = *junctional adhesion molecule A*, VE-Cadherin = *vascular endothelial cadherin*; ADAM – a disintegrin and metalloproteinase; ZO-1 = zonula occludens-1; PSGL-1 = P-selectin glycoprotein ligand-1; LFA-1 – *lymphocyte function-associated antigen-1*; Mac-1 = *macrophage antigen-1*; CD44 = *cluster of differentiation 44*; MPO = Myeloperoxidase-Aktivität; BCA = *bicinchoninic acid assay* (zur Bestimmung der Proteinkonzentration); CXCL1/2 = *C-X-C motif chemokine ligand 1/2*; TNF- α = Tumornekrosefaktor alpha, IL-6 = Interleukin-6. Eigene Darstellung

Abbildung 41 verdeutlicht somit nicht nur die funktionelle Arbeitsteilung, sondern auch die potenziell hierarchische Beziehung beider Proteasen. ADAM10 übernimmt zentrale Funktionen in der Adhäsions- und Aktivierungskaskade von PMNs, während ADAM17 stärker mit thrombozytären Prozessen und der frühen Mediatorfreisetzung assoziiert ist. Diese differenzierten Funktionen könnten

Ansatzpunkte für eine gezielte therapeutische Modulation der inflammatorischen Kaskade bieten.

Im Folgenden wird untersucht, ob sich diese Mechanismen auch in einem nicht-infektiösen Modell, der ventilationsinduzierten Lungenschädigung (VILI), widerspiegeln.

4.4.3. Schutz vor ventilationsbedingten Lungenschäden (VILI) und weiterführende Forschung

Neben infektiösen Ursachen stellt die mechanische Beatmung eine zentrale nicht-infektiöse Ursache für akute Lungenschädigung dar und trägt wesentlich zur Pathogenese des ARDS bei (Ak and Anjum, 2023). Das Konzept der ventilations-induzierten sterilen Lungenschädigung (engl. *Ventilation-induced lung injury*, VILI) beschreibt eine sterile Entzündungsreaktion, die durch Überdehnung und mechanische Stressfaktoren ausgelöst wird. Während die Rolle protektiver Beatmungsstrategien klinisch gut belegt ist, sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht vollständig verstanden (Brower et al., 2000).

Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine Überdruckbeatmung im murinen Modell – im Sinne eines sterilen VILI – eine signifikante PMN-Migration sowie eine Zunahme der Septendicke verursachte. Diese morphologischen Veränderungen spiegelten eine gesteigerte inflammatorische Aktivität wider.

Vergleichbare Befunde wurden bereits von Liu *et al.* beschrieben, die in einem Rattenmodell zeigten, dass hohe Tidalvolumina mit strukturellen Lungenschäden einhergingen, während eine lungenprotektive Beatmung diese Effekte verhinderte (Liu *et al.*, 2014). Auch klinische Daten von Brower *et al.* untermauerten diese Beobachtungen, indem sie eine Reduktion der ARDS-Mortalität durch niedrigere Beatmungsdrücke dokumentierten (Brower *et al.*, 2000).

Unsere Studie ergänzte diese Erkenntnisse um einen molekularen Mechanismus. Die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 reduzierte sowohl die PMN-Migration als auch die Septendicke signifikant. Dies deutet darauf hin, dass die proteolytische Aktivität dieser Metalloproteinasen maßgeblich an der beatmungsinduzierten Entzündungsantwort beteiligt ist. Grannemann *et al.* zeigten zudem, dass mechanische Dehnung mechanosensitive Kationenkanäle aktivierte,

welche wiederum die Aktivität von ADAM10 und ADAM17 erhöhten. Ein Prozess, der die epitheliale Barrierefunktion störte und die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren begünstigte (Grannemann *et al.*, 2023). Unsere Ergebnisse stehen somit in enger Übereinstimmung mit dieser mechanistischen Sichtweise und erweitern sie um den funktionellen Zusammenhang zwischen ADAM-Aktivität und struktureller Lungenschädigung.

Zusammenfassend legen unsere Daten nahe, dass die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 einen bislang unterschätzten Beitrag zur Pathogenese ventilation-sinduzierter Lungenschädigung leistet. Ihre pharmakologische Inhibition reduziert nicht nur die PMN-Migration, sondern auch strukturelle Zeichen der Gewebeschädigung wie die Septendicke. Diese Erkenntnisse stellen eine wichtige Ergänzung zu bisherigen Studien dar, die sich primär auf mechanische Parameter der Beatmung konzentrierten. Unsere Daten verknüpfen diese phänotypischen Veränderungen mit konkreten molekularen Mechanismen.

Im folgenden Abschnitt diskutieren wir, welche methodischen Einschränkungen bei der Interpretation dieser Daten zu berücksichtigen sind und welche Relevanz diese Ergebnisse für klinische Anwendungen haben könnten.

4.4.4. Methodische Überlegungen: Interpretation und klinische Relevanz

Die vorliegende Studie untersuchte die Rolle der Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 in der Regulation der pulmonalen Entzündungsantwort und deren potenzielle therapeutische Relevanz im Kontext des ARDS. Die selektive Inhibition dieser Proteasen stellt einen vielversprechenden Ansatz dar, um überschießende inflammatorische Prozesse zu dämpfen, die Integrität der alveolokapillären Barriere zu erhalten und Gewebeschädigungen zu begrenzen. Zelltypspezifische Strategien könnten die Wirksamkeit weiter erhöhen, indem gezielt Endothelzellen oder PMNs moduliert werden. Eine Kombination mit etablierten antiinflammatorischen Substanzen könnte zudem synergistische Effekte erzielen.

Trotz der gewonnenen Erkenntnisse sind einige methodische Einschränkungen zu berücksichtigen. Tiermodelle erlauben zwar die Analyse zentraler pathophysiologischer Mechanismen, bilden jedoch nicht die gesamte Komplexität des menschlichen ARDS ab (Matute-Bello *et al.*, 2008). Unterschiede in

Immunantworten, Pharmakokinetik sowie in der Reaktion auf mechanische Beatmung zwischen Maus und Mensch schränken die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den klinischen Kontext ein.

Darüber hinaus ergeben sich auf Grundlage unserer Daten weiterführende mechanistische Fragestellungen: Inwieweit beruhen die beobachteten Unterschiede zwischen ADAM10 und ADAM17 auf substratspezifischen Eigenschaften? Welche Bedeutung haben der Zelltyp, die subzelluläre Lokalisation und kontextabhängige, umgebungsbezogene Signale für deren Aktivierung und Funktion? Auch die Übertragbarkeit auf chronisch-inflammatorische oder systemische Modelle bleibt bislang offen und sollte in zukünftigen Studien adressiert werden.

Ein weiterer relevanter Aspekt betrifft den Zeitpunkt der Intervention. In dem verwendeten Modell erfolgte die Proteaseninhibition prophylaktisch, also vor Induktion der Entzündung – ein in präklinischen Studien gängiger, aber in klinischen Alltag nicht realistischer Ansatz. Therapeutische Maßnahmen werden in der Regel erst nach Krankheitsausbruch eingeleitet, weshalb der Zeitpunkt der Hemmung entscheidenden Einfluss auf deren Effektivität hat. Künftige Untersuchungen sollten deshalb auch postentzündliche Inhibitionsstrategien evaluieren.

Ein wesentlicher Schritt in der Translation unserer Ergebnisse ist die Identifikation der optimalen Dosierungsstrategie, der geeignete Applikationszeitpunkt, sowie eine umfassende Sicherheitsbewertung im Rahmen von Langzeit- und klinischen Studien. Dabei wäre insbesondere zu untersuchen, wie sich eine frühe versus späte Inhibition auf die Krankheitsdynamik auswirkt und welche Effekte eine selektive Hemmung auf unterschiedliche Zelltypen im Kontext von ARDS und VILI entfaltet.

Neben der klassischen inflammatorischen Kaskade könnten auch mechanosensitive Prozesse – wie sie etwa im VILI-Modell relevant sind – neue therapeutische Zielstrukturen bieten. Die Aktivierung von ADAM10 und ADAM17 durch mechanische Dehnung sowie deren Rolle in der dehnungsinduzierten Entzündungsantwort eröffnen Perspektiven für Interventionen, die nicht nur biochemische sondern auch biomechanische Krankheitsfaktoren adressieren.

Insgesamt leistet die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum besseren Verständnis der differenzierten Funktionen von ADAM10 und ADAM17 in der akuten pulmonalen Inflammation. Sie schafft eine Grundlage für zukünftige translational orientierte Forschung und könnte langfristig zur Entwicklung neuer, zielgerichteter Therapien im Umgang mit ARDS und VILI beitragen.

4.5. Fazit und Implikationen für zukünftige Forschung

Die vorliegende Studie liefert neue Erkenntnisse zur Rolle von ADAM10 und ADAM17 im Rahmen des ARDS. Beide Proteasen sind maßgeblich an der Regulation der Entzündungsreaktion und der epithelialen sowie endothelialen Barrierefunktion beteiligt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine gezielte Hemmung dieser Proteasen zu einer signifikanten Reduktion der Entzündung und der Barriereinstabilität führt. Dennoch bleiben zentrale Fragen hinsichtlich der genauen Aktivierungsmechanismen, der Signalwege und der zelltypspezifischen Effekte offen.

