

Aus der
Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

**Endotheliales ADAM17 als Schlüsselregulator der
mikrovaskulären Permeabilität und Neutrophilenmigra-
tion in der LPS-induzierten akuten pulmonalen
Inflammation**

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

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

vorgelegt von

Biedritzky, Anna

2026

Dekanin: Professorin Dr. S. Y. Brucker

1. Berichterstatter: Professorin Dr. F. Konrad

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Franz

Tag der Disputation: 07.07.2026

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)	1
1.1.1. Definition und Geschichte	1
1.1.2. Epidemiologie	3
1.1.3. Ätiologie	4
1.1.4. Klinik und Therapie	4
1.1.5. Tierexperimentelle Modelle zur ARDS-Forschung	5
1.2. Akute pulmonale Inflammation	7
1.2.1. Pathophysiologie	7
1.2.2. Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel	8
1.3. A Disintegrin and Metalloproteinase 17 (ADAM17)	10
1.3.1. Struktureller Aufbau und Funktion	11
1.3.2. Regulation und physiologische Bedeutung von ADAM17	14
1.3.3. ADAM17 in der pulmonalen Inflammation	16
1.3.4. ADAM17 als möglicher Therapieansatz in der pulmonalen Inflammation	18
1.4. Zielsetzung der Arbeit	20
2. Material	21
2.1. Tierversuch	21
2.1.1. Tiere	21
2.1.2. Inhibitoren und LPS	22
2.1.3. Anästhesie und Analgetika	22
2.2. Zellkultur	23
2.2.1. Zellkultur von H441	23
2.2.2. Zellkultur von HMEC-1	23
2.2.3. Zellkultur von HMVEC-L	24
2.2.4. PMN Isolation mittels Percoll-Methode	24
2.2.5. Inhibitoren und Stimulanzen	25
2.3. Antikörper	26
2.4. Primer	28
2.5. Gebrauchsfertige Reaktionslösungen und Kits	30

2.6. Chemikalien und Reagenzien	32
2.7. Selbsthergestellte Puffer	34
2.8. Enzyme	35
2.9. Geräte	36
2.10. Verbrauchsmaterialien	37
2.11. Software	40
3. Methoden	41
3.1. Murines LPS-induziertes akutes pulmonales Inflammationsmodell	41
3.2. In-vivo-Migrationsanalyse	41
3.3. Durchflusszytometrie	45
3.3.1. Prinzip und Kompensation	45
3.3.2. Fluoreszenzbasierte Zellfärbung	47
3.3.3. Messung und Auswertung	49
3.4. Genexpressionsanalyse	51
3.4.1. RNA-Isolation	52
3.4.2. RNA-Konzentrationsbestimmung	53
3.4.3. cDNA-Umschrieb	53
3.4.4. RT-qPCR	54
3.5. Proteinexpressionsanalysen	55
3.5.1. Myeloperoxidase-Assay	55
3.5.2. Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Assay)	56
3.5.3. ELISA	56
3.5.3.1. DuoSet ELISA	57
3.5.3.2. ELISA VE-Cadherin	58
3.5.4. Immunhistochemie	58
3.5.4.1. Immunfluoreszenzfärbung	59
3.5.4.2. Immunhistologische Färbung der PMNs	61
3.5.5. Western Blot	62
3.5.5.1. Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele	62
3.5.5.2. Probengewinnung, Gesamtproteinbestimmung und Vorbereitung	63
3.5.5.3. SDS-Page	63
3.5.5.4. Transfer	64

3.5.5.5. Immundetektion mit proteinspezifischen Antikörpern.....	64
3.6. Evans Blue Extravasations-Assay	65
3.7. In-vitro-Modellsysteme.....	66
3.7.1. Chemotaxis-Assay	66
3.7.2. Transmigrationsassay	67
3.7.3. Signalweganalyse mittels siRNA-Transfektion	69
3.8. Statistik	70
4. Ergebnisse	72
4.1. Expression von ADAM17 in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation	72
4.2. Einfluss von ADAM17 auf die inflammatorischen TNFR1/2- und IL-6R- Signalwege in vivo	74
4.3. ADAM17 moduliert in vitro im TNFR1-Signalweg über NF-κB, CREB, JNK, TRADD, JAK1 und STAT3.....	78
4.4. In-vitro-PMN-Migration nach ADAM17-Inhibition	84
4.5. In-vivo-Migration von PMNs mit systemischer Inhibition von ADAM17 ..	88
4.6. Regulation der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf PMNs mit systemischer Inhibition von ADAM17	91
4.7. Regulation der Zytokinfreisetzung durch die systemische Inhibition von ADAM17	94
4.8. Regulation der mikrovaskulären Permeabilität und endothelialer Adhäsionsmoleküle infolge der systemischen Inhibition von ADAM17	96
4.9. Deletion von endothelialem ADAM17 in der konditionalen Knockout- Mauslinie ADAM17 ^{Tie2+}	102
4.10. Einfluss von endothelialem ADAM17 auf die inflammatorischen TNFR1/2- und IL-6R-Signalwege in vivo	106
4.11. In-vivo-Migration von PMNs in der ADAM17 ^{Tie2+} Knockoutlinie	109
4.12. Regulation der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf PMNs durch den Knockout von ADAM17 auf Endothelzellen.....	111
4.13. Regulation der Zytokinfreisetzung in der ADAM17 ^{Tie2+} Knockoutlinie	113
4.14. Bedeutung von endothelialem ADAM17 auf die Regulation der mikrovaskulären Permeabilität und endothelialer Adhäsionsmoleküle	115
4.15. Zusammenfassung der Ergebnisse	121

5. Diskussion	123
5.1. ADAM17-Expression in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation	123
5.2. Einfluss von ADAM17 auf Mechanismen der akuten pulmonalen Inflammation	124
5.3. Einfluss von endothelialem ADAM17 auf die transendotheliale PMN- Migration und die mikrovaskuläre Permeabilität	129
5.3.1. Endotheliales ADAM17 reguliert über TNFR1 und IL-6R α	130
5.3.2. Endotheliales ADAM17 verstärkt die PMN-Migration in das Interstitium und den bronchoalveolären Raum	131
5.3.3. Endotheliales ADAM17 fördert den Verlust der endothelialen Barriere und die Entstehung eines proteinreichen Lungenödems	133
5.3.4. Endotheliales ADAM17 verstärkt die pulmonale Inflammation in den Alveolen	135
5.4. Methodik und Limitierungen der Studie	137
5.5. Klinische Relevanz und Ausblick	138
5.6. Schlussfolgerung	140
 6. Zusammenfassung	 141
 7. Literaturverzeichnis	 143
 8. Anhang	 167
 9. Erklärung zum Eigenanteil	 168
 10. Danksagung	 170

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Leukodiapedese.	9
1.2	Schematische Darstellung der Multidomänenstruktur von ADAM17 in der inaktiven und aktiven Form.	12
1.3	Schematische Darstellung der Reifung im endoplasmatischen Retikulum, des Transports und der Aktivierung von ADAM17.	15
2.1	Gentechnische Erzeugung der Knockout-Mauslinie ADAM17 ^{Tie2+} mit Deletion von endothelialem ADAM17 durch Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems.	21
3.1	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der in-vivo-Versuche.	42
3.2	Gatingstrategie zur Identifikation von polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) in einer repräsentativen Lungenprobe.	50
3.3	Gatingstrategie zur Identifikation von pulmonalen Endothelzellen in einer repräsentativen Lungenprobe.	51
3.4	Schematische Darstellung des Aufbaus einer Kammer des μ -Slides.	66
3.5	Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Transmigrationsassays.	68
4.1	Expression von ADAM17 in murinem Lungengewebe in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation und Einfluss der systemischen Inhibition auf das Expressionslevel.	73
4.2	Genexpressionsanalyse im murinen Lungengewebe nach systemischer Inhibition von ADAM17.	75
4.3	Proteinexpression von TNFR1 und IL-6R α auf Endothelzellen im Lungengewebe, nachgewiesen durch Immunfluoreszenzfärbung mit endothelspezifischem Marker.	77
4.4	Validierung der siRNA-Transfektion von HMVEC-L mittels Kontroll-siRNA sowie Ermittlung der Gen- und Proteinexpression von TNFR1 und IL-6R α mittels RT-qPCR und Immunfluoreszenzfärbung.	79
4.5	Genexpression von ADAM17 in HMVEC-L vor und nach siRNA-Transfektion.	80
4.6	Einfluss von ADAM17 auf den TNFR1-Signalweg untersucht mittels in-vitro-siRNA-Transfektion in HMVEC-L.	82
4.7	Einfluss von ADAM17 auf den IL-6R-Signalweg untersucht mittels in-vitro-siRNA-Transfektion in HMVEC-L.	83
4.8	In-vitro-Migration humaner PMNs mit ADAM17-Inhibition entlang eines fMLP-Gradienten.	85
4.9	In-vitro-Transmigration von humanen PMNs durch eine Endothel- und Epithelzellschicht mit ADAM17-Inhibition.	87
4.10	In-vivo-Migration muriner PMNs in das entzündete Lungengewebe während der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation unter systemischer ADAM17-Inhibition.	90
4.11	Einfluss der systemischen ADAM17-Inhibition auf die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf PMNs bei LPS-induzierter akuter pulmonaler Inflammation.	93

4.12	Einfluss der systemischen ADAM17-Inhibition auf die Zytokinfreisetzung bei LPS-induzierter akuter pulmonaler Inflammation.	95
4.13	Einfluss der systemischen ADAM17-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität.	99
4.14	Modulation von VE-Cadherin im Lungengewebe durch die systemische ADAM17-Inhibition.	101
4.15	Gen- und Proteinexpression von ADAM17 in murinem Lungengewebe der Knockout-Mauslinie ADAM17 ^{Tie2+} .	104
4.16	Nachweis des konditionalen Knockouts von ADAM17 auf Endothelzellen im Vergleich zu PMNs und Thrombozyten.	105
4.17	Gen- und Proteinexpressionsanalyse der proinflammatorischen TNFR1/2- und IL-6R-Signalwege nach Deletion von endothelialelem ADAM17.	107
4.18	Bedeutung von endothelialelem ADAM17 für die Aktivierung und in-vivo-Migration von PMNs in die entzündeten Lungenstrukturen.	110
4.19	Regulation der neutrophilen Oberflächenexpression von CD62L, CD162, CD49d und CD11b nach endothelialer Deletion von ADAM17.	112
4.20	Auswirkung des Knockouts von endothelialelem ADAM17 auf die Freisetzung von Zytokinen und ADAM17-Substraten in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation.	114
4.21	Bedeutung von endothelialelem ADAM17 auf die mikrovaskuläre Permeabilität.	117
4.22	Modulation von VE-Cadherin auf Endothelzellen im Lungengewebe durch endotheliales ADAM17.	120
8.1	Vollständige Western Blot-Membranen von VE-Cadherin.	167

Tabellenverzeichnis

1.1	Diagnosekriterien der neuen globalen ARDS-Definition nach Matthay et al., 2024.	2
2.1	Inhibitoren für die systemische Inhibition der ADAM-Proteasen im in-vivo-Tiermodell.	22
2.2	Narkosemittel für das in-vivo-Tiermodell.	22
2.3	Zellkulturmedium der Zelllinie H441.	23
2.4	Zellkulturmedium der Zelllinie HMEC-1.	24
2.5	Inhibitoren für die Inhibition der ADAM-Proteasen in in vitro Untersuchungen.	25
2.6	Primär- und Sekundärantikörper.	26
2.7	Murine und humane Primer für die RT-qPCR.	28
2.8	Gebrauchsfertige Reaktionslösungen und Kits.	30
2.9	Chemikalien und Reagenzien.	32
2.10	Selbsthergestellte Puffer.	34
2.11	Enzyme.	35
2.12	Geräte.	36
2.13	Verbrauchsmaterialien.	37
2.14	Software.	40
3.1	Zusammensetzung der Narkoselösung am Beispiel für die Herstellung von 10 ml.	43
3.2	Zusammensetzung der Enzymlösung am Beispiel für eine Lungenprobe.	45
3.3	Antikörpermix 1.	48
3.4	Antikörpermix 2.	48
3.5	Antikörpermix 3.	48
3.6	Antikörpermix 4.	48
3.7	Antikörpermix 5.	48
3.8	Reaktionsprotokoll des Thermocyclers für den cDNA-Umschrieb (RT-PCR).	53
3.9	Arbeitsschritte zur Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffin-Schnitte.	59
3.10	Färbepanels für die murinen und humanen Immunfluoreszenzaufnahmen.	60
3.11	Rezeptur von Sammel- und Trenngel (Menge für vier SDS-Polyacrylamid-gel).	62
3.12	Übersicht der verwendeten Entwicklungsreagenzien.	65
3.13	Antikörpermix Transmigrationsassay.	69

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
ALI	Acute Lung Injury (Akute Lungenschädigung)
APC/Cy7	Allophycocyanin/Cyanin7
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome (Akutes Lungenversagen)
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BCA	bicinchoninic acid (Bicinchoninsäure)
CANDIS	conserved adam seventeen dynamic interaction sequence
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary desoxyrybonucleic acid (komplementäre DNA)
CREB	cAMP response element-binding protein
CX3CL1	C-X3-C Chemokin Ligand 1
CXCL	C-X-C Motiv Chemokin Ligand
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ECMO	extracorporeal membrane oxygenation (extrakorporale Membranoxygenierung)
EGF	epidermal growth factor (epidermaler Wachstumsfaktor)
ELA2	neutrophile Elastase
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ERK	extracellular signal-related kinases (extrazellulär signalregulierte Kinasen)
EXITS	exon induced translational stop
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FADD	fas-associated protein with death domain
FBS	fetal bovine serum (fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
FSC	forward scatter (Vorwärtsstreulicht)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HFNO	high flow nasal cannula
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettichperoxidase)
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IL	Interleukin
iRhom2	inaktives Rhomboid-Protein 2
JAK1	Januskinase 1
JAM	junctional adhesion molecule
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
MAC-1	macrophage-1 antigen
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MEM	minimal essential medium
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MPO	Myeloperoxidase
NaCl	Natriumchlorid
NFW	Nuklease-freies Wasser
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NIV	non-invasive ventilation (nichtinvasive Beatmung)
NTC	no template control
OD	optische Dichte
PaO ₂ /FiO ₂	Verhältnis von arteriellem Sauerstoffpartialdruck zur Fraktion des einge-atmeten Sauerstoffs
PBS	phosphate-buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7
PEEP	positive endexpiratory pressure (positiv-endexpiratorischer Druck)
PEG	Polyethylenglykol

PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PKC	Proteinkinase C
PMNs	polymorphkernige Neutrophile
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radioimmunpräzipitations-Assay
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
ROS	reactive oxygen species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	real time quantitative polymerase chain reaction
siRNA	small interfering RNA
SSC	side scatter (Seitwärtsstreulicht)
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3
SVMPs	snake venom metalloproteinases (Schlagengift-Metalloproteasen)
TACE	tumor necrosis factor-alpha converting enzyme
TGF	transforming growth factor (transformierender Wachstumsfaktor)
TLR4	Toll-like Receptor 4
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktorrezeptor
TRADD	tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VE-Cadherin	vascular endothelial-cadherin
VEGFR2	vascular endothelial growth factor receptor 2
VILI	ventilator-induced lung injury (beatmungsinduzierte Lungenschädigung)
VLA-4	very late antigen-4
vWF	von-Willebrand-Faktor

1. Einleitung

1.1. Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)

1.1.1. Definition und Geschichte

Das *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) ist ein akut lebensbedrohliches klinisches Syndrom, das infolge einer Entzündung der Lunge durch ein akutes hypoxämisches Lungenversagen entsteht und nicht durch ein kardiales Lungenödem verursacht wird.

Erstmals beschrieben wurde das ARDS 1967 von Ashbaugh et al., die in einem Fallbericht über zwölf Patienten ein einheitliches klinisches Bild mit schwerer Dyspnoe, Tachypnoe, einer auf Sauerstofftherapie nicht ansprechenden Zyanose, verminderter Lungencompliance und diffusen alveolären Infiltraten im Röntgen-Thorax beobachteten (Ashbaugh et al., 1967). Im Jahr 1988 stellten Murray et al. eine erweiterte und standardisierte Definition vor, die ein systematisches und quantifizierbares Vorgehen zur Diagnose und Beurteilung des Schweregrades ermöglichte. Diese Definition betonte den akuten Krankheitsverlauf, berücksichtigte die Ätiologie und führte den sogenannten *lung injury score* ein (Murray et al., 1988).

1992 wurde im Rahmen der *American-European Consensus Conference* erstmals eine international anerkannte, einheitliche Definition für das ARDS und die *Acute Lung Injury* (ALI) etabliert. Zu den zentralen diagnostischen Kriterien zählten der akute Krankheitsbeginn, bilaterale Infiltrate im Röntgen-Thorax, das Fehlen von Anzeichen einer linksventrikulären Dysfunktion sowie die Einstufung des Schweregrades anhand der Oxygenierungsstörung mittels Horovitz-Index (Verhältnis von arteriellem Sauerstoffpartialdruck zur inspiratorischen Sauerstofffraktion, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$). Dabei wurde ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 \leq 300$ mmHg für ALI und ≤ 200 mmHg für ARDS definiert, jeweils bei einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) ≥ 5 cm H₂O (Bernard et al., 1994).

2012 wurden diese Kriterien durch die *ARDS Definition Task Force* der *European Society of Intensive Care Medicine* zeitlich, radiologisch und klinisch präzisiert (Force et al., 2012). Der akute Beginn oder die Verschlechterung einer hypoxämischen respiratorischen Insuffizienz wurde dabei zeitlich klar definiert: Die Symptome müssen innerhalb einer Woche nach einem bekannten klinischen Ereignis oder innerhalb einer Woche nach neu aufgetretenen bzw. sich verschlechternden respiratorischen Symptomen

auftreten. Zudem wurden diffuse bilaterale Infiltrate im Röntgen-Thorax, die nicht durch Pleuraergüsse, Atelektasen oder Raumforderungen erklärbar sind, als diagnostisches Kriterium festgelegt. Eine kardiale Ursache des Lungenversagens muss echokardiographisch ausgeschlossen werden, wobei das pulmonale Ödem nicht vollständig durch eine akute Herzinsuffizienz oder Volumenüberladung erklärbar sein darf. Die Schwere der Oxygenierungsstörung wird in der sogenannten Berlin-Definition anhand des $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Quotienten (bei $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$) in drei Kategorien unterteilt: mildes ARDS (201–300 mmHg), moderates ARDS (101–200 mmHg) und schweres ARDS ($\leq 100 \text{ mmHg}$).

Seit der Veröffentlichung der Berlin-Definition haben verschiedene Studien Limitierungen dieser Definition aufgezeigt und diverse Weiterentwicklungen die Ausweitung der ARDS-Definition gefordert (Angus, 2012, Grasselli et al., 2023). Diskutiert wurden insbesondere die Einbeziehung nicht-invasiver pulsoximetrischer Verfahren zur Beurteilung der Oxygenierung, der Einsatz von High-Flow-Nasenkanülen (*high flow nasal oxygenation*, HFNO) bei schwerem hypoxämischem Atemversagen sowie der Gebrauch von Ultraschall als alternative bildgebende Methode (Vercesi et al., 2018, Wick et al., 2022, Frat et al., 2015, Ranieri et al., 2022). Vor allem in ressourcenlimitierten Regionen sind Thorax-Röntgenaufnahmen, arterielle Blutgasanalysen und die mechanische Beatmung nicht immer verfügbar. Infolgedessen veröffentlichte 2024 eine *Global Consensus Conference* eine neue, erweiterte ARDS-Definition. Diese berücksichtigt nun auch indolentere Verläufe im zeitlichen Kriterium (z.B. bei COVID-19), erlaubt die Verwendung von Ultraschallbefunden als Alternative zur Röntgenbildgebung und erweitert die Diagnostik durch die Integration pulsoximetrischer Messungen anstelle der arteriellen Blutgasanalyse (Matthay et al., 2024). Zusätzlich wurde eine neue Kategorie für nicht intubierte Patienten und eine modifizierte Definition für ressourcenlimitierte Umgebungen eingeführt (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1. Diagnosekriterien der neuen globalen ARDS-Definition nach (Matthay et al., 2024).

Diagnosekriterien, die auf alle ARDS-Kategorien zutreffen	
Risikofaktoren und Ursprung des Ödems	Ausgelöst durch einen akuten prädisponierenden Risikofaktor (siehe Ätiologie) Lungenödem ist nicht ausschließlich oder primär kardial bedingt Hypoxämie/ Gasaustauschstörung ist nicht primär auf Atelektasen zurückzuführen
Zeit	Akuter Beginn oder Verschlechterung innerhalb einer Woche nach prädisponierendem Risikofaktor oder neu aufgetretenen/ sich verschlechternden respiratorischen Symptomen
Thorax-bildgebung	Bilaterale Verschattungen im Röntgen/ Computertomographie Beidseitige B-Linien und/ oder Konsolidierungen im Ultraschall

Kriterien, die für spezifische ARDS-Kategorien gelten (Oxygenierung)	
Nicht intubiertes ARDS	$\text{PaO}_2:\text{FiO}_2 \leq 300 \text{ mmHg}$ oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$ (bei $\text{SpO}_2 \leq 97 \%$) unter HFNO mit $> 30 \text{ L/min}$ oder unter NIV/CPAP mit $\text{PEEP} \geq 5 \text{ cm H}_2\text{O}$
Intubiertes ARDS	mild = $\text{PaO}_2:\text{FiO}_2 200\text{-}300 \text{ mmHg}$ oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$ (bei $\text{SpO}_2 \leq 97 \%$) moderat = $\text{PaO}_2:\text{FiO}_2 100\text{-}200 \text{ mmHg}$ oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 235$ (bei $\text{SpO}_2 \leq 97 \%$) schwer = $\text{PaO}_2:\text{FiO}_2 \leq 100 \text{ mmHg}$ oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 148$ (bei $\text{SpO}_2 \leq 97 \%$)
Modifizierte Definition für ressourcenlimitierte Umgebungen	$\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$ (bei $\text{SpO}_2 \leq 97 \%$)

1.1.2. Epidemiologie

Einer der bekanntesten populationsbasierten Studien zufolge liegt die Inzidenz von moderatem und schwerem ARDS bei 58,7 Fällen pro 100.000 Einwohner und die Mortalität bei 41,1 % (Rubenfeld et al., 2005). Eine der bislang größten populationsbasierten Studien wurde von Villar et al. in 13 geographischen Regionen Spaniens über einen Zeitraum von mehr als 18 Jahren durchgeführt (Villar et al., 2011). Für die Gesamtpopulation beschrieben die Autoren eine Inzidenz von 7,2 Fällen pro 100.000 Einwohner sowie eine Mortalität von 42,7 % auf der Intensivstation und 47,8 % bei allgemeiner Hospitalisierung bei Patienten mit moderatem oder schwerem ARDS.

Die jüngste große, krankenhausbasierte Studie wurde 2016 von Bellani et al. veröffentlicht und lieferte erstmals umfassende, weltweit erhobene epidemiologische Daten zum ARDS aus 459 Intensivstationen in 50 Ländern. Unter 29.144 Intensivaufnahmen lag die Prävalenz des ARDS bei 10,4 %. Von 12.906 Patienten, die eine mechanische Beatmung erhielten, erfüllten 23,4 % die ARDS-Kriterien der Berlin-Definition (Bellani et al., 2016). Dabei entwickelten 30 % der Patienten ein mildes, 46,6 % ein moderates und 23,4 % ein schweres ARDS. Die Mortalität betrug 35,3 % auf der Intensivstation und 40 % bei allgemeiner Hospitalisierung, wobei sie mit zunehmendem Schweregrad von 34,9 % (mild) über 40,3 % (moderat) bis 46,1 % (schwer) stieg.

Die intensivmedizinische Behandlung des ARDS ist häufig langwierig und die Langzeitfolgen der Überlebenden gehen oftmals mit erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität einher. Neben einer reduzierten pulmonalen Funktion und einer verminderten körperlichen Leistungsfähigkeit (Orme et al., 2003, Pfoh et al., 2016) berichten viele Betroffene über physische, emotionale, neurokognitive und soziale Beeinträchtigungen, die

unter anderem mit Depressionen und posttraumatischen Belastungsstörungen assoziiert sind (Kersten et al., 2020).

1.1.3. Ätiologie

Das ARDS kann als akute, diffuse und entzündliche Lungenschädigung durch eine Vielzahl prädisponierenden Risikofaktoren ausgelöst werden. ARDS tritt entweder infolge einer direkten Schädigung der Lunge, z.B. durch Pneumonie, Aspiration oder Lungenkontusion, oder indirekt infolge einer systemischen Erkrankung wie nicht-pulmonaler Inflammation, extrapulmonaler Sepsis, hämorrhagischem Schock, Trauma, Verbrennungen oder Transfusion auf (Matthay et al., 2024).

Die häufigste Ursache von ARDS ist mit 59,4 % die Pneumonie, die auf eine bakterielle, virale oder fungizide Infektion zurückgeführt werden kann (Bellani et al., 2016). Die Pneumonie kann dabei entweder ambulant oder nosokomial erworben sein. Die zweithäufigste Ursache stellt mit 16 % eine extrapulmonale Sepsis dar (Bellani et al., 2016).

1.1.4. Klinik und Therapie

Klinisch ist der akute Beginn des ARDS durch eine rasch zunehmende, schwere Dyspnoe mit Tachypnoe und Zyanose infolge einer Gasaustauschstörung gekennzeichnet. Weitere typische Symptome sind Unruhe, Angst, Verwirrtheit und Erschöpfung. Diese Leitsymptome spiegeln die arterielle Hypoxämie wider, die zusammen mit bilateralen Röntgentrübungen, einem vergrößerten Shuntvolumen, erhöhtem alveolären Totraum und verminderter Lungencompliance zu den zentralen klinischen Merkmalen des ARDS zählt (Matthay et al., 2024, Ware et al., 2000).

Jahrzehntelange Forschung und moderne Intensivmedizin ermöglichen zunehmend ein Überleben des akut lebensbedrohlichen Syndroms. Die Therapie richtet sich dabei nach dem Schweregrad des Lungenversagens. In der Akutversorgung liegt der Schwerpunkt, sofern möglich, auf der Vermeidung einer invasiven Beatmung durch Verfahren wie HFNC und *non-invasive ventilation* (NIV). Ist eine invasive Beatmung erforderlich, wird eine lungenprotektive Beatmungsstrategie mit niedrigem Tidalvolumen (6 ml/kg ideales Körpergewicht (KG)) und adäquatem PEEP empfohlen. Ergänzend werden Strategien zur Reduktion von Baro- und Atelektrauma, ein angepasstes Volumenmanagement sowie Lagerungstherapien eingesetzt (Kersten et al., 2020). Die Lagerungstherapie in Bauchlage oder in einer 130°-Seitenlage des Patienten verbessert nachweislich die Oxygenierungsparameter, reduziert das Risiko einer *ventilator-induced lung injury* (VILI)

und führt zu einer absoluten Risikoreduktion der 28-Tage-Mortalität um 16 % (Broccard et al., 2000, Marini, 2010, Guerin et al., 2013).

Kausale Therapieoptionen bestehen, abgesehen von der Behandlung der ursächlichen Infektion, bislang nicht. Die Evidenzlage zu medikamentösen, adjunktiven Therapien, wie z.B. neuromuskulärer Blockade, inhalativer Stickstoffmonoxidgabe, Steroidtherapie oder immunmodulatorischen Ansätzen, bleibt uneinheitlich und zeigt bislang keine klaren Überlebensvorteile (Papazian et al., 2010, National Heart et al., 2019, Adhikari et al., 2014, Seam et al., 2016, Ranieri et al., 2020). Neuere Erkenntnisse einer multizentrischen, randomisierten Studie aus 17 Intensivstationen deuten jedoch darauf hin, dass die frühzeitige Gabe von Dexamethason die Dauer der mechanischen Beatmung und die Mortalität bei Patienten mit moderatem und schwerem ARDS signifikant reduzieren kann (Villar et al., 2020a, Villar et al., 2020b).

In extremen Fällen kommen als *Ultima ratio* Lungenersatzverfahren wie die extrakorporeale Membranoxygenierung (*extracorporeal membrane oxygenation*, ECMO) zur temporären Überbrückung des Lungenversagens zum Einsatz (Patel et al., 2019).

1.1.5. Tierexperimentelle Modelle zur ARDS-Forschung

Die humane ARDS-Forschung steht vor mehreren zentralen Herausforderungen. Humanstudien liefern wertvolle Erkenntnisse über den Krankheitsverlauf und die pulmonalen Veränderungen, erlauben jedoch nur selten gezielte experimentelle Eingriffe oder die systematische Untersuchung einzelner Einflussfaktoren. Hypothesen, die aus klinischen Studien abgeleitet werden, lassen sich beim Menschen nur schwer überprüfen, da zahlreiche klinische Variablen bei kritisch kranken Patienten nicht kontrollierbar sind. Zusätzlich erschweren die hohe Variabilität der Ursachen, Symptome, pathophysiologischen Mechanismen und Therapieansprechen die Durchführung und Vergleichbarkeit humaner Studien (Matute-Bello et al., 2008). Diese Heterogenität erfordert adaptive Studiendesigns sowie Strategien zur gezielten Patientenselektion, um die Aussagekraft der Studien zu erhöhen. Darüber hinaus fehlen bislang größere, wissenschaftlich auswertbare Register mit Langzeitdaten aus klinischen Studien. Bestehende Datensätze lassen sich aufgrund der Methodik randomisierter, kontrollierter Studien häufig nicht auf ein breiteres Patientenkollektiv übertragen (Kersten et al., 2020).

Tiermodelle bieten die Möglichkeit klinische Hypothesen aus Patientenstudien im intakten biologischen System unter standardisierten Bedingungen zu testen. Zudem können Ergebnisse aus in-vitro-Systemen hinsichtlich ihrer Relevanz in vivo validiert werden. In

dieser Arbeit wurde die Maus als Versuchstier gewählt, da sie weit verbreitet für die Erforschung von menschlichen Krankheiten eingesetzt wird und die gewünschten, genetisch modifizierten Mäuse in kurzer Zeit und in großer Anzahl selbst gezüchtet werden können (Matute-Bello et al., 2008). Nach Matute-Bello et al. zählen zu den am häufigsten verwendeten in-vivo-Modellen des ARDS die mechanische Ventilation, Lipopolysaccharide (LPS), lebende Bakterien und Hyperoxie. Keines der genannten Modelle bildet jedoch alle pathophysiologischen Merkmale des humanen ARDS vollständig ab, weshalb die Modellauswahl gezielt nach dem jeweiligen Forschungsaspekt erfolgen muss.

Ein wesentlicher Vorteil des Modells der ventilationsinduzierten Lungenschädigung liegt in seiner hohen klinischen Relevanz. Allerdings ist die mechanische Ventilation technisch anspruchsvoll und kann im Gegensatz zum Patienten bei Versuchstieren nur über kurze Zeiträume angewendet werden (Dos Santos et al., 2000, Dreyfuss et al., 1998, Acute Respiratory Distress Syndrome et al., 2000). Sie eignet sich insbesondere für die Untersuchung epithelialer Mechanismen, während z.B. die Applikation lebender Bakterien sowohl das Epithel als auch das Endothel betrifft. Die intrapulmonale Gabe von Bakterien induziert eine erhöhte Permeabilität, ein interstitielles Ödem und eine neutrophile Alveolitis und ist somit dem ARDS klinisch sehr ähnlich (Fox-Dewhurst et al., 1997). Dieses Modell ist jedoch zeit- und kostenintensiv und erfordert erhöhte Sicherheitsstandards im Umgang mit pathogenen Kulturen. Das Hyperoxie-Modell bleibt hinsichtlich seiner klinischen Relevanz umstritten, da eine dreitägige Exposition gegenüber 100 % Sauerstoff beim Menschen keine Lungenschädigung verursacht (Barber et al., 1970). Dennoch führt Hyperoxie im Tiermodell zu klar definierten exsudativen und proliferativen Phasen und eignet sich daher besonders zur Untersuchung von Reparaturprozessen nach Lungenschädigung.

Für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der inhalativen, LPS-vermittelten Lungenschädigung gewählt. Dieses Modell betrifft primär das Kapillarendothel, wobei die Veränderungen der alveolär-kapillären Permeabilität im Vergleich zum humanen ARDS weniger ausgeprägt sind (Wiener-Kronish et al., 1991). LPS induziert eine ausgeprägte neutrophile Entzündungsreaktion mit intrapulmonaler Zytokinfreisetzung. Technisch ist vernebeltes LPS einfach zu verabreichen, erfordert keine Narkose der Versuchstiere, weist eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen den Experimenten auf und zeigt auch in vitro nur eine geringe direkte zelluläre Toxizität (Matute-Bello et al., 2008).

1.2. Akute pulmonale Inflammation

1.2.1. Pathophysiologie

Die akute pulmonale Inflammation ist ein zentraler Schlüsselprozess in der Pathogenese des ARDS. Sie beschreibt eine plötzlich einsetzende Entzündungsreaktion des Lungengewebes, die unter anderem durch Infektionen, die Inhalation toxischer Substanzen, Aspiration oder systemische Entzündungsprozesse ausgelöst werden kann (Ashbaugh et al., 1967). Die akute pulmonale Inflammation stellt einen unspezifischen, aber fundamentalen pathophysiologischen Mechanismus bei verschiedenen Lungenerkrankungen dar und kann abhängig von Ausmaß und Dauer in komplexere Krankheitsbilder wie das ARDS übergehen. Die pulmonale Entzündungsreaktion ist somit ein zentraler Bestandteil der ARDS-Entstehung, der eine Kaskade aus Gewebeschädigung und funktioneller Beeinträchtigung der Lunge auslöst. Unabhängig von der auslösenden Noxe folgt diese Entzündung einer charakteristischen pathophysiologischen Abfolge, die klassischerweise in drei Phasen unterteilt wird: exsudativ, proliferativ und fibrotisch (Katzenstein et al., 1976).

Die exsudative Phase ist gekennzeichnet durch eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität und eine massive Infiltration polymorphkerniger Neutrophiler (PMNs) in das Lungengewebe. Zu Beginn werden Zytokine von aktivierten Alveolarmakrophagen und dem betroffenen Lungenepithel freigesetzt (Force et al., 2012). Diese extensive Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren führt zu einer diffusen Schädigung der alveolär-kapillären Membran. Der Verlust der Endothelbarriere und die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität begünstigen die Bildung eines proteinreichen interstitiellen und intraalveolären Lungenödems, das die Diffusionsstrecke zwischen Blut und Gewebe vergrößert und somit den Gasaustausch erheblich beeinträchtigt (Matthay et al., 2011, Staub, 1981, Pugin et al., 1999). Darüber hinaus fördert die gestörte Barrierefunktion die Rekrutierung und Transmigration aktivierter PMNs in den Alveolarraum. Dort setzen diese Zytokine, reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS), Leukotriene und Proteasen frei, die eine weitere Rekrutierung von PMNs induzieren und über eine Hyperinflammation zu Kapillar- und Gewebeschäden führen (Force et al., 2012, Reutershan et al., 2005).

Die proliferative Phase ist durch die Proliferation von Alveolarzellen Typ II, die Regeneration des Alveolarepithels sowie die Organisation der hyalinen Membranen und den Beginn einer reversiblen Fibrosierung gekennzeichnet (Kersten et al., 2020, Matthay et al., 2019). In dieser reparativen Phase werden Pathogene, tote Wirtszellen und

Immunzellen durch Makrophagen aus dem Alveolarraum entfernt, wodurch die Regeneration und der Wiederaufbau geschädigter alveolärer Strukturen unterstützt werden (Englert et al., 2019, Pugin et al., 1999, Matthay et al., 2011).

Im Spätstadium der Erkrankung, der fibrotischen Phase, kommt es zu einer generalisierten, teils irreversiblen Fibrosierung der Lunge, die mit einer massiven Einschränkung der Lungenfunktion und einer ungünstigen Prognose einhergeht (Matthay et al., 2011, Thompson et al., 2017). Eine übermäßige Fibroblastenproliferation und Kollagenablagerung führen zu einer interstitiellen und alveolären Fibrose, die auch als Hepatisation bezeichnet wird, und die eine irreversible Verminderung der Lungencompliance und der Oxygenierung zur Folge hat (Katzenstein et al., 1976, Ware et al., 2000).

1.2.2. Interaktion zwischen Leukozyten und Endothel

Der Schweregrad der endothelialen Aktivierung und das Ausmaß der endothelialen Dysfunktion sind entscheidende Faktoren für Prognose und Überleben intensivpflichtiger ARDS-Patienten (Ware et al., 2004, Boyle et al., 1997). Entzündungsmediatoren wie Zytokine, Chemokine, ROS und Komplementfaktoren aktivieren das Endothel und induzieren eine veränderte Genexpression (Fischetti et al., 2006). Diese Aktivierung führt zu einer vermehrten Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, die für die Leukodiapedese essenziell sind und löst die Synthese sowie Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus. Beide Prozesse begünstigen eine verstärkte Transmigration von Leukozyten durch das pulmonale Endothel und können bei unkontrollierter und exzessiver Infiltration von Neutrophilen zu einer ausgeprägten Lungenschädigung führen.

Die Aktivierung des Endothels erfolgt in zwei Phasen, wobei die frühe Aktivierung komplementvermittelt ist und insbesondere zur Hochregulierung von P-Selektin führt. P-Selektin ist konstitutiv im Cytoplasma der Endothelzellen vorhanden und kann nach Aktivierung rasch auf die Zelloberfläche transloziert werden, um zirkulierende Leukozyten zu rekrutieren (Foreman et al., 1994, Springer, 1994). Da diese komplementvermittelte Aktivierung nur von kurzer Dauer ist, folgt eine nachgeschaltete, zytokinabhängige Phase (Fischetti et al., 2006). Hierbei spielen insbesondere die Zytokine Tumornekrosefaktor (TNF)- α und Interleukin (IL)-1 β , die die Expression und Freisetzung von Selektinen weiter steigern, eine entscheidende Rolle (Wyble et al., 1997). Selektine sind Glykoproteine, die die frühen Schritte der Leukodiapedese vermitteln, darunter die Margination, die initiale Endothelbindung und das Rollen der Leukozyten.

Neutrophile Adhäsionsmoleküle wie L-Selektin und P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) vermitteln eine initiale, lockere Adhäsion an endotheliale Selektine (Springer, 1994, McEver, 1994). Die Selektin-vermittelte Bindung sowie Chemokinsignale aktivieren über intrazelluläre Signalwege Integrine auf der Oberfläche der Leukozyten (Ley et al., 2007). Integrine wie *macrophage-1 antigen* (MAC-1) und *very late antigen-4* (VLA-4) besitzen eine hohe Affinität zu ihren Liganden auf Endothelzellen, insbesondere *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1). Über diese Interaktionen vermitteln sie eine feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel und ermöglichen die anschließende transendotheliale Migration in das entzündete Gewebe (Vestweber, 2015).

Die Integrin-vermittelte Bindung und proinflammatorische Zytokine beeinflussen zudem die Expression interzellulärer Adhäsionsmoleküle und führen zu einer Auflockerung der endothelialen Zell-Zell-Verbindungen, beispielsweise durch Dissoziation von *vascular endothelial-cadherin* (VE-Cadherin) und *junctional adhesion molecule* (JAM)-A. Diese strukturellen Veränderungen schwächen die Barrierefunktion des Endothels und erleichtern die Leukodiapedese (Nottebaum et al., 2008, Broermann et al., 2011, Ostermann et al., 2002, Weber et al., 2007).