Zukünftige Studien sollten sich verstärkt auf die molekularen Mechanismen konzentrieren, die die Aktivität und Regulation von ADAM10 und ADAM17 steuern. Eine detaillierte Aufklärung dieser Prozesse könnte zur Identifikation neuer therapeutischer Zielstrukturen führen und die Entwicklung spezifischer, selektiv wirksamer Inhibitoren ermöglichen.

Ein vielversprechender Ansatz ist die zelltypspezifische Modulation dieser Proteasen. Die in dieser Studie beobachteten protektiven Effekte durch ADAM-Hemmung deuten darauf hin, dass eine präzise Steuerung, abgestimmt auf spezifische Zelltypen wie Alveolarepithelzellen oder Endothelzellen, die entzündliche Gewebeschädigung gezielt begrenzen könnte, ohne dabei essenzielle Funktionen in anderen Geweben zu beeinträchtigen.

Die gegenseitige Regulation von ADAM10 und ADAM17 in unterschiedlichen Zellpopulationen stellt ein weiteres relevantes Forschungsfeld dar. Erste Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe mit zelltypspezifischen Knockout-Mäusen liefern bereits Hinweise auf differenzierte Funktionen der Proteasen unter pathologischen Bedingungen. Diese Erkenntnisse könnten ein tieferes Verständnis der molekularen Pathomechanismen im ARDS ermöglichen.

Zudem sollte in künftigen Studien die mechanosensitive Aktivierung von ADAM10 und ADAM17, insbesondere im Kontext der Überdruckbeatmung, stärker berücksichtigt werden. Dies könnte zur Entwicklung personalisierter Beatmungsstrategien beitragen, um das Risiko von ventilationsinduzierten Lungenschäden weiter zu reduzieren.

Ein bislang wenig beachteter, aber entscheidender Aspekt ist die Untersuchung der Langzeitfolgen einer ADAM-Hemmung. Bislang ist unklar, wie sich eine dauerhafte oder wiederholte Modulation dieser Proteasen auf die Lungenfunktion und andere Organsysteme auswirkt. Langzeitstudien sind daher essenziell, um die Sicherheit und potenzielle Nebenwirkungen dieser Therapieansätze umfassend zu bewerten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ADAM10 und ADAM17 vielversprechende therapeutische Zielstrukturen im Kontext des ARDS darstellen. Die zukünftige Forschung sollte sich auf die zelltypspezifische Modulation, die Aufklärung der molekularen Signalwege und Aktivierungsmechanismen, die Rolle mechanosensitiver Reize bei der Proteasenregulation und der Evaluation von Langzeiteffekten einer proteasenspezifischen Hemmung konzentrieren. Die Berücksichtigung dieser Faktoren könnte entscheidend zur Entwicklung neuer, präziser Therapiestrategien beitragen – mit dem Ziel, die Prognose von Patient*innen mit ARDS nachhaltig zu verbessern.

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Funktionen der ADAM-Proteasen ADAM10 und ADAM17 in der akuten pulmonalen Entzündungsantwort beim ARDS untersucht - insbesondere im Hinblick auf deren Einfluss auf die Migration neutrophiler Granulozyten (PMNs). Ziel war es, die zelltypspezifischen Rollen beider Metalloproteinasen im Kontext der neutrophilen Inflammation und der Integrität der alveolokapillären Barriere zu charakterisieren, sowie ihre potenzielle Bedeutung als therapeutische Zielstrukturen zu evaluieren.

Mithilfe des LPS-induzierten Mausmodells sowie verschiedener zellbiologischer und histologischer Methoden wurde gezeigt, dass die Hemmung von ADAM10 und ADAM17 zu einer signifikanten Reduktion der PMN-Transmigration, einer Stabilisierung der alveolokapillären Barriere und einer verminderten Expression proinflammatorischer Mediatoren führte. Darüber hinaus zeigten sich differenzielle Effekte auf PMNs (z.B. L-Selektin, Mac-1, CD44), wobei insbesondere ADAM10 die Expression dieser Moleküle beeinflusste. ADAM17 hingegen war neben den überlappenden Funktionen vor allem an thrombozytären Prozessen sowie der initialen Freisetzung von Entzündungsmediatoren beteiligt.

Die kombinierte Inhibition beider Proteasen verstärkte die protektiven Effekte in mehreren Parametern, was auf additive oder synergistische Wirkmechanismen hinweist. Zudem wurde eine asymmetrische Regulation zwischen ADAM10 und ADAM17 beobachtet, bei der ADAM10 die Expression von ADAM17 modulierte, nicht jedoch umgekehrt – ein Befund, der auf eine hierarchische Interaktion beider Proteasen schließen lässt.

Insgesamt weisen die Ergebnisse auf eine funktionelle Arbeitsteilung zwischen ADAM10 und ADAM17 in der akuten Lungenentzündung hin und unterstreichen deren potenzielle Relevanz als differenzierbare therapeutische Angriffspunkte. Besonders die selektive Modulation von ADAM10 könnte ein vielversprechender Ansatz sein, um inflammatorische Prozesse gezielt zu regulieren, ohne dabei thrombozytäre oder systemische Funktionen wesentlich zu beeinträchtigen.

Für eine umfassende Bewertung sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, um die molekularen Grundlagen dieser Arbeitsteilung, ihre zeitliche Dynamik sowie ihre Übertragbarkeit auf andere Entzündungsmodelle – insbesondere nicht-infektiöse oder chronisch-inflammatorische Formen wie ventilationsinduzierte Lungenschädigung (VILI) – zu klären. Die vorliegenden Ergebnisse liefern damit eine fundierte Basis für zukünftige Forschungsansätze zur Rolle von ADAM-Proteasen in der inflammatorischen Pathophysiologie der Lunge und eröffnen Perspektiven für innovative Therapieansätze im ARDS.

6. Anhang

6.1. Ergänzende, nicht im Ergebnisteil dargestellte Befunde

Die folgenden Abbildungen und Analysen wurden aufgrund begrenzter Aussagekraft, hoher Variabilität oder inhaltlicher Redundanz mit bereits präsentierten Daten nicht in den zentralen Ergebnisteil aufgenommen. Sie werden hier zur Vollständigkeit dokumentiert.

CD162-Expression auf Endothelzellen

Zusätzlich zur Analyse der CD162-Expression auf PMNs (Vgl. Kapitel 3.1.1) wurde dieser Ligand auch auf Endothelzellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Nach LPS-Inhalation zeigte sich kein signifikanter Unterschied gegenüber der Kontrolle. Eine zusätzliche Behandlung mit GI254023X führte jedoch zu einer deutlichen Erhöhung, während GW280264X eine signifikante Reduktion der CD162-Expression bewirkte (Abbildung 42).

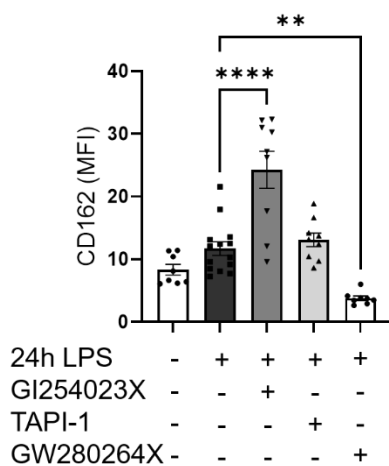


Abbildung 42: CD162-Expression auf Endothelzellen muriner Lungen.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD162 auf Endothelzellen der Lunge vergleichend zwischen null bzw. 24 Stunden nach LPS-Inhalation und LPS-Inhalation mit jeweils einem der drei Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 und GW280264X. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, $n = 8-14$.

HCAM-Expression auf Thrombozyten

Die Expression von HCAM auf Thrombozyten wurde in drei Kompartimenten analysiert (Abbildung 43). Intravasal führte die LPS-Stimulation zu einer signifikanten Expressionserhöhung, die durch ADAM17-Hemmung signifikant reduziert wurde (A). In der Lunge bewirkte die ADAM10-Hemmung eine signifikante Erhöhung der CD44-Expression, während die Hemmung von ADAM17 und die kombinierte Hemmung keinen Effekt zeigten (B). In der BAL führte die LPS-Inhalation zu einer Erhöhung der Expression, die durch die Inhibitoren jedoch nicht beeinflusst

wurde (C). Die insgesamt niedrige MFI und hohe Variabilität in allen Kompartimenten schränkten die Aussagekraft ein, sodass keine belastbaren Schlussfolgerungen zur HCAM-Expression auf Thrombozyten gezogen werden konnten.