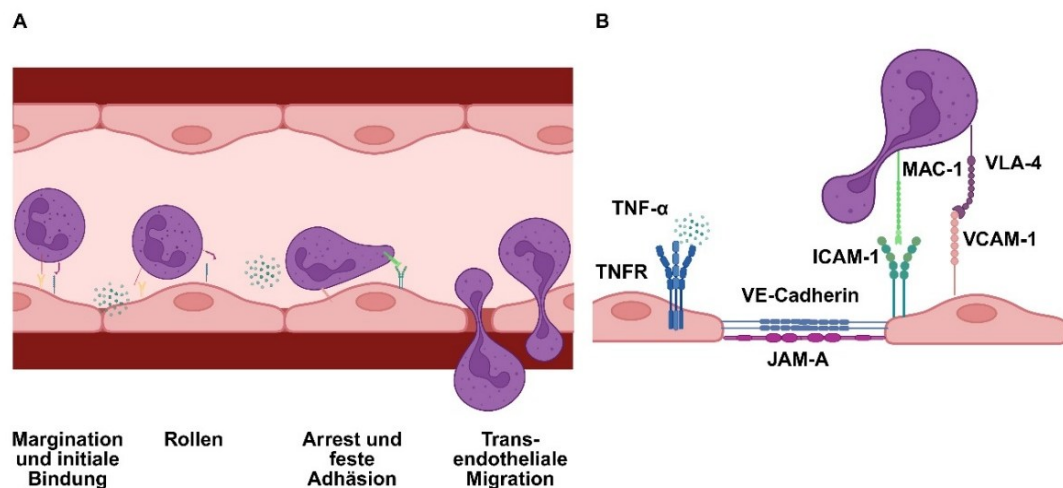


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Leukodiapedese. (A) Die Endothelaktivierung führt zur Rekrutierung und transendothelialen Migration von polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs), einschließlich der Margination und initialer, Selektin-vermittelter Adhäsion, dem Rollen, der festen Integrin-vermittelten Adhäsion und der endothelialen Transmigration durch das Endothel. Die initiale, lockere Adhäsion und das Rollen entlang des Endothels erfolgen über Bindung von neutrophilem L-Selektin und P-Selektin Glykoprotein Ligand-1 (PSGL-1) an endotheliales E-Selektin und P-Selektin. (B) Die feste Adhäsion und transendotheliale Migration erfolgen über eine feste Bindung der Integrine *macrophage-1 antigen* (MAC-1) und *very late antigen-4* (VLA-4) an die endothelialen Bindungspartner *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1). Über Regulation der Adhäsionsmoleküle *vascular endothelial-cadherin* (VE-Cadherin) und *junctional adhesion molecule* (JAM)-A werden die Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen gelockert und folglich die endotheliale Barrierefunktion abgeschwächt sowie die Leukodiapedese erleichtert. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/khi4j3l>).

Von zentraler Bedeutung für die gezielte Transmigration von Leukozyten in das entzündete Lungengewebe ist die Chemotaxis (Baggiolini, 1998, Bhatia et al., 2012). Zytokine, Komplementfaktoren, bakterielle Membranbestandteile und Chemokine können als chemotaktische Signalstoffe wirken und einen chemotaktischen Gradienten erzeugen, der Immunzellen, insbesondere Leukozyten, gezielt zum Entzündungsherd lenkt (Ley et al., 2007). In der akuten pulmonalen Inflammation sind vor allem die proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 maßgeblich an der Chemotaxis beteiligt. Sie werden vorwiegend von aktivierten Alveolarmakrophagen, Monozyten und Endothelzellen sezerniert (Bhatia et al., 2012). Chemokine stellen eine funktionell spezialisierte Untergruppe der Zytokine dar und spielen ebenfalls eine zentrale Rolle bei der gezielten Rekrutierung und Migration von Leukozyten. Das wichtigste humane Chemokin ist der C-X-C Motiv Chemokin Ligand (CXCL) 8, auch IL-8 genannt. Es wird insbesondere von aktivierten Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen freigesetzt. Die murinen Homologe von IL-8 sind CXCL1 und CXCL2/3 (Reutershan, 2006, Zlotnik et al., 2012).

Eine Dysregulation der Zytokin- und Chemokinfreisetzung kann im Verlauf des ARDS zu einem Zytokinsturm führen, der neben dem Ausmaß der endothelialen Aktivierung entscheidend für Krankheitsverlauf, Prognose und Überleben der Patienten ist (Ley et al., 2006, Matthay et al., 2011).

1.3. A Disintegrin and Metalloproteinase 17 (ADAM17)

Ein kontrollierter, zelltypspezifischer und zeitlich koordinierter Auf- und Abbau von Signalproteinen, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen ist für zahlreiche biologische Prozesse, wie z.B. die transendotheliale Migration von Leukozyten, von zentraler Bedeutung. Diese Regulation kann über intrazelluläre Signaltransduktionswege, über die Modulation von Interaktionsmechanismen, z.B. durch Veränderung der Spezifität oder Adhäsionsstärke, (Gumbiner, 2000, Yap et al., 1997) oder über proteolytische Ektodomä-nenspaltung erfolgen. Letztere, auch *Ectodomain-Shedding* oder kurz *Shedding* genannt, beschreibt die proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne eines transmembranen Proteins durch spezifische Proteasen, sogenannte Sheddasen, wobei die freigesetzte Ektodomäne in den Extrazellularraum abgegeben wird (Hooper et al., 1997). Über diesen Mechanismus lassen sich beispielsweise Entzündungsreaktionen regulieren, da die abgespaltene Ektodomäne, abhängig vom jeweiligen Substrat, sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkungen entfalten kann (Dreymueller et al., 2012b, Dreymueller et al., 2015).

Zu den wichtigsten Sheddases zählen die Mitglieder der *A Disintegrin and Metalloprotease* (ADAM)-Familie, insbesondere ADAM10 und ADAM17. Die ADAMs sind Metalloproteinasen, die zur Gruppe der Metzinkine gehören. Diese umfasst Zink-abhängige Metalloproteasen, die in vier Untergruppen unterteilt sind, wobei die ADAM-Familie den Adamlysinen untergeordnet ist (Bode et al., 1993). ADAM-Proteasen wurden erstmals 1992 in Spermien des Meerschweinchens identifiziert, wo sie sowohl an der Spermatogenese als auch an der Fusion von Spermium und Eizelle beteiligt sind (Blobel et al., 1992). Vertreter dieser Proteinfamilie finden sich sowohl bei Säugetieren als auch bei Nicht-Säugetieren, z.B. *Xenopus laevis* oder *Drosophila melanogaster*, nicht jedoch bei Bakterien oder Pflanzen (Stone et al., 1999, Edwards et al., 2008). Insgesamt sind 34 Mitglieder der ADAM-Familie bekannt, von denen 22 im Menschen vorkommen und 13 dieser humanen ADAMs eine proteolytisch aktive Domäne mit vergleichbarer Struktur besitzen (Seals et al., 2003, Andreini et al., 2005, Edwards et al., 2008).

ADAM17 ist die erste ADAM-Protease, die in direktem Zusammenhang mit *Shedding* beschrieben und molekular charakterisiert wurde (Black et al., 1997, Moss et al., 1997a). Sie ist verantwortlich für die proteolytische Spaltung von TNF- α , der im Rahmen von Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigungen freigesetzt wird. Aufgrund dieser Funktion wird ADAM17 auch als *tumor necrosis factor-alpha converting enzyme* (TACE) bezeichnet. Die Protease spaltet eine Peptidbindung in der extrazellulären Domäne der membranständigen Vorläuferform pro-TNF- α und setzt das lösliche, biologisch aktive Zytokin frei, das zentrale immunmodulatorische Funktionen besitzt. Inzwischen sind für ADAM17 mehr als 80 Substrate identifiziert, darunter Wachstumsfaktoren der EGF-Familie, Zytokine, Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle (Scheller et al., 2011a, Hinkle et al., 2004).

1.3.1. Struktureller Aufbau und Funktion

Die ADAMs sind membranständige Multidomänenproteine, die eine charakteristische Domänenstruktur besitzen, welche zuvor bei einigen Vertretern der Gruppe der Schlangengift-Metalloproteasen (*snake venom metalloproteinases*, SVMPs) entdeckt wurde. Wie in Abbildung 1.2 dargestellt, bestehen die Transmembranproteine aus einem Signalpeptid, einer N-terminalen Prodomäne, der Metalloprotease-Domäne, der Disintegrin-ähnlichen Domäne, der Cystein-reichen Domäne, der *epidermal growth factor* (EGF)-ähnlichen Domäne sowie der Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne (Seals et al., 2003). Die atypischen Strukturen von ADAM10 und ADAM17 stellen zwei Ausnahmen dar. Sie besitzen statt der Cystein-reichen und EGF-ähnlichen Domäne eine

membranproximale Domäne, die auch als *stalk region* bezeichnet wird (Black et al., 1997, Moss et al., 1997a, Lambrecht et al., 2018, Grotzinger et al., 2017).

Das Signalpeptid an der Prodomäne von ADAM17 leitet den Transport der Protease in das endoplasmatische Retikulum und somit in den sekretorischen Weg der Zelle ein (Seals et al., 2003, Bhardwaj et al., 2023). Es wird im Verlauf der ADAM17-Maturation abgespalten. Die N-terminale Prodomäne von ADAM17 hat eine inhibitorische Funktion und fungiert als Chaperon. Beide Funktionen sind essenziell für die Regulation und Funktionsfähigkeit von ADAM17. Während der intrazellulären Reifung hält die Prodomäne das katalytische Zentrum der Metalloproteinase-Domäne über ein Cystein-Switch-Motiv in einer inaktiven Zymogen-Form (Van Wart et al., 1990). Die Chaperon-Funktion gewährleistet die korrekte Proteinfaltung und den Transport innerhalb der Zelle. Die Pro-Protein-Konvertase Furin spaltet die Prodomäne sequenziell an zwei Schnittstellen, wodurch ADAM17 aktiviert wird und seine proteolytische Funktion ausüben kann (Wong et al., 2015).

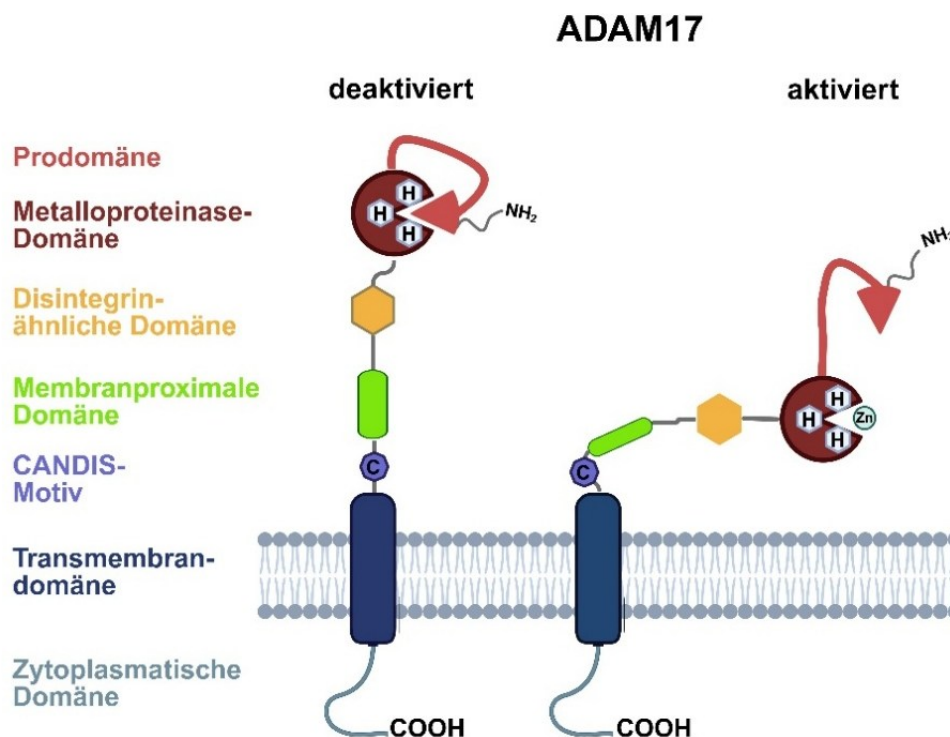


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Multidomänenstruktur von ADAM17 in der inaktiven und aktiven Form. Die Struktur von *A Disintegrin and Metalloproteinase 17* (ADAM17) besteht aus einer N-terminalen Prodomäne, gefolgt von einer Metalloproteinase-Domäne, Disintegrin-ähnlichen Domäne, einer membranproximalen Domäne, dem *conserved adam seventeen dynamic interaction sequence* (CANDIS)-Motiv, der Transmembrandomäne und der C-terminalen zytoplasmatischen Domäne. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/nr7h25y>).

Die Metalloproteinase-Domäne von ADAM17 ist für die proteolytische Spaltung der Substrate verantwortlich. Dabei können Zielproteine sowohl auf der eigenen Zelloberfläche

als auch auf unmittelbar benachbarten Zellen gespalten werden. Das katalytische Zentrum dieser Domäne enthält ein charakteristisches Zinkbindungsmotiv (HEXXHXXGXXH), in dem die Histidinreste das Zinkion komplexieren und ein konservierter Methioninrest (*Met-Turn*) die funktionelle Konformation des aktiven Zentrums stabilisiert (Wolfsberg et al., 1995). Die katalytische Domäne weist eine definierte dreidimensionale Struktur mit einem β -Faltblatt und drei α -Helices auf (Stöcker et al., 1995). Die tertiäre Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum ermöglicht spezifische Wechselwirkungen mit den Peptidsequenzen des Substrats (Caescu et al., 2009). Die charakteristische C-förmige Multidomänenstruktur der ADAM-Proteasen erlaubt eine kooperative Substraterkennung zwischen der Protease- und den Adhäsionsdomänen (Takeda et al., 2006). Dabei erhöhen insbesondere die Disintegrin- und Cystein-reiche Domäne über zusätzliche Interaktionen mit Zelloberflächenmolekülen die Substratspezifität. Diese wird zusätzlich durch substratinduzierte Konformationsänderungen bestimmt (Stawikowska et al., 2013).

Die Disintegrin-ähnliche Domäne von ADAM17 ist wesentlich für die strukturelle Ausrichtung der Metalloproteinase-Domäne zum Substrat (Takeda, 2009) und vermittelt Bindungen an Integrine, wodurch sie an Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen beteiligt ist (Wolfsberg et al., 1995). Die membranproximale Domäne wird durch die Disintegrin-stabilisierte C-Form in unmittelbare Nähe zur Metalloproteinase-Domäne gebracht (Takeda et al., 2006) und spielt dadurch eine zentrale Rolle bei der Substraterkennung, Dimerisierung und Regulation von ADAM17 (Lorenzen et al., 2012, Lorenzen et al., 2011, Reddy et al., 2000). Die membranproximale Domäne kann zwei verschiedene Isoformen annehmen, die jeweils mit einer inaktiven oder aktiven Konformation korrespondieren und somit die enzymatische Aktivität von ADAM17 bestimmen (Dusterhoft et al., 2013). In der *stalk-region* von ADAM17 befindet sich zwischen membranproximaler und Transmembrandomäne das evolutionär konservierte *conserved adam seventeen dynamic interaction sequence* (CANDIS)-Motiv. Dieses Motiv ist entscheidend für die Interaktion zwischen Zellmembran und Substrat sowie für Dimerisierung und Substraterkennung (Dusterhoft et al., 2014). Die Transmembrandomäne verankert ADAM17 fest in der Zellmembran und beeinflusst über die korrekte räumliche Ausrichtung der extrazellulären Domäne ebenfalls die *Shedding*-Aktivität (Li et al., 2007). Der zytoplasmatische Schwanz enthält Phosphorylierungsstellen für verschiedene Kinasen, darunter die p38-mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK), *extracellular signal-related kinases* (ERKs) oder die Polo-ähnliche Kinase 2. Über diese posttranslationale Modifikation kann die

Aktivität von ADAM17 gezielt reguliert werden (Xu et al., 2010, Xu et al., 2012, Schwarz et al., 2014).

Das *Shedding* hat weitreichende funktionelle Konsequenzen. Die Reduktion der Rezeptordichte auf der Zelloberfläche vermindert die Ligandenempfindlichkeit der betroffenen Zellen, während die freigesetzten löslichen Ektodomänen eigenständige biologische Aktivität entfalten. Diese können Signalkaskaden durch autokrine oder parakrine Agonismus- bzw. Antagonismusmechanismen modulieren. Darüber hinaus führt das *Shedding* von Adhäsionsmolekülen zur Auflösung von Zell-Zell-Kontakten, was die Integrität von Geweben und Barrieren nachhaltig beeinflusst (Lichtenthaler et al., 2018, Blobel, 2005, Arribas et al., 2002, Reiss et al., 2009, Garton et al., 2006).

1.3.2. Regulation und physiologische Bedeutung von ADAM17

Die Regulation der *Shedding*-Aktivität von ADAM17 ist aufgrund der vielseitigen physiologischen Funktionen essenziell, allerdings noch nicht vollständig untersucht (Dusterhoft et al., 2019). ADAM17 ist auf zahlreichen Zelltypen konstitutiv exprimiert (Moss et al., 1997b). Die Prozessierung der Vorläuferform im Golgi-Apparat durch Furin ist ebenfalls ein konstitutiver Prozess (Schlondorff et al., 2000). Das ADAM17-vermittelte *Shedding* kann konstitutiv oder induziert erfolgen, z.B. durch Zellaktivierung infolge einer LPS-Stimulation (Grotzinger et al., 2017, Pruessmeyer et al., 2009). Daraus ergeben sich verschiedene Regulationsmechanismen, wie das Zurückhalten der ADAMs im endoplasmatischen Retikulum, Konformationsänderungen an der Zelloberfläche und Phosphorylierung oder Dimerisierung der ADAM-Proteine (Marcello et al., 2010, Cisse et al., 2011, Sommer et al., 2016).

Die inaktive Proform von ADAM17 wird im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet (Abbildung 1.3). Inaktives Rhomboid-Protein 2 (iRhom2) gilt als wichtiger Regulator, der an die inaktive Proform der Protease bindet, den Austritt aus dem ER und den Transport zum Golgi-Apparat und zur Zelloberfläche ermöglicht (Adrain et al., 2012, McIlwain et al., 2012). *iRhom2-interacting protein* (iTAP) bindet als Regulator an iRhom2 und stabilisiert den iRhom2/ADAM17-Komplex an der Zelloberfläche, wodurch ein endolysosomaler Abbau von reifem ADAM17 verhindert wird. Der Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor (AT1R) kann nach Bindung von Angiotensin II eine spezifische intrazelluläre Signalkaskade auslösen, die zur Aktivierung und Hochregulation von membranständigem ADAM17 führt. Die *Shedding*-Aktivität von ADAM17 kann über Regulation der Phosphorylierungsstellen am cytoplasmatischen Schwanz durch mp38-MAPK und ERK verstärkt werden (Xu et al., 2012, Killock et al., 2010). Weitere Regulationsmechanismen zur

Kontrolle der ADAM17-Aktivität stellen Proteinkinasen C (PKCs), die Lokalisation von ADAM17, die Interaktion der Ektodomäne mit anderen Proteinen und Redoxreaktionen dar (Dang et al., 2013).

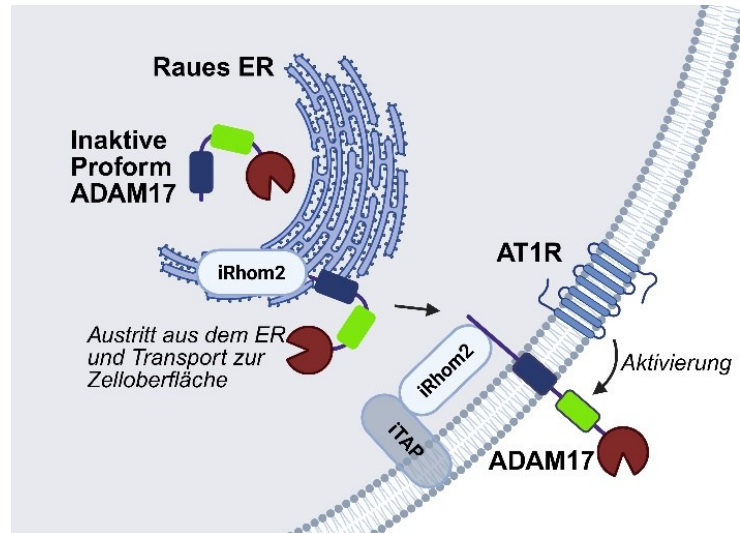


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Reifung im endoplasmatischen Retikulum, des Transports und der Aktivierung von ADAM17. Die inaktive Proform von *A Disintegrin and Metalloproteinase 17* (ADAM17) wird im rauen endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet. Inaktives Rhomboid-Protein 2 (iRhom2) bindet an die inaktive Proform der Protease, ermöglicht den Austritt aus dem ER und den Transport zur Zelloberfläche. *iRhom2-interacting protein* (iTAP) bindet als Regulator an iRhom2 und stabilisiert den iRhom2/ADAM17-Komplex in der Zellmembran. Der Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor (AT1R) aktiviert membranständiges ADAM17. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/lwmhluu>).

ADAM17 ist im Organismus ubiquitär exprimiert und hat demzufolge eine große physiologische Bedeutung. Bereits in der frühen Entwicklung bis zum Erwachsenenalter ist ADAM17 in den meisten Geweben vorhanden und wird in Neuronen, Gefäßzellen, Leukozyten und Tumorzellen kontinuierlich exprimiert (Pruessmeyer et al., 2009). Durch die Spaltung verschiedener Wachstumsfaktoren und EGF-Rezeptor-Liganden sowie essenzieller Substrate für die Entwicklung, z.B. Notch, Delta, *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2) und JAM-A, beeinflusst das ADAM17-vermittelte *Shedding* Proliferation, Differenzierung, Entwicklungs- und Regenerationsprozesse (Pruessmeyer et al., 2009, Vallath et al., 2014).

Knockout-Mausmodelle verdeutlichen die grundlegende Bedeutung von ADAM17 auf diese Prozesse im Organismus. Ein vollständiger Knockout von ADAM17 führt im Zeitraum vom Embryonaltag 17,5 bis kurz nach der Geburt zum Tod der Mäuse (Peschon et al., 1998). Die ADAM17-defizienten Mäuse zeigen Haar- und Hautdefekte sowie Entwicklungsstörungen der Lunge und des Herzens auf. Mittels *exon induced translational stop* (EXITS)-Methode generierte hypomorphe Mäuse, die ein ADAM17 mRNA- und Proteinspiegel von 5 % aufweisen, sind zwar lebensfähig, zeigen allerdings eine verminderte

Regenerationsfähigkeit, Augen-, Herz- und Hautfehler und eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber entzündlichen Erkrankungen (Chalaris et al., 2010).

In der Literatur sind drei Patienten mit einer ADAM17-Defizienz beschrieben (Blaydon et al., 2011, Tsukerman et al., 2015). Die weibliche Patientin eines Geschwisterpaars, mit derselben Mutation in ADAM17 und neonatalen entzündlichen Haut- und Darmläsionen, verstarb im Alter von zwölf Jahren an einer mit dem Parvovirus B19 assoziierten Myokarditis. Ihr Bruder lebte trotz leichter Kardiomyopathie und immer wiederkehrenden Hautentzündungen ein relativ normales Leben (Blaydon et al., 2011). Der dritte Patient war sehr anfällig für bakterielle Infektionen, entwickelte eine Hyperinflammation und verstarb mit zwei Jahren an den Folgen seiner Erkrankung (Tsukerman et al., 2015).

Aufgrund der großen Substratvielfalt von ADAM17 beeinflusst die Protease auch eine Reihe von pathophysiologischen Prozessen und wird insbesondere mit Erkrankungen des zentralen Nervensystems, der Tumorentwicklung und inflammatorischen Krankheiten in Verbindung gebracht (Pruessmeyer et al., 2009, Gooz, 2010). Diese umfassen unter anderem Alzheimer, Multiple Sklerose, Brust-, Hirn-, Darm-, Nieren-, Leber- und Lungenkrebs, aber auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, rheumatoide Arthritis, Asthma, Autoimmunerkrankungen, Herzerkrankungen oder akute und chronische Lungenentzündungen (Gooz, 2010, Pruessmeyer et al., 2009, Tian et al., 2023, Hartl et al., 2020, Lendeckel et al., 2005, Zheng et al., 2007, Blanchot-Jossic et al., 2005, Roemer et al., 2004, Ding et al., 2004, Zhou et al., 2006, Moss et al., 2008, Song et al., 2016, Zunke et al., 2017, Dittrich et al., 2020, Dreymueller et al., 2015, Chalaris et al., 2010, Li et al., 2006).

1.3.3. ADAM17 in der pulmonalen Inflammation

Alle pulmonalen Zellen exprimieren ADAM17 in variierenden Expressionsniveaus, wobei entzündliche Stimuli die Transkription von ADAM17 in der Lunge hochregulieren (Dijkstra et al., 2009, Ermert et al., 2003). Je nach Zellart wird die ADAM17-Aktivität mit unterschiedlichen Prozessen der Entzündungsreaktion in Verbindung gebracht. Leukozytäres ADAM17 reguliert die Freisetzung von Zytokinen und die Rekrutierung von Immunzellen (Black et al., 1997). Epitheliales ADAM17 beeinflusst die Regulation der epithelialen Barriere- und Abwehrfunktion (Murthy et al., 2012). Endotheliales ADAM17 wird mit der vaskulären Immunantwort, der Regulation von Adhäsionsmolekülen zwischen Endothelzellen und Leukozyten, sowie Endothelzellen untereinander, und folglich mit der mikrovaskulären Permeabilität, Ödembildung und transendothelialen Migration in Verbindung gebracht (Dreymueller et al., 2015). ADAM17 kann über das *Shedding*

von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen Entzündungsvorgänge in der Lunge regulieren. Durch die proteolytische Spaltung von TNF- α , TNF-Rezeptoren, IL-6R, L-Selektin, C-X3-C Chemokin Ligand 1 (CX3CL1), VCAM-1, ICAM-1, JAM-A und *cluster of differentiation* (CD) 44 beeinflusst ADAM17 unmittelbar die mikrovaskuläre Permeabilität und die transendotheliale Migration (Dreymueller et al., 2015). Im Folgenden werden ausgewählte Substrate aus dieser Aufzählung und deren Einfluss auf die Inflammation detailliert beschrieben.

ADAM17 vermittelt nach Zellaktivierung die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α , indem es die membranständige Vorläuferform Pro-TNF- α spaltet und in die lösliche, biologisch aktive Form überführt (Black et al., 1997, Moss et al., 1997a, Grell et al., 1995). TNF- α kann an seine Rezeptoren Tumornekrosefaktorrezeptor (TNFR) 1 und TNFR2 binden, die ebenfalls beide Substrate von ADAM17 sind (Peschon et al., 1998). Durch diese Bindung werden die intrazellulären TNF-Signalwege aktiviert, die u.a. zur Induktion der Genexpression proinflammatorischer Zytokine führen. Die proinflammatorische Immunantwort wird hauptsächlich über TNFR1 vermittelt, der im Organismus ubiquitär exprimiert ist. Die proteolytische Spaltung von TNFR1 und TNFR2 induziert eine antagonistische Wirkung und die Herunterregulierung der zellulären Reaktionsfähigkeit (Kalliolias et al., 2016, Porteu et al., 1990).

Der in nur wenigen Zelltypen exprimierte Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) ist ebenfalls ein Substrat von ADAM17 und im Zusammenspiel mit seinem Zytokin IL-6 von zentraler Bedeutung für Entzündungsreaktionen. IL-6 kann pro- und antiinflammatorische Wirkungen entfalten, die jeweils von der Signalübertragung abhängen (Scheller et al., 2011b). IL-6 vermittelt nach Bindung an den membrangebundenen IL-6R über den klassischen Signalweg eher antiinflammatorische, regenerative Effekte (Wolf et al., 2014), wobei diese Bindung in akuten Entzündungsreaktionen nachweislich auch proinflammatorische Effekte vermitteln kann (Rose-John, 2020, Luig et al., 2015, Avci et al., 2024). Ein experimentelles ComputermodeLL sagte voraus, dass IL-6 über den klassischen und Trans-Signalweg eine vergleichbare Wirkung bei der Induktion von inflammatorischen *Downstream*-Signalwegen in Endothelzellen aufweist (Song et al., 2023). Die nach proteolytischer Spaltung von ADAM17 freigesetzte lösliche Form des IL-6R ermöglicht Zellen, die keinen IL-6R stattdessen aber gp130 exprimieren, das proinflammatorische IL-6-*trans-Signaling* (Chalaris et al., 2011). Hierfür bindet IL-6 an den löslichen sIL-6R. Dieser Komplex kann über die Bindung an das Transmembranprotein gp130 den IL-6-Trans-Signalweg aktivieren.

ADAM17 spaltet unter seinen Substraten auch Adhäsionsmoleküle, die sowohl die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel und dem darunterliegenden Gewebe als auch die Permeabilität des entzündeten Gefäßendothels aktiv beeinflussen. L-Selektin ist ein Glykoprotein, welches auf zirkulierenden Leukozyten konstitutiv exprimiert wird und für das Rollen am entzündeten Gefäßendothel durch Interaktion mit seinem endothelialen Liganden PSGL-1 verantwortlich ist (Springer, 1994, McEver, 1994). Die ADAM17-vermittelte Spaltung von L-Selektin ermöglicht die nachfolgende, integrin-vermittelte transendotheliale Migration zum Entzündungsherd. Ein gestörtes L-Selektin-*Shedding* wird mit einer verringerten Rollgeschwindigkeit und einer erhöhten Akkumulation von PMNs am Gefäßendothel in Verbindung gebracht (Hafezi-Moghadam et al., 1999).

JAM-A ist ein transmembranes adhäsives Glykoprotein, welches unter anderem auf Neutrophilen, Epithelzellen und Endothelzellen exprimiert wird. Endotheliales JAM-A ist an der Organisation der *Tight Junctions* und Ausbildung der endothelialen Barrierefunktion beteiligt (Weber et al., 2007). Proinflammatorische Zytokine verstärken die konstitutive, endotheliale Freisetzung von löslichem JAM-A durch ADAM17. Dadurch schwächen sie endotheliale Zellverbindungen und erhöhen sowohl die mikrovaskuläre Permeabilität als auch die transendotheliale Migration von Leukozyten (Koenen et al., 2009).

1.3.4. ADAM17 als möglicher Therapieansatz in der pulmonalen Inflammation

Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass ADAMs, insbesondere ADAM10 und ADAM17, bei entzündlichen Lungenerkrankungen eine entscheidende Rolle spielen (Chalaris et al., 2010, Arndt et al., 2011, Ludwig A, 2012, Dreymueller et al., 2012a, Pruessmeyer et al., 2014). Diese Tatsache hat das Interesse an beiden Proteasen als potenzielle Angriffspunkte für Medikamente weiter erhöht. Neben vielversprechenden Studien zum gezielten Einsatz von ADAM10 und ADAM17 in verschiedenen Krankheitsmodellen zeigen alarmierende Erkenntnisse, potentielle Nebenwirkungen dieser Hemmstrategien bei Lungenentzündung auf (Dreymueller et al., 2015).

Die berichteten Nebenwirkungen sind auf Breitband-Inhibitoren zurückzuführen, die insbesondere bei einer systemischen Verabreichung durch Hemmung verschiedener Metalloproteinasen, vielseitige Wirkungen auf diversen Zelltypen verursachen können (Dreymueller et al., 2015). Beide Proteasen sind ubiquitär exprimiert und erfüllen je nach Zelltyp verschiedene Funktionen. Endotheliales ADAM17 kann proinflammatorisch auf den Verlauf einer akuten Lungenentzündung wirken (Dreymueller et al., 2012a),

wohingegen leukozytäres ADAM17 eine untergeordnete Rolle spielt und in der frühen Neutrophilenmigration durch das *Shedding* von L-Selektin protektiv wirken kann (Pruessmeyer et al., 2014). Dies verdeutlicht sowohl die Notwendigkeit proteasespezifischer Inhibitoren als auch die Bedeutung der zeitlichen Komponente im Verlauf einer akuten pulmonalen Inflammation. Das Timing der Inhibitoren-Verabreichung und die zeitliche Begrenzung sind wichtige Komponenten, um gewünschte Wirkungen gezielt zu induzieren. Erste Ansätze selektiver Inhibitoren, die beispielsweise die Prodomäne von ADAM17 hemmen, wurden in verschiedenen in-vitro-Studien getestet und zeigten eine Blockade der LPS-induzierten TNF-Ausschüttung in der Lunge (Li et al., 2009a, Li et al., 2009b, Buckley et al., 2005).

TAPI-1 ist ein in der Literatur viel beschriebener und in der Forschung häufig eingesetzter Breitband-Metalloproteaseinhibitor, der gezielt das aktive Zentrum von ADAM17 hemmt (Saha et al., 2024). Dieser ADAM17-Inhibitor basiert allerdings, wie viele weitere Verbindungen, auf Hydroxamatbasis. Diese Verbindungen weisen bei systemischer Verabreichung Hepatotoxizität auf, weshalb sie für klinische Studien nicht geeignet sind und den Bedarf nach Inhibitoren ohne Hydroxamaten verdeutlichen (Dreymueller et al., 2015).

Eine weitere Möglichkeit die Selektivität zu steuern ist die räumliche Begrenzung der ADAM17-Inhibitoren. Die Lunge bietet vorteilweise die Möglichkeiten der inhalativen oder intratrachealen Applikation, um Wirkstoffe lokal anzuwenden. Eine murine in-vivo-Studie beschreibt für die intratracheale Applikation von GW280264X, einem kombinierten ADAM17 und ADAM10-Inhibitor, eine wirksame Unterbindung der LPS-induzierten Ödembildung, Zytokinausschüttung und Rekrutierung von Neutrophilen (Ludwig A, 2012). Die lokale Applikation von neutralisierenden Antikörpern mit gekoppeltem Polyethylenglykol (PEG) am Fab-Fragment zur Steigerung der Verweildauer am Wirkort, die siRNA-Applikation um gezielt Epithelzellen und alveoläre Immunzellen zu adressieren sowie die Verwendung von siRNA-beladene Nanopartikel und Liposomen zur gezielten Inhibition von pulmonalen Endothelzellen, stellen Möglichkeiten intensiver Forschung dar (Dreymueller et al., 2015, McCaskill et al., 2013, Dahlman et al., 2014). Ziel ist es durch die lokale Medikamentenverabreichung mit Mikrosprays, Nanopartikeln, Liposomen oder PEG-gekoppelten Antikörpern die Nebenwirkungen der in der Forschung aktuell eingesetzten Breitband-Inhibitoren zu umgehen (Dreymueller et al., 2015, Chen et al., 2025).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das ARDS ist ein weltweit auftretendes, akut lebensbedrohliches klinisches Syndrom, welches intensivmedizinischer Behandlung bedarf und trotz intensiver Forschung und medizinischer Fortschritte weiterhin mit einer hohen Mortalität assoziiert ist. Die derzeit verfügbaren Therapieoptionen beschränken sich im Wesentlichen auf präventive und supportive Maßnahmen. Die Schädigung des funktionellen Lungengewebes resultiert primär aus einer dysregulierten und überschießenden Entzündungsreaktion, in deren Folge die Kapillarpermeabilität ansteigt, die endotheliale Barrierefunktion verloren geht, ein Lungenödem entsteht, der Gasaustausch gestört und die extensive transendotheliale PMN-Migration gefördert wird. Langfristig kann das ARDS zu einem fibrotischen Umbau des Lungengewebes führen und eine erheblich eingeschränkte Lungenfunktion zur Folge haben. Die große medizinische Relevanz ist durch das Fehlen kausaler Therapieansätze und durch die hohe Letalität begründet. Die Entwicklung gezielter antiinflammatorischer Therapieansätze ist ein vielversprechender Ansatz als Ergänzung zur bestehenden Behandlungsstrategie und zur Verbesserung des klinischen Outcomes betroffener ARDS-Patienten.

Die Entzündungsreaktion wird durch eine Vielzahl von Immunzellen, Entzündungsmediatoren und Adhäsionsmolekülen gesteuert. Proteasen der ADAM-Familie, insbesondere ADAM17, spielen dabei eine zentrale Rolle, indem sie durch das *Shedding* wichtiger Substrate wie Zytokine und Adhäsionsmoleküle die mikrovaskuläre Permeabilität und die PMN-Migration beeinflussen. Da das ADAM17-vermittelte *Shedding* kontext- und substratabhängig sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte haben kann, ist der Einsatz von Breitband-Inhibitoren problematisch. Daher ist eine detaillierte Untersuchung der Bedeutung von ADAM17 auf die Regulierung der Integrität der Endothelbarriere und die PMN-Rekrutierung entscheidend. In dieser Arbeit wurde endotheliales ADAM17 als mögliche Zielstruktur für einen inflammationsmodulierenden Therapieansatz für das ARDS untersucht, wobei folgende Forschungsfragen adressiert wurden:

- Wie ist ADAM17 in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation exprimiert?
- Welche inflammatorischen Signalwege moduliert ADAM17 in der akuten pulmonalen Inflammation und welche funktionellen Auswirkungen hat dies auf die zentralen Pathomechanismen des ARDS?
- Wie beeinflusst endotheliales ADAM17 die transendotheliale PMN-Migration und die mikrovaskuläre Permeabilität?

2. Material

2.1. Tierversuch

2.1.1. Tiere

Die $Adam17^{tm1.2Bbl/J}$ floxierten-Mäuse (Stamm: 009597; RRID:IMSR_JAX:009597, MGI ID: MGI:4354847) wurden von Jackson Laboratory (Bar Harbour, USA) erworben. Diese Mauslinie weist loxP-Stellen auf, die das Exon 2 des ADAM17 Locus flankieren. Zur Vereinfachung werden die $Adam17^{tm1.2Bbl/J}$ floxierten-Mäuse im Folgenden als ADAM17 fl/fl bezeichnet. Diese Mauslinie wurde nach dem Cre/loxP-Rekombinationssystem mit Tie2-Cre Mäusen ($Tg(Tek-cre)12Flv$; MGI ID: MGI: 2136412) (bereitgestellt durch Prof. Dr. Peter Rosenberger, Universitätsklinikum Tübingen) verpaart, um folgenden Mausstamm zu erhalten: B6.129P2-ADAM17 $^{tm1.2Bbl}$ -Tek-cre1Ywa/J bzw. $ADAM17^{loxP/loxP}$ -Tie2-Cre $^{+}$. Dieser Mausstamm wird im Folgenden der Dissertation als ADAM17 $^{Tie2+}$ bezeichnet. Die Kreuzung der oben genannten Linien erzeugte einen gewebespezifischen ADAM17-Knockout in murinen Endothelzellen durch Cre-vermittelte Deletion des geflochtenen ADAM17-Gens.