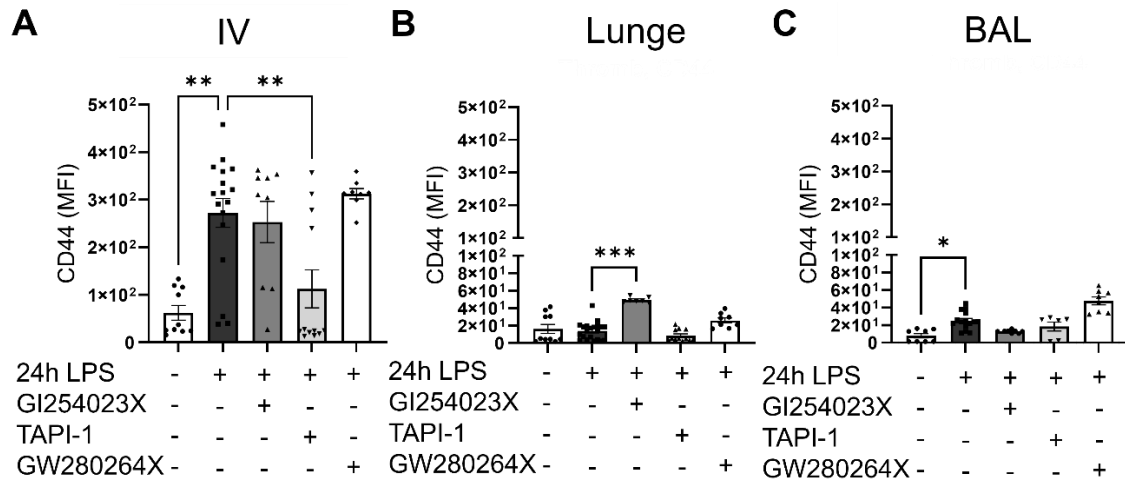


Abbildung 43: CD44 (HCAM) -Expression auf Thrombozyten während der Migration durch drei Kompartimente.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD44 (HCAM) auf Thrombozyten während der Migration durch drei Kompartimente vergleichend zwischen null bzw. 24 Stunden nach LPS-Inhalation und LPS-Inhalation mit jeweils einem der drei Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 und GW280264X. IV = Intravasal zirkulierende PMNs (A); Lunge = PMNs am Lungenendothel anhaftend und im Lungeninterstitium (B); BAL = PMNs im Alveolarraum (C). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 6-21$.

Epitheliale Transmembranproteine

Ergänzend zur Darstellung endothelialer Barriereproteine (Vgl. Kapitel 3.2) wurde auch deren Expression am Lungenepithel analysiert (Abbildung 44 + 45). Da die Veränderungen identisch zu denen am Endothel verliefen, wurden die epithel-spezifischen Ergebnisse aus Gründen der Redundanz aus dem Haupttext ausgelagert.

Die quantitativen Auswertungen zeigten bei Occludin, ZO-1, ICAM-1 und JAM-A vergleichbare Signifikanzniveaus wie an der Endothelbarriere, was auf eine parallele Regulation epithelialer und endothelialer Zell-Zell-Kontakte hinweist. Die genauere Ausführung der Ergebnisse kann im Kapitel 3.2 nachvollzogen werden.

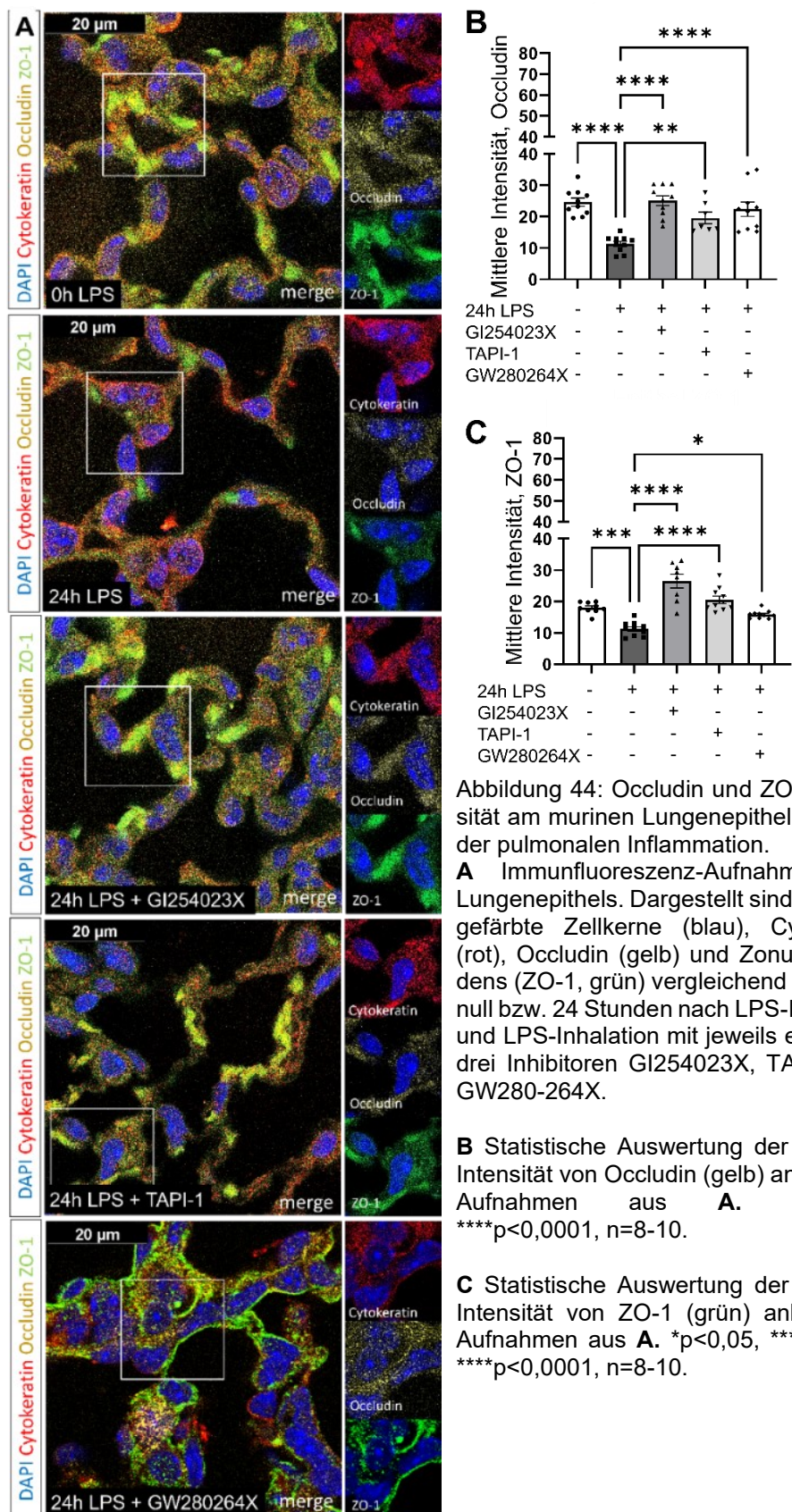


Abbildung 44: Occludin und ZO-1 -Intensität am murinen Lungenepithel während der pulmonalen Inflammation.

A Immunfluoreszenz-Aufnahmen des Lungenepithels. Dargestellt sind mit DAPI gefärbte Zellkerne (blau), Cytokeratin (rot), Occludin (gelb) und Zonula Occludens (ZO-1, grün) vergleichend zwischen null bzw. 24 Stunden nach LPS-Inhalation und LPS-Inhalation mit jeweils einem der drei Inhibitoren GI254023X, TAPI-1 und GW280-264X.

B Statistische Auswertung der mittleren Intensität von Occludin (gelb) anhand der Aufnahmen aus **A**. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$, $n = 8-10$.

C Statistische Auswertung der mittleren Intensität von ZO-1 (grün) anhand der Aufnahmen aus **A**. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, $n = 8-10$.

6.2. Literaturverzeichnis

- AK, A. K. & ANJUM, F. 2023. Ventilator-Induced Lung Injury (VILI). *StatPearls*. Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Fatima Anjum declares no relevant financial relationships with ineligible companies.: StatPearls Publishing
- Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.
- AMALAKUHAN, B., HABIB, S. A., MANGAT, M., REYES, L. F., RODRIGUEZ, A. H., HINOJOSA, C. A., SONI, N. J., GILLEY, R. P., BUSTAMANTE, C. A., ANZUETO, A., LEVINE, S. M., PETERS, J. I., ALIBERTI, S., SIBILA, O., CHALMERS, J. D., TORRES, A., WATERER, G. W., MARTIN-LOECHES, I., BORDON, J., BLANQUER, J., SANZ, F., MARCOS, P. J., RELLO, J., RAMIREZ, J., SOLÉ-VIOLÁN, J., LUNA, C. M., FELDMAN, C., WITZENRATH, M., WUNDERINK, R. G., STOLZ, D., WIEMKEN, T. L., SHINDO, Y., DELA CRUZ, C. S., ORIHUELA, C. J. & RESTREPO, M. I. 2016. Endothelial adhesion molecules and multiple organ failure in patients with severe sepsis. *Cytokine*, 88, 267-273.
- ANDEREGG, U., EICHENBERG, T., PARTHAUNE, T., HAIDUK, C., SAALBACH, A., MILKOVA, L., LUDWIG, A., GROSCHE, J., AVERBECK, M., GEBHARDT, C., VOELCKER, V., SLEEMAN, J. P. & SIMON, J. C. 2009. ADAM10 is the constitutive functional sheddase of CD44 in human melanoma cells. *J Invest Dermatol*, 129, 1471-82.
- ANDREW, D. P., SPELLBERG, J. P., TAKIMOTO, H., SCHMITS, R., MAK, T. W. & ZUKOWSKI, M. M. 1998. Transendothelial migration and trafficking of leukocytes in LFA-1-deficient mice. *Eur J Immunol*, 28, 1959-69.
- ARATANI, Y. 2018. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*, 640, 47-52.
- ARNDT, P. G., STRAHAN, B., WANG, Y., LONG, C., HORIUCHI, K. & WALCHECK, B. 2011. Leukocyte ADAM17 regulates acute pulmonary inflammation. *PLoS One*, 6, e19938.
- ASHBAUGH, D. G., BIGELOW, D. B., PETTY, T. L. & LEVINE, B. E. 1967. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, 2, 319-23.
- BECKER, K. A., FAHSEL, B., KEMPER, H., MAYERES, J., LI, C., WILKER, B., KEITSCH, S., SODDEMANN, M., SEHL, C., KOHNEN, M., EDWARDS, M. J., GRASSMÉ, H., CALDWELL, C. C., SEITZ, A., FRAUNHOLZ, M. & GULBINS, E. 2018. Staphylococcus aureus Alpha-Toxin Disrupts Endothelial-Cell Tight Junctions via Acid Sphingomyelinase and Ceramide. *Infect Immun*, 86.
- BELL, J. H., HERRERA, A. H., LI, Y. & WALCHECK, B. 2007. Role of ADAM17 in the ectodomain shedding of TNF-alpha and its receptors by neutrophils and macrophages. *J Leukoc Biol*, 82, 173-6.
- 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.
- BERNARD, G. R., ARTIGAS, A., BRIGHAM, K. L., CARLET, J., FALKE, K., HUDSON, L., LAMY, M., LEGALL, J. R., MORRIS, A. & SPRAGG, R. 1994. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*, 149, 818-24.
- BIAN, Z., GUO, Y., HA, B., ZEN, K. & LIU, Y. 2012. Regulation of the inflammatory response: enhancing neutrophil infiltration under chronic inflammatory conditions. *J Immunol*, 188, 844-53.
- BIOSCIENCE, B. 2012. Brochure BD FACS CANTO II.

- BOYLE, A. J., MADOTTO, F., LAFFEY, J. G., BELLANI, G., PHAM, T., PESENTI, A., THOMPSON, B. T., O'KANE, C. M., DEANE, A. M. & MCAULEY, D. F. 2018. Identifying associations between diabetes and acute respiratory distress syndrome in patients with acute hypoxemic respiratory failure: an analysis of the LUNG SAFE database. *Crit Care*, 22, 268.
- 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.
- CALFEE, C. S., MATTHAY, M. A., KANGELARIS, K. N., SIEW, E. D., JANZ, D. R., BERNARD, G. R., MAY, A. K., JACOB, P., HAVEL, C., BENOWITZ, N. L. & WARE, L. B. 2015. Cigarette Smoke Exposure and the Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit Care Med*, 43, 1790-7.
- CAPPENBERG, A., MARGRAF, A., THOMAS, K., BARDEL, B., MCCREEDY, D. A., VAN MARCK, V., MELLMANN, A., LOWELL, C. A. & ZARBOCK, A. 2019. L-selectin shedding affects bacterial clearance in the lung: a new regulatory pathway for integrin outside-in signaling. *Blood*, 134, 1445-1457.
- CHOI, H., FLEMING, N. W. & SERIKOV, V. B. 2007. Contact activation via ICAM-1 induces changes in airway epithelial permeability in vitro. *Immunol Invest*, 36, 59-72.
- CHONG, D. L. W., REBEYROL, C., JOSÉ, R. J., WILLIAMS, A. E., BROWN, J. S., SCOTTON, C. J. & PORTER, J. C. 2021. ICAM-1 and ICAM-2 Are Differentially Expressed and Up-Regulated on Inflamed Pulmonary Epithelium, but Neither ICAM-2 nor LFA-1: ICAM-1 Are Required for Neutrophil Migration Into the Airways In Vivo. *Front Immunol*, 12, 691957.
- CLEARY, S. J., RAUZI, F., SMYTH, E., CORREIA, A., HOBBS, C., EMERSON, M., PAGE, C. P. & PITCHFORD, S. C. 2020. Radiolabelling and immunohistochemistry reveal platelet recruitment into lungs and platelet migration into airspaces following LPS inhalation in mice. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 102, 106660.
- CONDON, T. P., FLOURNOY, S., SAWYER, G. J., BAKER, B. F., KISHIMOTO, T. K. & BENNETT, C. F. 2001. ADAM17 but not ADAM10 mediates tumor necrosis factor-alpha and L-selectin shedding from leukocyte membranes. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 11, 107-16.
- COPELAND, R. A. 2005. Evaluation of enzyme inhibitors in drug discovery. A guide for medicinal chemists and pharmacologists. *Methods Biochem Anal*, 46, 1-265.
- CORTEGIANI, A., MADOTTO, F., GREGORETTI, C., BELLANI, G., LAFFEY, J. G., PHAM, T., VAN HAREN, F., GIARRATANO, A., ANTONELLI, M., PESENTI, A. & GRASSELLI, G. 2018. Immunocompromised patients with acute respiratory distress syndrome: secondary analysis of the LUNG SAFE database. *Crit Care*, 22, 157.
- COSSARIZZA, A., CHANG, H. D., RADBRUCH, A. & AL., E. 2019. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies (second edition). *Eur J Immunol*, 49, 1457-1973.
- DE FILIPPO, K., DUDECK, A., HASENBERG, M., NYE, E., VAN ROOIJEN, N., HARTMANN, K., GUNZER, M., ROERS, A. & HOGG, N. 2013. Mast cell and macrophage chemokines CXCL1/CXCL2 control the early stage of neutrophil recruitment during tissue inflammation. *Blood*, 121, 4930-7.
- DONNERS, M. M., WOLFS, I. M., OLIESLAGERS, S., MOHAMMADI-MOTAHARI, Z., TCHAIKOVSKI, V., HEENEMAN, S., VAN BUUL, J. D., CAOLO, V., MOLIN, D. G., POST, M. J. & WALTENBERGER, J. 2010. A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 30, 2188-95.
- 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.

- DREYMUELLER, D., MARTIN, C., KOGEL, T., PRUESSMEYER, J., HESS, F. M., HORIUCHI, K., UHLIG, S. & LUDWIG, A. 2012. Lung endothelial ADAM17 regulates the acute inflammatory response to lipopolysaccharide. *EMBO Mol Med*, 4, 412-23.
- DREYMUELLER, D., UHLIG, S. & LUDWIG, A. 2015. ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308, L325-43.
- EDWARDS, D. R., HANDSLEY, M. M. & PENNINGTON, C. J. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, 29, 258-89.
- EL-BROLOS, M. A. & STAINIER, D. Y. R. 2017. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet*, 13, e1006780.
- FERGUSON, N. D., FAN, E., CAMPOROTA, L., ANTONELLI, M., ANZUETO, A., BEALE, R., BROCHARD, L., BROWER, R., ESTEBAN, A., GATTINONI, L., RHODES, A., SLUTSKY, A. S., VINCENT, J. L., RUBENFELD, G. D., THOMPSON, B. T. & RANIERI, V. M. 2012. The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive Care Med*, 38, 1573-82.
- FILIPPI, M. D. 2019. Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood*, 133, 2149-2158.
- FLEMMING, S., BURKARD, N., RENSCHLER, M., VIELMUTH, F., MEIR, M., SCHICK, M. A., WUNDER, C., GERMER, C. T., SPINDLER, V., WASCHKE, J. & SCHLEGEL, N. 2015. Soluble VE-cadherin is involved in endothelial barrier breakdown in systemic inflammation and sepsis. *Cardiovasc Res*, 107, 32-44.
- GAWAZ, M., DICKFELD, T., BOGNER, C., FATEH-MOGHADAM, S. & NEUMANN, F. J. 1997. Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. *Intensive Care Med*, 23, 379-85.
- GORINA, R., LYCK, R., VESTWEBER, D. & ENGELHARDT, B. 2014. β 2 integrin-mediated crawling on endothelial ICAM-1 and ICAM-2 is a prerequisite for transcellular neutrophil diapedesis across the inflamed blood-brain barrier. *J Immunol*, 192, 324-37.
- GOTTSCHALDT, U. & RESKE, A. W. 2018. Pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiologie und Intensivmedizin*, 59, 249-264.
- GRANNEMANN, C., PABST, A., HONERT, A., SCHIEREN, J., MARTIN, C., HANK, S., BÖLL, S., BLÄSIUS, K., DÜSTERHÖFT, S., JAHR, H., MERKEL, R., LEUBE, R., BABENDREYER, A. & LUDWIG, A. 2023. Mechanical activation of lung epithelial cells through the ion channel Piezo1 activates the metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 and promotes growth factor and adhesion molecule release. *Biomater Adv*, 152, 213516.
- GUO, Z., LI, Q., HAN, Y., LIANG, Y., XU, Z. & REN, T. 2012. Prevention of LPS-induced acute lung injury in mice by progranulin. *Mediators Inflamm*, 2012, 540794.
- HAN, X., FINK, M. P., UCHIYAMA, T., YANG, R. & DELUDE, R. L. 2004. Increased iNOS activity is essential for pulmonary epithelial tight junction dysfunction in endotoxemic mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 286, L259-67.
- HERRERO, R., PRADOS, L., FERRUELO, A., PUIG, F., PANDOLFI, R., GUILLAMAT-PRATS, R., MORENO, L., MATUTE-BELLO, G., ARTIGAS, A., ESTEBAN, A. & LORENTE, J. 2019. Fas activation alters tight junction proteins in acute lung injury. *Thorax*, 74, 69-82.
- HIKITA, A., TANAKA, N., YAMANE, S., IKEDA, Y., FURUKAWA, H., TOHMA, S., SUZUKI, R., TANAKA, S., MITOMI, H. & FUKUI, N. 2009. Involvement of a disintegrin and metalloproteinase 10 and 17 in shedding of tumor necrosis factor- α . *Biochem Cell Biol*, 87, 581-93.
- HUNDHAUSEN, C., SCHULTE, A., SCHULZ, B., ANDRZEJEWSKI, M. G., SCHWARZ, N., VON HUNDELSHAUSEN, P., WINTER, U., PALIGA, K., REISS, K., SAFTIG, P., WEBER, C. & LUDWIG, A. 2007. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J Immunol*, 178, 8064-72.