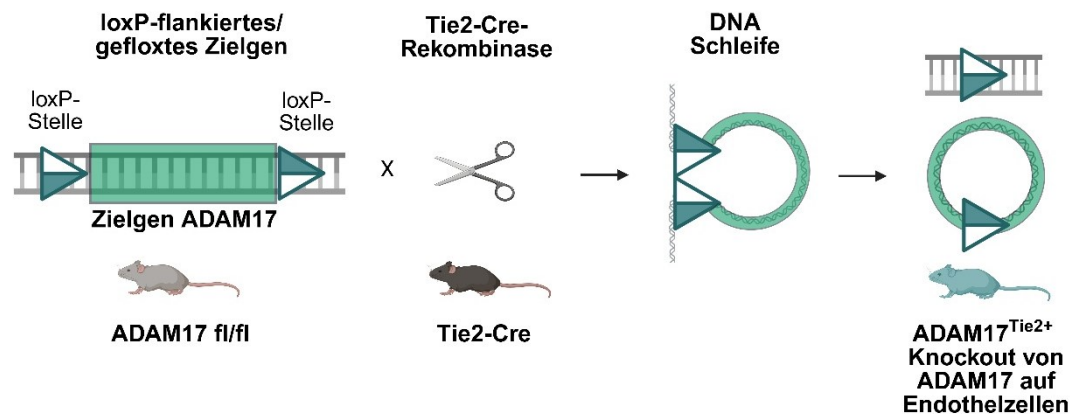


Abbildung 2.1: Gentechnische Erzeugung der Knockout-Mauslinie ADAM17^{Tie2+} mit Deletion von endotheliale ADAM17 durch Verwendung des Cre/loxP-Rekombinationssystems. Schematische Darstellung der Kreuzung von *Disintegrin and Metalloproteinase 17* (ADAM17)-flankierten Mäusen (ADAM17 fl/fl) mit Tie2-Cre Mäusen. Die Cre-Rekombinase erkennt die loxP-Stellen und kann an diesen das Zielgen aus der DNA-Schleife ausschneiden. In der erzeugten Knockoutline ADAM17^{Tie2+} ist das Zielgen endothelial deletiert. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/ox2grmt>).

Die Zucht der gewebespezifischen Knockout-Mauslinie ADAM17^{Tie2+} erfolgte eigenverantwortlich in der Versuchstierhaltung Pharmakologie der Universität Tübingen. Die Cre-negativen Wurfgeschwister wurden als Kontrolltiere verwendet und werden im Folgenden als ADAM17^{Tie2-} bezeichnet. Alle Tiere wurden genotypisiert, bevor sie für die Versuche eingesetzt wurden. Die Genotypisierung erfolgte durch die Firma Transnetyx, Inc.

(USA). Weibliche und männliche Tiere wurden in einem Verhältnis von 1:1 im Alter von acht bis zwölf Wochen eingesetzt. Alle Tierversuche wurden von der Einrichtung für Tier-schutz, Tierärztlichen Dienst und Labortierkunde der Universität und des Universitätskli-nikums Tübingen geprüft und von dem Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (A 05/21 G).

2.1.2. Inhibitoren und LPS

Für die systemische Inhibition der ADAM17 Protease und der gemeinsamen Inhibition von ADAM17/ADAM10 wurden die in Tabelle 2.1 aufgelisteten Inhibitoren verwendet.

Tabelle 2.1: Inhibitoren für die systemische Inhibition der ADAM-Proteasen im in-vivo-Tiermodell.

Bezeichnung	Verwendung	Konzentration	Hersteller	Bestell-nummer
TAPI-1	ADAM17-Inhibitor	5 (µg/g KG)	Selleck Chemicals	S7434
GW280264X	ADAM17/ADAM10-Inhibitor	30 (µg/g KG)	MCE MedChemExpress	HY-115670

Zur Induktion einer LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation wurde LPS von *Salmonella enterica* serotype enteritidis mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml (Sigma Aldrich, L6011) verwendet.

2.1.3. Anästhesie und Analgetika

Für die Operation und Organentnahme wurden die Mäuse durch eine gewichtsadaptive Dosierung mittels intraperitonealer (i.p.) Injektion narkotisiert. Hierfür wurden die in Tabelle 2.2 genannten Medikamente in der aufgeführten Konzentration und in einem finalen Volumen von 0,1 ml / 10 g KG eingesetzt.

Tabelle 2.2: Narkosemittel für das in-vivo-Tiermodell.

Medikament	Wirkstoff	Konzentration	Hersteller	Zul.-Nr.
Ketamin	Ketaminhydrochlorid	100 mg/ml	Bela-pharm GmbH & Co. KG	9089.01.00
Xylazin	Xylazinhydrochlorid	20 mg/ml	Serumwerk Bernburg AG	3100265.00.00

2.2. Zellkultur

2.2.1. Zellkultur von H441

Für den epithelialen Zelllayer des in-vitro-Transmigrationsassays wurde die humane Lungenepithelzelllinie NCI-H441 (CRM-HTB-174™) von ATCC verwendet. Es handelt sich hierbei um eine immortalisierte Zelllinie, die aus der Lunge eines männlichen Patienten mit papillärem Adenokarzinom isoliert wurde. Die Zelllinie wird im Folgenden als H441 bezeichnet. Für die Kultivierung von H441 wurde das in Tabelle 2.3 genannte Medium verwendet und die angegebenen Zusätze zugegeben.

Tabelle 2.3: Zellkulturmedium der Zelllinie H441.

Bezeichnung	Menge / Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
Minimal essential Medium Eagle (MEM)	500 ml	Sigma	R-8758
Fetales Kälberserum (<i>fetal bovine serum</i> (FBS) Superior)	10 %	Sigma	S0615
D-Glucose	1,25 g	Sigma	G8644
HEPES	10 mM	Gibco	15630
Natrium-Pyruvat	1 mM	Sigma	S-8636
Antibiotikum-Antimykotikum	1 %	Sigma	A5955

2.2.2. Zellkultur von HMEC-1

Für den endothelialen Zelllayer des in-vitro-Transmigrationsassays wurde die humane Endothelzelllinie HMEC-1 (CRL-3243™) von ATCC verwendet. Es handelt sich hierbei um eine immortalisierte Zelllinie mikrovaskulärer Endothelzellen, die aus dem Endothel der Vorhaut eines männlichen Patienten isoliert wurden. Für die Kultivierung von HMEC-1 wurde das in Tabelle 2.4 genannte Medium sowie die angegebenen Zusätze verwendet.

Tabelle 2.4: Zellkulturmedium der Zelllinie HMEC-1.

Bezeichnung	Menge / Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
MCDB 131 Medium ohne L-Glutamin	500 ml	Gibco	10372019
Fetales Kälberserum (FBS Superior)	10 %	Sigma	S0615
EGF	5 µg	PromoKine	C-60170
Hydrokortison	500 µg	Sigma	H-0888
L-Glutamin	5 mM	Gibco	25030024
Antibiotikum-Antimykotikum	1 %	Sigma	A5955

2.2.3. Zellkultur von HMVEC-L

Für die Transfektionsversuche mit siRNA wurde die humane mikrovaskuläre Lungenendothelzelllinie HMVEC-L (CC-0264) von Lonza verwendet. Es handelt sich hierbei um eine primäre Endothelzelllinie, die aus mikrovaskulären Blutgefäßen im normalen Lungengewebe isoliert wurde. HMVEC-L sind eine gemischte Population aus vaskulären und lymphatischen Endothelzellen. Für die Kultivierung von HMVEC-L wurde das *EGM[®]-2 MV Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2 BulletKit[®]* (CC-3202) von Lonza verwendet.

2.2.4. PMN Isolation mittels Percoll-Methode

Die Isolation humaner PMNs aus frischem Vollblut erfolgte mit Hilfe der Percoll-Methode, die auf dem Prinzip einer Dichtegradientenzentrifugation beruht. Freiwillige und gesunde Probanden wurden rekrutiert und vor der Blutentnahme durch medizinisches Fachpersonal aufgeklärt. Die Genehmigung der Blutentnahme erfolgte durch die Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen (483/2021BO2). Folgende Ausschlusskriterien wurden bei der Spenderauswahl berücksichtigt: Einnahme von Drogen oder Medikamenten, die das Verhalten von Neutrophilen nachweislich beeinflussen können, innerhalb eines Zeitraumes von zehn Tagen vor der Blutentnahme sowie Allergien, Infektionskrankheiten, Diabetes und Nikotinkonsum. Die Blutentnahme erfolgte durch Venenpunktion einer antekubitalen Vene mit einer Butterfly-Kanüle in Citrat-Monovetten. Das gewonnene Citratblut wurde auf Raumtemperatur (RT) abgekühlt und somit auf die gleiche Temperatur wie die Percoll-Lösungen gebracht. Zwischenzeitlich wurden 4 ml der

72 % Percoll-Lösung in ein transparentes 15 ml Röhrchen mit rundem Boden pipettiert und vorsichtig mit 4 ml 63 % Percoll-Lösung überschichtet. Abschließend wurden 4 ml des Citratbluts auf das Percoll geschichtet und die Röhrchen bei 1700 rpm und RT für 30 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Dichtegradientenzentrifugation lieferte eine Auftrennung der Lymphozyten und Monozyten, welche in der oberen Bande zu finden waren, und der gewünschten Neutrophilen in der unteren Bande. Die obere Bande wurde zusammen mit dem Überstand verworfen und die isolierten PMNs vorsichtig in ein auf Eis stehendes 50 ml Falcon überführt, um eine Aktivierung der Zellen zu vermeiden. Vereinzelte Erythrozyten wurden durch die Zugabe von 30 ml Lysepuffer je 15 ml Zellsuspension und 10 min Inkubationszeit lysiert. Nach Zentrifugation für 10 min bei 1300 rpm und 4 °C wurde der Überstand abdekantiert, das Pellet zum Waschen in 45 ml phosphatgepufferte Kochsalzlösung (*phosphate-buffered saline*, PBS⁻) resuspendiert und erneut unter den genannten Bedingungen zentrifugiert. Die Zellzahl wurde manuell mit einer Neubauerzählkammer und Türk'scher Lösung bestimmt und auf die benötigte Zellzahl in dem entsprechenden Puffer für das jeweilige Experiment eingestellt. Als PMN-Medium wurde phenolfreies RPMI-1640-Medium (Sigma Aldrich, R7509) mit 10 % FBS verwendet.

2.2.5. Inhibitoren und Stimulanzen

Im Rahmen der *in vitro* Untersuchungen wurden für die Behandlung der Zelllinien H441, HMEC-1 und HMVEC-L sowie der humanen PMNs die in Tabelle 2.5 genannten Inhibitoren und folgende Stimulanzen verwendet:

Tabelle 2.5: Inhibitoren für die Inhibition der ADAM-Proteasen in *in vitro* Untersuchungen.

Bezeichnung	Verwendung	Konzentration	Hersteller	Bestellnummer
TAPI-1	ADAM17-Inhibitor	10 µM	Selleck Chemicals	S7434
GW280264X	ADAM17/ ADAM10-Inhibitor	10 µM	Tocris	7030/10

Zur Stimulation wurde LPS aus *Escherichia coli* O26:B6 mit einer Konzentration von 100 ng/ml (Sigma Aldrich, L8274) und Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) mit einer Konzentration von 10 ng/ml (Sigma Aldrich, F3506) verwendet.

2.3. Antikörper

Tabelle 2.6: Primär- und Sekundärantikörper.

Antikörper für die Durchflusszytometrie					
Bezeichnung		Klon	Hersteller	Bestellnummer	
PerCP anti-murin CD45		30-F11	BioLegend	103130	
PE/Cy7 anti-murin Ly6G		1A8	BioLegend	127618	
Pacific Blue anti-murin CD62L		MEL-14	BioLegend	104424	
APC anti-murin CD49d		R1-2	BioLegend	103621	
PE anti-murin CD162		2PH1	BioLegend	104424	
FITC anti-murin CD41		MWReg30	BioLegend	133904	
Pacific Blue anti-murin/human CD11b		M1/70	BioLegend	101224	
PE anti-murin ADAM17		polyclonal	Bioss	bs-4236R-PE	
PE/Cy7 anti-murin CD62P		RMP-1	BioLegend	148310	
FITC anti-murin/human CD44		IM7	BioLegend	103006	
PE/Cy7 anti-murin CD144		BV13	BioLegend	138015	
APC anti-murin CD106		429	BioLegend	105717	
PE anti-murin CD321 (F11R)		27-9	BioLegend	107803	
FITC anti-murin CD31		390	BioLegend	102406	
Pacific Blue anti-murin CD54		YN1/1.7.4	BioLegend	116116	
APC/Cy7 anti-murin Ly6G		1A8	BioLegend	127624	
PerCP anti-human CD45		2D1	BioLegend	368506	
PE/Cy7 anti-human CD66b		G10F5	BioLegend	305116	
APC anti-human CD62L		DREG-56	BioLegend	304810	
PE anti-human CD44		C44Mab-5	BioLegend	397503	
FITC anti-human CD321 (F11R)		OV-5B8	BioLegend	353504	
Primärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung					
Bezeichnung		Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-ADAM17		Kaninchen	1:200	Bioss	Bs-4236R
Anti-Ly6g + Ly6c [RB6-8C5]		Ratte	1:100	Abcam	ab25377
Anti-CD45 (I3/2.3)		Ratte	1:100	Abcam	Ab25386
Anti-JAM-A (H-80)		Kaninchen	1:100	Santa Cruz	sc-25629

Anti-CD62L (DREG-56)	Maus	1:100	BD Biosciences	555541
Anti-VE-Cadherin	Ziege	1:50	R&D systems	AF1002
Anti-vWF	Schaf	1:200	Abcam	ab11713
Anti-IL-6R α (H-7)	Maus	1:200	Santa Cruz	sc-373708
Anti-TNFR1 (H-5)	Maus	1:200	Santa Cruz	sc-8436
Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenzfärbung				
Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestell-Nr.
Anti-Kaninchen-IgG (H+L) (Alexa Fluor™ 488)	Ziege	1:200	Invitrogen	A-11008
Anti-Ratte-IgG (H+L) (Alexa Fluor™ 647)	Ziege	1:500	Invitrogen	A-21247
Anti-Kaninchen-IgG (H+L) (Alexa Fluor™ 647)	Ziege	1:200	Invitrogen	A-21245
Anti-Maus-IgG (H+L) (Alexa Fluor™ 594)	Ziege	1:200	Invitrogen	A-11005
Anti-Ziege (H+L) (Alexa Fluor™ 488)	Affe	1:200	Invitrogen	A-11055
Anti-Schaf (H+L) (Alexa Fluor™ 647)	Affe	1:200	Invitrogen	A-21448
Anti-Mouse (H+L) (Alexa Fluor™ 488)	Affe	1:200	Invitrogen	A-21202
Primärantikörper für die Immunhistochemie				
Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Ly6g + Ly6c [RB6-8C5]	Ratte	1:500	Abcam	ab25377
Sekundärantikörper für die Immunhistochemie				
Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Ratte IHC biotinylated IgG	Kaninchen	1:100	Vector Laboratories	BA-4000

Primärantikörper für Western Blot				
Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-VE-Cadherin	Ziege	1:500	R&D systems	AF1002
GAPDH	Kaninchen	1:5000	Sigma Aldrich	G9545-200UL
Sekundärantikörper für Western Blot				
Bezeichnung	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Bestellnummer
Anti-Ziege IgG-HRP	Affe	1:5000	Santa Cruz	sc-2020
Anti-Kaninchen HRP	Ziege	1:10000	Invitrogen	65-6120
Antikörper für IgG-Kontrollen				
Bezeichnung	Spezies	Hersteller	Bestellnummer	
Normal sheep IgG	Schaf	Santa Cruz	sc-2717	
Rabbit IgG Isotype Control	Kaninchen	Invitrogen	31235	
Normal rat IgG	Ratte	Santa Cruz	sc-2026	
Normal mouse IgG	Maus	Santa Cruz	sc-2025	
Normal donkey IgG	Affe	Santa Cruz	sc-2044	

2.4. Primer

Die für die *real time quantitative polymerase chain reaction* (RT-qPCR) verwendeten Primer wurden mit PRIMER-BLAST von NCBI designiert und von der Firma biomers.net GmbH in Ulm bezogen.

Tabelle 2.7: Murine und humane Primer für die RT-qPCR.

Primer	Sequenz	Annealing-Temp.
Murin Cdh5 forward	5'-gtg ctc tcc aca aag ctc gg-3'	65,5°C
Murin Cdh5 revers	5'-gga gga gct gat ctt gtc cg-3'	
Murin ADAM10 forward	5'-tga agt gga gag agg g-3'	67°C
Murin ADAM10 revers	5'-act gtc ggc aac cat c-3'	
Murin ADAM17 forward	5'-gag agc cat cag ttt g-3'	59,8°C
Murin ADAM17 revers	5'-ccc tcc atg agt ttg c-3'	
Murin AT1R forward	5'-tgc cgt gaa ctt gaa ggt tat tc-3'	67,0°C
Murin AT1R revers	5'-gct tga gaa cac caa gca gc-3'	
Murin iRhom2 forward	5'-gac acc ttc gac tcc tcc tt-3'	65,5°C

Murin iRhom2 revers	5'-ccg ctg tat tct ttt agc ggg -3'	
Murin iTAP forward	5'-tcc aga act gga ggc ctg a-3'	61,6°C
Murin iTAP revers	5'-ctt ctg ccc cct cca tct tg-3'	
Murin TNFR1 forward	5'-ctt cag cac ccc agg ctt ta-3'	66,5°C
Murin TNFR1 revers	5'-tcg caa ggt ctg cat tgt ca-3'	
Murin TNFR2 forward	5'-cta agt gtc ctc ctg gcc aat -3'	66,5°C
Murin TNFR2 revers	5'-tgg gtt ttc aag gcg cag ta-3'	
Murin TRADD forward	5'-tct gca ggt tcg aag ttc cc-3'	66,5°C
Murin TRADD revers	5'-gtg gcc ggt tca cta cga g-3'	
Murin TRAF2 forward	5'-gct act gct cct tct gcc tg-3'	66,0°C
Murin TRAF2 reverse	5'-gca ggt tct cag tct cca cc-3'	
Murin NF-κB forward	5'-gcc aag tgc acg agt c-3'	61,0°C
Murin NF-κB reverse	5'-gaa gga cga gac gag c-3'	
Murin p38 forward	5'-agc tgg tag cgg tgc gat aa-3'	65,5°C
Murin p38 reverse	5'-cat ctc tct ctg tcc agt gcc a-3'	
Murin CREB forward	5'-gag cag aca acc agc aga gt-3'	67,0°C
Murin CREB reverse	5'-tgg cat gga tac ctg ggc ta-3'	
Murin MAPK1 forward	5'-tga agt tga aca ggc tct ggc -3'	65,5°C
Murin MAPK1 reverse	5'-tcc tct gag ccc ttg tcc tga -3'	
Murin MAPK3 forward	5'-gta cgg cat ggt cag ctc ag-3'	67,0°C
Murin MAPK3 reverse	5'-ctg agg atg tct cgg atg cc-3'	
Murin JNK forward	5'-agc cgt ctc ctt tag cac ag-3'	58,6°C
Murin JNK reverse	5'-tgt atc cga ggc caa agt cg-3'	
Murin FADD forward	5'-ctc aat cgc ctt ccg cat tg-3'	66,5°C
Murin FADD reverse	5'-aca gcc agg tga gaa atg gg-3'	
Murin IL-6R forward	5'-tca ctg tgc gtt gca aac ag-3'	58,6°C
Murin IL-6R reverse	5'-gat ccg gct gca cca ttt tt-3'	
Murin STAT3 forward	5'-tca gcg aga gca gca aag aa-3'	66,0°C
Murin STAT3 reverse	5'-ctt ggt ctt cag gta cgg gg-3'	
Murin JAK1 forward	5'-gcc tgt cta ctc cat gag cc-3'	64,9°C
Murin JAK1 reverse	5'-gtc tgg atc ttg cct ggt ca-3'	
Murin TRIF forward	5'-ctt ccc cac agt ccc aat cc-3'	64,9°C
Murin TRIF reverse	5'-gaa cca tct ggg cat ggt ga-3'	
Murin Tram forward	5'-tct atg ctt gtc ctc gca cc-3'	65,6°C

Murin Tram reversed	5'-gga gcg act act ttc cca gg-3'	
Murin/human 18S forward	5'-gta acc cgt tga acc cca tt-3'	-
Murin/human 18S reverse	5'-cca tcc aat cgg tag tag cg-3'	
Human TNFR1 forward	5'-ttg gac tgg tcc ctc acc ta-3'	
Human TNFR1 reverse	5'-cct gac cca ttt cct ttc gg-3'	66,5°C
Human IL-6R forward	5'-agt gtc ggg agc aag ttc ag-3'	66,5°C
Human IL-6R reverse	5'-gga ggt cct tga cca tcc at-3'	
Human ADAM17 forward	5'-ctg gac acg tgg ttg gtg a-3'	67,0°C
Human ADAM17 reverse	5'-tga aca agc tct tca ggt ggt -3'	
Human NF-κB forward	tgaagtgtggggctgatgtc	61,0°C
Human NF-κB reverse	agtcacatagggcagctcg	
Human CREB forward	5'-gac gga gga gct tgt acc ac-3'	67,0°C
Human CREB reverse	5'-ctg gca tag ata cct ggg ct-3'	
Human JNK forward	5'-ctt ggc atg ggc tac aag ga-3'	63,7°C
Human JNK reverse	5'-ccc ttg cct gac tgg ctt ta-3'	
Human TRADD forward	5'-gtc agc ctg tag tga atc gg-3'	67,0°C
Human TRADD reverse	5'-ctg ctc gta cag tcc ctc g-3'	
Human JAK1 forward	5'-gcc cat cat tac ctc tgc ac-3'	67,0°C
Human JAK1 reverse	5'-cct gca cct gct cag ac-3'	
Human STAT3 forward	5'-caa gca gtt tct tca gag cag g-3'	63,7°C
Human STAT3 reverse	5'-tgc agt ctg tag aag gcg tg-3'	

2.5. Gebrauchsfertige Reaktionslösungen und Kits

Tabelle 2.8: Gebrauchsfertige Reaktionslösungen und Kits.

ELISA		
Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Mouse Neutrophil Elastase/ELA2 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY4517-05
Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA	R&D Systems	DY410-05
Mouse CXCL2/MIP-2 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY452-05
Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY401-05
Mouse CX3CL1/Fractalkine DuoSet ELISA	R&D Systems	DY472

Mouse IL-6 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY406-05
Mouse L-Selectin/CD62L DuoSet ELISA	R&D Systems	DY576
Mouse IL-10 DuoSet ELISA	R&D Systems	DY417-05
Mouse IL-6R alpha DuoSet ELISA	R&D Systems	DY1830
Mouse VE-Cadherin ELISA Kit	abcam	ab206980
Reagent Diluent	R&D Systems	DY995
Substrate Solution	R&D Systems	DY999
RT-qPCR		
Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
iScript™ cDNA Synthesis Kit	Bio Rad	1708891
iTaq™ Universal SYBR® Green Super-mix	Bio Rad	1725124
FACS		
Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
BD FACSTFlow™ Sheath Fluid	BD Bioscience	342003
BD FACSClean	BD Bioscience	340345
BD FACS Shutdown Solution	BD Bioscience	334224
BD FACS Lysing Solution	BD Bioscience	349202
BD™ Cytometer Setup & Tracking Beads Kit	BD Bioscience	641319
Immunhistochemie		
Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories	SK-4100
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories	SP2001
Unmasking Solution	Vector Laboratories	H-3300
Vectastain ABC-HRP Kit	Vector Laboratories	PK-6100
Eukitt Quick-hardening mounting medium	Sigma Aldrich	03989
Western Blot		
Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
10x Tris/Glycine/SDS Buffer	Bio Rad	1610772

Trans-Blot Turbo Midi 0.2 µm PVDF Transfer Packs	Bio Rad	1704157
Proteinmarker prestained (11 - 245 kDa)	neoFxxx	1123YL500
Clarity Western ECL Substrate	Bio Rad	170-5060
Super Signal West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate	Thermo Scientific	34577
Super Signal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific	34095
Western Blotting Luminol Reagent	Santa Cruz	sc-2048
Halt Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail (100X)	Thermo Scientific	78442
BCA		
Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225
siRNA-Transfektion		
jetPRIME® vielseitiges DNA/siRNA-Transfektionsreagenz	Polyplus	101000027
TNF-R1 siRNA (h)	Santa Cruz	sc-29507
IL-6Rα siRNA (h)	Santa Cruz	sc-35663

2.6. Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 2.9: Chemikalien und Reagenzien.

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
2-Propanol	Thermo Scientific	BCBN7386V
2-Mercaptoethanol	Carl Roth	4227.1
ABTS	Sigma Aldrich	A1888-2G
Accutase	EMD Millipore	SCR005
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	PanReac AppliChem	3J002532
APS 10%	Thermo Scientific	17874
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich	A3294
CellTracker Green CMFDA	Invitrogen	C7025
Chloroform	Sigma Aldrich	C2432

Chlorwasserstoffsäure (HCl)	PanReac AppliChem	A3452
Disodium EDTA	Sigma-Aldrich	ED4S
DMSO	Sigma-Aldrich	D5879
Ethanol	PanReac AppliChem	A3678
Evans Blue	Sigma Aldrich	E2129
Formalin (4%)	Sigma-Aldrich	100496
Glycerin	Carl Roth GmbH	3783
HBSS ⁻	Sigma-Aldrich	H4891
HBSS ⁺	Sigma-Aldrich	H1387
Isopropanol	Sigma Aldrich	102802278
Kaliumchlorid (KCl)	Riedel-de Haën	31248
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën	30404
Mayers Hämalaunlösung	Merck	1.09249.0500
Methanol	Merck	106009
Natriumacid (NaN ₃)	Sigma Aldrich	S8032
Natriumchlorid (NaCl)	B.Braun	21385311
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck	K10720529
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich	S5011
NH ₄ Cl	Merck	101145
Nonfat dried milk powder	PanReac AppliChem	A0830
Nuklease Freies Wasser	PanReac AppliChem	A7398
Paraffin Ritoplast	Carl Roth	6642.5
Paraffinöl	Carl Roth	8904.1
PBS ⁻ Tabletten	Gibco	18912-014
Percoll	Cytiva Sweden	17089101
Phosphat-gepufferte Saline	Gibco	D8537
RNAse Away	Thermo Scientific	7003
RNase Away	Molecular BioProducts	7002
RotiMount FluorCare DAPI	Carl Roth	HP20.1
Rotiphorese Gel 30%	Carl Roth	3029.1
Salzsäure (HCl)	Carl Roth	K025.1
Schwefelsäure (H ₂ SO ₄)	Carl Roth	9316.1
SDS	Carl Roth	2326.2

TEMED	PanReac AppliChem	A1148
Trisbase	Sigma Aldrich	T1503
Triton X-100	Sigma Aldrich	X100
TRIzol™ Reagent	Thermo Scientific	15596026
Trockenmilchpulver	PanReac AppliChem	A0830
Türk'sche Lösung	Merck	93770
Tween 20	PanReac AppliChem	A4974
Wasserstoffperoxid (30%)	Merck	108597
Xylol	PanReac AppliChem	131769

2.7. Selbsthergestellte Puffer

Tabelle 2.10: Selbsthergestellte Puffer.

Bezeichnung	Zusammensetzung
10X TBS	24,2 g Tribase 80 g NaCl 1 l Aqua Dest. pH 7,6
Cellfix	FACS Färbepuffer und 4% Paraformaldehyd im Verhältnis 1:1
ELISA PBS	1 l Aqua Dest. 0,2 g KCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ 8,0 g NaCl 1,4 g Na ₂ HPO ₄
ELISA Stopplösung	68 ml Aqua Dest. 4 ml H ₂ SO ₄ (18 M)
Erythrozyten-Lysepuffer	1 l Aqua Dest. 8,024 g NH ₄ Cl 0,84 g NaHCO ₃ 0,372 g Disodium-EDTA
FACS Färbepuffer	1 l Aqua Dest. 2 Tabletten PBS ⁻ 10 g BSA 5 ml NaN ₃

Percoll 63%	31,5 ml Percoll (Dichte 1,130 g/ml) 3,5 ml PBS 10X 15 ml PBS 1X
Percoll 72%	36 ml Percoll (Dichte 1,130 g/ml) 4 ml PBS 10X 10 ml PBS 1X
Western Blot <i>Running Buffer</i>	100 ml 10x Tris/Glycine/SDS Buffer 900 ml Aqua Dest.
Western Blot <i>Washing Buffer</i> 0,05% TBST-Puffer	100 ml 10x TBS 900 ml Aqua Dest. 500 µl Tween-20
Western <i>Loading Buffer</i> 5x Lämmli-puffer	100 mg Bromphenolblau 3,2 ml trisHCL 1M pH 6,8 3,5 ml Glycerol 1,5 g SDS 2,5 ml 2-Mercaptoethanol
Western <i>Lower Buffer</i>	90,85 g Trisbase (1,5 M) 2,0 g SDS (0,4%) 500 ml Aqua Dest. pH 8,8
Western RIPA-Puffer	750 mg Trisbase in 75 ml Aqua Dest. 900 mg NaCl pH 7,4 10 ml 10% NP-40 0,2 ml 500 mM EDTA Auf 100 ml auffüllen
Western <i>Upper Buffer</i>	30,3 g Trisbase (0,5 M) 2 g SDS (0,4%) 500 ml Aqua Dest. pH 6,86

2.8. Enzyme

Tabelle 2.11: Enzyme.

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
Collagenase from <i>Clostridium histolyticum</i>	Sigma-Aldrich	C7667
DNAse from bovine pancreas	Sigma-Aldrich	D4527
Hyaluronidase from bovine testes	Sigma-Aldrich	H3506

2.9. Geräte

Tabelle 2.12: Geräte.

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Aqua Dest. Anlage	Urelab flex 2	Veolia Water Technologies
Chemilumineszenz Reader	Fusion SL4	Vilber Lourmat
CO ₂ -Inkubator	Cytoperm 2 (1003917)	Heraeus Instruments
CO ₂ -Inkubator	Heraeus	Thermo Scientific
Durchflusszytometer	FACS Canto™ II (10044058)	Becton, Dickinson and Company, BD Bioscience
Einbettautomat	EG1150H	Leica
Eismaschine	AF-103	Scotsman
Heizplatte	HI1220	Leica
Histologisches Karussell	TP1020	Leica
Homogenisator	Precellys 24	Bertin technologies
Inhalationskammer		Medizinische Werkstatt UKT
Inkubationsschüttler	Infors HT Ecotron	Infors AG
Kamera	Axiocam MRc	Zeiss
Konfokales Lasermikroskop	Stellaris 5	Leica
Magnetrührer	RCT basic	IKA Labortechnik
Mehrkanalpipette	300 µl (311400058)	Eppendorf
Mehrkanalpipette 100µl	Research plus	Eppendorf
Mehrkanalpipette 300µl	Research plus	Eppendorf
Mikroplatten-Washer	HydroFlex™ (10052466)	Tecan
Mikroskop	Leica DMIL (30301)	Leica
Mikroskop	Leica DM-IRB (55853)	Leica
Mikrowelle	Cookmate	Daewoo
Multimode-Platten-Reader	Infinite M200 PRO	Tecan
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf
Pinzetten	BD312R, BD311R	Aesculap
Pipetboy	Pipetboy acu (120840)	Integra Bioscience

Pipetten	0,1 µL – 2500 µL	Eppendorf
Rotationsmikrotom	RM 2235	Leica Biosystems
Spektrophotometer	Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf
Thermocycler	T100 Thermal Cycler	Bio Rad
Thermocycler	CFX96	Bio Rad
Thermocycler	CFX Connect	Bio Rad
Thermoschüttler	AK 82	Infors AG
Tischmischer	Vortex-Genie 2 (4,781,487)	Scientific Industries Inc
Tischmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Tischzentrifuge	Mini-Zentrifuge Rotolabo®	Carl Roth
Trans-Blot Turbo Transfer System	1704150	Bio Rad
Vaporisator	Micro-A-I-R U22	OMRON Healthcare
Waage	HR-120-EC	A&D Instruments
Waage	Mettler PK 4800	Mettler
Wasserbad	HI 1210	Leica
Wippschüttler	ST5	Bioblock Scientific
Zentrifuge	5417R	Eppendorf
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17	Heraeus Instruments
Zentrifuge	Heraeus Multifuge X1R	Heraeus Instruments
Zentrifuge	Megafuge 1.0R (178411)	Heraeus Instruments

2.10. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.13: Verbrauchsmaterialien.

Produktbezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
1,5 mm 10-Well Combs	Invitrogen	NC3510
6.5 mm Transwell®, 3.0 µm Pore Polyester Membrane Insert	Corning Inc	3472
Cassettes 1,5 mm	Novex	NC2015
Combitips® advanced 10 mL	Eppendorf	0030089464
Combitips® advanced 5 mL	Eppendorf	0030089456
Costar® 24-Well Clear Flat Bottom Ultra-Low Attachment Multiple Well	Corning Inc	3473

Plates		
Costar® TC-behandelte Multiwellplatte, 12 Well	Corning Inc	3512
Deckgläser	R. Langenbrinck	01-2460/1
Einbettkassetten ROTILABO®	Corning Inc	K113.1
Einbettkassetten Rotilapo	Carl Roth	K113.1
Einweg-Pasteur-Pipetten	Carl Roth	EA70.1
FACS-Falcon 5 ml	Corning Inc	352052
Falcon Tubes 15 mL	Greiner Bio-One	188271
Falcon Tubes 50 mL	Becton Dickinson	352070
Falcon™ Polystyrolröhrchen mit rundem Boden	Corning B.V. Life Sciences	352052
Färbeeinsatz	R. Langenbrinck	11-0002
Färbeküvette	R. Langenbrinck	11-0001
Filterpapier (10 cm)	Carl Roh	CA20.1
Filterspitzen Filter Tip PP natural 0-20 µL	Nerbe plus	07-622-8300
Filterspitzen Filter Tip PP natural 0-200 µL	Nerbe plus	07-662-8300
Filterspitzen Filter Tip PP natural 0,1-10 µL short	Nerbe plus	07-602-8300
Filterspitzen Filter Tip PP natural 0,1-10 µL super slim	Nerbe plus	07-613-8300
Filterspitzen Filter Tip PP natural 100-1000 µL	Nerbe plus	07-693-8300
GAZIN Mullkompressen	Lohmann & Rauscher	18500
Handschuhe Dermaclean	Ansell	PFC 4303971
Handschuhe peha-soft nitrile	Hartmann	9422011
ImmEdge Hydrophobic Barrier Pen	Vector Laboratories	H-4000
Kanüle Microlance 20 G	Becton Dickinson	301300
Kanüle Microlance 24 G	Becton Dickinson	304100
Kanüle Microlance 27 G	Becton Dickinson	302200
Kanüle Stercan 20 G	B. Braun	4657519
Kryoröhrchen 1,8 ml	Thermo Scientific	10674511

Microseal `B` seal	Thermo Scientific	MSB1001
Mikroreaktionsgefäß Safe-lock 0,5 mL	Eppendorf	30121023
Mikroreaktionsgefäß 1,5 mL	Greiner bio-one	616201
Mikroreaktionsgefäß 2,0 mL	Carl Roth	7083,1
Mikrotiterplatte	Bio Rad	655101
Mikrotiterplatte	Greiner bio-one	GB655101
Mikrotiterplatte Multiplate PCR Plates	Bio Rad	MLL9601
Mikrotomklinge A35	Feather	0207500005
Multiplate PCR Plates 96-Well, clear	Greiner Bio-One	650101
Nähgarn Mercifil No 50	Amann und Söhne	M3541
Nunc Kryoröhrchen	Thermo Scientific	368632
Objektträger	R. Langenbrinck	03-0004
Objektträger Superfrost +	R. Langenbrinck	03-0060
Parafilm M	Carl Roth	PM-999
Paraplast Plus	Leica	X881.1
Petrischalen Cellstar	Greiner Bio-One	E2193G5
Pipettenspitzen 10 µL	Sarstedt	70.1115
Pipettenspitzen 20 µL	Sarstedt	70.1116
Pipettenspitzen 200 µL	Eppendorf	30.000.870
Pipettenspitzen 200 µL	Sarstedt	70760002
Precellys Ceramic Beads 1,4 mm	Peqlab Biotechnologie	432-0293
Precellys Keramikkügelchen 1,4 mm	Peqlab Biotechnologie	91-PCS-CK14
Reaktionsgefäß 0,2 ml (RNase-frei)	Carl Roth	XT87.1
Reaktionsgefäß 1,5 ml (RNase-frei)	Carl Roth	EA84.1
Safety-Multifly-Kanüle	Sarstedt	9053712X
S-Monovette 10 mL	Sarstedt	8030311
Spitzen ELISA epT.I.P.S® 2-200 µl	Eppendorf	0030000870
Spritze 1 mL	Becton Dickinson	300013
Spritze 1 mL	B. Braun	9166017V
Spritze 10 mL	B. Braun	4606108V
Spritze 5 mL	B. Braun	4606051V
Stripette 1 mL	Becton Dickinson	300013

Stripette 10 mL	Becton Dickinson	356551
Stripette 25 mL	Becton Dickinson	356525
Stripette 5 mL	Becton Dickinson	356543
Venenkatheter Insyte 22G	Becton Dickinson	381223
Verschlussfolie	Carl Roth	EN76.1
Zählkammer C-Chip	Digital Bio	DHC-N01
Zellkultur Multiwellplatte, 6 Well, PS	Greiner Bio-One	657160
Zellkulturflasche T75	TPP	90076
Zellsieb 100 µm	Greiner Bio-One	5402000
Zellsieb EASYstrainer 70 µm steril	Greiner bio-one	542070

2.11. Software

Tabelle 2.14: Software.

Software	Version	Hersteller
Axio Vision	4.8.2.0	Zeiss
Bio Render	-	Bio Render
CFX Manager	3.1	Bio Rad
EndNote	X9.3.3	Clarivate Analytics
Excel	2021	Microsoft
FACS Diva Software	9	Becton Dickinson
Flow Jo	7.2.5	FlowJo LCC
GraphPad Prism 9	9	GraphPad Software, Inc.
ImageJ	1.54p	Wayne Rasband
LAS X	5.0.3.24880	Leica
Magellan	7.2	Tecan
Nanodrop 2000	1.6	Thermo Fisher Scientific
Power Point und Word	2021	Microsoft
Perplexity AI (KI-System)	2025	Perplexity AI, Inc.
ChatGPT Plus (KI-System)	2025	Open AI

3. Methoden

3.1. Murines LPS-induziertes akutes pulmonales Inflammationsmodell

Die LPS-Inhalation ist ein murines in-vivo-Modell der akuten pulmonalen Inflammation, welches im Ausmaß der Inflammation in hohem Maße reproduzierbar ist. Mit dem speziell entwickelten Versuchsaufbau wird den Mäusen vernebeltes LPS des Bakterienstammes *Salmonella enterica* serotype enteritidis inhalativ verabreicht. Dieser Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien induziert eine transiente Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität. Der Verlust der endothelialen Barrierefunktion begünstigt die Entstehung eines proteinreichen Lungenödems und die Migration von PMNs aus dem zirkulierenden Blut durch das Lungenendothel, übers Interstitium bis in die Alveolen.