- HYUN, Y. M., CHOE, Y. H., PARK, S. A. & KIM, M. 2019. LFA-1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) distinctly regulate neutrophil extravasation through hotspots I and II. *Exp Mol Med*, 51, 1-13.
- IDELL, S. 2003. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med*, 31, S213-20.
- JEYASEELAN, S., CHU, H. W., YOUNG, S. K. & WORTHEN, G. S. 2004. Transcriptional profiling of lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Infect Immun*, 72, 7247-56.
- JOHANSSON, D., SHANNON, O. & RASMUSSEN, M. 2011. Platelet and neutrophil responses to Gram positive pathogens in patients with bacteremic infection. *PLoS One*, 6, e26928.
- KHAN, A. I., KERFOOT, S. M., HEIT, B., LIU, L., ANDONEGUI, G., RUFFELL, B., JOHNSON, P. & KUBES, P. 2004. Role of CD44 and hyaluronan in neutrophil recruitment. *J Immunol*, 173, 7594-601.
- KOENEN, R. R., PRUESSMEYER, J., SOEHNLEIN, O., FRAEMOHS, L., ZERNECKE, A., SCHWARZ, N., REISS, K., SARABI, A., LINDBOM, L., HACKENG, T. M., WEBER, C. & LUDWIG, A. 2009. Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood*, 113, 4799-809.
- KÖHLER, D., GRANJA, T., VOLZ, J., KOEPPEN, M., LANGER, H. F., HANSMANN, G., LEGCHENKO, E., GEISLER, T., BAKCHOUL, T., EGGSTEIN, C., HÄBERLE, H. A., NIESWANDT, B. & ROSENBERGER, P. 2020. Red blood cell-derived semaphorin 7A promotes thrombo-inflammation in myocardial ischemia-reperfusion injury through platelet GPIb. *Nature Communications*, 11, 1315.
- KONRAD, F. M., WOHLERT, J., GAMPER-TSIGARAS, J., NGAMSRI, K. C. & REUTERSHAN, J. 2019. How Adhesion Molecule Patterns Change While Neutrophils Traffic through the Lung during Inflammation. *Mediators Inflamm*, 2019, 1208086.
- LAMBRECHT, B. N., VANDERKERKEN, M. & HAMMAD, H. 2018. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat Rev Immunol*, 18, 745-758.
- LENTINI, G., FAMÀ, A., BIONDO, C., MOHAMMADI, N., GALBO, R., MANCUSO, G., IANNELLO, D., ZUMMO, S., GIARDINA, M., DE GAETANO, G. V., TETI, G., BENINATI, C. & MIDIRI, A. 2020. Neutrophils Enhance Their Own Influx to Sites of Bacterial Infection via Endosomal TLR-Dependent Cxcl2 Production. *J Immunol*, 204, 660-670.
- LERMAN, Y. V. & KIM, M. 2015. Neutrophil migration under normal and sepsis conditions. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*, 15, 19-28.
- 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.
- LI, N., YANG, H., WANG, M., LÜ, S., ZHANG, Y. & LONG, M. 2018. Ligand-specific binding forces of LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion and crawling. *Mol Biol Cell*, 29, 408-418.
- LIAO, S., LIN, Y., LIU, L., YANG, S., LIN, Y., HE, J. & SHAO, Y. 2023. ADAM10-a "multitasker" in sepsis: focus on its posttranslational target. *Inflamm Res*, 72, 395-423.
- LIU, M., GU, C. & WANG, Y. 2014. Upregulation of the tight junction protein occludin: effects on ventilation-induced lung injury and mechanisms of action. *BMC Pulm Med*, 14, 94.
- LÜLLMANN-RAUCH, R. & ASAN, E. 2015. *Taschenlehrbuch Histologie*, Stuttgart Georg Thieme Verlag
- MANGIALARDI, R. J., MARTIN, G. S., BERNARD, G. R., WHEELER, A. P., CHRISTMAN, B. W., DUPONT, W. D., HIGGINS, S. B. & SWINDELL, B. B. 2000. Hypoproteinemia predicts acute respiratory distress syndrome development, weight gain, and death in patients with sepsis. Ibuprofen in Sepsis Study Group. *Crit Care Med*, 28, 3137-45.
- MARETZKY, T., REISS, K., LUDWIG, A., BUCHHOLZ, J., SCHOLZ, F., PROKSCH, E., DE STROOPER, B., HARTMANN, D. & SAFTIG, P. 2005. ADAM10 mediates E-cadherin shedding and regulates epithelial cell-cell adhesion, migration, and beta-catenin translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 9182-7.

- MATTHAY, M. A., ARABI, Y., ARROLIGA, A. C., BERNARD, G., BERSTEN, A. D., BROCHARD, L. J., CALFEE, C. S., COMBES, A., DANIEL, B. M., FERGUSON, N. D., GONG, M. N., GOTTS, J. E., HERRIDGE, M. S., LAFFEY, J. G., LIU, K. D., MACHADO, F. R., MARTIN, T. R., MCAULEY, D. F., MERCAT, A., MOSS, M., MULARSKI, R. A., PESENTI, A., QIU, H., RAMAKRISHNAN, N., RANIERI, V. M., RIVIELLO, E. D., RUBIN, E., SLUTSKY, A. S., THOMPSON, B. T., TWAGIRUMUGABE, T., WARE, L. B. & WICK, K. D. 2024. A New Global Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 209, 37-47.
- MATTHAY, M. A., ZEMANS, R. L., ZIMMERMAN, G. A., ARABI, Y. M., BEITLER, J. R., MERCAT, A., HERRIDGE, M., RANDOLPH, A. G. & CALFEE, C. S. 2019. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers*, 5, 18.
- MATUTE-BELLO, G., FREVERT, C. W. & MARTIN, T. R. 2008. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295, L379-99.
- MCEVER, R. P. 2015. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*, 107, 331-9.
- MCKINNON, K. M. 2018. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol*, 120, 5.1.1-5.1.11.
- MEDCHEMEXPRESS 2024a. GW280264X Product Information.
- MEDCHEMEXPRESS 2024b. TAPI-1 Product Information.
- MISHRA, H. K., LONG, C., BAHAE, N. S. & WALCHECK, B. 2015. Regulation of CXCR2 expression and function by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *J Leukoc Biol*, 97, 447-54.
- MISHRA, H. K., MA, J. & WALCHECK, B. 2017. Ectodomain Shedding by ADAM17: Its Role in Neutrophil Recruitment and the Impairment of This Process during Sepsis. *Front Cell Infect Microbiol*, 7, 138.
- MOORE, K. L., PATEL, K. D., BRUEHL, R. E., LI, F., JOHNSON, D. A., LICHENSTEIN, H. S., CUMMINGS, R. D., BAINTON, D. F. & MCEVER, R. P. 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*, 128, 661-71.
- MORSING, S. K. H., RADEMAKERS, T., BROUNS, S. L. N., STALBORCH, A. D. V., DONNERS, M. & VAN BUUL, J. D. 2021. ADAM10-Mediated Cleavage of ICAM-1 Is Involved in Neutrophil Transendothelial Migration. *Cells*, 10.
- MOSS, M., BUCHER, B., MOORE, F. A., MOORE, E. E. & PARSONS, P. E. 1996. The role of chronic alcohol abuse in the development of acute respiratory distress syndrome in adults. *Jama*, 275, 50-4.
- NAGASAWA, A., MATSUNO, K., TAMURA, S., HAYASAKA, K., SHIMIZU, C. & MORIYAMA, T. 2013. The basis examination of leukocyte-platelet aggregates with CD45 gating as a novel platelet activation marker. *Int J Lab Hematol*, 35, 534-41.
- NGAMSRI, K. C., FUHR, A., SCHINDLER, K., SIMELITIDIS, M., HAGEN, M., ZHANG, Y., GAMPERTSIGARAS, J. & KONRAD, F. M. 2022. Sevoflurane Dampens Acute Pulmonary Inflammation via the Adenosine Receptor A2B and Heme Oxygenase-1. *Cells*, 11.
- NGAMSRI, K. C., PUTRI, R. A., JANS, C., SCHINDLER, K., FUHR, A., ZHANG, Y., GAMPERTSIGARAS, J., EHNERT, S. & KONRAD, F. M. 2021. CXCR4 and CXCR7 Inhibition Ameliorates the Formation of Platelet-Neutrophil Complexes and Neutrophil Extracellular Traps through Adora2b Signaling. *Int J Mol Sci*, 22.
- ORTIZ-MUÑOZ, G., MALLAVIA, B., BINS, A., HEADLEY, M., KRUMMEL, M. F. & LOONEY, M. R. 2014. Aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 regulates neutrophil-platelet aggregation and attenuates acute lung injury in mice. *Blood*, 124, 2625-34.
- PAGE, C. & PITCHFORD, S. 2013. Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation. *Int Immunopharmacol*, 17, 1176-84.
- PAUDEL, S., BARAL, P., GHIMIRE, L., BERGERON, S., JIN, L., DECORTE, J. A., LE, J. T., CAI, S. & JEYASEELAN, S. 2019. CXCL1 regulates neutrophil homeostasis in pneumonia-derived sepsis caused by *Streptococcus pneumoniae* serotype 3. *Blood*, 133, 1335-1345.