Die LPS-Inhalation fand unter einem Abzug in einem speziellen Inhalationssystem statt (siehe Abbildung 3.1). Das Inhalationssystem bestand aus einer Plexiglaskammer, in der bis zu vier Mäuse gleichzeitig für die Inhalation eingebracht werden konnten. An die Kammer wurde der Vaporisator Micro-A-I-R U22 von OMRON Healthcare als Vernebler angeschlossen. Die Plexiglaskammer wurde über einen zweiten Anschluss an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen, um einen kontinuierlichen Luftstrom des vernebelten LPS innerhalb der Kammer zu gewährleisten. Die Versuchsgruppen inhalierten in einem Zeitraum von 30-45 min das in 0,9-prozentigem Natriumchlorid (NaCl) (7,5 ml) gelöste LPS mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml. Unter gleichen Bedingungen erhielten die Kontrollgruppen eine NaCl-Inhalation mit der 0,9-prozentigen Trägerlösung NaCl.

3.2. In-vivo-Migrationsanalyse

Das unter Punkt 3.1. beschriebene in-vivo-Inflammationsmodell induziert eine pulmonale Inflammationsreaktion in der Akutphase. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen für das beschriebene Inflammationsmodell Zeitreihenversuche auf, die die Zeitpunkte identifizieren, zu denen die PMN-Migration in das entzündete Lungengewebe und die mikrovaskuläre Permeabilität maximal sind (Reutershan et al., 2005). Die transendotheliale Migration in das Interstitium zeigte zwischen zwölf und 24 Stunden ein Plateau und die transepitheliale Migration in die Alveolen einen Höhepunkt nach 24 Stunden. Die Extravasation von Evans Blue und damit die mikrovaskuläre Permeabilität waren bereits

sechs Stunden nach LPS-Inhalation signifikant erhöht. Die Freisetzung von Zytokinen und die Aktivierung proinflammatorischer Gen- und Proteinexpressionsregulationsmechanismen waren schon drei Stunden nach LPS-Inhalation maximal. Basierend auf den erläuterten Daten, erfolgten die Gen- und Proteinexpressionsanalysen mittels RT-qPCR, *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) und Western Blot zu dem Zeitpunkt drei Stunden nach LPS-Inhalation. Die Quantifizierung der Evans Blue-Extravasation zur Ermittlung der mikrovaskulären Permeabilität erfolgte sechs Stunden nach LPS-Applikation. Die Analyse der neutrophilen Migration in die verschiedenen Lungenkompartimente wurde mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie zu dem Zeitpunkt 24 Stunden nach LPS-Applikation durchgeführt.

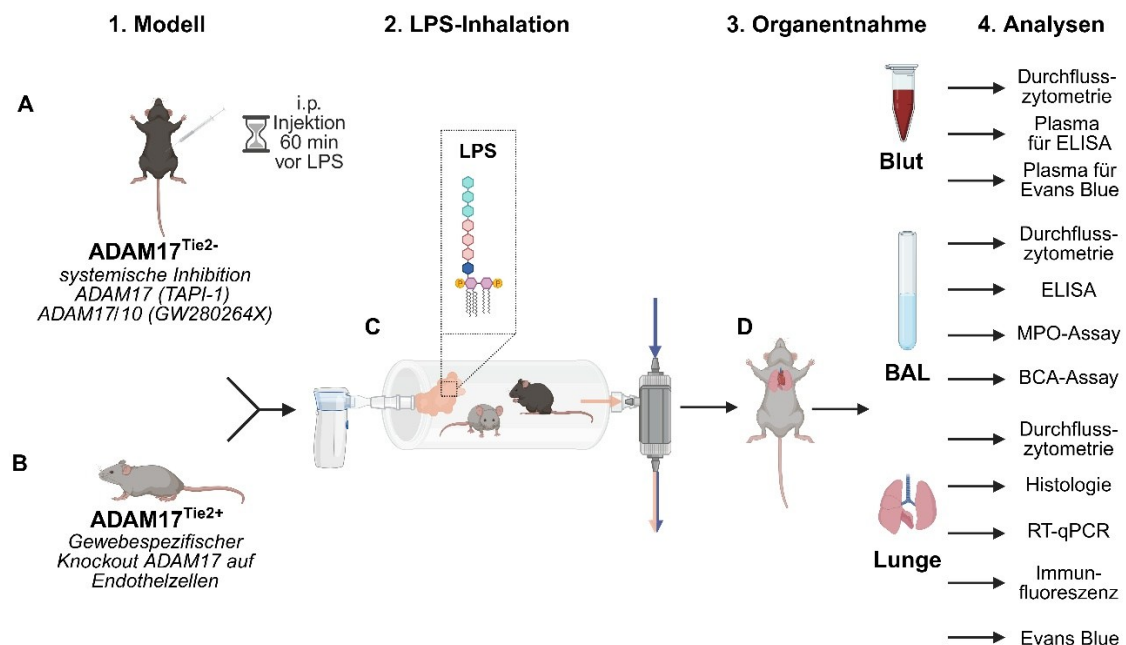


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus der in-vivo-Versuche. (A) *A Disintegrin and Metalloproteinase 17* ($ADAM17^{Tie2-}$) Mäuse erhielten zur Induktion einer systemischen $ADAM17$ -Inhibition (mit TAPI-1) und der kombinierten Hemmung von $ADAM17/ADAM10$ (mit GW280264X), 60 min vor Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation den entsprechenden Inhibitor intraperitoneal (i.p.) injiziert. (B) Zur Analyse der Deletion von endothelialem $ADAM17$ wurden $ADAM17^{Tie2+}$ Mäuse mit einem konditionalen gewebespezifischen Knockout der Protease in Endothelzellen verwendet. (C) Versuchsaufbau für die LPS-Inhalation. Ein an die Inhalationskammer angeschlossener Vaporisator verdampfte das flüssige LPS und leitete das Aerosol zu den Versuchstieren in die Kammer. Eine angeschlossene Wasserstrahlpumpe sorgte für die Aufrechterhaltung eines kontinuierlichen Sogs. Die orangen Pfeile stellen die Richtung des LPS und die blauen Pfeile die Flussrichtung des Wasserstrahls dar. (D) Unter tiefer Narkose erfolgte die Organentnahme von Blut, bronchoalveolärer Lavage (BAL) und der Lunge für folgende Analysen: Gen- und Proteinexpression drei Stunden nach LPS-Inhalation, Evans Blue Extravasations-Assay sechs Stunden nach LPS-Applikation und die Migrationsanalyse 24 Stunden nach LPS-Inhalation. ELISA = *enzyme-linked immunosorbent assay*; MPO = Myeloperoxidase; BCA = *bicinchoninic acid*; RT-qPCR = *real time quantitative polymerase chain reaction*. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/ficrvxz>).

Die systemische ADAM17-Inhibition beziehungsweise die kombinierte systemischen Inhibition von ADAM17/ADAM10 erfolgte in ADAM17^{Tie2}- Tieren eine Stunde vor LPS-Inhalation durch i.p. Injektion der in Tabelle 2.1 aufgeführten Inhibitoren. Für die durchflusszytometrische Migrationsanalyse wurde den Versuchstieren ein fluoreszenz-markierter Antikörper 10 min vor Einleitung der Narkose intravenös (i.v.) in die Schwanzvene injiziert. Mithilfe des Allophycocyanin/Cyanin7 (APC/Cy7)-markierten anti-murin Ly6G Antikörpers konnten endothelial adhärenente Neutrophile gekennzeichnet werden, um diese in den Lungenproben von interstitiellen Neutrophilen unterscheiden zu können (siehe Abbildung 3.2 in Kapitel 3.3.3). Die Versuchsgruppen anderer Analysen haben diesen Antikörper nicht erhalten.

Für die operative Probenentnahme von Blut, bronchoalveolärer Lavage (BAL) und der Lunge wurden die Versuchstiere mit einer Dosierung von 10 µl/g KG der in Tabelle 3.1 genannten Narkoselösung mittels i.p. Injektion narkotisiert.

Tabelle 3.1: Zusammensetzung der Narkoselösung am Beispiel für die Herstellung von 10 ml.

Wirkstoff	Konzentration	Menge
Ketaminhydrochlorid	100 mg/ml	1,2 ml
Xylazinhydrochlorid	20 mg/ml	0,4 ml
NaCl	0,9 %	7,2 ml oder 8,4 ml

Das Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe im Stadium der chirurgischen Toleranz wurde mittels Zwischenzehenreflex überprüft. Anschließend wurden die Versuchstiere in Rückenlage auf einer Operationsunterlage aus Kork an Pfoten und Kopf fixiert. Die Fixierung des Kopfes erfolgte in Überstreckung des Halses, um eine nachfolgende Tracheotomie zu ermöglichen. Das Fell der Versuchstiere wurde mit Glycerol vollständig benetzt und die Haut durch einen Schnitt unterhalb des Unterkiefers und durch laterale Hautschnitte bis zum Becken stumpf abpräpariert. Das Peritoneum wurde unterhalb des Xiphoids entlang des unteren Thoraxrands eröffnet, um im Anschluss eine Thorakotomie durchzuführen. Hierzu wurde das Diaphragma inzidiert und ein Kollaps der Lunge ausgelöst. Die vollständige Eröffnung des Thorax erfolgte durch die beidseitige Durchtrennung der Rippenbögen mittels kranialer Schnitte. Das Brustschild konnte anschließend hochgeklappt und mittels Kanüle auf der Korkunterlage fixiert werden. Mit Hilfe des Trendelenburg-Manövers wurde der vaskuläre Rückstrom des Blutes aus den unteren Körperpartien induziert. Zur Blutentnahme wurde der rechte Ventrikel entlang der Herzachse punktiert. Die Blutentnahme von ca. 700 µl Blut erfolgte mit einer Heparin-

benetzten 1 ml Spritze durch vorsichtige Aspiration. Das Blut wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei 37 °C in einem Wärmeschrank zwischengelagert. Auf die Blutentnahme erfolgte die Inzision der abdominalen Vena cava caudalis und der Aorta abdominalis. Das Versuchstier wurde mittels Injektion von 3 ml PBS⁻ in den rechten Ventrikel ausgeblutet. Gleichzeitig wurden durch das Spülen des gesamten Blutkreislaufes zirkulierende Neutrophile aus dem Lungengefäßsystem entfernt. Nach Euthanasie durch Ausbluten wurde mit Hilfe eines 22 G Venenverweilkatheters die BAL entnommen. Hierzu wurde die Trachea stumpf freipräpariert und ein Tubus über den genannten Katheter eingeführt. Der Tubus wurde mit Nähgarn fixiert. Zur Gewinnung der BAL wurde mehrfach PBS⁻ über den Tubus in den bronchoalveolären Raum injiziert und anschließend aspiriert. Die gewonnene BAL, mit einem Gesamtvolumen von 2 ml, wurde in einem Falcon Polystyrolröhrchen bis zur Weiterverarbeitung auf Eis gelagert. Abschließend erfolgte die Entnahme des Herz-Lungenpakets, wobei Herz und Lymphgewebe abgetrennt wurden. Die Lungenlappen der beiden Lungenflügel wurden bronchiennah getrennt. Der rechte Ober- und Unterlappen wurden in einem Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Der linke Lungenflügel sowie der Mittellappen und der zusätzliche Lappen der rechten Lunge wurden für die durchflusszytometrische Migrationsanalyse nachfolgend weiterverarbeitet.

Die Weiterverarbeitung von Blut, Lunge und BAL erfolgte unmittelbar an die operative Probenentnahme. Das für die durchflusszytometrische Migrationsanalyse entnommene Lungengewebe wurde in einer Petrischale mit einer chirurgischen Schere mechanisch zerkleinert und für den enzymatischen Verdau in ein 50 ml Falcon transferiert. Nach Zugabe von 2,5 ml Enzymlösung (siehe Tabelle 3.2) wurde das Lungengewebe im Dunkeln bei 37 °C und 70 rpm für 30 min in einem Thermoschüttler inkubiert. Im Anschluss an den enzymatischen Verdau wurden die Proben durch ein Zellsieb mit 70 µm Porengröße in ein neues Falcon überführt. Mit Hilfe des Konus einer 5 ml Spritze wurde das restliche Lungengewebe mechanisch aufgelöst und vorsichtig durch das Sieb gedrückt. Die verbliebenen Zellen wurden mit 20 ml PBS⁻ durch das Zellsieb gespült. Die Zellsuspension wurde 10 min bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in ca. 2,5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 10 min auf Eis wurde die Lyse durch Zugabe von 15 ml Färbepuffer gestoppt und erneut 10 min bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml (NaCl-Versuchsgruppen) bzw. 2 ml Färbepuffer (LPS-Versuchsgruppen) resuspendiert.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Enzymlösung am Beispiel für eine Lungenprobe.

Substanz	Volumen
Collagenase	2,5 µl
DNAse	2,5 µl
Hyaluronidase	2,5 µl
PBS ⁻	2,5 ml

Die BAL wurde 10 min bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und für ELISA, Myeloperoxidase-(MPO)- und *bicinchoninic acid*-(BCA)-Assay bei -80 °C eingefroren. Das Zellpellet wurde in 600 µl Färbepuffer resuspendiert.

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl in Blut, Lunge und BAL wurden jeweils 10 µl Probe entnommen und 90 µl Türk'sche Lösung zugegeben. Hiervon wurden wiederum 10 µl Lösung in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Gesamtzellzahl ermittelt.

Das Blut sowie die Zellsuspensionen der Lunge und der BAL wurden anschließend für die durchflusszytometrische Färbung eingesetzt.

3.3. Durchflusszytometrie

3.3.1. Prinzip und Kompensation

Die Durchflusszytometrie ist eine laser-basierte Analysetechnologie, die es ermöglicht physikalische und chemische Eigenschaften von Zellen oder Partikeln innerhalb einer Flüssigkeit anhand einer speziellen Optik zu detektieren. Die Zellen oder Partikel werden mit einem Laserstrahl angeregt, dessen Wellenlänge im Absorptionsspektrum der verwendeten Fluorochrome liegt (Loken et al., 1977). Diese absorbieren die Lichtenergie, wodurch ihre Elektronen in einen angeregten Zustand versetzt werden. Bei Rückkehr in den Grundzustand wird die freiwerdende Energie als Fluoreszenzstrahlung emittiert und nach dem Passieren entsprechender Bandpassfilter von speziellen Detektoren erfasst (Herzenberg et al., 1976, Loken et al., 1977, Baumgarth et al., 2000).

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Charakterisierung verschiedener Zellen in Abhängigkeit ihrer Größe und Granularität. Die Größe einer Zelle kann durch das Vorwärtstreulicht (*forward scatter* (FSC)) und die Granularität durch das Seitwärtstreulicht (*side scatter* (SSC)) bestimmt werden. Die zu untersuchenden Zellen werden innerhalb einer speziellen Trägerlösung über eine Probenkapillare angesaugt und in eine Messküvette geleitet, in der sie vereinzelt einen Laserstrahl passieren. Das entstehende Streulicht

wird von speziellen Detektorlinsen gemessen. Der FSC-Detektor misst die in einem flachen Winkel entstehende Lichtbeugung, welche ein relatives Maß für die Größe der Zelle darstellt (Herzenberg et al., 1976). Der SSC-Detektor detektiert das durch Lichtbrechung im 90°-Winkel abgelenkte Licht und liefert Rückschlüsse auf die Granularität der Zellen (Herzenberg et al., 1976). FSC und SSC können in einem Plot gegeneinander aufgetragen werden, um einzelne Zellpopulationen voneinander abzugrenzen. Im sogenannten FSC vs. SSC-Plot können die wesentlichen Subpopulationen von Immunzellen anhand ihrer Größe und Granularität dargestellt und unterschieden werden. Kleine und wenig granuläre Zellen, z.B. Lymphozyten, lassen sich von größeren Zellen moderater Granularität, z.B. Monozyten, und größerer Zellen hoher Granularität, z.B. neutrophile Granulozyten, abgrenzen.

Durch die Markierung bestimmter zelltypspezifischer Oberflächenantigene mit fluoreszenz-markierten Antikörpern können die verschiedenen Zellpopulationen und die Expression ausgewählter Moleküle eindeutig identifiziert und quantifiziert werden (Baumgarth et al., 2000). Nach dem oben beschriebenen Prinzip der Absorptions- und Emissionsstrahlung wird die langwellige, emittierte Fluoreszenzstrahlung detektiert. Die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) ist dabei proportional zur Menge des gebundenen fluoreszenz-markierten Antikörpers.

Die zur Markierung verwendeten Fluorochrome besitzen unterschiedliche Absorptions- und Emissionsspektren, sodass verschiedene Zellmarker gleichzeitig untersucht werden können. Für die parallele Analyse mehrerer Antigene wurden die fluoreszenz-markierten Antikörper eines Antikörpermixes so gewählt, dass sich ihre Emissionsspektren nicht bzw. möglichst wenig überschneiden. Bei der Verwendung verschiedener Fluorochrome kann es zur spektralen Überschneidung der zugehörigen Emissionsspektren kommen (Tung et al., 2004). Nach Anregung eines Fluorochroms durch den Laserstrahl passiert das emittierte Fluoreszenzsignal den Bandpassfilter eines bestimmten Wellenlängenbereiches und wird danach von dem dem Fluorochrom zugeordneten Detektor erfasst (Loken et al., 1977). Allerdings ist das Emissionsspektrum eines Fluorochroms nicht zwangsweise auf den ihm zugewiesenen Kanal (Bandpassfilter und Detektor) beschränkt. Dies führt dazu, dass ein Teil des emittierten Fluoreszenzsignals anderer Fluorochrome in einem spezifischen Kanal gemessen wird. Diese unspezifischen Fluoreszenzsignale müssen subtrahiert werden, um in einem Kanal ausschließlich das Signal des zugehörigen Fluorochroms bewerten zu können. Eine spektrale Überlappung der

Emissionsspektren einzelner Fluorochrome, z.B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Einstrahlung in den Phycoerythrin (PE)-Kanal, wurde durch eine Kompensation korrigiert.

Die Fluoreszenzkompensation ist ein Verfahren zur Korrektur der spektralen Überlagerung von Fluorochromen und wurde erstmals 1977 von Leonard A. Herzenberg et al. bei der Analyse eines Einlaser-Zweifarbigen-FACS-Experimentes beschrieben (Loken et al., 1977). Sie stellt einen zentralen Schritt in der Datenanalyse dar und umfasst die Subtraktion der unspezifischen spektralen Überlappungssignale von der in jedem Kanal erfassten Gesamtfluoreszenz (Tung et al., 2004). Die Kompensation erfolgte durch eine berechnete Transformation mit FlowJo7. Für jedes verwendete Fluorochrom wurden Einzelfärbungen, sogenannte Kompensationskontrollen, erstellt und gemessen, wobei in jeden Fluoreszenzkanal jeweils eine positive und eine negative Population definiert wurden. Das Kompensationsprogramm von FlowJo7 berechnete anhand der identifizierten Positiv- und Negativpopulationen eine sogenannte Kompensationsmatrix, die zu Beginn der Datenanalyse auf alle unkompensierten Messdaten angewendet wurde, um die spektrale Überlappung zu korrigieren.

3.3.2. Fluoreszenzbasierte Zellfärbung

Für die fluoreszenzbasierte Zellfärbung wurden je Probe 50 µl des entsprechenden Antikörpermixes in *fluorescence-activated cell sorting* (FACS)-Tubes vorgelegt. Alle Blut-, Lungen- und BAL-Proben wurden mit Antikörpermix 1-3 (Tabellen 3.3-3.5) gefärbt, um Adhäsionsmoleküle auf PMNs und Thrombozyten zu analysieren. Die Lungenproben wurden zusätzlich mit Antikörpermix 4-5 (Tabellen 3.6-3.7) gefärbt, um weitere Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen untersuchen zu können. Im Anschluss wurden 25 µl Vollblut bzw. 100 µl der hergestellten Zellsuspensionen der Lunge und BAL (Kapitel 3.2.) hinzugegeben und gevortext. Die Antikörperinkubation erfolgte für 30 min bei 4 °C im Dunkeln. Die Blutproben erhielten nach 20 min zusätzlich 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer, der während der verbliebenen Inkubationszeit für 10 min inkubiert. Nach beendeter Inkubationszeit wurden die Proben mit Färbepuffer auf ein Gesamtvolumen von 2 ml verdünnt und für 10 min bei 1300 rpm und 4 °C zentrifugiert. Ungebundene Antikörper wurden nach der Zentrifugation durch Dekantieren des Überstandes entfernt. Es folgten zwei weitere Waschschrte, ehe die Proben in 400 µl Cellfix resuspendiert und fixiert wurden.

Tabelle 3.3: Antikörpermix 1. Untersuchung der gelisteten Adhäsionsmoleküle auf PMNs in Blut, Lunge und BAL (Zusammensetzung je FACS-Tube), wobei die Populationsmarker grau hinterlegt sind.

AK Mix 1		
Antikörper	Fluorchrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl
Ly6G	PE/Cy7	1 µl
CD62L	Pacific Blue	1 µl
CD49d	APC	1 µl
CD162	PE	1 µl
CD41	FITC	1 µl
Färbepuffer		44 µl

Tabelle 3.4: Antikörpermix 2. Untersuchung der gelisteten Adhäsionsmoleküle auf PMNs in Blut, Lunge und BAL (Zusammensetzung je FACS-Tube), wobei die Populationsmarker grau hinterlegt sind.

AK Mix 2		
Antikörper	Fluorchrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl
Ly6G	PE/Cy7	1 µl
CD11b	Pacific Blue	1 µl
ADAM17	PE	1 µl
CD41	FITC	1 µl
Färbepuffer		45 µl

Tabelle 3.5: Antikörpermix 3. Untersuchung der gelisteten Adhäsionsmoleküle auf Thrombozyten in Blut, Lunge und BAL (Zusammensetzung je FACS-Tube), wobei die Populationsmarker grau hinterlegt sind.

AK Mix 3		
Antikörper	Fluorchrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl
CD62P	PE/Cy7	1 µl
CD41	Pacific Blue	1 µl
ADAM17	PE	1 µl
CD44	FITC	1 µl
Färbepuffer		45 µl

Tabelle 3.6: Antikörpermix 4. Untersuchung der gelisteten Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen in der Lunge (Zusammensetzung je FACS-Tube), wobei die Populationsmarker grau hinterlegt sind.

AK Mix 4		
Antikörper	Fluorchrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl
CD144	PE/Cy7	1 µl
Zombi Violet	Pacific Blue	1 µl
CD106	APC	1 µl
CD321	PE	1 µl
CD31	FITC	1 µl
Färbepuffer		44 µl

Tabelle 3.7: Antikörpermix 5. Untersuchung der gelisteten Adhäsionsmoleküle auf Endothelzellen in der Lunge (Zusammensetzung je FACS-Tube), wobei die Populationsmarker grau hinterlegt sind.

AK Mix 5		
Antikörper	Fluorchrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl
Ly6G	PE/Cy7	1 µl
CD54	Pacific Blue	1 µl
ADAM17	PE	1 µl
CD31	FITC	1 µl
Färbepuffer		45 µl

3.3.3. Messung und Auswertung

Die gefärbten Proben wurden mit einem FACS Canto™ II Durchflusszytometer der Firma BD Bioscience gemessen. Das Durchflusszytometer wurde routinemäßig vor jeder Messung mit den vom Hersteller empfohlenen *Cytometer and Tracking Beads* von BD kalibriert. Für die Durchführung des Kalibrierungsverfahrens und die Erfassung der Messdaten wurde die zugehörige BD FACSDiva Software Version 9 verwendet. Die Laserkonfiguration des verwendeten FACS Canto™ II bestand aus einem blauen (488 nm, 29 mW solid state), einem roten (633 nm, 17 mV HeNe) und einem violetten (405 nm, 30 mW solid state) Laser sowie den zugehörigen Filtern und Detektoren. Für die Messung wurde im FSC vs. SSC-Plot ein Gate um intakte Zellen gesetzt, um Zellschrott auszuschließen. Die Messdauer wurde mit 10.000 gemessenen intakten Zellen, sogenannten *Events*, innerhalb des gesetzten Gates einheitlich definiert. Die Flussrate wurde entsprechend eingestellt, um einen Grenzwert von 800 *Events* pro Sekunde nicht zu überschreiten und die Messung vereinzelter Zellen innerhalb der Messküvette zu gewährleisten.

Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung der FlowJo7-Software. Zu Beginn der Auswertung wurde die anhand der Kompensationskontrollen generierte Kompensationsmatrix über die unkompensierten Rohdaten gelegt, um spektrale Überlappungen zu korrigieren (siehe Kapitel 3.3.1.). Die Identifikation der PMNs erfolgte entsprechend der in Abbildung 3.2 beschriebenen Gatingstrategie am Beispiel einer repräsentativen Lungenprobe. Zu Beginn wurde ein *Single Cell Gating* durchgeführt, um Zellaggregate auszuschließen sowie eine präzise Analyse spezifischer Zellpopulationen in heterogenen Proben zu gewährleisten. Hierfür wurde der SSC-A (*area*) vs. SSC-H (*high*)-Plot aufgetragen und ein Parallelogramm um die *Single Cells* gesetzt. Aus den *Single Cells* wurde im FSC vs. SSC-Plot die Leukozytenpopulation anhand der Zellgröße und Granularität definiert. Im Leukozytengate wurden wiederum CD45⁺ Zellen (Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex (PerCP)) als Leukozyten identifiziert. Innerhalb dieser Leukozytenpopulation wurden PMNs über den neutrophilen Marker Ly6G (Phycoerythrin-Cyanin 7 (PE-Cy7)) bestimmt. Auf den definierten PMNs wurde mit der MFI der jeweiligen Fluorochrome die Proteinexpression der untersuchten Adhäsionsmoleküle quantifiziert. Für die PMN-Migrationsanalyse in die verschiedenen Lungenkompartimente wurde mithilfe des i.v. injizierten APC/Cy7-markierten anti-murine Ly6G Antikörpers und eines Quadrantengates zwischen Ly6G^{+/+} endothelial adhären PMNs und Ly6G^{+/-} interstitiellen PMNs in den Lungenproben unterschieden.

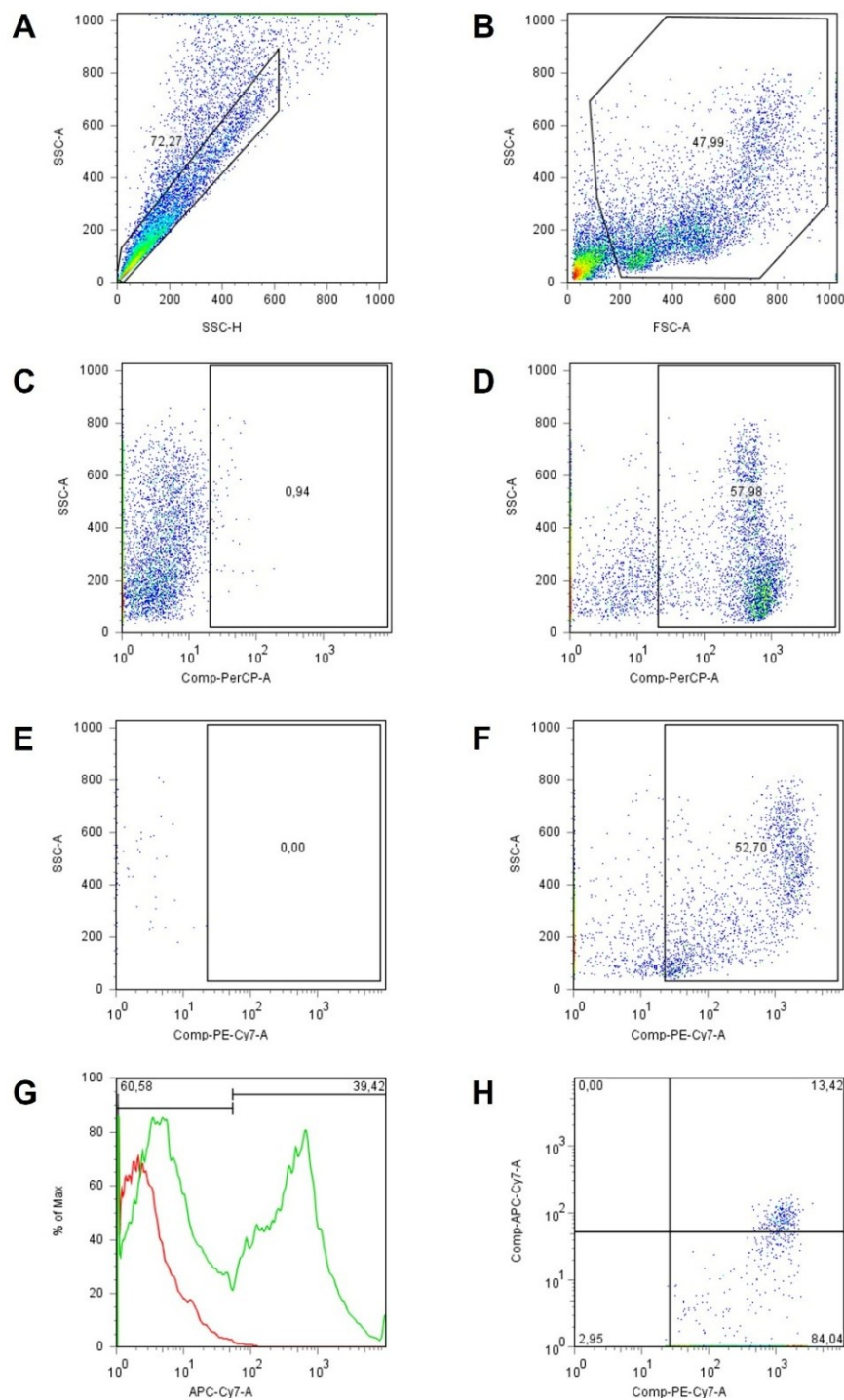


Abbildung 3.2: Gatingstrategie zur Identifikation von polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) in einer repräsentativen Lungenprobe. (A) SSC-A (*side scatter-area*) vs. SSC-H (*side scatter-high*)-Plot zur Identifikation der *Single Cells* in einem Parallelogramm. (B) Aus den *Single Cells* wurde im FSC (*forward scatter*) vs. SSC-Plot anhand der Zellgröße und Granularität ein Leukozytengate gesetzt. Anhand der *Unstained*-Kontrolle (C) wurden CD45⁺ Zellen im Leukozytengate eindeutig als Leukozyten identifiziert (D). Aus den CD45⁺ Leukozyten wurden mit Hilfe der *Unstained*-Probe (E) Ly6G⁺ PMNs identifiziert (F). Anschließend folgte die Unterscheidung zwischen endothelial-adhären und interstitiellen PMNs. (G) Hierzu wurde anhand der Kompensationskontrolle der *Cutoff*-Punkt zwischen Allophycocyanin/Cyanin7 (APC-Cy7)^{neg} (rote Linie) und APC-Cy7^{pos} (grüne Linie) Zellen gesetzt. (H) Quadranten-Gating zur Identifikation endothelial-adhären (Ly6G^{+/+}) und interstitiellen (Ly6G^{+/-}) PMNs. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 3.2 A-H).

Zur Detektion der Endothelzellen wurde ein *Single Cell Gating* durchgeführt und der Zellschrott abgegrenzt. Daraus wurden die Endothelzellen als CD45⁻ und CD31⁺ Zellen identifiziert und über die MFI die Expression der Adhäsionsmoleküle bestimmt.

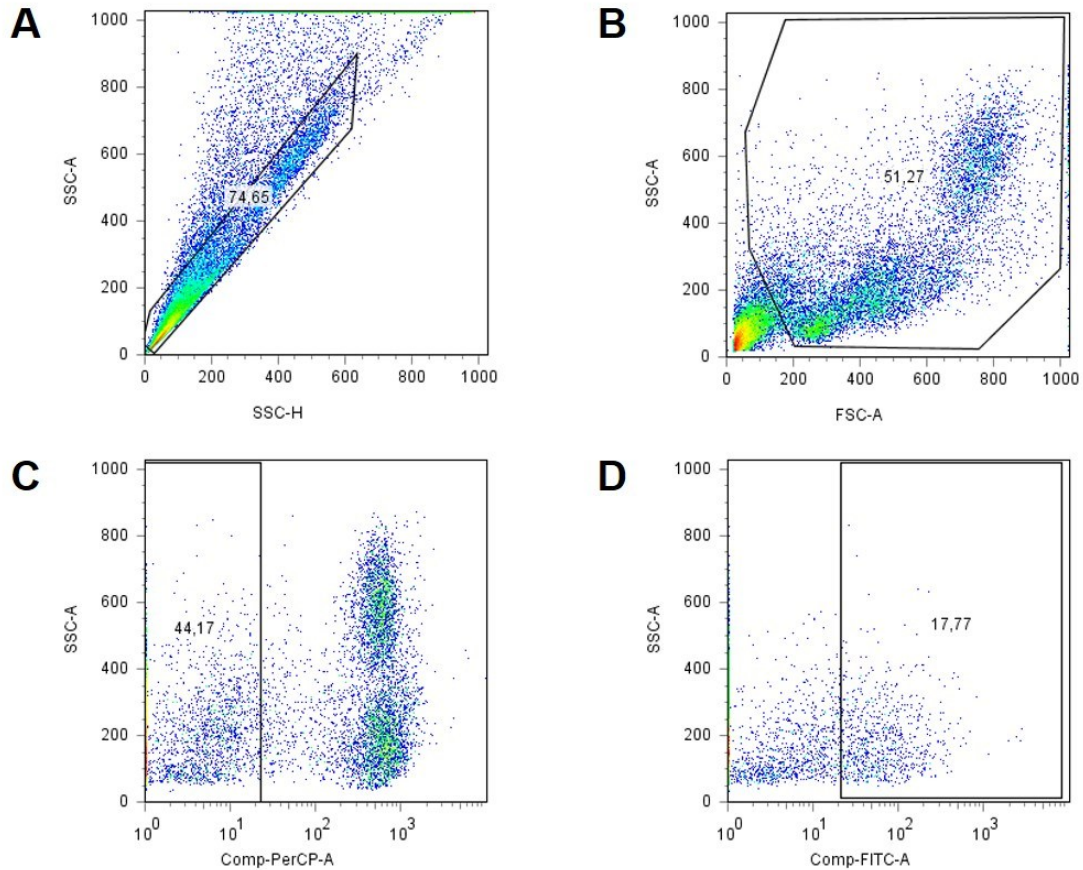


Abbildung 3.3: Gatingstrategie zur Identifikation von pulmonalen Endothelzellen in einer repräsentativen Lungenprobe. (A) SSC-A (*side scatter-area*) vs. SSC-H (*side scatter-high*)-Plot zur Identifikation der *Single Cells* in einem Parallelogramm. (B) Aus den *Single Cells* wurde der Zellschrott im FSC vs. SSC-Plot abgegrenzt. (C) Identifikation der CD45⁻ Zellen anhand der *Unstained*-Kontrolle. (D) Aus den CD45⁻ Zellen wurden anhand der *Unstained*-Probe CD31⁺ Endothelzellen identifiziert.

3.4. Genexpressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse inflammationsassoziiierter Gene sowie relevanter Rezeptoren erfolgte anhand komplementärer DNA (*complementary desoxyribonucleic acid*, cDNA) mittels quantitativer Echtzeit-PCR (*real time quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR). Zunächst wurde die Ribonukleinsäure (*ribonucleic acid*, RNA) aus dem murinen Lungengewebe isoliert und eine definierte Menge dieser RNA in cDNA umgeschrieben. Die aus RNA synthetisierte cDNA enthielt ausschließlich die kodierenden Bereiche eines Gens, die sogenannten Exons, wodurch die Analyse aktiv exprimierter Gene ermöglicht wurde.

3.4.1. RNA-Isolation

Die Extraktion der Gesamt-RNA aus dem Lungengewebe erfolgte mittels TRIzol™ entsprechend den Herstellerangaben. TRIzol™ ist eine chemische Lösung, die aus Phenol und Guanidiniumthiocyanat besteht und die Zellmembran lysiert sowie die Proteine denaturiert. Gleichzeitig wird die RNA vor einem Abbau durch Hemmung der entsprechenden RNAsen geschützt.

Die bei -80 °C gelagerten murinen Lungengewebe wurden langsam auf Eis aufgetaut. Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte innerhalb spezifischer Reaktionsgefäße durch die Verwendung entsprechender Keramik-Beads in 1 ml TRIzol™. Für den Aufschluss des Gewebes wurden die vorbereiteten Proben im Homogenisator bei 5500 rpm für 15 s homogenisiert.

Die aus dem in-vitro-*small interfering RNA*-(siRNA)-Transfektionsversuch generierten und bei -80 °C gelagerten Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut.

Die im weiteren Verlauf beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten unter einem Abzug und wurden für die murinen und humanen Proben identisch durchgeführt. Eine Inkubationszeit von 5 min bei RT ermöglichte die Dissoziation der Nukleotidkomplexe. Pro Lysat wurden 200 µl Chloroform hinzu pipettiert, die Proben gründlich gevortext und für weitere 10 min bei RT inkubiert. Um die Ausbildung einer Phasentrennung zu erreichen, wurden die Proben bei 12.000 g und RT für 15 min zentrifugiert. Die untere organische Phenol-Phase enthielt Proteine und andere Zellkomponenten, die mittlere Interphase die *deoxyribonucleic acid* (DNA) und die obere wässrige Phase die gewünschte RNA. Die wässrige Phase mit der extrahierten RNA wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches 1,5 mL Eppendorf Tube überführt. Anschließend erfolgte die Präzipitation der RNA durch Zugabe von 500 µl eisgekühltem Isopropanol, Vortexen der Proben und einer mindestens 30-minütigen Inkubation auf Eis. Nach Zentrifugation bei 12.000 g und 4 °C für 10 min entstand ein weißes RNA-Pellet, welches durch Abnahme des Isopropanolüberstandes und zweimaliges Waschen mit 75%-Ethanol von Phenol- und Chloroformresten gereinigt wurde. Im Anschluss an den letzten Waschvorgang wurde der Überstand vollständig abpipettiert und das RNA-Pellet für 30 min an der Luft getrocknet. Das RNA-Pellet wurde in 40 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst. Um die Löslichkeit der RNA zu erhöhen, wurden die Proben für 10 min im Thermoblock unter leichtem Schütteln auf 55 °C erhitzt. Die Proben wurden kurzfristig bei -20 °C oder langfristig bei -80 °C weggefroren, um bei der nachfolgenden Konzentrationsbestimmung konstante RNA-Konzentrationen ermitteln zu können.

3.4.2. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der isolierten RNA wurde photometrisch mit dem NanoDrop 2000 Spektrometer und zugehöriger Software bestimmt. Das Betriebssystem des Gerätes führte vor jeder Verwendung eine automatische Wellenlängenkontrolle durch, um die Messgenauigkeit sicherzustellen. Zur Definition des Leerwerts wurden 2 µl Nuklease-freies Wasser (NFW) auf den unteren Probenhalter pipettiert und die Nulllinie photometrisch bestimmt. Die photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte ebenfalls anhand von 2 µl Probe. Die RNA-Konzentration sollte für den Umschrieb in cDNA im Bereich von 300 – 800 ng/µl liegen. Je nach gemessener RNA-Konzentration wurde die RNA-Probe durch die Zugabe von NFW auf diesen Bereich verdünnt. Jede Probe wurde als Duplikat gemessen und die mittlere RNA-Konzentration bestimmt. Zusätzlich wurde die Reinheit der RNA-Lösung über den $A_{260/280}$ – Quotient bestimmt, wobei RNA bei 260 nm und Proteine bei 280 nm Licht absorbieren. Ein $A_{260/280}$ – Quotient von 2,0 beschrieb eine reine RNA-Probe, frei von Proteinen. Zwischen jeder Messung wurde der untere und obere Probenhalter mit einem fusselfreien Tuch gereinigt.

3.4.3. cDNA-Umschrieb

Der Umschrieb in cDNA erfolgte durch die Verwendung des Bio Rad *iScript cDNA Synthesis Kit* entsprechend den Herstellerangaben. Für den Umschrieb wurden 1 µg der isolierten RNA eingesetzt, um final 1 µg cDNA in 160 µl NFW vorliegen zu haben. Zu Beginn wurde aus den Kitbestandteilen ein Mix aus 5x *iScript Reaction Mix* und der *iScript Reverse Transkriptase* im Verhältnis 4:1 hergestellt. Der Umschrieb erfolgte in einem 200 µl Reaktionsgefäß, in welches zunächst NFW vorgelegt und anschließend die RNA-Lösung hinzugegeben wurde. Die exakten Volumina berechneten sich anhand der bestimmten RNA-Konzentration. Das benötigte Volumen für 1 µg RNA wurde mit NFW auf 15 µl aufgefüllt. Abschließend wurden 5 µl des *iScript Mixes* zugegeben, um ein finales Volumen von 20 µl zu erreichen. Die vollständigen Reaktionsmische wurden in einem Thermocycler nach dem in Tabelle 3.8 aufgezeigten Protokoll inkubiert.

Tabelle 3.8: Reaktionsprotokoll des Thermocyclers für den cDNA-Umschrieb (RT-PCR).

Vorgang	Temperatur	Zeit
Priming	25 °C	5 min
Reverse Transkription	46 °C	20 min
Inaktivierung Reverse Transkriptase	95 °C	1 min
Ende	4 °C	beibehaltend

Die Reverse Transkription umfasste hierbei zwei Prozesse, die von zwei verschiedenen Transkriptasen durchgeführt wurden. Zu Beginn katalysierte eine RNA-abhängige DNA-Polymerase die Synthese des DNA-Leitstrangs aus der vorliegenden RNA und den anschließenden RNA-Abbau. Eine DNA-abhängige Polymerase synthetisierte im Anschluss den Folgestrang.

Nach abgeschlossenem Syntheseprogramm wurde der vorliegenden cDNA 140 µl NFW zugegeben, um eine finale Konzentration von 1 µg cDNA in 160 µl NFW vorliegen zu haben. Diese wurde bis zum Einsatz für die RT-qPCR bei -20 °C gelagert.

3.4.4. RT-qPCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) wurde 1983 vom US-amerikanischen Biochemiker Kary Banks Mullis erfunden und erstmals beschrieben (Mullis et al., 1987). Mullis entwickelte die Methode, um DNA-Sequenzen durch wiederholte Zyklen der Denaturierung, Primerhybridisierung und DNA-Synthese exponentiell zu vervielfältigen. 1993 erhielt er für die Erfindung dieser Methode den Nobelpreis für Chemie (Mullis, 2003). Die exponentielle Amplifikation der Nukleinsäure erfolgt in drei Prozessen, die zyklisch wiederholt werden. Durch Denaturierung bei 95 °C wird der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge aufgespalten. Hierdurch wird die Matrize für das spezifische Primer-Paar zugänglich. Die beiden Primer können während des *Annealings* an die komplementären Sequenzen des zu amplifizierenden Gens an den Einzelstränge binden, wobei die exakte Temperatur von der Schmelztemperatur der verwendeten Primer abhängt. Eine thermostabile Taq-Polymerase synthetisiert während der Elongation bei 72 °C den neuen DNA-Strang durch Anfügen freier dNTPs an das 3'-Ende der Primer. Mit jeder Wiederholung dieses Zyklus verdoppelt sich die Menge des amplifizierten Gens.

In dieser Arbeit wurde die RT-qPCR zur Quantifizierung der Genexpression von ausgewählten inflammationsassoziierten Genen eingesetzt. Zur Durchführung wurde der gebrauchsfertige *iTaq Universal SYBR Green Supermix* von Bio Rad verwendet. Der SYBR Green I Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des amplifizierten Gens zunimmt. Über die Messung der Fluoreszenzintensität konnte die Genexpression des Zielgens quantifiziert werden.

Für die Durchführung der RT-qPCR wurden zunächst die Primer-Mixe für das zu amplifizierende Zielgen und das *Housekeeping*-Gen 18S hergestellt. Die 18S ribosomale RNA wird als Bestandteil der ribosomalen RNA in allen Zellen, unabhängig von

experimentellen Bedingungen, konstitutiv und stabil exprimiert und stellt folglich ein zuverlässiges Referenzgen dar. Für die Primer-Mixe wurden 160 µl NFW vorgelegt und jeweils 20 µl des *Forward*- und *Reverse*-Primers hinzugefügt. Des Weiteren wurden die beiden zugehörigen PCR-Mixe, bestehend aus 10 µl *iTaq Universal SYBR Green Supermix*, 5 µl NFW und 1 µl Primer-Mix pro Probe, sowie eine Verdünnungsreihe des Standards (1:2, 1:4, 1:8 und 1:16) hergestellt. Als Standard wurde die cDNA LPS-stimulierter Kontrolltiere verwendet. Beginnend wurden je Well 4 µl cDNA-Probe bzw. Standard oder NFW als *no template control* (NTC) in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert und 16 µl PCR-Mix hinzugegeben. Für jede Probe wurden Duplikate für Zielgen und 18S durchgeführt. Die Platte wurde mit einer entsprechenden Folie versiegelt, abzentrifugiert und die RT-qPCR in einem PCR-Cycler mit *Real-Time* PCR Detektionssystem der Firma Bio Rad mit entsprechendem Temperaturprofil durchgeführt. Die Denaturierung, das *Annealing* sowie die Elongation wurden für insgesamt 40 Zyklen wiederholt, wobei die Fluoreszenzsignalmessung nach jedem Zyklus stattfand. Die Primer-spezifischen *Annealing*-Temperaturen sind der Tabelle 2.7 zu entnehmen. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte unter Verwendung der Software Bio Rad CFX Maestro Version 2.3. Die Daten wurden nach der $\Delta\Delta C_q$ -Methode auf das Referenzgen 18S normalisiert.

3.5. Proteinexpressionsanalysen

3.5.1. Myeloperoxidase-Assay

Aktiviert PMNs setzen während der Phagocytose von Mikroorganismen ROS frei, ein Prozess der auch als Oxidativer Burst bezeichnet wird. Die MPO ist eine hämhaltige Peroxidase, die in aktivierten PMNs vermehrt exprimiert wird und für die Katalyse der Reaktion zwischen Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und einem Halogen, z.B. dem Chloridion (Cl^-), verantwortlich ist (Hellebrekers et al., 2018). MPO katalysiert im Rahmen dieser Reaktion die Bildung von Hypochloritionen (OCl^-), die als ROS fungieren. Über diese MPO-vermittelte Reaktion konnte mit Hilfe des Redoxindikators und MPO-Substrats 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) die MPO-Freisetzung in den BAL-Überständen, als indirekter Nachweis der Neutrophilen-Aktivität, nachgewiesen werden. ABTS wurde durch die Reduktion von H_2O_2 zu Wasser (H_2O) oxidiert. Der resultierende blaue Farbumschlag war proportional zur Menge an vorhandenem MPO und konnte photometrisch bestimmt werden. Für die Durchführung wurden 50 µl Probe, 50 µl Citratpuffer und 100 µl ABTS-Lösung in die Wells einer 96-Well-Platte pipettiert und im Dunkeln für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Farbintensität wurde mit dem TECAN *Microplate Reader*

Infinite 2000 Pro bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt. Die erhaltenen Messwerte wurden in der Einheit optische Dichte (OD) angegeben.

3.5.2. Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung (BCA-Assay)

Die quantitative Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den BAL-Überständen und in den Homogenisaten der Lungengewebe für die Western Blot-Analyse erfolgte unter Verwendung des BCA-Protein-Assay Kits von Thermo Scientific. Die BCA-Methode basiert auf zwei chemischen Reaktionen, die im alkalischen Milieu ablaufen und zur Bildung eines violetten Farbkomplexes führen. Proteine reduzieren Kupfer(II)-Ionen (Cu^{2+}) zu Kupfer(I)-Ionen (Cu^{+}), die wiederum mit der BCA reagieren und einen stabilen violetten Chelatkomplex bilden (Smith et al., 1985).

Hierzu wurden 25 μl der Probe bzw. 25 μl des BCA-Standards mit 200 μl BCA-Lösung (Zusammensetzung aus zwei Kit-Reagenzien entsprechend den Herstellerangaben) in einer 96-Well-Platte im Dunkeln für 30 min bei 37 °C inkubiert. Standard und Proben wurden jeweils in Duplikaten bestimmt. Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der Homogenisate des Lungengewebes wurden die Proben 1:15 verdünnt. Die Farbintensität wurde mit dem TECAN *Microplate Reader* Infinite 2000 Pro bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch gemessen. Die Quantifizierung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte anhand der Albumin-Standardreihe.

3.5.3. ELISA

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren zur Detektion und Quantifikation von Proteinen über eine enzymatisch katalysierte Farbreaktion. Der Nachweis von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und löslichen Rezeptor- und Adhäsionsmolekülbestandteilen erfolgte mittels der Methode des Sandwich-ELISAs. Dabei wird das Zielantigen an unterschiedlichen Epitopen von einem immobilisierten *Capture*-Antikörper und einem enzymgekoppelten *Detection*-Antikörper gebunden. Über eine Streptavidin-Biotin-Bindung wird die Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) an den *Detection*-Antikörper gekoppelt. Nach Zugabe einer Substratlösung katalysiert die HRP eine Farbreaktion, die photometrisch gemessen werden kann und deren Intensität proportional zur Konzentration des Zielantigens in der Probe ist. Die Quantifizierung der Antigenkonzentration erfolgte über eine Standardkurve.

3.5.3.1. DuoSet ELISA

Zum Nachweis ausgewählter Antigene wurden die in Tabelle 2.8 aufgeführten DuoSet ELISA Kits von R&D Systems verwendet und entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurde am Vortag eine 96-Well-ELISA-Platte mit dem *Capture*-Antikörper, welcher in ELISA PBS gelöst wurde, beschichtet. Pro Well wurden 100 µl des *Capture*-Antikörpers pipettiert, die Platte mit einer speziellen Folie versiegelt und über Nacht bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde die Platte mit einem automatischen *Microplate Washer* drei Mal mit je 300 µl Waschpuffer (0,05 % Tween in ELISA PBS) gewaschen. Nachfolgend wurde die Platte für eine Stunde mit 150 µl *Reagent Diluent* (1 % BSA) geblockt, um freie Bindungsstellen zu blockieren und unspezifische Bindungen zu verhindern. Analog zum vorherig beschriebenen Waschvorgang wurde die Platte erneut gewaschen und je Well 100 µl BAL-Probe bzw. Standard, der zuvor hergestellten Verdünnungsreihe, zugegeben und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Einem erneuten dreimaligen Waschprozess folgte die Zugabe von 100 µl des Biotin-gekoppelten *Detection*-Antikörpers und eine zweistündige Inkubation. Im Anschluss auf einen weiteren analogen Waschvorgang wurden 100 µl der HRP-Enzymlösung zugegeben und innerhalb einer 20-minütigen Inkubationszeit im Dunkeln die Kopplung der HRP über eine Streptavidin-Biotin-Bindung an den gebundenen *Detection*-Antikörper ermöglicht. Einem letzten Waschprozess folgte die Zugabe und 20-minütige Inkubation von 100 µl Substratlösung (Substrat A (Tetramethylbenzidin, (TMB)) und Substrat B (H₂O₂) im Verhältnis 1:1), was zu einem türkisblauen Farbumschlag führte. Die Farbreaktion wurde nach der Inkubationszeit durch Zugabe von 50 µl Stopplösung aus verdünnter Schwefelsäure abgebrochen, wodurch ein Farbumschlag von türkisblau zu gelb stattfand.

Die Messung der Farbintensität erfolgte mit einem TECAN *Microplate Reader* Infinite Pro 2000 bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Referenzwellenlänge von 570 nm wurde nach Messung automatisch von den Messwerten bei 450 nm subtrahiert, um optische Unvollkommenheiten der Platte zu korrigieren. Im weiteren Verlauf der Datenanalyse mit der zugehörigen Software Magellan Version 7.2 wurde anhand dieser Differenzdaten eine Leerwert-Reduktion durchgeführt, um die optische Absorption der Trägerlösung abzuziehen. Anhand der Standardreihe erfolgte eine Regressionsanalyse der Daten nach Leerwert-Reduktion und die Quantifizierung des Zielantigens.

3.5.3.2. ELISA VE-Cadherin

Die quantitative Bestimmung von löslichem VE-Cadherin in den BAL-Überständen erfolgte mit Hilfe des murinen VE-Cadherin ELISA Kits von abcam, welches ebenfalls auf der Methode eines Sandwich-ELISAs basierte. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Hierzu wurden jeweils 50 µl Probe bzw. Standard in die entsprechenden Wells der vorbeschichteten 96-Well-Platte pipettiert. Zusätzlich wurden 50 µl eines Antikörper-Cocktails hinzugegeben, die Platte versiegelt und für eine Stunde unter leichtem Schütteln bei 400 rpm und RT inkubiert. Es folgte ein manueller Waschvorgang durch dreimalige Aspiration und Zugabe von 350 µl 1x Waschpuffer in jedes Well. Nach der letzten Aspiration des Waschpuffers wurde die Platte auf einem Stapel sauberer Papiertücher ausgeklopft, um restliche Flüssigkeit vollständig zu entfernen. Im Anschluss wurden 100 µl einer TMB-Entwicklungslösung pro Well zugegeben und im Dunkeln unter leichtem Schütteln bei 400 rpm inkubiert. Die Farbreaktion wurde durch die Zugabe von 100 µl Stopplösung beendet und die Platte für 1 min auf dem Plattenschüttler gemixt. Die optische Dichte (OD) wurde mit einem TECAN *Microplate Reader* Infinite Pro 2000 bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt. Die Datenanalyse erfolgte wie im vorherigen Kapitel 3.5.3.1. beschrieben.

3.5.4. Immunhistochemie

Die Probengewinnung von murinen Lungen für die immunhistochemischen Analysen erfolgte in einem separaten in-vivo-Histologieversuch, bei dem die Applikation der Inhibitoren, die LPS-Inhalation, die Narkose, die Eröffnung des Thorax, das Spülen des Blutkreislaufs und die Intubation analog zum beschriebenen operativen Vorgehen in Kapitel 3.2. der in-vivo-Migrationsanalyse durchgeführt wurden. Nach erfolgter Intubation wurden die Lungen über den gelegten Tubus für 10 min mit 4 % Formalin und einem Druck von 30 cm H₂O gefüllt, um die Lungenstruktur zu fixieren. Zusätzlich wurde die Lunge von außen mit 4 % Formalin durch die Verwendung einer Pasteurpipette gespült und fixiert. Abschließend wurde das gesamte Herz-Lungen-Paket entnommen, um die Lungenflügel nicht zu beschädigen. Die beiden Lungenflügel wurden vorsichtig abpräpariert und getrennt voneinander in Einbettkassetten überführt, welche über Nacht in 4 % Formalin gelagert wurden.

Die Probengewinnung für die immunhistochemische Analyse des Transwell-Assays erfolgte nach Beenden des Versuches durch Inkubation der Inserts über Nacht in 4 %

Formalin. Die Membranen der Inserts wurden am Folgetag abgezogen und in Einbettkassetten überführt.

Die weitere histologische Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe eines Gewebe-Probevorbereitungsgerätes von Leica, welches aus einem Karussellsystem besteht und die Prozesse der Entwässerung und Einlagerung in Paraffin automatisiert durchführte. Die Präparate durchliefen eine Ethanol-Reihe aufsteigender Konzentration (50-100 % Ethanol) und eine Xylol-Reihe zur vollständigen Entwässerung, ehe sie schlussendlich in Paraffin überführt wurden. Die in Paraffin eingelagerten Präparate wurden anschließend mit Hilfe eines Einbettautomats in Paraffinblöcke gegossen. Durch die Verwendung eines Rotationsmikrotoms konnten drei μm dicke Schnitte angefertigt werden, die nach Überführung auf spezielle Superfrost Objektträger über Nacht auf einer Wärmeplatte getrocknet wurden.

3.5.4.1. Immunfluoreszenzfärbung

Für die Immunfluoreszenzfärbung war eine Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffin-Schnitte erforderlich. Hierfür wurden die in Tabelle 3.9 aufgelisteten Arbeitsschritte durchgeführt.

Tabelle 3.9: Arbeitsschritte zur Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffin-Schnitte.

Substanz	Durchführung	Inkubationszeit
Xylol	3x	5 min
100 % Ethanol	2x	5 min
96 % Ethanol	1x	5 min
70 % Ethanol	1x	5 min
50 % Ethanol	1x	5 min
Aqua Dest.	3x	5 min

Um eine Bindung der Primärantikörper an die Zielantigene zu ermöglichen, folgte im Anschluss der Rehydrierung eine Demaskierung der Antigene durch ein 10-minütiges Aufkochen der Präparate in Demaskierungspuffer und einem 60-minütigen Abkühlen auf RT. Die Präparate wurden zweimal mit PBS⁻ für je 5 min gespült. Dieser Waschvorgang wiederholte sich im Anschluss an jeden der im Folgenden genannten Arbeitsschritte. Nach Zellfixierung mit 4 % PFA folgte eine Permeabilisierung für 3 min mit 0,1 % Triton-X und ein Blocken freier Bindungsstellen mit 5 % BSA in PBS⁻ für eine Stunde. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Primärantikörper und IgG-Kontrollen bei 4 °C. Die

verwendeten Primärantikörper und die zugehörigen Verdünnungen in 1 % BSA-Lösung sind der Tabelle 2.6 zu entnehmen. Die zugehörigen Sekundärantikörper wurden am Folgetag, nach dreimaligem Waschen, für eine Stunde inkubiert und können ebenfalls dieser Tabelle entnommen werden. Vor einem weiteren Färbedurchlauf wurden die Präparate erneut für eine Stunde mit 5 % BSA geblockt. Daraufhin folgte eine jeweils einstündige Inkubationszeit des zweiten Primärantikörpers und anschließend des zweiten Sekundärantikörpers. Abschließend wurden die Präparate drei Mal 5 min mit PBS⁻ gewaschen und eingedeckt. Hierfür wurde die Reagenz Roti®-Mount FluorCare 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) verwendet, die simultan eine Kernfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI ermöglichte. Nach luftblasenfreiem Aufbringen des Deckglases wurden die Schnitte im Dunkeln und Trocknen über Nacht bei 4 °C gelagert, um ein Aushärten des Eindeckmediums zu ermöglichen.

Die Aufnahmen wurden an dem konfokalen Lasermikroskop Stellaris 5 und der zugehörigen Software LAS X Version 5.0.3.24880 bei den entsprechenden Wellenlängen und mit einem 63x Objektiv für Immersionsöl aufgenommen. Für die 3D-Darstellung ausgewählter Färbungen wurden z-Stack Aufnahmen entsprechend der Anweisungen im Benutzerhandbuch des Mikroskopherstellers angefertigt.

Tabelle 3.10: Färbepanels für die murinen und humanen Immunfluoreszenzaufnahmen.

Färbung	Primärantikörper	Sekundärantikörper	Konjugat
ADAM17 Expression (murin)	ADAM17 Kaninchen anti-Maus	Ziege anti-Kaninchen	Alexa 488
	Ly6G + Ly6C Ratte anti-Maus	Ziege anti-Ratte	Alexa 647
VE- Cadherin Expression (murin)	VE-Cadherin Ziege anti-Maus	Affe anti-Ziege	Alexa 488
	vWF Schaf anti-Maus	Affe anti-Schaf	Alexa 647
IL-6R α Expression (murin)	IL-6R α Maus anti-Maus	Affe anti-Maus	Alexa 488
	vWF Schaf anti-Maus	Affe anti-Schaf	Alexa 647
TNFR1	TNFR1 Maus anti-Maus	Affe anti-Maus	Alexa 488

Expression (murin)	vWF Schaf anti-Maus	Affe anti-Schaf	Alexa 647
Transwell- Assay (human)	JAM-A Kaninchen anti-human	Ziege anti-Kaninchen	Alexa 488
	CD62L Maus anti-human	Ziege anti-Maus	Alexa 594
	CD45 Ratte anti-human	Ziege anti-Ratte	Alexa 647

3.5.4.2. Immunhistologische Färbung der PMNs

Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffin-Schnitte erfolgte wie im vorherigen Kapitel 3.5.4.1. und Tabelle 3.9 angegeben. Die endogene Peroxidase wurde durch die Zugabe einer Lösung aus 200 ml Methanol und 3 µl 30% Wasserstoffperoxid für 30 min geblockt. Die Präparate wurden für 10 min in Aqua Dest. gespült. Anschließend erfolgte die Demaskierung der Antigene wie unter 3.5.4.1. beschrieben. Die Objektträger wurden für 10 min in PBS⁻ gespült, ehe die Schnitte für eine Stunde bei RT unter leichtem Wippen in einer *Avidin-Blocking*-Lösung inkubiert wurden. Einem weiteren 10-minütigen Spülvorgang in PBS⁻ folgte die Inkubation des Primärantikörpers Ly6G + Ly6C (Ratte anti-Maus; 1:500) über Nacht bei 4 °C. Hierfür wurde der Primärantikörper in einer *Biotin-Blocking*-Lösung (1 % BSA und 10 % Normal-Serum der Spezies des Sekundärantikörpers) verdünnt. Desweiteren wurde eine IgG-Kontrolle (*Normal rat IgG*) und eine Negativkontrolle ohne Primärantikörper mitgefärbt.

Am Folgetag wurden die Präparate für 5 min in einer 1 % BSA-Lösung in PBS⁻ gespült und der Sekundärantikörper unter leichtem Wippen bei RT für eine Stunde inkubiert. Hierfür wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper (Kaninchen anti-Ratte; 1:500) aus dem ABC-Kit von Vectastain verwendet. Die zwei weiteren Lösungen des Kits (Lösung A und Lösung B) wurden zwischenzeitlich in einem Verhältnis von 1:1 gemischt und durch eine Überkopfrotation für mindestens 30 min inkubiert, sodass sich ein HRP-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex bildete. Nach Spülen der Schnitte in PBS⁻ für 5 min wurde diese Lösung für eine Inkubationszeit von 30 min im Dunkeln aufgetragen. Ungebundene ABC-Lösung wurde durch einen weiteren Spülvorgang entfernt. Die 3,3'-Diaminobenzidin (DAB)-Substratlösung aus dem Vectastain *Peroxidase Substrate Kit*

wurde für 4 min zugegeben. Dies resultierte in einer bräunlichen Farbreaktion, die die Ly6G + Ly6C positiven PMNs mit einem wasserunlöslichen, braunen Farbstoff anfärbte. Nach einem intensiven Spülvorgang (1x 5 min mit Aqua Dest. und 3x 5 min PBS⁻) wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne mit filtriertem Mayer's Hämalaun (1:1 verdünnt in Aqua Dest.) durch eine Inkubationszeit von 10 Sekunden durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden zum Bläuen 5 min unter einen laufenden Wasserstrahl von Aqua Dest. gestellt. Es folgte eine Dehydrierung der Schnitte in entgegengesetzter Richtung der in Tabelle 3.9 genannten Arbeitsschritte. Die dehydrierten Präparate wurden anschließend in Eukitt luftblasenfrei eingedeckt und getrocknet.

Die Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung erfolgten an einem Inversmikroskop von Leica und der zugehörigen Software Axiovision Version SE64 REL 4.9. Verwendet wurde ein 40x Immersionsöl-Objektiv und eine 1,6-fache Vergrößerung.

3.5.5. Western Blot

Zur Ermittlung der Proteinexpression von VE-Cadherin in murinem Lungengewebe erfolgte eine Western Blot-Analyse.

3.5.5.1. Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

Zur Auftrennung der Proteingemische wurde eine *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-Page) durchgeführt. Hierfür wurden SDS-Polyacrylamidgele verwendet, welche in Abhängigkeit der Größe bzw. des Molekulargewichtes des zu untersuchenden Proteins mit der geeigneten Porengröße hergestellt wurden. Für das Protein VE-Cadherin (125 kDa) wurden 10 % SDS-Polyacrylamidgele hergestellt, die für die Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 50-120 kDa geeignet sind. Die Gele bestanden aus einem Sammel- und einem Trenngel. Hierfür wurde ein *Upper Buffer* und ein *Lower Buffer* angesetzt (Tabelle 2.10). Das Sammel- und Trenngel wurde entsprechend der Rezeptur in Tabelle 3.11 hergestellt und in Gelkassetten gegossen.

Tabelle 3.11: Rezeptur von Sammel- und Trenngel (Menge für vier SDS-Polyacrylamidgele).

Gel	30 % Acrylamid	Puffer	Aqua Dest.	10 % APS	TEMED
5 % Sammelgel	2,5 ml	3,8 ml <i>Upper Buffer</i>	8,7 ml	60 µl	20 µl
10 % Trenngel	13,3 ml	10,8 ml <i>Lower Buffer</i>	15,9 ml	200 µl	80 µl

3.5.5.2. Probengewinnung, Gesamtproteinbestimmung und Vorbereitung

Zu Beginn wurden die Proteine aus dem murinen Gewebe isoliert. Hierfür wurden spezielle Probenröhrchen mit Keramik-Kügelchen bestückt und auf Eis vorgekühlt. Je Probe wurde ein bei -80 °C gelagerter, mittelgroßer Lungenlappen und 500 µl eiskalter Radioimmunpräzipitations-Assay (RIPA)-Puffer mit frisch zugesetzten Proteinaseinhibitoren (Verhältnis 1:100) zugegeben. Die Proben wurden in einem elektrischen Homogenisator bei 5500 rpm für 2x 20 s homogenisiert, unmittelbar im Anschluss auf Eis überführt und dort für 20 min inkubiert. Die Proben wurden bei 12.000 g und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand mit dem Gesamtprotein in ein frisches Eppendorf-Tube überführt.

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte mittels BCA-Assay wie in Kapitel 3.5.2. beschrieben.

Die Probenvorbereitung umfasste eine Denaturierung der Tertiärstruktur und Entfaltung der Proteinketten in eine lineare Form, um während der Elektrophorese eine Auftrennung der Proteine nach molekularer Größe zu ermöglichen. Je Probe wurde in Abhängigkeit der bestimmten Gesamtproteinkonzentration das entsprechende Volumen für eine finale Konzentration von 30 µg Protein in ein frisches Eppendorf-Tube gegeben und mit RIPA-Puffer auf 24 µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden 6 µl eines 5x Lämmli-Puffers mit β-Mercaptoethanol zugegeben und die Proben für 5 min bei 95 °C in einem Wärmeblock aufgeköcht, um eine vollständige Denaturierung zu erreichen. Die Proben wurden anschließend auf Eis abgekühlt.

3.5.5.3. SDS-Page

Die SDS-Page fand in einer Elektrophoresekammer statt, die mit dem selbstgegossenen SDS-Polyacrylamidgel bestückt und mit dem *Running Buffer* aus Eigenherstellung befüllt wurde. Die Geldaschen wurden entsprechend des Pipettierschemas mit je 30 µg Protein in einem Ladevolumen von 30 µl pro Probe befüllt. In die äußeren Taschen wurde ein Proteinmarker (11-245 kDa) gegeben. Die Elektrophoresekammer wurde mit dem zugehörigen Deckel verschlossen, die Elektroden an ein PowerPac200 Spannungsgeber angeschlossen und eine Vorspannung von 100 Volt eingestellt, um eine vollständige Sammlung der Proteine am Übergang von Sammel- zu Trenngel zu erreichen. Sobald die Proteine das Sammelgel verlassen haben, wurde die Spannung auf 150 Volt erhöht und die Proteine innerhalb einer Gesamtlaufzeit von ca. 1,5 Stunden aufgetrennt.

3.5.5.4. Transfer

Der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran erfolgte mittels *Dry-Blotting*-Methode und der Verwendung des *Trans-Blot Turbo Midi 0.2 µm PVDF Transfer Packs* von Bio Rad. Die Durchführung erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Gelkassette wurde aufgebrochen und vorsichtig der untere Bereich des Gels und das Sammelgel abgetrennt. Das Gel wurde vorsichtig auf die PVDF-Membran in der Mitte des mit Transferpuffers durchtränkten Filterpapierstapels gelegt. Mit einer speziellen Rolle wurden eventuell vorhandene Luftblasen entfernt. Die verschlossene Schubblade wurde in das Transfergerät eingeschoben. Für 10 % SDS-Polyacrylamidgele wurde das Programm „*Mixed MW Protokoll*“ ausgewählt. Der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran fand innerhalb von 7 min statt. Nach erfolgtem Transfer wurde die Membran unmittelbar in eine 5 % Magermilch-Lösung in 0,05 % *Tris-Buffered Saline with Tween 20* (TBST)-Puffer überführt und für eine Stunde unter leichtem Wippen bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

3.5.5.5. Immundetektion mit proteinspezifischen Antikörpern

Die verwendeten Primärantikörper wurden entsprechend den Konzentrationsangaben des Herstellers in einem finalen Volumen von 3 ml in 5 % Magermilch-Lösung in 0,05 % TBST-Puffer verdünnt. Die Primärantikörper und die zugehörigen Verdünnungen sind der Tabelle 2.6 in Kapitel 2.3. zu entnehmen. Die Membran wurde mit der jeweiligen Antikörperlösung in einer Folie eingeschweißt. Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Wippen.

Am Folgetag wurde die Membran für 3x 10 min in 0,05 % TBST-Puffer gewaschen, um ungebundene Antikörper gründlich zu entfernen. Anschließend folgte die Inkubation eines HRP-konjugierten IgG-Sekundärantikörpers für eine Stunde bei RT und leichtem Wippen. Die verwendeten Sekundärantikörper und die zugehörigen Verdünnungen können ebenfalls der Tabelle 2.6 in Kapitel 2.3. entnommen werden. Im Anschluss wurde erneut 3x 10 min in 0,05 % TBST-Puffer gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran für 5 min in einer Entwicklungslösung inkubiert. Die verwendeten und in Tabelle 3.12 aufgelisteten Entwicklungsreagenzien unterschieden sich in der Sensitivität und wurden in Abhängigkeit der Expression des untersuchten Proteins eingesetzt. Die Bildgebung der Blots erfolgte mit einem Fusion SL Gerät und der Software Fusion über Chemilumineszenz. Die Aufnahme des Proteinmarkers erfolgte als *bright field* (BF)-Aufnahme.

Tabelle 3.12: Übersicht der verwendeten Entwicklungsreagenzien.

Kit	Sensitivität	Protein
Immunocruz	Niedrig	GAPDH
Bio Rad	Mittel	VE-Cadherin

Als Ladekontrolle wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) mit einer Größe von 37 kDa verwendet. Hierfür wurde die Membran nach der Entwicklung für 3x 10 min in 0,05 % TBST-Puffer gewaschen, erneut in 5 % Magermilch-Lösung in 0,05 % TBST-Puffer für eine Stunde geblockt und der GAPDH-Primärantikörper über Nacht bei 4 °C wie zuvor beschrieben inkubiert. Das weitere Vorgehen zur Inkubation des entsprechenden Sekundärantikörpers und die Detektion mittels Chemilumineszenz erfolgte analog zur beschriebenen Durchführung bei VE-Cadherin.

3.6. Evans Blue Extravasations-Assay

Der Evans Blue Extravasations-Assay erfolgte in einem separaten murinen in-vivo-Permeabilitätsversuch, bei dem die Applikation der Inhibitoren und die LPS-Inhalation analog zum beschriebenen Vorgehen in Kapitel 3.2. der in-vivo-Migrationsanalyse durchgeführt wurden. 5 Stunden und 30 min nach der LPS-Inhalation erfolgte die gewichtsadaptive i.v. Injektion von Evans Blue in die Schwanzvene mit einer Dosierung von 20 µg/g KG. Hierfür wurde eine Evans Blue-Lösung mit einer Konzentration von 4 µg/µl hergestellt. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wurde die Narkose eingeleitet. Die Eröffnung des Thorax, die Blutentnahme, das Spülen des Blutkreislaufs und die Entnahme der Lunge erfolgten ebenfalls analog zum beschriebenen operativen Vorgehen in Kapitel 3.2. der in-vivo-Migrationsanalyse. Die entnommene Lunge wurde abgewogen, mit der 3,5-fachen Menge an PBS⁻ versetzt und mit Hilfe von Keramik-Kügelchen im Homogenisator bei 6500 rpm für 2x 10 s mit einer 30-sekündigen Pause homogenisiert. Die Homogenisate wurden im Verhältnis 1:2 mit Formamid bei 60 °C über Nacht für zwölf bis 16 Stunden inkubiert. Die Blutproben wurden für 10 min bei 4 °C und 12.000g zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen, in ein frisches Eppendorf-Tube überführt und bei 4 °C über Nacht gelagert. Am nächsten Tag wurden die Lungen-Proben bei 5000 rpm und RT für 30 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Auf eine 96-Well-Platte wurden jeweils 200 µl der Evans Blue-Standards sowie Plasma- und Lungenproben pipettiert. Die Messung der Farbtintensität erfolgte mit einem TECAN *Microplate Reader* Infinite Pro 2000 bei einer Wellenlänge von 620 nm. Als Referenzwellenlänge wurde 740

nm detektiert, um Kontaminationen der Proben mit Hemmpigmenten auszuschließen. Die korrekte Absorption von Evans Blue im Standard, Plasma und Lungengewebe wurde nach der Gleichung „Gemessene Absorption bei 620nm - $[1,426 \times (\text{Absorption bei } 740\text{nm}) + 0,03]$ “ bestimmt. Anhand der Standardreihe wurde eine Regressionsanalyse und die Berechnung der Evans Blue-Konzentrationen im Plasma und Lungengewebe durchgeführt.

3.7. In-vitro-Modellsysteme

3.7.1. Chemotaxis-Assay

Die Migrationsanalyse humaner PMNs mittels *live cell imaging* erfolgte unter Verwendung eines μ -Slide Chemotaxis-Assays der Firma ibidi. Hierzu wurden die humanen PMNs entsprechend dem Protokoll in Kapitel 2.2.4. aus Vollblut isoliert. Pro Ansatz wurde die Zellzahl auf eine Konzentration von 2×10^6 PMNs in 50 μl eingestellt. Die Zellen wurden anschließend mit *Celltracker Green* CMFDA (10 μM , Ex 492 nm, Em 517 nm) angefärbt. Hierfür wurden die PMNs mit dem in *hanks' balanced salt solution* (HBSS) gelöstem Farbstoff in einem Thermoschüttler bei 37 °C für 30 min inkubiert. Im Anschluss an die Färbung wurden die Zellen durch Zugabe von 1 ml vorgewärmten HBSS und Zentrifugation bei 1300 rpm und RT für 10 min gewaschen. Je nach Ansatz folgte die Inkubation der in Tabelle 2.5 genannten Inhibitoren mit der angegebenen Konzentration für 30 min bei 37 °C im Thermoschüttler. Es wurde erneut durch die Zugabe von 1 ml vorgewärmten HBSS und Zentrifugation gewaschen. Die PMNs wurden final in 80 μl PMN-Medium resuspendiert.

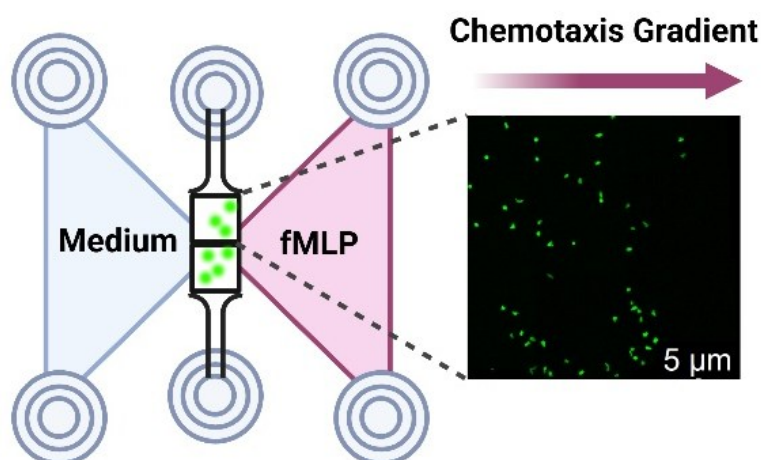


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Aufbaus einer Kammer des μ -Slides. Der linke Flügel ist mit dem *Vehicle* (Medium) und der rechte Flügel mit dem *Chemoattractant* Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP) in Medium gefüllt, um innerhalb der mittigen Messkammer die Ausbildung eines

konstanten Konzentrationsgradienten zu ermöglichen. Die frisch isolierten und je Versuchsgruppe entsprechend vorbehandelten polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) (grün dargestellt) wurden in die Messkammer, welche in zwei Quadrate unterteilt ist, gegeben. Unter einem konfokalen Lasermikroskop wurde die Migration der PMNs in einem *Live-Cell-Imaging*-Experiment aufgezeichnet und nachfolgend mittels ImageJ analysiert. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/zmmecor>). Abbildung in ähnlicher Form in folgender Originalpublikation erstveröffentlicht: (Biedritzky et al., 2025).

In Abbildung 3.4 wird der Aufbau des genutzten Assayformats gezeigt. Der μ -Slide wurde entsprechend den Herstellerangaben mit den Pufferlösungen, PMN-Medium bzw. fMLP, und den PMN-Proben befüllt. Während der Befüllung einer Kammer mussten die anderen Kammern stets geschlossen sein. Zu Beginn wurden die mittleren Kammern (je 12 μ l) und die Flügel (je 65 μ l) mit PMN-Medium als Pufferlösung vorbefüllt, um ein luftblasenfreies System zu ermöglichen. Anschließend wurde in die in der Übersicht markierten Flügel das *chemoattractant* fMLP (Konzentration 10 ng/ml; gelöst in PMN-Medium) gegeben. Hierzu wurden 32 μ l fMLP-Lösung in das untere Loch des Flügels pipettiert und langsam am oberen Loch aspiriert. Dieser Prozess wurde insgesamt drei Mal wiederholt, um einen gleichmäßigen Konzentrationsgradienten aufzubauen. Die mittleren Kammern wurden mit jeweils 10 μ l der entsprechenden PMN-Probe unter gleichem Vorgehen befüllt. Für jede Bedingung wurden drei unabhängige Experimente mit zwei technischen Wiederholungen durchgeführt. Das *live cell imaging* wurde mit dem konfokalen Lasermikroskop Stellaris 5 von Leica als definiertes Zeitexperiment (Zeitintervall 3-5 min; 40 Wiederholungen; Aufnahmedauer ca. 4 Stunden; 20x Objektiv) aufgenommen. Die Analyse der PMN-Migration erfolgte mit dem ImageJ-Plugin *manual tracking tool*, indem 20 randomisierte Zellen über jeweils 10 Zeitintervalle pro Experiment getrackt wurden.