- PETER C., H., MÜLLER, M. & GRAEVE, L. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*, Berlin ; Heidelberg, Springer-Verlag.
- 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. & KUBES, P. 2011. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med*, 17, 1381-90.
- PRUESSMEYER, J., HESS, F. M., ALERT, H., GROTH, E., PASQUALON, T., SCHWARZ, N., NYAMOYA, S., KOLLERT, J., VAN DER VORST, E., DONNERS, M., MARTIN, C., UHLIG, S., SAFTIG, P., DREYMUELLER, D. & LUDWIG, A. 2014. Leukocytes require ADAM10 but not ADAM17 for their migration and inflammatory recruitment into the alveolar space. *Blood*, 123, 4077-88.
- RAHMAN, I., COLLADO SÁNCHEZ, A., DAVIES, J., RZENIEWICZ, K., ABUKSCEM, S., JOACHIM, J., HOSKINS GREEN, H. L., KILLOCK, D., SANZ, M. J., CHARRAS, G., PARSONS, M. & IVETIC, A. 2021. L-selectin regulates human neutrophil transendothelial migration. *J Cell Sci*, 134.
- 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.
- REILLY, J. P., ZHAO, Z., SHASHATY, M. G. S., KOYAMA, T., CHRISTIE, J. D., LANKEN, P. N., WANG, C., BALMES, J. R., MATTHAY, M. A., CALFEE, C. S. & WARE, L. B. 2019. Low to Moderate Air Pollutant Exposure and Acute Respiratory Distress Syndrome after Severe Trauma. *Am J Respir Crit Care Med*, 199, 62-70.
- REISS, K. & SAFTIG, P. 2009. The "A Disintegrin And Metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: Physiological and cellular functions. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 20, 126-137.
- 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.
- ROSENDAHL, M. S., KO, S. C., LONG, D. L., BREWER, M. T., ROSENZWEIG, B., HEDL, E., ANDERSON, L., PYLE, S. M., MORELAND, J., MEYERS, M. A., KOHNO, T., LYONS, D. & LICHENSTEIN, H. S. 1997. Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J Biol Chem*, 272, 24588-93.
- ROSSAINT, J., MARGRAF, A. & ZARBOCK, A. 2018. Role of Platelets in Leukocyte Recruitment and Resolution of Inflammation. *Front Immunol*, 9, 2712.
- SADIK, C. D., KIM, N. D. & LUSTER, A. D. 2011. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol*, 32, 452-60.
- SADOWSKA, A. M., VAN OVERVELD, F. J., LUYTEN, C., GERMONPRÉ, P. & DE BACKER, W. A. 2004. Use of ICAM-1 antibodies and antisense oligonucleotides to inhibit transmigration of neutrophils. *Inflamm Res*, 53, 143-9.
- SAFTIG, P. & REISS, K. 2011. The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: novel drug targets with therapeutic potential? *Eur J Cell Biol*, 90, 527-35.
- SCHULZ, B., PRUESSMEYER, J., MARETZKY, T., LUDWIG, A., BLOBEL, C. P., SAFTIG, P. & REISS, K. 2008. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res*, 102, 1192-201.
- SCIENTIFIC, T. F. 2020. Introduction Pierce™ BCA Protein Assay Kit.
- SHAW, S. K., MA, S., KIM, M. B., RAO, R. M., HARTMAN, C. U., FROIO, R. M., YANG, L., JONES, T., LIU, Y., NUSRAT, A., PARKOS, C. A. & LUSCINSKAS, F. W. 2004. Coordinated redistribution of leukocyte LFA-1 and endothelial cell ICAM-1 accompany neutrophil transmigration. *J Exp Med*, 200, 1571-80.

- SOETHOUT, E. C., MÜLLER, K. E. & RUTTEN, V. P. 2002. Neutrophil migration in the lung, general and bovine-specific aspects. *Vet Immunol Immunopathol*, 87, 277-85.
- SREERAMKUMAR, V., ADROVER, J. M., BALLESTEROS, I., CUARTERO, M. I., ROSSAINT, J., BILBAO, I., NÁCHER, M., PITAVAL, C., RADOVANOVIC, I., FUKUI, Y., MCEVER, R. P., FILIPPI, M. D., LIZASOAIN, I., RUIZ-CABELLO, J., ZARBOCK, A., MORO, M. A. & HIDALGO, A. 2014. Neutrophils scan for activated platelets to initiate inflammation. *Science*, 346, 1234-8.
- STAMENKOVIC, I. & YU, Q. 2009. Shedding light on proteolytic cleavage of CD44: the responsible sheddase and functional significance of shedding. *J Invest Dermatol*, 129, 1321-4.
- SU, Y., LUCAS, R., FULTON, D. J. R. & VERIN, A. D. 2024. Mechanisms of pulmonary endothelial barrier dysfunction in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Chin Med J Pulm Crit Care Med*, 2, 80-87.
- TANG, J., ZARBOCK, A., GOMEZ, I., WILSON, C. L., LEFORT, C. T., STADTMANN, A., BELL, B., HUANG, L. C., LEY, K. & RAINES, E. W. 2011. Adam17-dependent shedding limits early neutrophil influx but does not alter early monocyte recruitment to inflammatory sites. *Blood*, 118, 786-94.
- THOMPSON, B. T., CHAMBERS, R. C. & LIU, K. D. 2017. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*, 377, 562-572.
- TOCRIS, B. 2024. GI254023X – ADAM10 Inhibitor.
- TSAKADZE, N. L., SITHU, S. D., SEN, U., ENGLISH, W. R., MURPHY, G. & D'SOUZA, S. E. 2006. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM-17) mediates the ectodomain cleavage of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem*, 281, 3157-64.
- TSUBOTA, Y., FREY, J. M., TAI, P. W., WELIKSON, R. E. & RAINES, E. W. 2013. Monocyte ADAM17 promotes diapedesis during transendothelial migration: identification of steps and substrates targeted by metalloproteinases. *J Immunol*, 190, 4236-44.
- VAN GRIENSVEN, M., PROBST, C., MÜLLER, K., HOEVEL, P. & PAPE, H. C. 2006. Leukocyte-endothelial interactions via ICAM-1 are detrimental in polymicrobial sepsis. *Shock*, 25, 254-9.
- VAN TETERING, G., VAN DIEST, P., VERLAAN, I., VAN DER WALL, E., KOPAN, R. & VOOIJS, M. 2009. Metalloprotease ADAM10 is required for Notch1 site 2 cleavage. *J Biol Chem*, 284, 31018-27.
- VENTURI, G. M., TU, L., KADONO, T., KHAN, A. I., FUJIMOTO, Y., OSHEL, P., BOCK, C. B., MILLER, A. S., ALBRECHT, R. M., KUBES, P., STEEBER, D. A. & TEDDER, T. F. 2003. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity*, 19, 713-24.
- VESTWEBER, D. 2015. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*, 15, 692-704.
- VESTWEBER, D., WINDERLICH, M., CAGNA, G. & NOTTEBAUM, A. F. 2009. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol*, 19, 8-15.
- WEBER, C. & SPRINGER, T. A. 1997. Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor. *J Clin Invest*, 100, 2085-93.
- 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.
- ZUNKE, F. & ROSE-JOHN, S. 2017. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864, 2059-2070.