3.7.2. Transmigrationsassay

Der verwendete Transmigrationsassay wurde zur Simulation der transendothelial-transepitelialen Migration von PMNs entlang eines chemotaktischen Konzentrationsgradienten möglichst nahe an die physiologischen Bedingungen angeglichen und hierfür entsprechend der Abbildung 3.5 aufgebaut. An Tag 1 wurde die epitheliale Zellschicht auf der unteren Seite des Transwell-Inserts ausgesät. Hierfür wurde die Epithelzelllinie H441 (siehe Kapitel 2.2.1.) mit einer Konzentration von 5×10^4 Zellen in 100 μ l Medium pro Insert auf die Unterseite des Transwells gegeben und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ zur Adhäsion inkubiert. An Tag 2 wurde die endotheliale Zellschicht auf der oberen Seite des Transwell-Inserts ausgesät. Dazu wurde die Endothelzelllinie HMEC-1 (siehe Kapitel 2.2.2.) mit einer Konzentration von 4×10^4 Zellen in 100 μ l Medium pro Insert in die Innenseite des Transwells gegeben und ebenfalls über Nacht im Brutschrank zur Adhäsion inkubiert. Nach zwei Tagen erfolgte ein Mediumwechsel an Tag 5. Die gewünschte Konfluenz von 80 % beider Monolayer war an Tag 6 bis 7 erreicht.

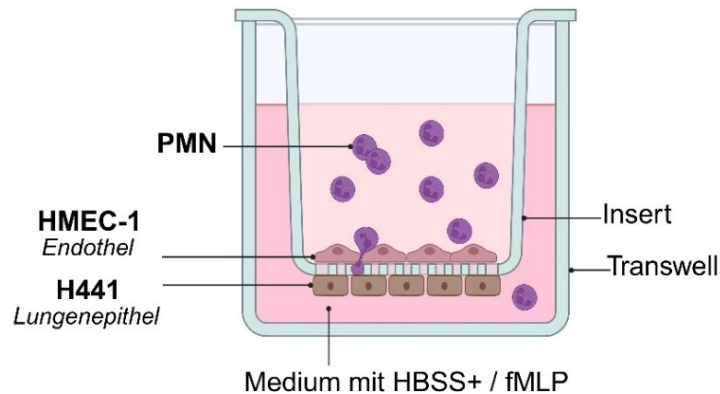


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus des Transmigrationsassays. Zur Analyse der transendothelial-transsepithelialen Migration von humanen polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) entlang eines Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)-Konzentrationsgradienten wurden die endothelialen HMEC-1 und die pulmonalen Epithelzellen H441 entsprechend der Abbildung am Insert kultiviert. Frisch isolierte humane PMNs wurden in das Insert gegeben und migrierten durch beide Monolayer entlang des Konzentrationsgradienten in das Transwell mit Medium (Zusätze: *hanks' balanced salt solution* (HBSS)⁺ für Kontrollgruppen oder fMLP für Versuchsgruppen). Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/7frz95n>).

Am Versuchstag (Tag 6/7) wurden die humanen PMNs mittels Percoll-Methode entsprechend dem Protokoll in Kapitel 2.2.4. isoliert. Die Zellzahl der PMNs wurde auf 1×10^6 Zellen pro Insert eingestellt und die PMNs auf Eis zwischengelagert. Im Anschluss erfolgte die Vorbehandlung der beiden Zellmonolayer mit den in Tabelle 2.5 genannten Inhibitoren und den jeweils angegebenen Konzentrationen. Hierfür wurden die Inserts aus der Platte genommen, vorsichtig ausgeleert, in warmem HBSS⁺ gewaschen und umgekehrt auf ein fusselfreies Tuch gestellt. Das Medium aus den Wells wurde abgesaugt und 1 ml HBSS⁺ bzw. 1 ml der in HBSS⁺ vorbereiteten Inhibitor-Lösungen in die jeweiligen Wells der Platte pipettiert. Die Inserts wurden anschließend zurück in die entsprechenden Wells gestellt und zusätzlich 100 μ l HBSS⁺ bzw. 100 μ l der jeweiligen Inhibitor-Lösung in das Insert zugegeben. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde im Inkubator. Zwischenzeitlich wurden je Well 900 μ l einer fMLP-Lösung mit einer Konzentration von 10 ng/ml hergestellt. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Inserts mit einer Pinzette aus der Platte genommen, vorsichtig ausgekippt, zwei Mal in warmem HBSS⁺ gewaschen und umgekehrt auf ein fusselfreies Tuch gestellt. Daraufhin wurden die Inserts in die Wells einer *ultra low attachment*-Platte gestellt, in welche bereits 900 μ l HBSS⁺ bzw. fMLP-Lösung pro Well vorgelegt wurden. Pro Insert wurden 100 μ l PMN-Suspension (1×10^6 Zellen pro Ansatz) zugegeben und für eine Stunde bei 37 °C und 40 rpm im Thermoschüttler inkubiert.

In die ehemaligen 24-Well-Platten wurden pro Well 4 % Formalin vorgelegt. Nach der vollendeten Inkubationszeit wurden die Inserts mit einer Pinzette entnommen, leicht am Rand abgeklopft, in die vorbereiteten Platten mit Formalin überführt und über Nacht

fixiert. Die Membranen der Inserts wurden am nächsten Tag vorsichtig entfernt, mit Hilfe eines Skalpell halbiert und in Histokassetten überführt. Die histologische Aufarbeitung erfolgte entsprechend der Angaben in Kapitel 3.5.4.

Die migrierten PMNs wurden aus dem Well entnommen, in FACS-Tubes überführt und bei 1300 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, je Tube 50 µl Antikörpermix (Tabelle 3.13) hinzu pipettiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss wurde zweimal durch die Zugabe von 1 ml Färbepuffer und Zentrifugation bei 1300 rpm und 4 °C für 10 min gewaschen. Die gefärbten PMNs wurden in Cellfix fixiert und mit einem FACS Canto™ II Durchflusszytometer der Firma BD Bioscience gemessen (siehe 1. Absatz in Kapitel 3.3.3.). Die Datenanalyse erfolgte unter Verwendung der FlowJo7-Software.

Tabelle 3.13: Antikörpermix Transmigrationsassay. Analyse der gelisteten Adhäsionsmoleküle auf migrierten PMNs (Zusammensetzung je FACS-Tube), wobei die Populationsmarker grau hinterlegt sind.

AK Mix Transmigrationsassay		
Antikörper	Fluorchrom	Menge
CD45	PerCP	1 µl
CD66b	PE/Cy7	1 µl
CD11b	Pacific Blue	1 µl
CD62L	APC	1 µl
CD44	PE	1 µl
CD321	FITC	1 µl
Färbepuffer		44 µl

3.7.3. Signalweganalyse mittels siRNA-Transfektion

Die siRNA-Transfektion ist eine Methode zur gezielten Abschaltung der Expression eines gewünschten Proteins durch Einbringen synthetischer siRNA in eukaryotische Zellen. Das Prinzip beruht auf dem natürlichen Mechanismus der siRNA-Interferenz, bei dem kleine, doppelsträngige RNA-Moleküle die Ziel-mRNA erkennen und deren Translation verhindern (Fire et al., 1998). Um zu analysieren über welche Signalwege die durch ADAM17-Inhibition detektierten Effekte vermittelt werden, wurden die Rezeptoren TNFR1 (TNF-Signalweg) und IL-6Rα (IL-6 Signalweg) durch siRNA-Transfektion abgeschaltet. Hierfür wurde die jeweilige siRNA mittels chemischer Transduktion (Lipofektion) in die HMVEC-L transportiert und anschließend in den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut (Pratt et al., 2009). Innerhalb des RISC wurde die siRNA in Einzelstränge getrennt. Der Leitstrang, der komplementär zur Ziel-mRNA ist, verblieb im RISC. Der andere Strang wurde abgebaut. Der aktivierte RISC-Komplex

bindete im Zellplasma an die Ziel-mRNA, wodurch diese gespalten und ihre Translation blockiert wurde (Pratt et al., 2009).

Für die Signalweganalyse wurden HMVEC-L entsprechend den Angaben in Kapitel 2.2.3. kultiviert. 24 Stunden vor der Transfektion wurden die Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 60 mm und einer Zelldichte von $1,6 \times 10^6$ Zellen in 4 ml Medium ausgesät, sodass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion 50 % konfluent waren. Vor Beginn der Transfektion wurde das Zellkulturmedium abgenommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Transfektion erfolgte mittels jetPRIME® entsprechend den Herstellerangaben. Hierzu wurden pro Ansatz 8,4 µl (20 nM; 84 pmol; 1168,4 ng) siNRA in 200 µl jetPRIME-Puffer angesetzt, durch Auf- und Abpipettieren gemischt, 10 s gevortext und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurden je Ansatz 8 µl jetPRIME-Reagenz hinzugefügt, ebenfalls 10 s gevortext und kurz abzentrifugiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde der Transfektionsmix tropfenweise zu den HMVEC-L gegeben und für 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Vier Stunden nach Beginn der Transfektion wurden pro Petrischale 600 µl FBS Superior zugegeben, um ein Kulturmedium mit 20 % FBS zu erhalten.

24 Stunden nach Beginn der Transfektion wurde die erfolgreiche Transfektion über das GFP-Signal der Kontroll-siRNA mittels Mikroskopie und Durchflusszytometrie überprüft. Bei den Versuchsansätzen wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS⁻ gespült. Im Anschluss wurden die Zellen je nach Behandlungsgruppe für eine Stunde mit 20 µM TAPI-1 bzw. 10 µM GW280264X oder Kulturmedium im Brutschrank kultiviert. Nach beendeter Inkubationszeit wurde das Medium erneut abgenommen und die Zellen mit PBS⁻ gewaschen. Es folgte die LPS-Stimulation mit einer Konzentration von 100 ng/ml für drei Stunden im Inkubator. Abschließend wurden die Überstände abgenommen, die Zellen in 1 ml TRIzol abgelöst und jeweils bei -80 °C bis zur Weiterverarbeitung eingefroren. Die RNA-Isolation, der cDNA-Umschrieb sowie die PCR erfolgten entsprechend den Angaben in Kapitel 3.4.1.

3.8. Statistik

Alle statistischen Analysen wurden unter Verwendung der Statistik- und Graphiksoftware GraphPad Prism Version 9.5. durchgeführt. Zu Beginn wurden alle Rohdaten mittels der kombinierten Methode *Robust Regression and Outlier Removal* (ROUT) auf statistische Ausreißer getestet, wobei der Koeffizient Q auf 1 % festgelegt wurde. Mit einem niedrigen Q = 1% wurde eine hohe Aggressivität der Ausreißer-Identifikation gewählt, um dank

der strengen Kriterien falsch-positive Ergebnisse zu reduzieren. Die geprüften Rohdaten wurden anschließend auf Normalverteilung getestet, wobei kleine Daten ($n < 6$) mittels Shapiro-Wilk Test und größere Datensätze ($n > 6$) mittels D'Agostino-Pearson Test analysiert wurden. Für beide Tests wurde das Signifikanzniveau α auf 0,05 gesetzt. Normalverteilte Daten wurden mittels unifaktorieller Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) und dem Bonferroni post hoc Test statistisch ausgewertet. Die statistische Auswertung nicht normalverteilter Daten erfolgte unter Verwendung des nichtparametrischen Kruskal-Wallis Tests. Für den Vergleich zwischen zwei unabhängigen Gruppen mit normalverteilten Daten wurde ein Student's t-test durchgeführt. Zwei Gruppen mit nicht normalverteilten Daten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Für alle statistischen Tests wurde das Signifikanzniveau α auf 0,05 gesetzt. Alle Daten sind, falls nicht anders angegeben, in der graphischen Darstellung als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (SD) präsentiert und statistisch signifikante Unterschiede entsprechend den Angaben in den Abbildungsunterschriften nachfolgender Klassifizierung dargestellt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

4. Ergebnisse

4.1. Expression von ADAM17 in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation

Bisherige Forschungsergebnisse zeigen auf, dass ADAM17 ein wichtiges Schlüsselenzym bei der Regulation von verschiedenen Entzündungsprozessen ist. Die ADAM17-spezifische Forschung steht allerdings vor mehreren zentralen Herausforderungen, die sowohl die Grundlagenforschung als auch die Entwicklung spezifischer Therapien erschweren. ADAM17 ist für das *Ectodomain-Shedding* von über 80 verschiedenen Substraten verantwortlich und somit an einer Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Das verdeutlicht die Tatsache, dass ein klassischer vollständiger Knockout von ADAM17 in Mäusen pränatal letal verläuft. Aufgrund dieser Herausforderungen ist der spezifische Einfluss von ADAM17 auf die akute pulmonale Inflammation bisher noch unzureichend erforscht. Daher untersuchte der erste Teil dieser Arbeit die spezifische Rolle von ADAM17 in der akuten pulmonalen Inflammation durch eine systemische Inhibition der Protease.

Die Untersuchungen wurden in einem murinen Modell der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation durchgeführt, welches in der Grundlagenforschung als standardisiertes Inflammodationsmodell mit transientser Entzündungsreaktion gilt. Eine Stunde vor LPS-Inhalation erfolgte die Applikation der spezifischen Inhibitoren: TAPI-1 zur Hemmung von ADAM17 und GW280264X zur kombinierten Hemmung von ADAM17/ADAM10. Zu Beginn wurde die Gen- und Proteinexpression von ADAM17 in murinem Lungengewebe bestimmt und untersucht, ob die Inhibitoren neben der Blockade der enzymatischen Aktivität der Proteasen, auch deren Expression regulieren. LPS erhöhte die Gen- und Proteinexpression von ADAM17 (Abbildung 4.1 A-B). Drei Stunden nach Induktion der akuten pulmonalen Inflammation blieb die Genexpression von ADAM17 durch die Applikation der Inhibitoren unverändert (Abbildung 4.1 A). Auf Proteinebene zeigte die Immunfluoreszenzfärbung, dass LPS 24 Stunden nach Inhalation die ADAM17-Expression im Lungengewebe erhöhte und beide Inhibitoren diesen Effekt unterdrückten (Abbildung 4.1 B-D). Zusammengefasst demonstrierte die Expressionsanalyse, dass die LPS-induzierte Lungenentzündung zu einer gesteigerten transkriptionellen und translationalen Expression von ADAM17 im Lungengewebe führt. Die systemische Inhibition unterdrückte diesen Expressionsanstieg.

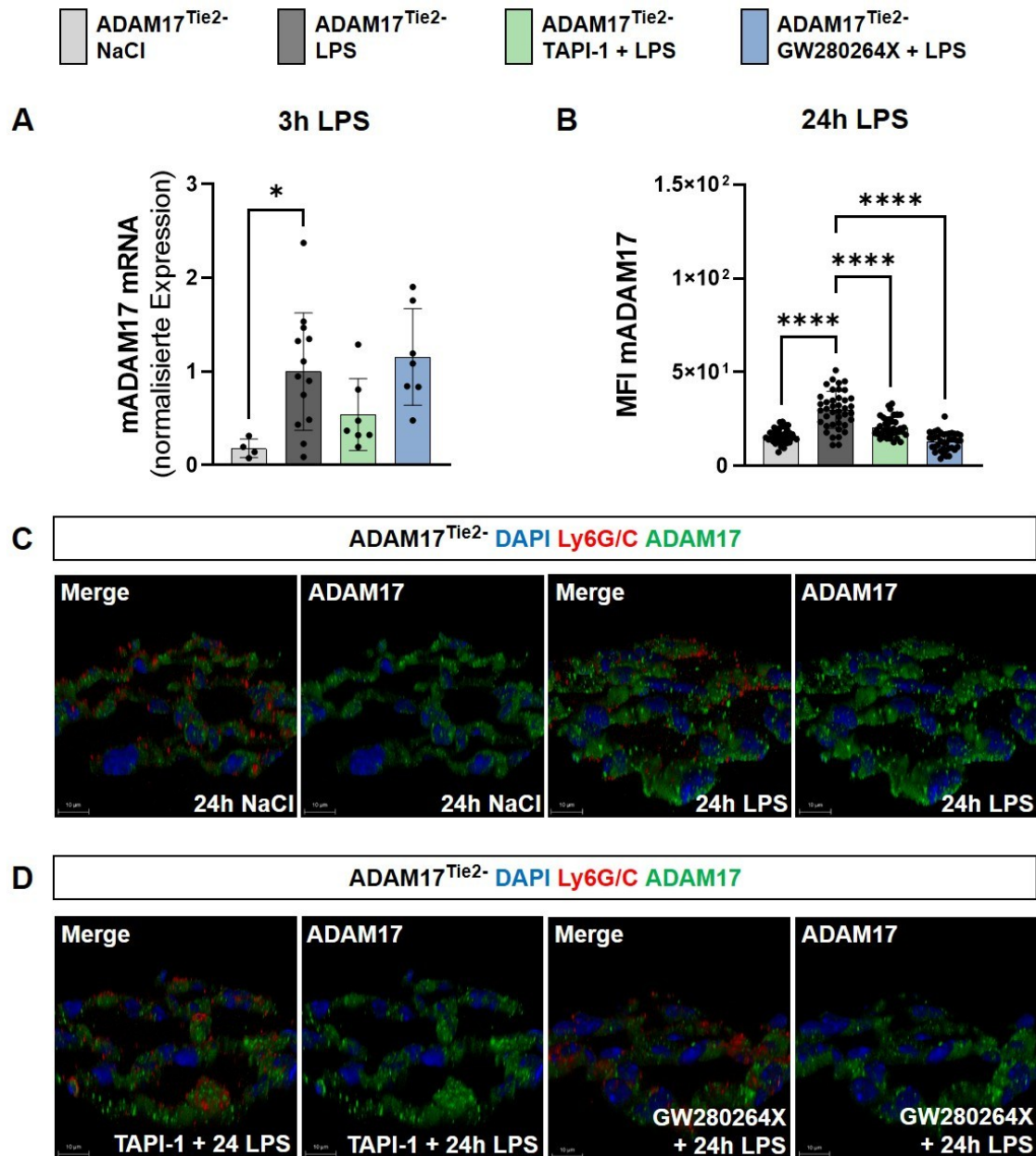


Abbildung 4.1: Expression von ADAM17 in murinem Lungengewebe in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation und Einfluss der systemischen Inhibition auf das Expressionslevel. (A) Genexpression von *A Disintegrin and Metalloproteinase 17* (ADAM17) in murinem Lungengewebe von ADAM17^{Tie2-} Tieren drei Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation mittels RT-qPCR (n=4/13/7/7). Die Expressionsdaten wurden durch Normalisierung auf die ADAM17^{Tie2-} LPS-Positivkontrolle quantifiziert, deren Mittelwert zur Vergleichbarkeit auf den Wert 1 gesetzt wurde. (B) Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von ADAM17 mittels Immunfluoreszenzanalyse (n=4 Mäuse pro Gruppe mit 10 Messungen je Aufnahme). Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tiere als Positivkontrolle mit der Natriumchlorid-(NaCl)-Negativkontrolle und den beiden Inhibitorgruppen. Repräsentative z-Stack Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen der (C) ADAM17^{Tie2-} Kontrollen und (D) ADAM17^{Tie2-} Tiere mit systemischer Inhibition zum Zeitpunkt 24 Stunden nach LPS-Inhalation (Originalvergrößerung: x63). Je Kondition sind eine *Merge*-Aufnahme und die ADAM17-Expression dargestellt. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau), die Neutrophile mit Ly6G/C (rot) und ADAM17 (grün) angefärbt. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. mRNA = *messenger ribonucleic acid*. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.1 C).

4.2. Einfluss von ADAM17 auf die inflammatorischen TNFR1/2- und IL-6R-Signalwege in vivo

ADAM17 vermittelt durch das *Shedding* zahlreicher Oberflächenproteine, einschließlich Zytokinen, Rezeptoren und Adhäsionsmolekülen, zentrale Signalereignisse in inflammatorischen Prozessen. Durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie TNF- α , TNFR1, TNFR2 und IL-6R trägt ADAM17 direkt zur Verstärkung und Regulation von Entzündungsreaktionen bei. Um den Einfluss von ADAM17 auf den TNFR1/2- und IL-6R-Signalweg in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation zu untersuchen, wurde eine Genexpressionsanalyse dieser Rezeptoren und zentraler Regulatoren der assoziierten Signaltransduktionswege durchgeführt. In Abbildung 4.2 A sind die Zusammenhänge schematisch vereinfacht dargestellt. Darüber hinaus wurde der Reifungs- und Transportprozess von ADAM17 und der von LPS aktivierte *Toll-like* Receptor 4 (TLR4)-Signalweg in die Analyse integriert.

Die LPS-Inhalation induzierte eine signifikante Induktion der Transkripte von TNFR1 und TNFR2 (Abbildung 4.2 B). Mit Ausnahme von *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2* (TRAF2) zeigten alle der untersuchten Gene im TNFR-Signalweg infolge von LPS eine tendenzielle Hochregulation der Genexpression. Die systemische Inhibition von ADAM17 mit TAPI-1 und die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 mit GW280264X bewirkten eine Reduktion der TNFR1 Genexpression. Die Expression von TNFR2 wurde durch TAPI-1 leicht reduziert, wohingegen die Applikation von GW280264X zu einer erhöhten Expression führte. Infolge der Inhibition wurden die analysierten Gene überwiegend reduziert exprimiert. Insbesondere *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD) und *cAMP response element-binding protein* (CREB) wurden durch die ADAM17-Inhibition verändert und als potentielle Interaktionsfaktoren identifiziert. Die kombinierte Inhibition von ADAM17/ADAM10 führte ausschließlich zu einer reduzierten Expression des *fas-associated protein with death domain* (FADD) Gens. Die anderen Gene wiesen kein verändertes Genexpressionslevel im Vergleich zur ADAM17^{Tie2}- Kontrolle mit LPS auf.

Wie erwartet führte die Inhalation mit LPS zu einer signifikanten Induktion des IL6R. Die globale Inhibition von ADAM17 durch TAPI-1 verhinderte diesen LPS-induzierten Expressionsanstieg. Zentrale nachgeschaltete Regulatoren des IL-6-Signaltransduktionsweges sind die Januskinase 1 (JAK1) und *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3). Analog zu den Befunden des IL6R verhinderte auch hier die ADAM17-

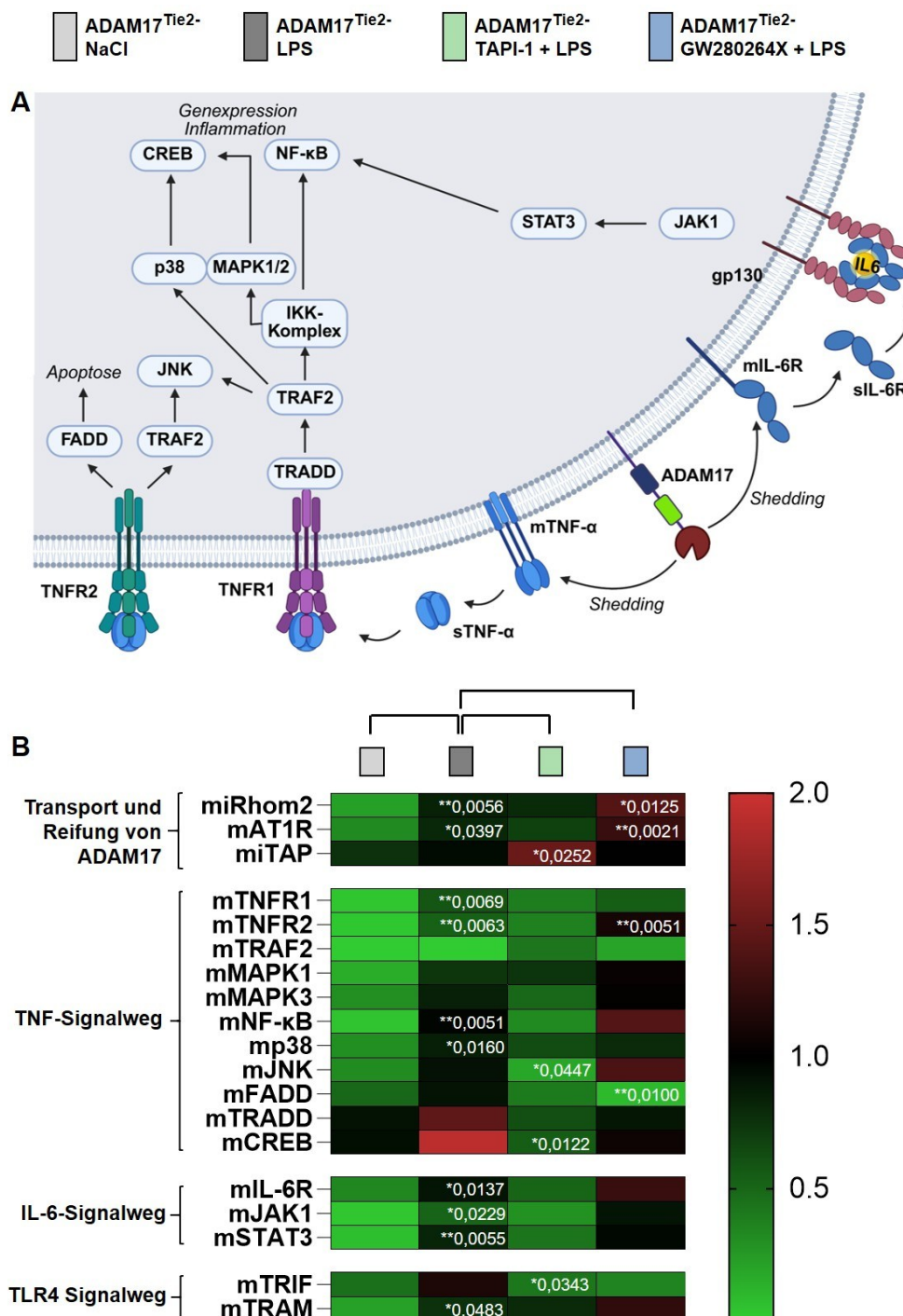


Abbildung 4.2: Genexpressionsanalyse im murinen Lungengewebe nach systemischer Inhibition von ADAM17. (A) Schematische Darstellung der Zusammenhänge des ADAM17-vermittelten Ectodomain-Sheddings der membranständigen Substrate Tumornekrosefaktor- α (mTNF- α) und Interleukin-6-Rezeptor (mIL-6R) sowie die darauffolgende Aktivierung der Tumornekrosefaktor-Rezeptor1/2-(TNFR1/2)-Signalwege und des Interleukin-6-(IL-6)-Trans-Signalweges. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/kb4rd2q>). (B) Genexpressionsanalyse in murinem Lungengewebe drei Stunden nach LPS-Inhalation mittels RT-qPCR der folgenden Gene (m=murin): inaktives Rhomboid-Protein 2 (iRhom2), Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor (AT1R), *iRhom2-interacting protein* (iTAP), TNFR1, TNFR2, *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2* (TRAF2), Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (MAPK1), Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3 (MAPK3), *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), p38-MAP-Kinasen (p38), c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), *fas-associated protein with death domain* (FADD), *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD), cAMP response

element-binding protein (CREB), Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R), Januskinase 1 (JAK1), *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM). Verglichen wurden jeweils die Lipopolysaccharid-(LPS)-stimulierten ADAM17^{Tie2}-Tiere als Positivkontrolle mit der Natriumchlorid-(NaCl)-Negativkontrolle und den beiden Inhibitorgruppen (n=4/10-14/6-7/7). Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.2 A).

Inhibition mittels TAPI-1 die transkriptionelle Regulation. Die Expression beider Gene war infolge von LPS signifikant erhöht und durch die systemische Inhibition von ADAM17 reduziert. Durch die Inhibition mit GW280264X blieb das Expressionslevel dieser Faktoren unverändert. Die LPS-Inhalation erhöhte auch die Genexpression des Adapterproteins iRhomb2 und des AT1R signifikant, die beide wichtige Regulatoren während der Reifung und Aktivierung von ADAM17 sind (siehe Abbildung 1.3). Die systemische Inhibition mittels TAPI-1 veränderte das Expressionslevel der zugehörigen Gene nicht, während die kombinierte Inhibition beider Proteasen es signifikant erhöhte. iTAP wies eine konstant hohe Expression auf. Im durch LPS aktivierten TLR4-Signaltransduktionssystem erhöhte die LPS-Inhalation das Expressionslevel der zentralen Adapterproteine des *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88)-unabhängigen Signalwegs, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF) und *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM). Die systemische Inhibition von ADAM17 verringerte die Genexpression von TRIF signifikant.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass eine gezielte Hemmung der ADAM17 Protease die Transkriptionslevel von TNFR1, TNFR2 und IL-6R reduziert und ADAM17 über diese Rezeptoren die Entzündungsreaktion im Lungengewebe modulieren könnte. Insbesondere die Gene NF- κ B, JNK, TRADD, CREB, JAK1 und STAT3 waren infolge der Inhibition von ADAM17 gehemmt. Von den beiden TNF-Rezeptoren war vor allem TNFR1 von der ADAM17-Inhibition betroffen.

Inwiefern die Inhibition von ADAM17 neben der Transkriptionsaktivität auch die Proteinexpression von TNFR1 und IL-6R und deren funktionelle Aktivität auf Endothelzellen im Lungengewebe beeinflusst, wurde mittels nachfolgender Proteinexpressionsanalyse untersucht. Abbildung 4.3 zeigt die statistische Auswertung der MFI von (A) TNFR1 und (B) IL-6R α mit den jeweils zugehörigen repräsentativen Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen (C-J). 24 Stunden nach LPS-Inhalation sind die Proteinlevel beider Rezeptoren auf Endothelzellen signifikant erhöht. Die Inhibition von ADAM17 mit TAPI-1 und die kombinierte Inhibition beider Proteasen mit GW280264X zeigten eine signifikante Reduktion der TNFR1- und IL-6R α Proteinexpressionen.

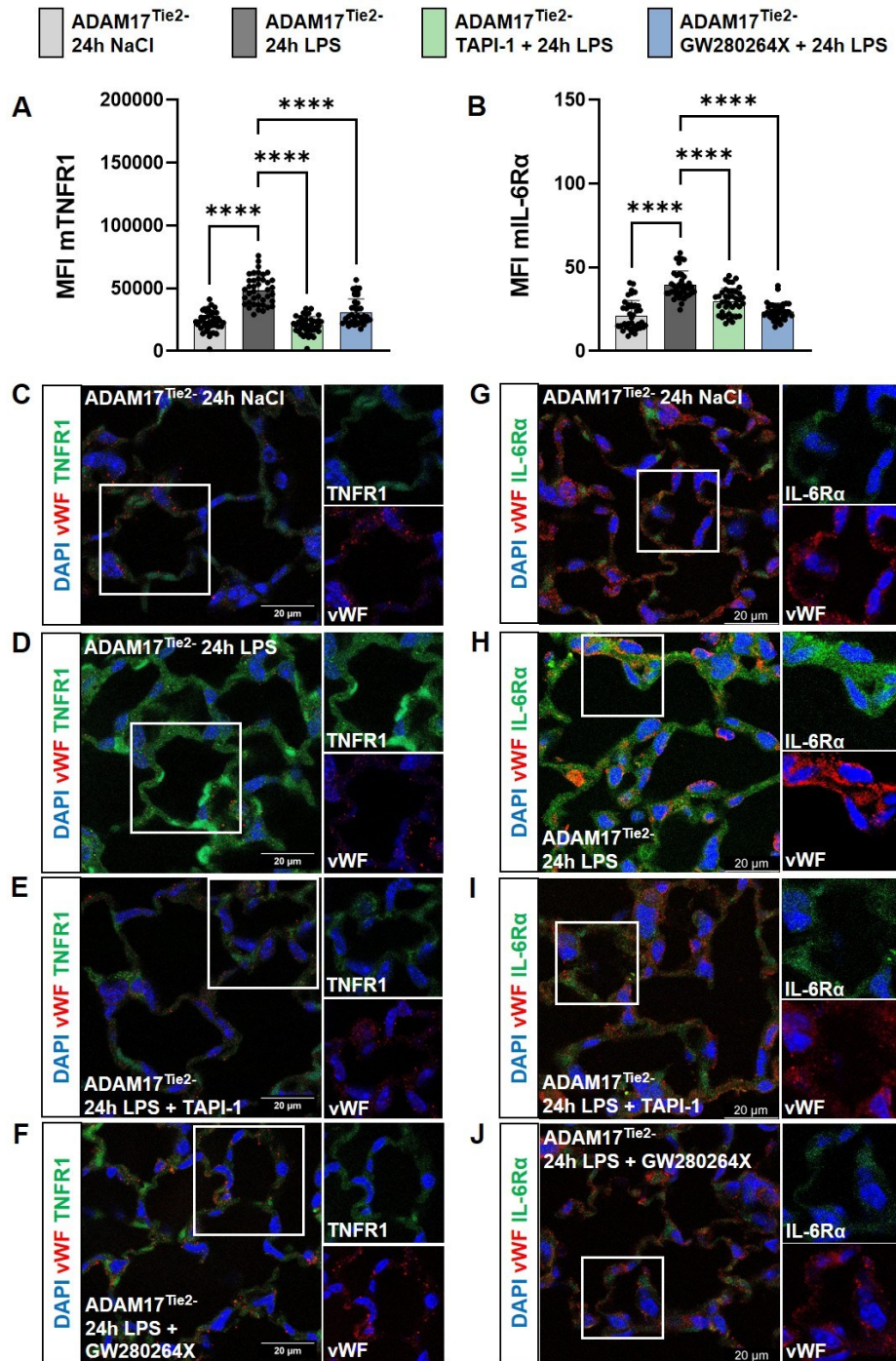


Abbildung 4.3: Proteinexpression von TNFR1 und IL-6Rα auf Endothelzellen im Lungengewebe, nachgewiesen durch Immunfluoreszenzfärbung mit endothelspezifischem Marker. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Proteinexpression von (A) Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) und (B) Interleukin-6-Rezeptor-alpha (IL-6Rα) in murinem Lungengewebe 24 Stunden nach LPS-Inhalation. Verglichen wurden jeweils die Lipopolysaccharid-(LPS)-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tiere als Positivkontrolle mit der Natriumchlorid-(NaCl)-Negativkontrolle und den beiden Inhibitorgruppen (n=4 Mäuse pro Gruppe mit 10 Messungen je Aufnahme). Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von (C-F) TNFR1 und (G-J) IL-6Rα zu den jeweiligen Konditionen (Originalvergrößerung: x63). Gefärbt wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau), die Endothelzellen mit von-Willebrand-Faktor (vWF) (rot) und TNFR1 bzw. IL-6Rα (grün). Die Daten werden als Mittelwert ± SD dargestellt. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.3 C-D und G-H).

4.3. ADAM17 moduliert in vitro im TNFR1-Signalweg über NF- κ B, CREB, JNK, TRADD, JAK1 und STAT3

Im murinen in-vivo-Inflamationsmodell deutete die systemische Inhibition von ADAM17 auf ein enges Zusammenspiel der Protease mit den TNFR1- und IL-6R-Signalwegen hin. Im Lungengewebe führte die systemische Inhibition von ADAM17 zu einer reduzierten Expression der proinflammatorischen Rezeptoren TNFR1 und IL-6R α . Die Inhibition der Protease hemmte im TNFR1-Signalweg NF- κ B, CREB, JNK, TRADD, JAK1 und STAT3 sowie im IL-6R-Signalweg JAK1 und STAT3. Es stellte sich die Frage, ob ADAM17 Inflamationsreaktionen über die TNFR1- und IL-6R-Signalwege reguliert und ob zwischen der Protease und diesen Rezeptoren eine bidirektionale Rückkopplungsschleife besteht. Hierzu wurde in vitro in HMVEC-L mittels siRNA-Transfektion die Translation der Rezeptoren TNFR1 und IL-6R α gehemmt, um die Proteinexpression zu verhindern. Nach erfolgreicher Transfektion erfolgte die Behandlung mit den ADAM17-Inhibitoren TAPI-1 oder GW280264X und anschließend die LPS-Stimulation. Anschließend wurde die Genexpression von ADAM17, den beiden Rezeptoren sowie der zugehörigen Signalmoleküle mittels RT-qPCR analysiert.

Zu Beginn wurde die Transfektion der HMVEC-L mit Fluorescein-konjugierter Kontroll-siRNA sowohl mikroskopisch (Abbildung 4.4 A) als auch durchflusszytometrisch (Abbildung 4.4 B–C) analysiert. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Genexpression von TNFR1 (Abbildung 4.4 D) und IL-6R α (Abbildung 4.4 E) vor und nach siRNA-Transfektion mittels RT-qPCR. Die LPS-Stimulation führte zu einer erhöhten Genexpression beider Rezeptoren im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS. Die Inhibition mit TAPI-1 und GW280264X senkte die Expressionslevel beider Rezeptoren und bestätigte damit die in-vivo-Ergebnisse. Die siRNA-Transfektion bewirkte eine noch deutlichere Reduktion der Genexpression als die ADAM17-Inhibition.

Mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde anschließend die Proteinexpression von TNFR1 (Abbildung 4.4 F–G) und IL-6R α (Abbildung 4.4 H–I) vor und nach siRNA-Transfektion, jeweils mit und ohne Inflammation, untersucht und die MFI bestimmt. Die siRNA-Transfektion führte dabei zu einer signifikanten Abnahme der Proteinexpression beider Rezeptoren, unabhängig vom Entzündungszustand. Damit konnte gezeigt werden, dass die Translation von TNFR1 und IL-6R α erfolgreich gehemmt und die Effizienz der Transfektion validiert wurde.