6.3. Material

6.3.1. Antikörper

Produktbezeichnung	Hersteller, Ort
Alexa Fluor 647 anti-mouse CD102 (105612)	Biolegend, San Diego (USA)
APC anti-mouse ADAM10 (FAB946A)	R&D Systems, Wiesbaden (DE)
APC anti-mouse CD11a/CD18 (LFA-1) (141010)	Biolegend, San Diego (USA)
APC/Cyanine7 anti-mouse Ly-6G (127624)	Biolegend, San Diego (USA)
DuoSet ELISA CXCL1/KC (DY543)	R&D Systems, Wiesbaden (DE)
DuoSet ELISA CXCL2/MIP-2 (DY542)	R&D Systems, Wiesbaden (DE)
DuoSet ELISA IL-6 (DY 406)	R&D Systems, Wiesbaden (DE)
DuoSet ELISA TNF-alpha (DY410)	R&D Systems, Wiesbaden (DE)
FITC anti-mouse CD31 (102406)	Biolegend, San Diego (USA)
FITC anti-mouse/human CD44 (103006)	BioLegend, San Diego (USA)
Ly-6G/Ly-6C Monoclonal Antibody (RB6-8C5)	Thermo Fisher Scientific, Wilmington
Normal Rabbit IgG (SH2429321A)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Normal Rat IgG (J0715)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (USA)
Pacific Blue anti-mouse CD11b (101224)	Biolegend, San Diego (USA)
Pacific Blue anti-mouse CD41 (133928)	Biolegend, San Diego (USA)
Pacific Blue anti-mouse CD54 (116116)	Biolegend, San Diego (USA)
Pacific Blue anti-mouse CD62L (104424)	Biolegend, San Diego (USA)
PE anti-mouse ADAM17 (bs-4236R-PE)	Bioss, Massachusetts (USA)
PE Anti-mouse PSGL-1/CD162 (555306)	BD Biosciences, New York (USA)
PE/Cyanine7 anti-mouse CD144	Biolegend, San Diego (USA)
PE/Cyanine7 anti-mouse Ly-6G (127618)	Biolegend, San Diego (USA)
PE/Cyanine7 anti-mouse/rat CD62P (148310)	Biolegend, San Diego (USA)
PerCP anti-mouse CD45 (103103)	Biolegend, San Diego (USA)

Zombie Violet Dye (77477)	Biolegend, San Diego (USA)
---------------------------	----------------------------

6.3.2. Chemikalien

Produktbezeichnung	Hersteller, Ort
2-Propanol (BCBN7386V)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Aqua dest (2351744)	Braun, Melsungen (DE)
Bovine serum albumin BSA (10018)	Boehringer, Mannheim (DE)
BSA (A3294)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Chloroform (SHBF6706V)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Cytometer Setup and Tracking Beads (642412)	BD Biosciences, San Jose (USA)
DAB Chromogen (S3000)	Dako, Hamburg (DE)
Disodium EDTA (ED4S)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
DMSO (D5879)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Ethanol absolut (A3678)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Eukitt (03989)	Sigma-Aldrich, St. Louis, (USA)
Formalin 4% (P6148)	Sigma-Aldrich, St. Louis, (USA)
H ₂ SO ₄ (18 M)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (DE)
LPS (L6011)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
Methanol (106009)	Merck, Darmstadt (DE)
NaCl (21385311)	Braun, Melsungen (DE)
NaHCO ₃ (K35580988 607)	Merck, Darmstadt (DE)
NaN ₃ -Lösung 20% (08591)	Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)
NH ₄ Cl (3J002532)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Nuklease-freies Wasser (NFW) (A7398)	AppliChem GmbH Darmstadt (DE)
Paraffin Ritoplast (6642.5)	Carl Roth, Karlsruhe (DE)
Paraffinöl (8904.1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (DE)
Phosphat Buffered Saline Tablets (18912-014)	Thermo Fisher Scientific, Wilmington
Reagent diluent (DY995)	R&D Systems, Wiesbaden (DE)

Streptavidin-HRP B 2ml (893975)	R&D Systems, Mineapolis (USA)
Treen 20 (A4974, 9250)	AppliChem, Darmstadt (DE)
Trizol (15596018)	Ambion, Carlsbad (USA)
Wasser, destilliert (Aqua dest) (2351744)	Braun, Melsungen (DE)
Wasserstoffperoxid H ₂ O ₂ 30% (108597)	Merck, Darmstadt (DE)
Xylol (9713.3)	Carl Roth, Karlsruhe (DE)

6.3.3. Enzyme

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

6.3.4. Geräte

Produktbezeichnung	Hersteller, Ort
Beatmungsschlauch aus Gummi	Simens-Elma, Stockholm
Eismaschine (AF-103)	Scotsman, Sprockhoevel
FACSCanto™JI Flow Cytometer (10044058)	BD Bioscience, Becton
Gefriertruhe Innova (C585)	Eppendorf, Hamburg
Histologisches Karussell TP 1020 (00335409)	Leica Biosystems, Nussloch
Homogenisator Precellys 24 (03119-200-RD000)	Peqlab Biotech, Erlangen
Mehrkanalpipette 100 µl (311400158)	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette 300 µl (311400158)	Eppendorf, Hamburg
Micro Zentrifuge (062294, 075514)	Carl Roth, Karlsruhe
Microplate Reader Infite M200 Pro	Tecan, Mänedorf (CH)
Microscop Leica DMIL (30301)	Leica, Wetzlar
Mikroskop Leitz DM-IRB (55853)	Leica, Wetzlar
Mikrowelle Cookmate	Deawoo, Butzbach
Pinzetten (BD312R, BD311R)	Aesculap, Tuttlingen

PipetBoy acu (1201840)	Integra Bioscience, Nussloch
Pipetten (0,1 µl – 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Plastikröhre (zylindrisch, 20 cm (l), 9 cm (d))	medizinische Werkstatt UKT
Rotationsmikrotom (RM 2235)	Leica Biosystems, Nussloch
Scheren (BC590R, BC060R)	Aesculap, Tuttlingen
Spectrophotometer (Nanodrop 2000)	Thermo Scientific, Peqlab, Wilmington
Thermal Cycler C1000, CFX96 (CC014318)	Bio-Rad Laboratories, München
Thermal Cycler CFX Connect (788BR06933)	Bio-Rad Laboratories, München
Thermal Cycler T100 (621BR67355)	Bio-Rad Laboratories, München
Thermomixer (5436)	Eppendorf, Hamburg
Vaporisator (Micro-A-I-R U22)	OMRON Healthcare, Kyoto
Vortex-Genie 2 (4,781,487)	Scientific industries Inc (USA)
Waage HR-120-EC	A&D Instruments, Ltd, Ahrensburg
Waage Sout II	Ohaus, Kirchheim
Wärmeplatte HI 1220	Leica biosystems, Nussloch
Washer Hydroflex ELISA (30045764)	Tecan, Crailsheim (Austria)
Wasserbad (HI 1210)	Leica Biosystems, Nussloch
Wasserstrahlpumpe (159600)	BRAND, Wertheim
Wippschüttler ST5 ()	Bioblock Scientific, Schwerte (DE)
Zentrifuge (41651200)	Thermo Scientific, Rockford
Zentrifuge Megafuge 1.0R (178411)	Heraeus instr. GmbH, Hanau
Paraffin-Einbettssystem EG1150 c + EG1150H	Leica, Wetzlar (DE)

6.3.5. Lösungen

Produktbezeichnung	Hersteller, Ort
Avidin Blocking Solution (SP-2001)	Vector labs, Peterborough (UK)
BCA Reagent A (23225)	Thermo Fisher Scientific, Wilmington

BCA Reagent B (23227)	Thermo Fisher Scientific, Wilmington										
Biotin Blocking Solution (SP2001)	Vector Labs, Peterborough (UK)										
ELISA Stopp Lösung	Eigene Herstellung, Tübingen (DE)										
<table> <tr> <th>Substanz</th><th>Menge</th></tr> <tr> <td>Aqua dest</td><td>68 ml</td></tr> <tr> <td>H₂SO₄ (18 M)</td><td>4 ml</td></tr> </table>	Substanz	Menge	Aqua dest	68 ml	H ₂ SO ₄ (18 M)	4 ml					
Substanz	Menge										
Aqua dest	68 ml										
H ₂ SO ₄ (18 M)	4 ml										
Erythrozyten-Lyse FACS Lysing Solution	BD Biosciences, San Jose (USA)										
FACS Clean	BD Biosciences, San Jose (USA)										
FACS Flow	BD Biosciences, San Jose (USA)										
FACS Shutdown Solution	BD Biosciences, San Jose (USA)										
Färbepuffer	Eigene Herstellung, Tübingen (DE)										
<table> <tr> <th>Substanz</th><th>Menge</th></tr> <tr> <td>Aqua dest</td><td>1000 ml</td></tr> <tr> <td>PBS- Tbl.</td><td>2 Tbl.</td></tr> <tr> <td>Bovines Serum Albumin (BSA)</td><td>10g</td></tr> <tr> <td>NaN₃-Lösung 20%</td><td>2,5 ml</td></tr> </table>	Substanz	Menge	Aqua dest	1000 ml	PBS- Tbl.	2 Tbl.	Bovines Serum Albumin (BSA)	10g	NaN ₃ -Lösung 20%	2,5 ml	
Substanz	Menge										
Aqua dest	1000 ml										
PBS- Tbl.	2 Tbl.										
Bovines Serum Albumin (BSA)	10g										
NaN ₃ -Lösung 20%	2,5 ml										
Mayers Häkalaunlösung (1.09249.0500)	Merck, Darmstadt (DE)										
Organ-Lyse	Eigene Herstellung, Tübingen (DE)										
<table> <tr> <th>Substanz</th><th>Menge</th></tr> <tr> <td>NH₄Cl</td><td>2,006 g</td></tr> <tr> <td>NaHCO₃</td><td>0,21 g</td></tr> <tr> <td>Disodium EDTA</td><td>0,093 g</td></tr> <tr> <td>Aqua dest</td><td>250 ml</td></tr> </table>	Substanz	Menge	NH ₄ Cl	2,006 g	NaHCO ₃	0,21 g	Disodium EDTA	0,093 g	Aqua dest	250 ml	
Substanz	Menge										
NH ₄ Cl	2,006 g										
NaHCO ₃	0,21 g										
Disodium EDTA	0,093 g										
Aqua dest	250 ml										
Reagent diluent (DY995)	R&D Systems, Wiesbaden (DE)										
Substrat solution (DY999)	R&D Systems, Wiesbaden (DE)										
Türk'sche Lösung (109277)	Merck, Darmstadt (DE)										
Unmasking Solution (H-3300)	Vector Labs, Peterborough (UK)										