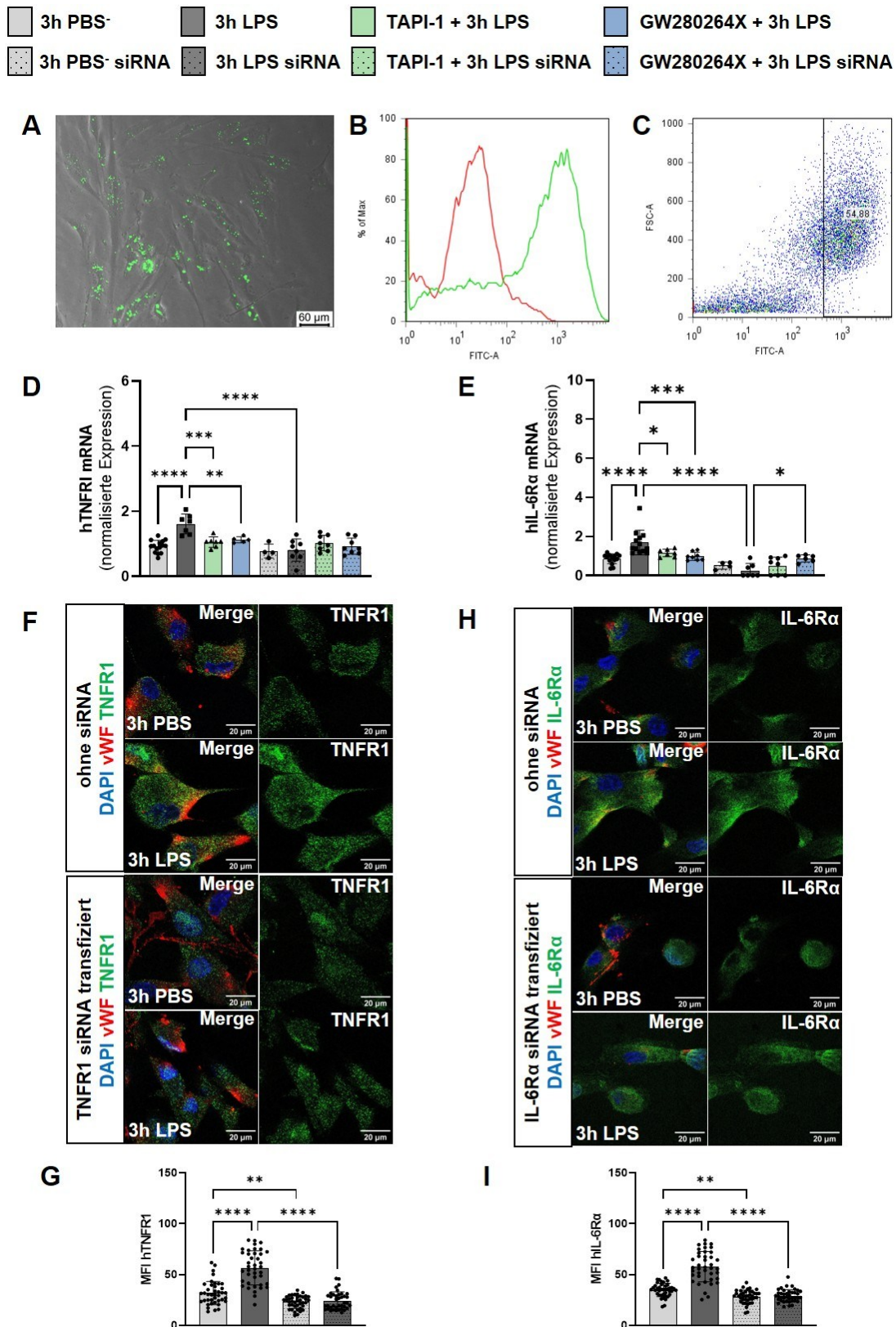


Abbildung 4.4: Validierung der siRNA-Transfektion von HMVEC-L mittels Kontroll-siRNA sowie Ermittlung der Gen- und Proteinexpression von TNFR1 und IL-6Rα mittels RT-qPCR und Immunfluoreszenzfärbung. (A) Overlay-Aufnahme von *human lung microvascular endothelial cells* (HMVEC-L) (Phasenkontrast), die mittels Fluorescein-konjugierter Kontroll-siRNA (*small interfering ribonucleic acid*) transfiziert wurden (grün) (Originalvergrößerung: 20x). (B) Durchflusszytometrische Analyse nicht-transfizierter

HMVEC-L (rote Linie) und mit Kontroll-siRNA transfizierter HMVEC-L (grüne Linie). (C) Dot-Plot Darstellung siRNA-transfizierter HMVEC-L mittels Durchflusszytometrie (*Gating* anhand der nicht-gezeigten *Unstained*-Kontrolle). Genexpression von (D) Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) und (E) Interleukin-6-Rezeptor-alpha (IL-6Rα) vor und nach siRNA-Transfektion sowie ohne und mit Inflammation bestimmt mittels RT-qPCR (n=14-15/7-15/7/5-8/4/7-8/8/6-8). Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von (F) TNFR1 und (H) IL-6Rα nicht- und siRNA-transfizierter HMVEC-L ohne und mit Inflammation (Originalvergrößerung: x63). Je Kondition sind eine *Merge*-Aufnahme und die Rezeptorexpression dargestellt. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau), die Endothelzellen mit von-Willebrand-Faktor (vWF) (rot) und der jeweilige Rezeptor (grün) angefärbt. Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von (G) TNFR1 und (I) IL-6Rα mittels Immunfluoreszenzanalyse (n=4 pro Kondition mit je 10 Messungen). Die Daten werden als Mittelwert ± SD dargestellt. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001.

Zur Überprüfung der Hypothese, dass zwischen der Protease ADAM17 und den beiden Rezeptoren eine bidirektionale Rückkopplungsschleife besteht, wurde die Genexpression von ADAM17 vor und nach siRNA-Transfektion in HMVEC-L bestimmt (Abbildung 4.5). Die LPS-Stimulation führte in nicht transfizierten HMVEC-L zu einer signifikanten transkriptionellen Hochregulation von ADAM17. Die Behandlung mit TAPI-1 und GW280264X bewirkte unter inflammatorischen Bedingungen eine signifikante Suppression der ADAM17-Genexpression und bestätigte damit auch in vitro die Wirksamkeit der beiden Inhibitoren. Die Transfektion mit TNFR1-siRNA (Abbildung 4.5 A) und IL-6Rα-siRNA (Abbildung 4.5 B) führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der ADAM17-Genexpression. Diese Befunde deuten auf eine bidirektionale Rückkopplungsschleife zwischen der Protease und den beiden Rezeptoren hin.

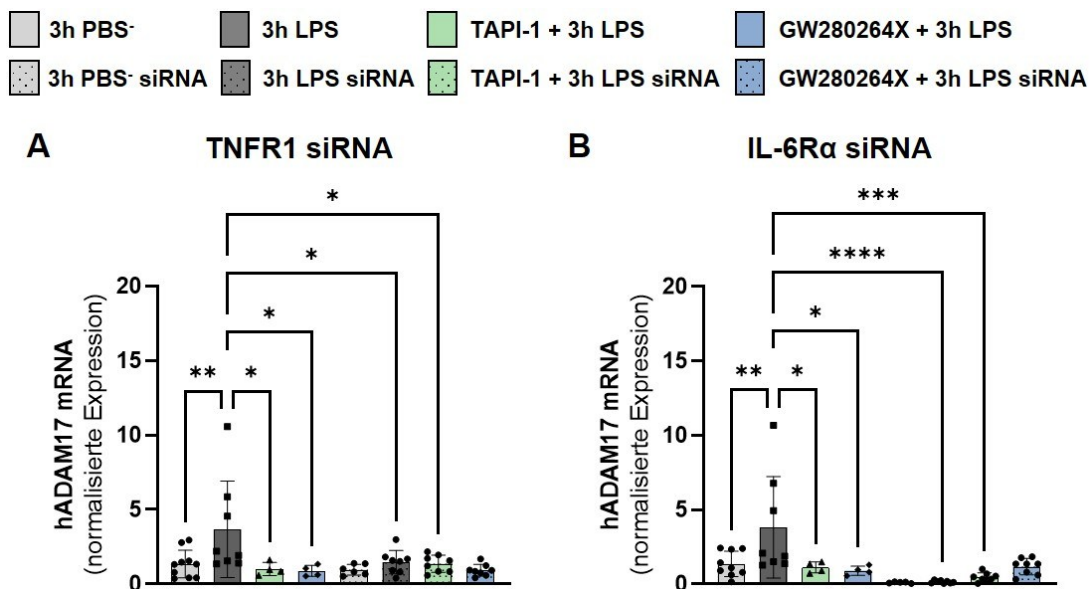


Abbildung 4.5: Genexpression von ADAM17 in HMVEC-L vor und nach siRNA-Transfektion. Genexpression von *A Disintegrin and Metalloproteinase 17* (ADAM17) vor und nach der Transfektion mit (A) Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1) *small interfering ribonucleic acid* (siRNA) und (B) Interleukin-6-Rezeptor-alpha (IL-6Rα) siRNA sowie ohne und mit Lipopolysaccharid-(LPS)-induzierter Inflammation bzw. ohne und mit ADAM17-Inhibition mittels RT-qPCR (n=9-10/8/4/4/5-6/8/8/8). Verglichen wurde die LPS-stimulierte Positivkontrolle nicht-transfizierter *human lung microvascular endothelial cells* (HMVEC-L) mit der Negativkontrolle und den Inhibitorgruppen. Zusätzlich wurde die LPS-stimulierte Positivkontrolle nicht-transfizierter HMVEC-L mit der zugehörigen Positivkontrolle transfizierter HMVEC-L und den transfizierten Inhibitorgruppen verglichen. Die Daten werden als Mittelwerte ± SD dargestellt. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001. mRNA = messenger ribonucleic acid.

Zur weiteren Verifizierung der Hypothese wurde untersucht, wie sich die durch die ADAM17-Inhibition beeinflussten Gene beider Signalwege nach siRNA-vermittelter Hemmung von TNFR1 und IL-6R α verhalten. Der Zusammenhang der im TNFR1-Signalweg untersuchten Gene ist in Abbildung 4.6 A dargestellt. In nicht transfizierten HMVEC-L führte die LPS-Stimulation zu einer signifikanten Hochregulation der analysierten Gene (Abbildung 4.6 B–G). Die durch TAPI-1 vermittelte Inhibition von ADAM17 unterdrückte die Genexpression von TRADD, JNK, CREB, NF- κ B, JAK1 und STAT3 signifikant und bestätigte damit die Befunde des in-vivo-Inflamationsmodells. Die kombinierte Inhibition von ADAM17/ADAM10 durch GW280264X verringerte im Vergleich zur Positivkontrolle die Expression von TRADD, NF- κ B und JAK1. Die siRNA-vermittelte Hemmung von TNFR1 verhinderte die durch ADAM17-Inhibition induzierte Reduktion dieser Gene. Diese Befunde zeigen, dass ADAM17 über TNFR1 wirkt und die Expression von TRADD, JNK, CREB, NF- κ B, JAK1 und STAT3 im entsprechenden Signalweg reguliert.

Die im IL-6R-Signalweg untersuchten Gene sind in Abbildung 4.7 A schematisch dargestellt. In nicht transfizierten HMVEC-L führte die LPS-Stimulation zu einer signifikanten Hochregulation der entsprechenden Gene (Abbildung 4.7 B–F). TAPI-1 schwächte diese Induktion ab und reduzierte die Expression von JAK1, STAT3, NF- κ B, CREB und JNK. Nach siRNA-vermittelter Hemmung von IL-6R α blieb die durch ADAM17-Inhibition verursachte Reduktion dieser Gene bestehen. Dies deutet darauf hin, dass ADAM17 nicht primär über den IL-6R reguliert wird.

Zusammenfassend legen die Ergebnisse nahe, dass zwischen ADAM17 und TNFR1 bzw. IL-6R α eine bidirektionale Rückkopplungsschleife besteht. In vivo führte die systemische Inhibition von ADAM17 zu einer Reduktion der Expression von TNFR1 und IL-6R α . In vitro bewirkte die siRNA-vermittelte Hemmung der Rezeptoren ebenfalls eine Abnahme der ADAM17-Genexpression. ADAM17 wirkte dabei primär über TNFR1 und modulierte in diesem Signalweg die Expression von TRADD, JNK, CREB, NF- κ B, JAK1 und STAT3. Nach Hemmung von IL-6R α blieben die durch ADAM17-Inhibition verursachten Reduktionen der untersuchten Gene bestehen, was darauf hinweist, dass die Protease nicht ausschließlich oder primär über diesen Rezeptor reguliert wird. Möglicherweise wurde das Fehlen von IL-6R α in diesem Fall durch TNFR1 kompensiert, wodurch ADAM17 weiterhin die reduzierte Genexpression der genannten Faktoren induzieren konnte.

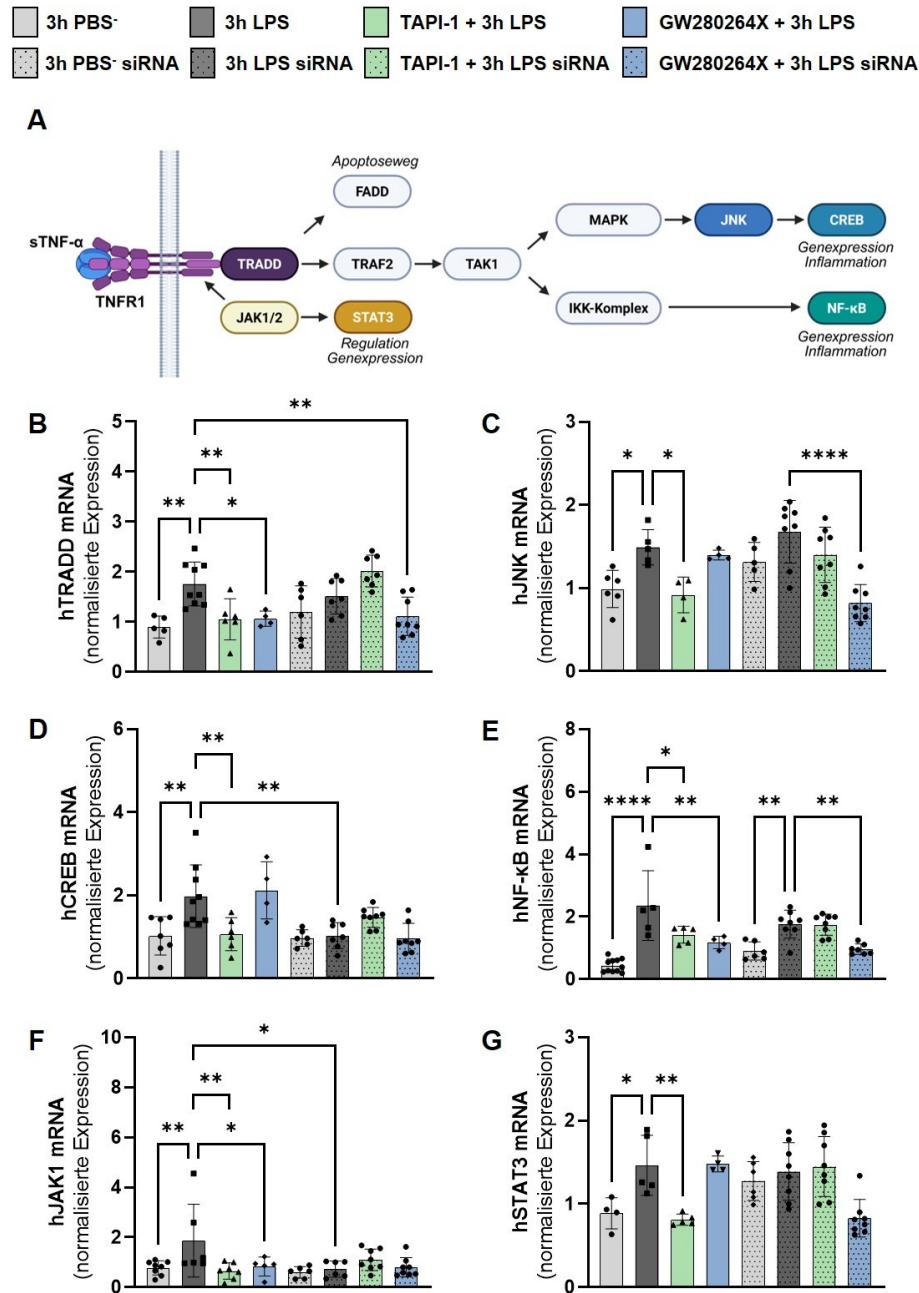


Abbildung 4.6: Einfluss von ADAM17 auf den TNFR1-Signalweg untersucht mittels in-vitro-siRNA-Transfektion in HMVEC-L. (A) Schematische Darstellung der im Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1-(TNFR1)-Signalweg untersuchten Gene. Löslicher Tumornekrosefaktor-α (sTNF-α) bindet an den TNFR1 und induziert die Aktivierung nachgeschalteter Gene. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/e8woq1x>). Die Genexpression der farblich gekennzeichneten humanen (h) Gene wurde mittels RT-qPCR bestimmt (n=4-11/5-9/4-7/4-5/5-6/7-8/7-8/7-8): (B) *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD), (C) *c-Jun-N-terminale Kinase* (JNK), (D) *cAMP response element-binding protein* (CREB), (E) *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB), (F) Januskinase 1 (JAK1) und (G) *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3). Verglichen wurde die Lipopolysaccharid-(LPS)-stimulierte Positivkontrolle nicht-transfizierter *human lung microvascular endothelial cells* (HMVEC-L) mit der Negativkontrolle und den Inhibitorgruppen. Zusätzlich wurde die LPS-stimulierte Positivkontrolle nicht-transfizierter HMVEC-L mit der zugehörigen Positivkontrolle *small interfering ribonucleic acid*-(siRNA)-transfizierter HMVEC-L und den transfizierten Inhibitorgruppen verglichen. Die Daten werden als Mittelwerte ± SD dargestellt. *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001. PBS = *phosphate-buffered saline* (phosphatgepufferte Kochsalzlösung); FADD = *fas-associated death domain*; TRAF2 = TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 2; TAK1 = *transforming growth factor-beta-activated kinase 1*; MAPK = Mitogen-aktivierte Proteinkinase; IKK-Komplex = IκB-Kinase-Komplex.

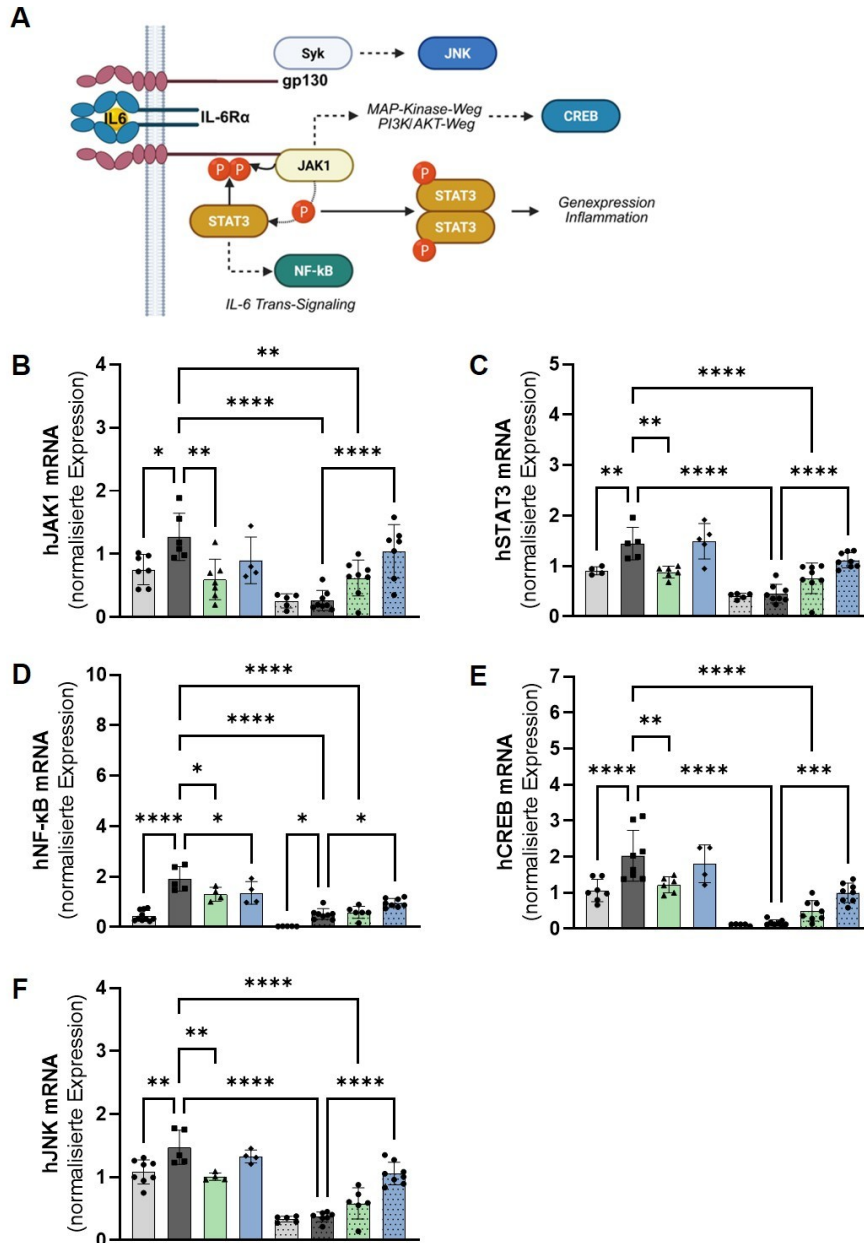
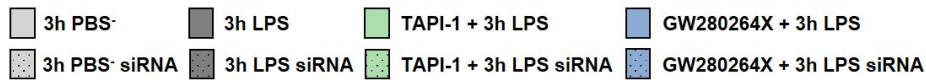


Abbildung 4.7: Einfluss von ADAM17 auf den IL-6R-Signalweg untersucht mittels in-vitro-siRNA-Transfektion in HMVEC-L. (A) Schematische Darstellung der im Interleukin-6-Rezeptor-(IL-6R)-Signalweg untersuchten Gene. Interleukin-6 (IL-6) bindet an den IL-6R und induziert die Aktivierung nachgeschalteter Gene. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/2bn5uwa>). Die Genexpression der farblich gekennzeichneten humanen (h) Gene wurde mittels RT-qPCR bestimmt (n=4-10/5-8/4-7/4-5/5/7-8/6-8/7-8): (B) Januskinase 1 (JAK1), (C) *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), (D) *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF-κB), (E) *cAMP response element-binding protein* (CREB) und (F) *c-Jun-N-terminale Kinase* (JNK). Verglichen wurde die Lipopolysaccharid-(LPS)-stimulierte Positivkontrolle nicht-transfizierter *human lung microvascular endothelial cells* (HMVEC-L) mit der Negativkontrolle und den Inhibitorgruppen. Zusätzlich wurde die LPS-stimulierte Positivkontrolle nicht-transfizierter HMVEC-L mit der zugehörigen Positivkontrolle *small interfering ribonucleic acid* (siRNA)-transfizierter HMVEC-L und den transfizierten Inhibitorgruppen verglichen. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. PBS = *phosphate-buffered saline* (phosphatgepufferte Kochsalzlösung); Syk = *spleen tyrosine kinase*; gp130 = Glykoprotein 130; P = Phosphat; MAP = *mitogen-activated protein*; PI3K = Phosphoinositid-3-Kinase; AKT = Proteinkinase B.

4.4. In-vitro-PMN-Migration nach ADAM17-Inhibition

Die bisherigen Untersuchungen zeigen, dass die Protease ADAM17 in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation vermehrt exprimiert wird und dabei primär über TNFR1 reguliert ist. Dies legt nahe, dass ADAM17 in diesem Kontext als zentrales Schlüsselenzym der Entzündungsreaktion fungiert. Charakteristisch für die akute pulmonale Inflammation sind die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität sowie die exzessive Migration von PMNs in das entzündete Lungengewebe. Ein wesentlicher pathophysiologischer Mechanismus besteht dabei in der Interaktion der PMNs mit dem Endothel. Im Folgenden wird daher untersucht, wie ADAM17 diese Interaktion in Bezug auf die PMN-Migration, die Aktivierung der PMNs und die mikrovaskuläre Permeabilität des Endothels funktionell beeinflusst.

Zu Beginn wurde in einem in-vitro-Chemotaxis-Assay der Einfluss von ADAM17 auf die Migration humaner Neutrophiler entlang eines fMLP-Gradienten untersucht. Es handelte sich hierbei um ein eindimensionales Testsystem ohne äußere Einflüsse. Der Aufbau des Chemotaxis-Assays ist in Abbildung 4.8 A dargestellt. Mittels *live cell imaging* wurde die Migration aus Vollblut isolierter humaner Neutrophiler entlang eines chemotaktischen fMLP-Gradienten aufgezeichnet (Abbildung 4.8 B) und anschließend sowohl graphisch (Abbildung 4.8 C–F) als auch statistisch (Abbildung 4.8 G–I) ausgewertet.

Als Negativkontrolle diente das Migrationsverhalten von PMNs in einer Migrationskammer ohne fMLP-Gradienten. Hierbei zeigten die Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle eine ungerichtete und deutlich geringere Migration. Im fMLP-Gradienten hingegen migrierten die PMNs gerichtet zur höchsten Konzentration und wiesen signifikant größere akkumulierte sowie euklidische Distanzen und eine höhere durchschnittliche Migrationsgeschwindigkeit auf. Die Vorbehandlung der PMNs mit TAPI-1 und GW280264X verringerte sowohl die akkumulierte und euklidische Migrationsdistanz als auch die mittlere Geschwindigkeit.

Diese Befunde zeigen, dass die in-vitro-Inhibition von ADAM17 sowie die kombinierte Inhibition von ADAM17/ADAM10 das Migrationsverhalten von PMNs im fMLP-Gradienten signifikant reduziert.

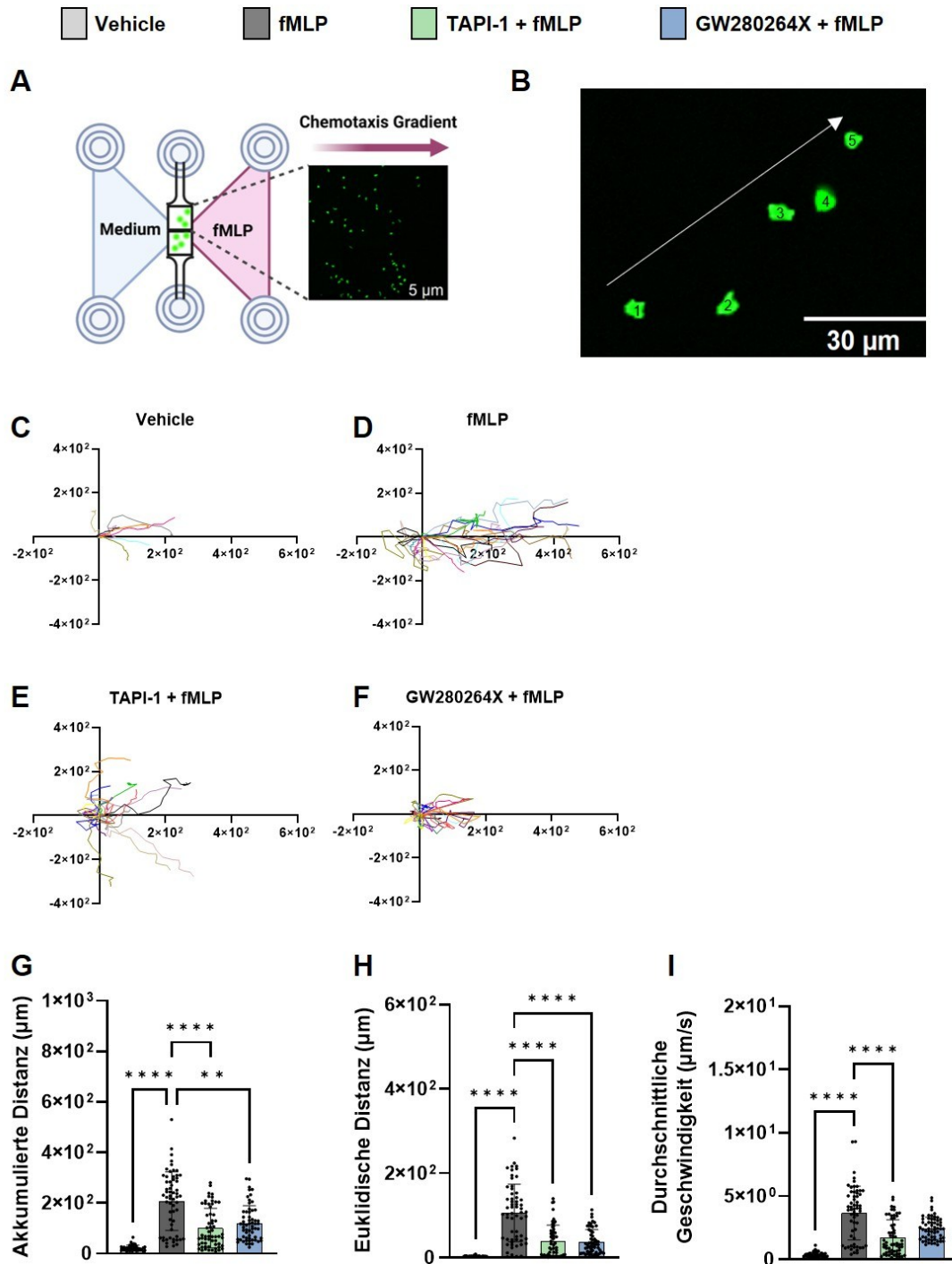


Abbildung 4.8: In-vitro-Migration humaner PMNs mit ADAM17-Inhibition entlang eines fMLP-Gradienten. (A) Schematische Darstellung eines μ -Slide Chemotaxis-Assays. Eigene Darstellung, erstellt mit BioRender.com (<https://BioRender.com/zmmecor>) und bereits gezeigt auf S. 66. Abbildung in ähnlicher Form in folgender Originalpublikation erstveröffentlicht: (Biedritzky et al., 2025). (B) *Overlay*-Bilder des Migrationsweges eines repräsentativen polymorphkernigen Neutrophilen (PMN) über fünf Bilder (Originalvergrößerung: x20) (Quelle: mit freundlicher Genehmigung von Carolin Kleinmaier (eigene Darstellung, 2024) und in folgender Originalpublikation erstveröffentlicht: (Biedritzky et al., 2025)). Repräsentative graphische Darstellung der Migration humaner PMNs zu folgenden Versuchsbedingungen: (C) Negativkontrolle ohne Gradienten (*Vehicle*), (D) Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP), (E) TAPI-1 + fMLP, (F) GW280264X + fMLP. Quantifizierung der Migrationsparameter (G) akkumulierte Distanz in μ m, (H) euklidische Distanz in μ m und (I) durchschnittliche Geschwindigkeit in μ m/s ($n=60$ PMNs pro Kondition aus drei unabhängigen Experimenten). Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$. Die Datenerhebung erfolgte in Zusammenarbeit mit Carolin Kleinmaier.

Zur Untersuchung, inwiefern die in-vitro-Inhibition von ADAM17 die Transmigration humaner PMNs durch Endothel- und Epithelzellen beeinflusst, wurde ein dreidimensionaler Transwell-Migrationsassay durchgeführt (Abbildung 4.9 A). Hierzu wurden Endothel- und Epithelzellen adhärent auf einem Transwell-Einsatz kultiviert, und die Transmigration humaner PMNs entlang eines fMLP-Gradienten durch den Zelllayer analysiert. Vor Beginn des Experiments wurde der Zelllayer mit TAPI-1 und GW280264X behandelt.

Der inflammatorische Stimulus fMLP führte zu einer signifikanten Zunahme der transmigrierten PMNs, während die Behandlung des Zelllayers mit den spezifischen Inhibitoren diese Transmigration signifikant reduzierte (Abbildung 4.9 B). Die Bestimmung der MPO-Freisetzung im Überstand zeigte, dass fMLP die PMNs stark aktivierte und die Inhibition der Proteasen auf dem Zelllayer die Aktivierung signifikant verringerte (Abbildung 4.9 C).

Aktivierte PMNs exprimieren auf ihrer Oberfläche spezifische Adhäsionsmoleküle, die für die Interaktion mit Endothelzellen und die anschließende Transmigration essenziell sind. Die Proteinexpression von CD62L (Abbildung 4.9 D), CD44 (Abbildung 4.9 E), CD11b (Abbildung 4.9 F) und JAM-A (Abbildung 4.9 G) wurde auf den transmigrierten PMNs durchflusszytometrisch bestimmt. CD62L und CD44 fördern die Adhäsion und das „Rollen“ der PMNs entlang des Endothels, indem sie als zentrale Adhäsionsmoleküle die initiale Bindung vermitteln. Beide Moleküle zeigten auf den transmigrierten PMNs eine konstant hohe Proteinexpression, die durch GW280264X signifikant reduziert wurde.

Die Expression von CD11b ist für die feste Adhäsion an das Endothel und eine effektive transendotheliale Migration unerlässlich. CD11b wurde auf transmigrierten PMNs durch fMLP tendenziell hochreguliert, durch Interaktion mit TAPI-1- oder GW280264X-behandelten Zell Layern jedoch signifikant herunterreguliert. Leukozytäres JAM-A ist an der Transmigration durch die Endothelbarriere beteiligt und wurde auf den transmigrierten PMNs durch fMLP ebenfalls hochreguliert. Die Inhibition von ADAM17 mit TAPI-1 führte zu einer signifikant reduzierten Oberflächenexpression von JAM-A auf den PMNs, während die Interaktion der transmigrierten PMNs mit GW280264X-behandelten Zellen hingegen eine weitere Hochregulation von JAM-A induzierte.

Zur Visualisierung der endothelial- und epithelial-adhärennten Zelllayer auf den Transwells wurden nach Abschluss des Migrationsversuchs die Transwell-Membranen abpräpariert und histologisch aufgearbeitet. Abbildungen 4.9 H–K zeigen repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung der an der Insert-Membran (transparent mit Poren) adhärennten endothelialen Zellschicht (oben; kleine, flache HMEC-1-Zellen)

und epithelialen Zellschicht (unten; große, rundliche H441-Zellen) sowie der braun gefärbten humanen PMNs unter den jeweiligen Versuchsbedingungen.

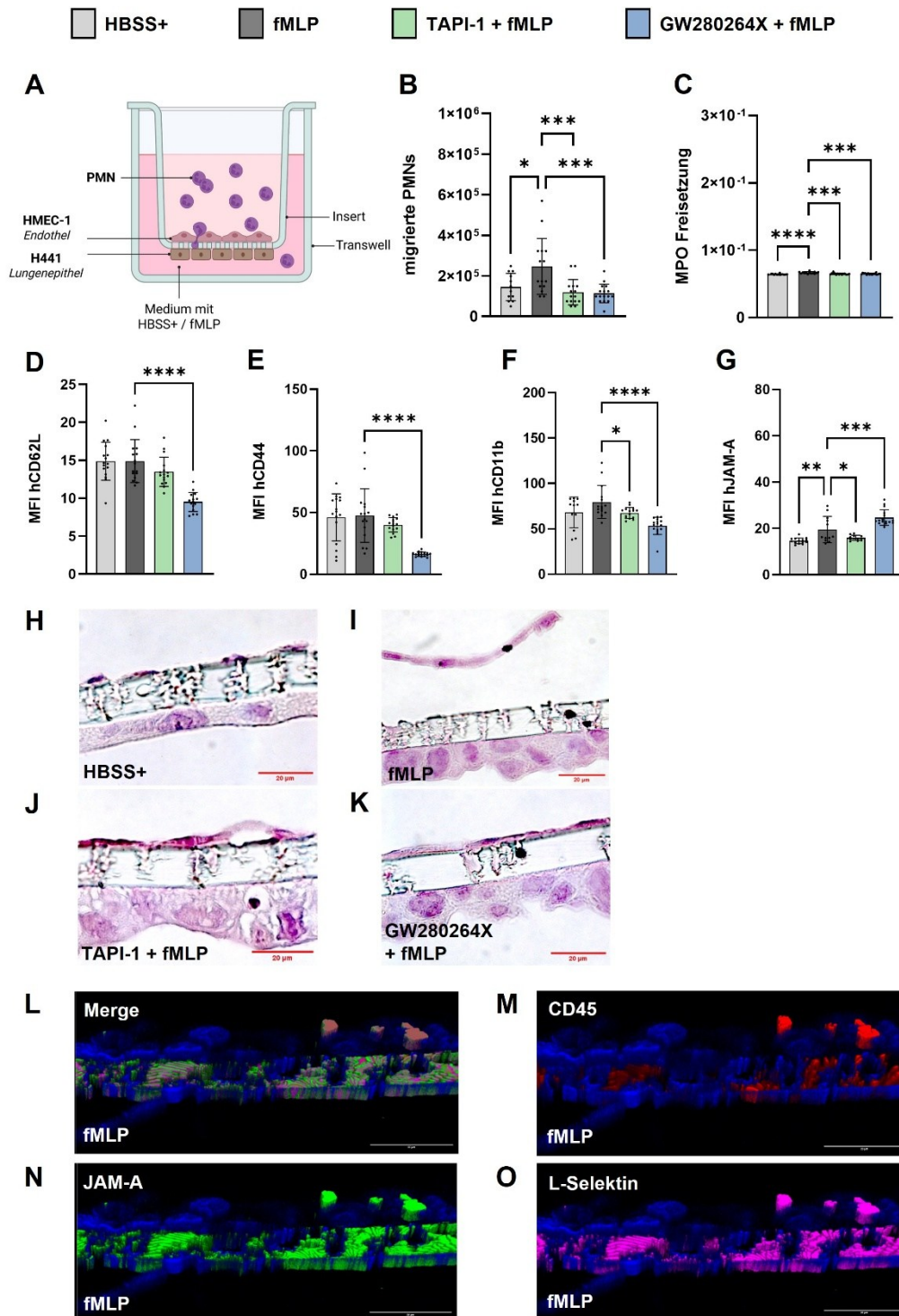


Abbildung 4.9: In-vitro-Transmigration von humanen PMNs durch eine Endothel- und Epithelzellschicht mit ADAM17-Inhibition. (A) Schematische Darstellung des in-vitro-Transmigrations-Assays. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/7frz95n>) und bereits gezeigt auf S. 68. (B) Statistische Auswertung der Anzahl transmigrierter polymorphkerniger Neutrophile (PMNs) zu den genannten Konditionen. (C) Semiquantitative Analyse der Freisetzung von Myeloperoxidase (MPO) durch PMNs in den jeweiligen Überständen. Durchflusszytometrische Analyse der mittleren Fluoreszenzintensität

(MFI) von humanem (h) (D) CD62L, (E) CD44, (F) CD11b und (G) *junctional adhesion molecule A* (JAM-A) auf den transmigrierten PMNs. Verglichen wurde die Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin (fMLP)-stimulierte Positivkontrolle mit der Negativkontrolle und den Inhibitorgruppen. (H-K) Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen Färbung der am Insert adhärennten endothelialen (oben) und epithelialen (unten) Zellschichten sowie der braun gefärbten PMNs (Originalvergrößerung: x20). (L-O) Repräsentative z-Stack Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung einer fMLP-Kontrolle, wobei die PMNs über CD45 (rot) identifiziert wurden und die Adhäsionsmoleküle JAM-A (grün) und L-Selektin (rosa) dargestellt sind. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt. (n=12-16/14-16/14-16/15-16). *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. HBSS = *hank's balanced salt solution*; HMEC-1 = humane Endothelzelllinie; H441 = humane Lungenepithelzelllinie; CD = cluster of differentiation.

Des Weiteren zeigt Abbildung 4.9 L–O eine repräsentative z-Stack-Aufnahme der Immunfluoreszenzfärbung eines Ausschnitts der fMLP-Versuchsgruppe. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt und zeigen die großen, rundlichen Zellkerne der Epithelzellen oberhalb sowie die kleinen, schmalen Zellkerne der Endothelzellen unterhalb der Insert-Membran. Neutrophile Granulozyten wurden über CD45 (rot) markiert und identifiziert, während die Expression der Adhäsionsmoleküle JAM-A (grün) und L-Selektin (rosa) dargestellt wurde. Die Insert-Membran wies eine deutliche Eigenfluoreszenz auf. In der z-Stack-Aufnahme sind drei PMNs erkennbar, die bereits transmigriert sind und sich auf der epithelialen Seite befinden.

Zusammenfassend führte die Inhibition von ADAM17 sowie die kombinierte Inhibition von ADAM17/ADAM10 in der Endothel- und Epithelzellschicht zu einer verminderten Transmigration humaner PMNs durch den Zelllayer. Die Interaktion der PMNs mit dem behandelten Zelllayer reduzierte die Aktivierung der Immunzellen, was sich in einer verringerten MPO-Freisetzung sowie in der veränderten Expression essenzieller Adhäsionsmoleküle für die Transmigration zeigte. GW280264X senkte die Oberflächenexpression von CD62L, CD44 und CD11b auf den PMNs, während TAPI-1 die Expression von CD11b und JAM-A verringerte.

4.5. In-vivo-Migration von PMNs mit systemischer Inhibition von ADAM17

Die durchgeführten in-vitro-Analysen belegen einen direkten Einfluss von ADAM17 auf die Migration humaner PMNs. Anschließend wurde die PMN-Migration in entzündetes Lungengewebe anhand des beschriebenen murinen in-vivo-Modells der akuten pulmonalen Inflammation nach systemischer ADAM17-Inhibition untersucht (Abbildung 4.10). Die in-vivo-Migrationsanalyse ermöglichte eine differenzierte, durchflusszytometrische Quantifizierung der PMNs in den verschiedenen Lungenkompartimenten: (A) intravasal im Blut, (B) adhärennt am Endothel, (C) im Interstitium und (D) im Alveolarraum. Die entsprechenden Zellzahlen sind in Abbildung 4.10 A–D dargestellt.