6.3.6. Medikamente

Produktbezeichnung	Hersteller, Ort
Desinfektionsspray Softasept	Braun Melsungen
Heparin-Natrium 5000 IE/ml	Ratiopharm, Ulm
Ketamin 100mg/ml (E1670044WDD)	bela-pharm, Garbsen
NaCl 0,9% (21275311)	Braun, Melsungen

Rompun® 2% (25ml Xylazin) Bayer, Leverkusen
(KPOE65K)

6.3.7. Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Hersteller, Ort
Combitips advanced 10 ml (0030089464)	Eppendorf, Hamburg
Combitips advanced 5 ml (0030089456)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (01-2460/1)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Einbett-Kassetten Ratilapo (K113.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Einweg-Pasteurpipetten (EA70.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Falcon 15 ml (188271-N)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Falcon 50 ml (352070)	Corning inc., Mexico
Färbeeinsatz (11-0002)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Färbeküvette (11-0001)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Filter tip 10 µl (239197)	Nerbe plus, Winsen (Luhe)
Filterspitzen 100 µl (VTO230)	Biozym, Oldendorf
Filterspitzen 1000 µl (S1126)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filterspitzen 200 µl (196415)	Nerbe plus, Winsen (Luhe)
Filterspitzen, steril (10 – 1000 µl)	Nerbeplus, Winsen/Luhe
GAZIN Mullkompressen (18501)	Lohmann & Rauscher, Neuwied
GAZIN Mullkompressen steril (13620)	Lohmann&Rauscher, Neuwied
Glas Röhrchen No 2775/6 75x12 mm	
Handschuhe Dermaclean (PFC 4303971)	Ansell, München
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen (H-4000)	Vector Labs, Peterborough, UK
Kanülen Microlance 20 G (301300)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 24 G (304100)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 25 G (300400)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kanülen Microlance 27 G (302200)	Becton Dickinson, Heidelberg

Kryoröhrchen 1,8 ml Nunc (368632)	Becton Dickinson, Heidelberg
Medical Examination Gloves (290418)	Abena, Aabenraa, Dänemark
Microtiter plates Mikroplate (655101)	Bio-Rad Laboratories, München
Microtiter plates Nunc Maxisorp (442404)	Freiner bio-one Frickenhausen
Mikrotomklinge S35	Feather, Tokyo, J
Multiplate PCR Plates 96-Well, clear (650101)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Multi-Safe Seal Tubes (7083.1)	Carl Roth, Karlsruhe
Nähgarn Mercifil No 50 (M3541)	Amann und Söhne, Bönningheim
Objektträger (03-0004)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger Superfrost Plus (03-0060)	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging
Pasteurpipetten, Einweg (EA 65.1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Petrischalen Cellstar (E2193G5)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipet tips + filter 20 µl (1770020)	Ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen 10 µl (720011)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen 10 µl (gestopft)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen 100 µl (gestopft)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen 1000 µl (777350)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Pipettenspitzen 1000 µl (gestopft)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen 20 µl (gestopft)	Nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen 200 µl (703030)	Sarstedt, Nürnberg
Precellys Keramikkügelchen 1,4 mm (Precellys-Kit 91-PCS-CK14)	Peqlab, Erlangen
Reaction Tubes 1,5 ml (616201)	Greiner bio-one, Frickenhausen
Safe-Lock Tubes 0,5 ml (30121023)	Eppendorf, Hamburg
Spitzen ELISA epT.I.P.S Standard/Bulk 2-200µl (K199840Q)	Eppendorf, Hamburg
Spritze 1 ml (9166017V)	Braun, Melsungen

Spritze 2 ml (4606027V)	Braun, Melsungen
Spritzen 5ml (4606051V)	Braun, Melsungen
Stripetten 10 ml (607160)	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Stripetten 25 ml (356525)	Becton Dickinson, Durham (USA)
Stripetten 5 ml (356543)	Becton Dickinson, Durham (USA)
Venenkatheter Insyte 22G (381223)	Becton & Dickinson, Heidelberg
Zählkammer C-Chip (DHC-N01)	Digital Bio, Seoul (ROK)
Zellsieb EASYstrainer 100 µm (542000)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsiebe Cell Strainer 100 µm (542000)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

6.3.8. Software

Produktbezeichnung	Hersteller, Ort
AxioVision	Zeiss, Oberkochen (DE)
Bio Render	Toronto, Kanada
CFX Manager	Bio Rad, München (DE)
Excel	Microsoft, Redmond (USA)
FACSDica Software	Becton Dickinson, Heidelberg (DE)
FlowJo7	FlowJo LCC, Ashland (USA)
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc., Sand Diego (USA)
ImageJ 1.53k	Wayne Rasband, USA
Magellan	Tecan, Männedorf (CH)
PowerPoint	Microsoft, Redmond (USA)
Word	Microsoft, Redmond (USA)

6.4. Erklärungen zum Eigenanteil

Die vorgelegte Arbeit wurde an der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Franziska Konrad durchgeführt. Konzeption und Supervision der Arbeit erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Franziska Konrad. Die methodische Einarbeitung wurde durch Anika Fuhr und Mariana Simelidis unterstützt. Die experimentellen Arbeiten sowie die Planung, Durchführung und Auswertung der Versuche erfolgten überwiegend selbstständig. Die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde von mir eigenständig durchgeführt.

Ein Teil der im Rahmen dieser Dissertation erhobenen experimentellen Daten wurde bereits in einer wissenschaftlichen Publikation verwendet (siehe Kapitel 6.5). Dies betrifft die in Kapitel 3.1 („Pharmakologische Hemmung von ADAM10 und ADAM17 reduziert die pulmonale PMN-Migration“) in Abbildung 15A dargestellten *in vivo* Migrationsdaten. Die Rohwerte zu den dort gezeigten Daten wurden in der genannten Publikation als Kontrollgruppendaten verwendet. Die statistischen Analysen, Datenauswertungen, Interpretation sowie die wissenschaftliche Einordnung der Ergebnisse erfolgten im Rahmen dieser Dissertation unabhängig und eigenständig.

Hiermit erkläre ich, Meike Goerlich, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel: *„Proteolytische Regulation der neutrophilen Migration durch ADAM10 und ADAM17 in der Frühphase des akuten Lungenversagens (ARDS)“* selbstständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel sowie mit fachlicher Beratung durch meine Betreuerinnen verfasst habe. Wörtlich oder sinngemäß übernommene Inhalte sind als solche gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder ganz noch in Teilen einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Der Weiteren erkläre ich, dass ich bislang kein Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet habe und dass mir kein akademischer Grad aberkannt wurde.

Ort, Datum

Unterschrift

6.5. Veröffentlichungen

Teile der im Rahmen dieser Dissertation erhobenen experimentellen Daten wurden bereits in einer wissenschaftlichen Publikation veröffentlicht:

Fuhr A., Goerlich M., Biedritzky A. et al. (2025).

Neutrophil ADAM10 promotes migration and inflammation in ARDS by modulating adhesion and chemokine signaling.

Mucosal Immunology.

doi:10.1016/j.mucimm.2025.09.003

6.6. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Franziska Konrad für ihre wertvolle wissenschaftliche Begleitung und Beratung während der gesamten Promotionszeit.

Ebenso danke ich meiner Betreuerin Anika Fuhr für ihre kontinuierliche Unterstützung, ihre Geduld und ihr fachliches Engagement – sowohl im Labor als auch während der Schreibphase.

Dem gesamten Laborteam danke ich herzlich, insbesondere den MTA-lerinnen, deren tägliche Arbeit eine wesentliche Grundlage für die Durchführung dieser Forschung darstellt.

Meiner Familie danke ich von Herzen. Meinen Eltern, für ihre stetige Unterstützung und dafür, dass sie mich von klein auf darin bestärkt haben, meinen Interessen zu folgen. Sie haben mich durch ihre Haltung und ihre Werte nachhaltig geprägt. Meinen beiden großen Schwestern danke ich für ihre Vorbildfunktion und den beständigen Austausch, aus dem ich bis heute lerne. Ebenso danke ich meinem Mann und meiner Tochter, die mir Rückhalt und Orientierung geben.

Meinem Mann Lukas gilt mein besonderer Dank für seine verlässliche Unterstützung und seine Geduld während dieser Zeit. Sein Rückhalt war für mich eine wichtige Voraussetzung für die Fertigstellung dieser Arbeit.

Die Forschung ist ein zentraler Bestandteil der Medizin und Grundlage ihres Fortschritts. Diese Überzeugung hat mich während meines Studiums und insbesondere bei der Anfertigung dieser Arbeit begleitet. Die Entscheidung zur Durchführung von Tierversuchen habe ich bewusst getroffen, um einen unverstellten Einblick in die medizinische Grundlagenforschung zu gewinnen. Zugleich hoffe ich, dass technologische Entwicklungen künftig verstärkt alternative, tierversuchsfreie Forschungsansätze ermöglichen.

Es war mir eine besondere Erfahrung, für eine begrenzte Zeit Teil dieser Welt der Forschung zu sein.