24 Stunden nach LPS-Inhalation zeigte sich eine signifikant erhöhte Migration von PMNs aus dem zirkulierenden Blut über das Endothel und das Interstitium bis in die Alveolen. Die systemische Inhibition von ADAM17 beeinflusste die Rekrutierung von PMNs in die entzündeten Lungenstrukturen deutlich, wobei insbesondere die Zellzahl im Interstitium durch TAPI-1 signifikant reduziert wurde. Die Behandlung mit GW280264X führte zu einer signifikant verminderten Migration der PMNs sowohl in das Interstitium als auch in die Alveolen. Die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 verstärkte diesen Effekt, was auf eine additive Wirkung der beiden Proteasen hinweist. Gleichzeitig zeigte die systemische Inhibition beider Proteasen eine signifikant erhöhte Akkumulation von PMNs am Endothel, was darauf schließen lässt, dass die Transmigration durch das Endothel gehemmt wird und die Immunzellen an der Gefäßwand verbleiben.

Die in Abbildung 4.10 dargestellten repräsentativen immunhistochemischen Aufnahmen bestätigen die durchflusszytometrischen Befunde. Zur besseren Sichtbarkeit wurden die braun gefärbten PMNs mit roten Pfeilen markiert. Im Vergleich zur NaCl-Negativkontrolle (E) zeigte sich 24 Stunden nach LPS-Inhalation eine ausgeprägte Akkumulation von PMNs im entzündeten Lungengewebe (F). Die Behandlung mit TAPI-1 (G) und GW280264X (H) reduzierte die Migration der PMNs in die Lunge signifikant. Die PMN-Zellzahlen pro Sichtfeld wurden für alle Versuchsbedingungen ermittelt und statistisch ausgewertet (I). Die Ergebnisse bestätigten die durchflusszytometrischen Daten und zeigten eine signifikante Zunahme der PMNs im Lungengewebe von ADAM17^{Tie2}- Tieren nach LPS-Inhalation, die durch die systemische Inhibition wieder vermindert wurde.

Die Auswirkungen der systemischen ADAM17-Inhibition auf die Aktivierung transmigrierter PMNs wurden zusätzlich durch die Messung der Freisetzung von MPO (J) und neutrophiler Elastase (ELA2) (K) im Alveolarraum analysiert. Beide Enzyme werden im Rahmen der Immunabwehr von aktivierten PMNs während des oxidativen Bursts und der NETose zur Bekämpfung von Pathogenen freigesetzt. LPS induzierte eine signifikant erhöhte Freisetzung von MPO und ELA2 in den Alveolarraum. Die systemische Inhibition von ADAM17 beeinflusste die Freisetzung dieser Aktivierungsmarker nicht, während die kombinierte Hemmung beider Proteasen die Freisetzung von ELA2 signifikant verringerte.

Zusammenfassend führte die systemische Inhibition von ADAM17 zu einer verminderten Migration von PMNs in das entzündete Lungengewebe, wobei insbesondere die Migration in das Interstitium signifikant reduziert war. Die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 verstärkte diesen Effekt, was sich in einer erhöhten Akkumulation

von PMNs am Endothel und einer signifikant verminderten Migration in das Interstitium und den Alveolarraum widerspiegelte. Die verringerte PMN-Migration infolge der systemischen Proteaseinhibition lässt sich nicht durch eine reduzierte Aktivierung der Immunzellen erklären, da die Freisetzung von MPO und ELA2 weitgehend unbeeinflusst blieb.

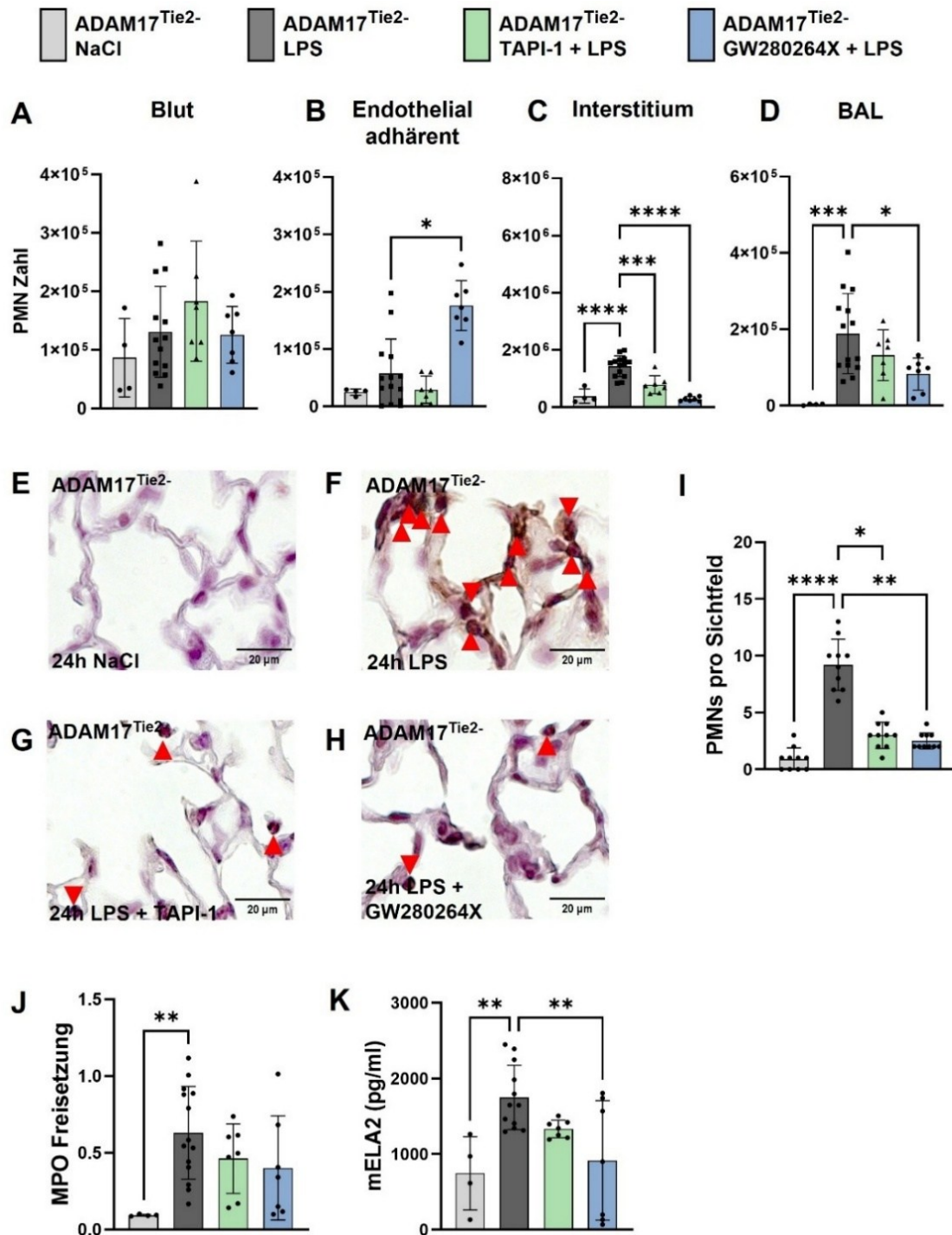


Abbildung 4.10: In-vivo-Migration muriner PMNs in das entzündete Lungengewebe während der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation unter systemischer ADAM17-Inhibition. Durchflusszytometrische Analyse der Migration von polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) in die verschiedenen Lungenstrukturen 24 Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation: (A) im Blut, (B) adhären am Endothel,

(C) im Interstitium, (D) im Alveolarraum. (E-H) Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen PMN-Färbung (braun, markiert mit rotem Pfeil) im Lungengewebe (lila, Gegenfärbung) zu den genannten Versuchsbedingungen (Originalvergrößerung: x20). (I) Statistische Auswertung der PMN-Zahl pro Sichtfeld (n=4 Tiere pro Kondition und 10 ausgezählte Aufnahmen). Aktivierung der alveolären PMNs 24 Stunden nach LPS-Inhalation durch (J) Freisetzung von Myeloperoxidase (MPO) mittels semiquantitativer Analyse und (K) Konzentration der neutrophilen Elastase (ELA2) mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) in der bronchoalveoläre Lavage (BAL). Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2}-Tiere als Positivkontrolle mit der Natriumchlorid-(NaCl)-Negativkontrolle und den beiden Inhibitorgruppen. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt (n=4/12-14/7/7). *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.10 A-I).

4.6. Regulation der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf PMNs mit systemischer Inhibition von ADAM17

Für die Transmigration von PMNs spielen neben deren Aktivierung insbesondere die Regulation der Oberflächenexpression relevanter Adhäsionsmoleküle eine zentrale Rolle. Adhäsionsmoleküle sind Membranproteine, die Interaktionen zwischen Zellen sowie mit der extrazellulären Matrix vermitteln. Einige dieser für die Transmigration essenziellen Moleküle sind bekannte Substrate von ADAM17 und werden proteolytisch gespalten.

Die Interaktion von PMNs mit dem Endothel erfolgt über eine Reihe von Adhäsionsmolekülen wie L-Selektin (CD62L), PSGL-1 (CD162), VLA-4 (CD49d) und CD11b und kann eine gegenseitige Aktivierung von Endothelzellen und PMNs auslösen. Die Oberflächenexpression dieser vier Adhäsionsmoleküle, die in direkter oder indirekter Verbindung zu ADAM17 stehen und nachweislich für die Transmigration erforderlich sind, wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Analyse der MFI erfolgte 24 Stunden nach LPS-Inhalation auf der PMN-Oberfläche in Blut, Lunge und BAL (Abbildung 4.11).

CD62L ist ein direktes Substrat von ADAM17 und vermittelt im initialen Schritt der Transmigration die Anheftung und das Rollen der PMNs entlang des Endothels. Die Inhibition von ADAM17 führte 24 Stunden nach LPS-Inhalation zu einer tendenziell reduzierten Oberflächenexpression von CD62L im (A) Blut, (B) der Lunge und (C) der BAL im Vergleich zu ADAM17^{Tie2}-Tieren. Die Applikation von GW280264X bewirkte eine signifikante Reduktion in allen drei Kompartimenten.

PSGL-1 ist kein direktes Substrat von ADAM17, bindet jedoch mit hoher Affinität an P-Selektin auf aktivierten Endothelzellen und Thrombozyten und fördert so die initiale Adhäsion und das Rollen der PMNs im frühen Transmigrationsschritt. Die Behandlung mit TAPI-1 zeigte keine Veränderung der PSGL-1-Oberflächenexpression im Vergleich zu

den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2}- Tieren ohne Behandlung. GW280264X induzierte hingegen eine erhöhte PSGL-1-Expression auf PMNs in (D) Blut, (E) Lunge und (F) BAL.

CD49d (VLA-4) ist kein direktes Substrat von ADAM17, vermittelt jedoch die feste Adhäsion der PMNs an VCAM-1, einem bekannten ADAM17-Substrat, auf aktivierten Endothelzellen. Die systemische Inhibition von ADAM17 führte zu einem unveränderten Oberflächenexpressionsniveau von CD49d, während die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 eine signifikante Hochregulation von CD49d auf PMNs in (G) Blut, (H) Lunge und (I) BAL induzierte.

CD11b ist ebenfalls kein Substrat von ADAM17 und vermittelt die feste Adhäsion von PMNs an der Gefäßwand sowie deren Diapedese durch das Endothel. Sowohl die Inhibition von ADAM17 als auch die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 führten zu einer signifikanten Reduktion der CD11b-Oberflächenexpression auf pulmonalen PMNs (K).

Die kombinierte systemische Inhibition von ADAM17/ADAM10 beeinflusste die Regulation der untersuchten Adhäsionsmoleküle auf der Zelloberfläche migrierender PMNs deutlich. Insbesondere die durch GW280264X induzierte erhöhte Expression von PSGL-1 und CD49d korreliert mit der zuvor beobachteten verstärkten Akkumulation der PMNs am Gefäßendothel und der damit einhergehenden reduzierten Migration in das Lungengewebe. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse der in-vivo-Migrationsanalyse und unterstreichen die funktionelle Bedeutung der Proteasen für die Regulation der PMN-Transmigration.

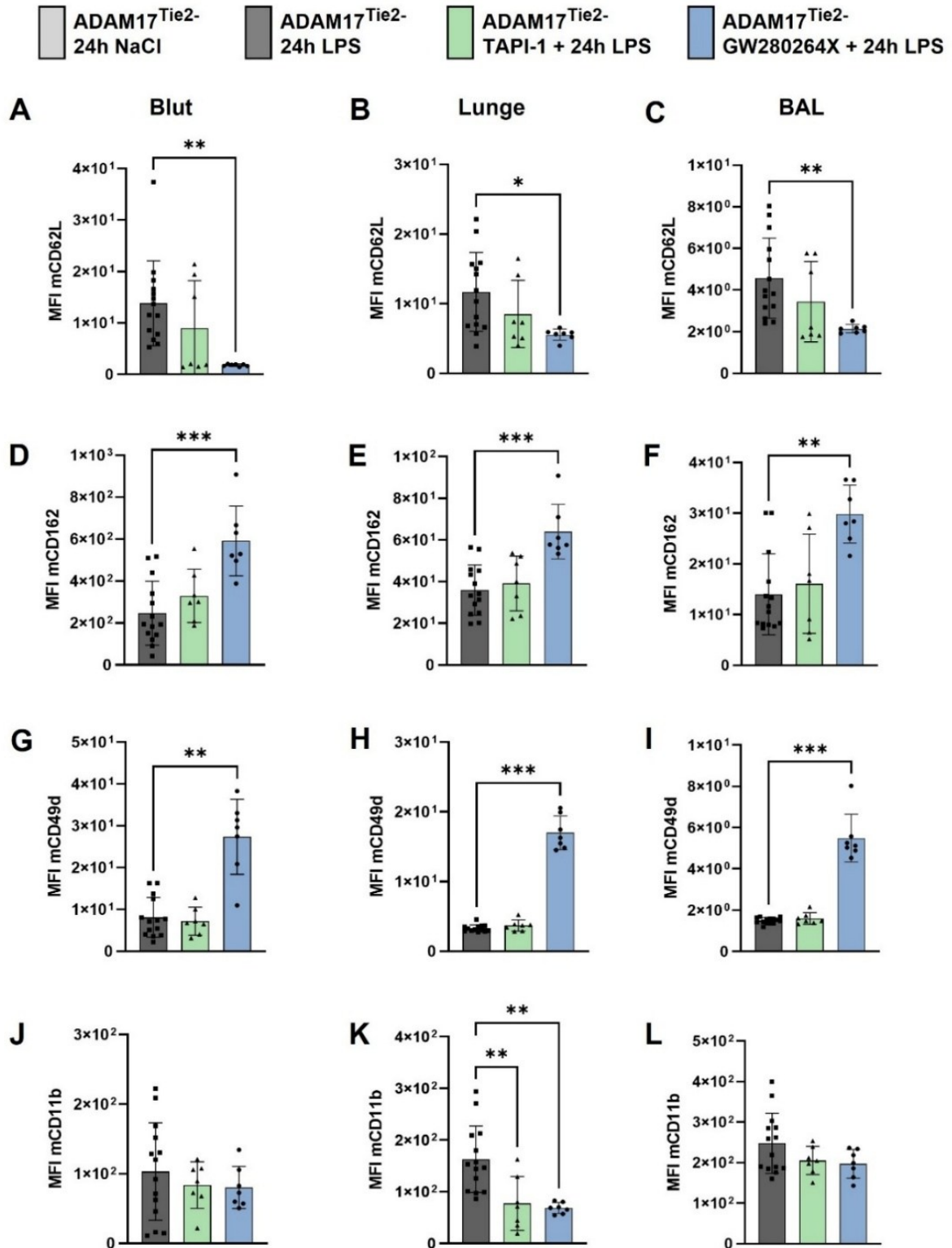


Abbildung 4.11: Einfluss der systemischen ADAM17-Inhibition auf die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf PMNs bei LPS-induzierter akuter pulmonaler Inflammation. Analyse der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf murinen (m) polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) mittels Durchflusszytometrie in Blut, Lunge und bronchoalveolärer Lavage (BAL). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) folgender Adhäsionsmoleküle: (A-C) CD62L (L-Selektin), (D-F) CD162 (PSGL-1), (G-I) CD49d (VLA-4) und (J-L) CD11b. Verglichen wurden jeweils die Lipopolysaccharid-(LPS)-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tiere als Positivkontrolle mit beiden Inhibitorgruppen. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt (n=14/7/7). *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. CD = cluster of differentiation.

4.7. Regulation der Zytokinfreisetzung durch die systemische Inhibition von ADAM17

In der akuten pulmonalen Inflammation beeinflussen neben der Regulation von Adhäsionsmolekülen auch die Freisetzung von Zytokinen die Chemotaxis und Migration von PMNs. Während der Entzündungsreaktion werden Zytokine von aktivierten Immunzellen sowie von Epithel- und Endothelzellen sezerniert und fungieren als zentrale Regulatoren für Initiation, Verstärkung und Aufrechterhaltung der Inflammation. Zahlreiche proinflammatorische Zytokine wirken zudem als Chemokine und modulieren die Migration von PMNs entlang chemotaktischer Gradienten in das entzündete Lungengewebe. Im nächsten Schritt wurde daher die Auswirkung der systemischen Inhibition von ADAM17 auf die Freisetzung von TNF- α (A), IL-1 β (B), CXCL2/3 (C), CX3CL1 (D), IL-6 (E), IL-10 (F), sIL-6R α (G) und sCD62L (H) in der BAL drei Stunden nach LPS-Inhalation mittels ELISA untersucht (Abbildung 4.12).

TNF- α ist ein direktes Substrat von ADAM17 und wird während der akuten pulmonalen Inflammation vor allem von aktivierten Monozyten und Makrophagen freigesetzt. Drei Stunden nach LPS-Inhalation führte LPS zu einer signifikant erhöhten TNF- α -Konzentration, die durch die systemische Inhibition mit TAPI-1 oder GW280264X nicht beeinflusst wurde. IL-1 β ist kein Substrat von ADAM17 und wird ebenfalls primär von aktivierten Monozyten und Makrophagen sezerniert. Die durch LPS induzierte Erhöhung der IL-1 β -Freisetzung blieb unter Inhibition beider Proteasen unverändert. CXCL2/3, ebenfalls kein Substrat von ADAM17, wird von aktivierten Monozyten, Makrophagen, PMNs und Mastzellen am Entzündungsort freigesetzt. Drei Stunden nach LPS-Inhalation war die Konzentration des Chemokins in der BAL signifikant erhöht, während die Behandlung mit TAPI-1 und GW280264X zu einer signifikant reduzierten Freisetzung führte.

CX3CL1 ist ein Substrat sowohl von ADAM17 als auch von ADAM10 und wird überwiegend von aktivierten Endothelzellen freigesetzt, wo es die Leukozytenmigration fördert. LPS erhöhte die CX3CL1-Freisetzung im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant, die Inhibition beider Proteasen zeigte jedoch keinen Einfluss.

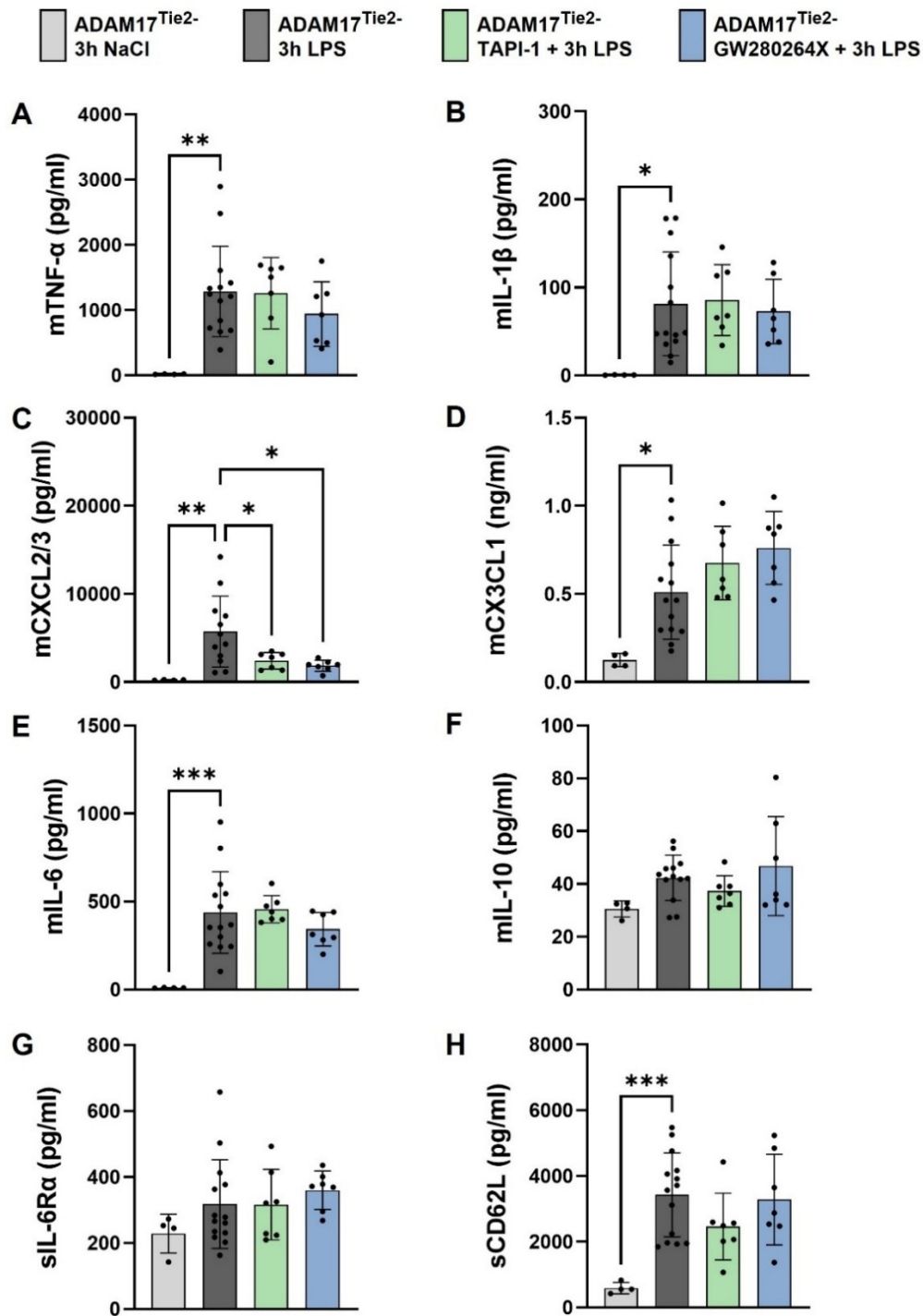


Abbildung 4.12: Einfluss der systemischen ADAM17-Inhibition auf die Zytokinfreisetzung bei LPS-induzierter akuter pulmonaler Inflammation. Zum Zeitpunkt drei Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation wurde die Freisetzung folgender muriner (m) Zytokine und *A Disintegrin and Metalloproteinase 17*-(ADAM17)-Substrate in die Alveolen über die Konzentration in der bronchoalveoläre Lavage (BAL) mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt: (A) Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), (B) Interleukin-1 β (IL-1 β), (C) C-X-C Motiv Chemokin Ligand 2/3 (CXCL2/3), (D) Fraktalkin (CX3CL1), (E) Interleukin-6 (IL-6), (F) Interleukin-10 (IL-10), (G) löslicher Interleukin-6-Rezeptor- α (sIL-6R α) und (H) lösliches L-Selektin (sCD62L). Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2}- Tiere als Positivkontrolle mit der Natriumchlorid-(NaCl)-Negativkontrolle und den beiden Inhibitorgruppen. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt (n=4/14/7/7). *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.12 C).

IL-6, kein Substrat von ADAM17, wird von verschiedenen aktivierten Immunzellen freigesetzt und spielt eine zentrale Rolle in der pulmonalen Inflammation. LPS induzierte einen signifikanten Anstieg der IL-6-Konzentration im Alveolarraum, der durch die systemische Inhibition mit TAPI-1 oder GW280264X unbeeinflusst blieb. IL-10, ebenfalls kein Substrat von ADAM17, wirkt als zentrales antiinflammatorisches Zytokin, das überschießende Immunreaktionen abschwächt und Gewebeschädigungen begrenzt. Drei Stunden nach LPS-Inhalation unterschied sich die IL-10-Konzentration nicht von der NaCl-Negativkontrolle und wurde durch die Inhibition nicht verändert.

Der membranständige IL-6R α ist ein Substrat von ADAM17 und wird durch proteolytische Spaltung in die lösliche, aktivierte Form sIL-6R α überführt. Drei Stunden nach LPS-Inhalation zeigten sich keine Unterschiede in der Konzentration von sIL-6R α zwischen den Behandlungsgruppen. CD62L wird auf der Zelloberfläche von ADAM17 gespalten, wodurch einerseits die feste Adhäsion der PMNs an das Endothel ermöglicht und andererseits lösliches sCD62L freigesetzt wird, das als kompetitiver Inhibitor die Leukozytenrekrutierung moduliert. LPS induzierte eine signifikant erhöhte Freisetzung von sCD62L, die durch die systemische Inhibition mit TAPI-1 oder GW280264X unbeeinflusst blieb.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die systemische ADAM17-Inhibition die Freisetzung pro- und antiinflammatorischer Zytokine, ausgenommen von einer reduzierten Freisetzung von CXCL2/3, nicht signifikant beeinflusste. Die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 führte ebenfalls zu einer signifikant reduzierten Freisetzung von CXCL2/3, was auf eine indirekte Beteiligung beider Proteasen an der Regulation chemotaktischer Signale hinweist.

4.8. Regulation der mikrovaskulären Permeabilität und endothelialer Adhäsionsmoleküle infolge der systemischen Inhibition von ADAM17

Die untersuchten proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 erhöhen die mikrovaskuläre Permeabilität, indem sie direkt auf das Endothel einwirken. Sie modulieren dabei die Expression von Adhäsionsmolekülen und die Zell-Zell-Verbindungen zwischen Endothelzellen, wodurch die Barrierefunktion geschwächt wird. Dieser Mechanismus begünstigt die Bildung von Ödemen und erleichtert zugleich die Transmigration von PMNs durch die alveolarkapilläre Barriere. Die Adhäsionsmoleküle VE-Cadherin und JAM-A regulieren als zentrale Komponenten endothelialer Zell-Zell-Verbindungen maßgeblich

die Gefäßpermeabilität. JAM-A ist ein Substrat von ADAM17 und wird auch in Epithelzellen exprimiert, wodurch die Protease die Permeabilität sowohl endothelialer als auch epithelialer Barrieren beeinflussen kann.

Zur Untersuchung, inwiefern die systemische Inhibition von ADAM17 die mikrovaskuläre Permeabilität in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation beeinflusst (Abbildung 4.13), wurden mehrere komplementäre Ansätze eingesetzt: die Gesamtproteinbestimmung in der BAL (A), die histologische Analyse der Septendicke (B–F), die Bestimmung der JAM-A-Expression (G), der Evans Blue Extravasations-Assay (H–I) sowie die Analyse der VE-Cadherin-Expression (Abbildung 4.14).

Die Gesamtproteinkonzentration in der BAL dient als indirekter Marker der mikrovaskulären Permeabilität. Unter physiologischen Bedingungen verhindert eine intakte Endothelbarriere aufgrund der Größe von Plasmaproteinen, wie Albumin, deren Übertritt aus der Zirkulation. Eine gestörte Barrierefunktion führt zu einer erhöhten Proteinleckage in das Interstitium und den Alveolarraum, die sich in einer gesteigerten Gesamtproteinkonzentration in der BAL widerspiegelt. 24 Stunden nach LPS-Inhalation war die Proteinkonzentration in der BAL von ADAM17^{Tie2}- Tieren im Vergleich zur NaCl-Negativkontrolle signifikant erhöht (Abbildung 4.13 A). Die systemische Inhibition von ADAM17 sowie die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 beeinflussten diesen Anstieg jedoch nicht.

Die Lungenarchitektur wurde histologisch mittels Mayer's Hämalaun-Färbung untersucht (Abbildung 4.13 B–F). Die Analyse der Alveolarseptendicke zeigte, dass LPS nach 24 Stunden eine ausgeprägte Destruktion der Lungenarchitektur mit signifikant verdickten bzw. aufgeschwemmten Septen verursachte (F). Die systemische Inhibition mit TAPI-1 und GW280264X verhinderte diese strukturellen Veränderungen und reduzierte die Septendicke signifikant im Vergleich zu den unbehandelten ADAM17^{Tie2}- Tieren.

Die Oberflächenexpression von JAM-A auf pulmonalen Endothelzellen wurde 24 Stunden nach LPS-Inhalation durchflusszytometrisch analysiert (G). LPS induzierte eine signifikante Erhöhung der MFI von JAM-A. Sowohl die systemische Inhibition von ADAM17 als auch die kombinierte Hemmung beider Proteasen führten während der Inflammation zu einer signifikanten Reduktion der MFI.

Die mikrovaskuläre Permeabilität wurde zusätzlich mithilfe des Evans Blue Extravasations-Assays bestimmt, der sechs Stunden nach LPS-Inhalation durchgeführt wurde. Vorangegangene Studien hatten gezeigt, dass der maximale Anstieg der Gefäßpermeabi-

lität zu diesem Zeitpunkt auftritt. Nach Entnahme der Lungen wurde Evans Blue aus Gewebe und Plasma extrahiert und photometrisch quantifiziert. Die im Lungengewebe nachweisbare Farbstoffmenge korreliert direkt mit dem Ausmaß der gestörten Barrierefunktion. Bei intakter Endothelbarriere verbleibt Evans Blue, an Serumalbumin gebunden, im Gefäßsystem, während bei erhöhter Permeabilität der Farbstoff in das Lungengewebe übertritt. Im Vergleich zur NaCl-Kontrolle wurde sechs Stunden nach LPS-Inhalation signifikant weniger Evans Blue im Plasma detektiert (Abbildung 4.13 H). Die systemische Inhibition mit TAPI-1 und GW280264X führte während der Inflammation zu einer signifikant erhöhten Evans Blue-Konzentration im Plasma im Vergleich zur LPS-Kontrolle, was auf eine stabilisierte Barrierefunktion hindeutet. Entsprechend war die Evans Blue-Menge im Lungengewebe von ADAM17^{Tie2}- Tieren signifikant erhöht (Abbildung 4.13 I), während die Inhibition von ADAM17 oder ADAM17/ADAM10 die Farbstoffextravasation signifikant reduzierte.

Der Einfluss von ADAM17 auf die Gen- und Proteinexpression von VE-Cadherin ist in Abbildung 4.14 dargestellt. Drei Stunden nach LPS-Inhalation war die Genexpression von VE-Cadherin signifikant erhöht (A). Die systemische Inhibition von ADAM17 und die kombinierte Hemmung beider Proteasen beeinflussten das Transkriptionsniveau jedoch nicht. LPS induzierte eine verstärkte Spaltung von VE-Cadherin, die sich in einer erhöhten Konzentration des löslichen sVE-Cadherin in der BAL nach drei Stunden zeigte (B). Die Inhibition mit TAPI-1 oder GW280264X veränderte diese Konzentration nicht. Die statistische Auswertung der VE-Cadherin-Proteinexpression auf pulmonalen Endothelzellen (C) sowie die repräsentativen Immunfluoreszenzaufnahmen (D–G) verdeutlichen, dass LPS die VE-Cadherin-Expression signifikant reduzierte und die Anzahl interzellulärer *Gaps* erhöhte (weiße Pfeile). Die systemische Inhibition von ADAM17 sowie die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 führten dagegen zu einer signifikant erhöhten VE-Cadherin-Expression und einer verminderten *Gap-Formation* im Endothel.

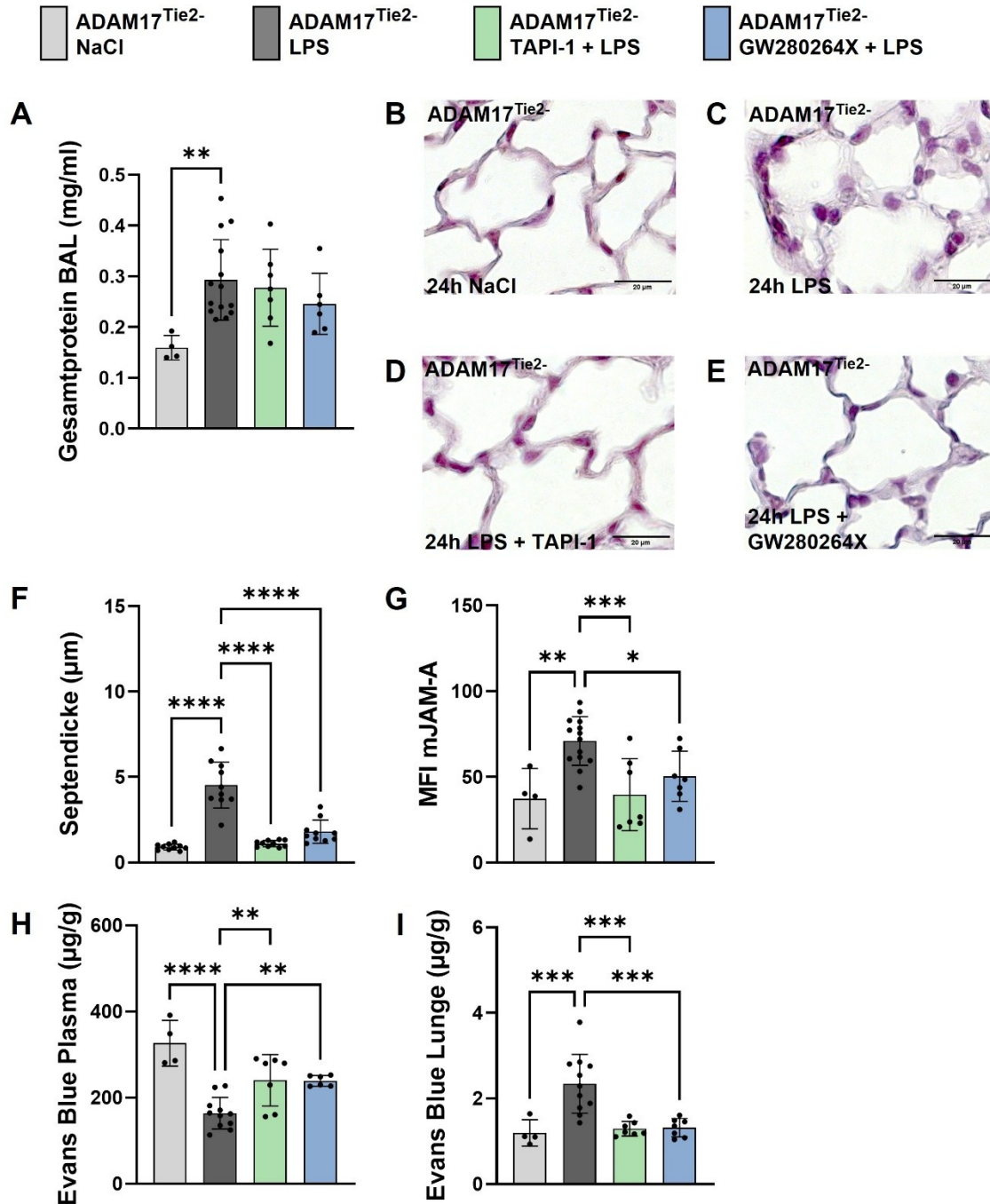


Abbildung 4.13: Einfluss der systemischen ADAM17-Inhibition auf die mikrovaskuläre Permeabilität. (A) Gesamtproteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL) 24 Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation bestimmt mittels *bicinchoninic acid*-(BCA)-Assay. (B-E) Repräsentative Aufnahmen immunhistologischer Färbungen von murinem Lungengewebe (Mayer's Hämalaun) zur Visualisierung der Lungenarchitektur und Alveolarseptendicke. (F) Statistische Auswertung der Septendicke mittels ImageJ (n=4 Tiere pro Gruppe mit jeweils 10 Messungen). (G) Durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von murinem (m) *junctional adhesion molecule A* (JAM-A) auf pulmonalen Endothelzellen 24 Stunden nach LPS-Inhalation. Photometrische Quantifizierung von Evans Blue im (H) Plasma und (I) Lungengewebe. Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2}- Tiere als Positivkontrolle mit der Natriumchlorid-(NaCl)-Negativkontrolle und den beiden Inhibitorgruppen. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt (n=4/11-14/7/6-7). *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.13 B-C und F-I).

Die Proteinexpressionsanalyse mittels Immunfluoreszenzfärbung wurde durch Western Blot-Analysen ergänzt, welche eine detaillierte Untersuchung der proteolytischen Spaltung von membranständigem VE-Cadherin ermöglichten (H). VE-Cadherin besitzt ein Gesamtmolekulargewicht von etwa 125 kDa und wird proteolytisch in extrazelluläre Fragmente von 90 kDa und 75 kDa sowie ein membranständiges C-terminales Fragment von rund 35 kDa gespalten (I). Die Western Blot-Analysen zeigten zwei unterschiedliche Spaltungszustände von VE-Cadherin im Lungengewebe (J, K).

Die NaCl-Negativkontrolle wies neben dem Gesamtprotein bei 125 kDa auch die Spaltprodukte bei 90 kDa und 75 kDa auf, wobei insbesondere das 75 kDa-Fragment eine ausgeprägte Expression zeigte (K). LPS induzierte eine verstärkte Spaltung von VE-Cadherin, was sich in einer deutlich verminderten Expression aller drei Banden widerspiegelte. Die systemische Inhibition von ADAM17 zeigte ein Expressionsmuster, das der LPS-Positivkontrolle weitgehend entsprach. Die kombinierte Inhibition von ADAM17/ADAM10 führte entweder zu einer stark reduzierten Spaltung von VE-Cadherin, erkennbar an einer deutlich erhöhten Expression des Gesamtproteins bei 125 kDa (J), oder zu einer partiellen Spaltung in die 90 kDa- und 75 kDa-Fragmente, wobei alle drei Banden im Vergleich zur LPS-Positivkontrolle intensiver exprimiert waren (K). Das C-terminale Fragment von 35 kDa war in den Western Blots nicht nachweisbar und wurde daher nicht dargestellt. Die vollständigen Membranen sind im Anhang in Abbildung 8.1 auf S. 167 dokumentiert.

Zusammenfassend zeigen die Daten einen direkten Einfluss von ADAM17 auf die mikrovaskuläre Permeabilität des Lungengewebes. LPS induzierte eine Destruktion der Lungenarchitektur mit aufgeschwemmten Alveolarsepten und die Ausbildung eines proteinreichen Lungenödems. Die systemische Inhibition von ADAM17 verringerte die Septendicke und modifizierte die Oberflächenexpression von JAM-A auf pulmonalen Endothelzellen. Zudem führte LPS zu einer verstärkten Evans Blue-Extravasation aus dem Blut in das Lungengewebe, die durch die systemische Inhibition mit TAPI-1 und GW280264X aufgehoben wurde. Besonders die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 beeinflusste die Modulation des Adhäsionsmoleküls VE-Cadherin auf pulmonalen Endothelzellen, was sich in einer erhöhten Proteinexpression widerspiegelte.

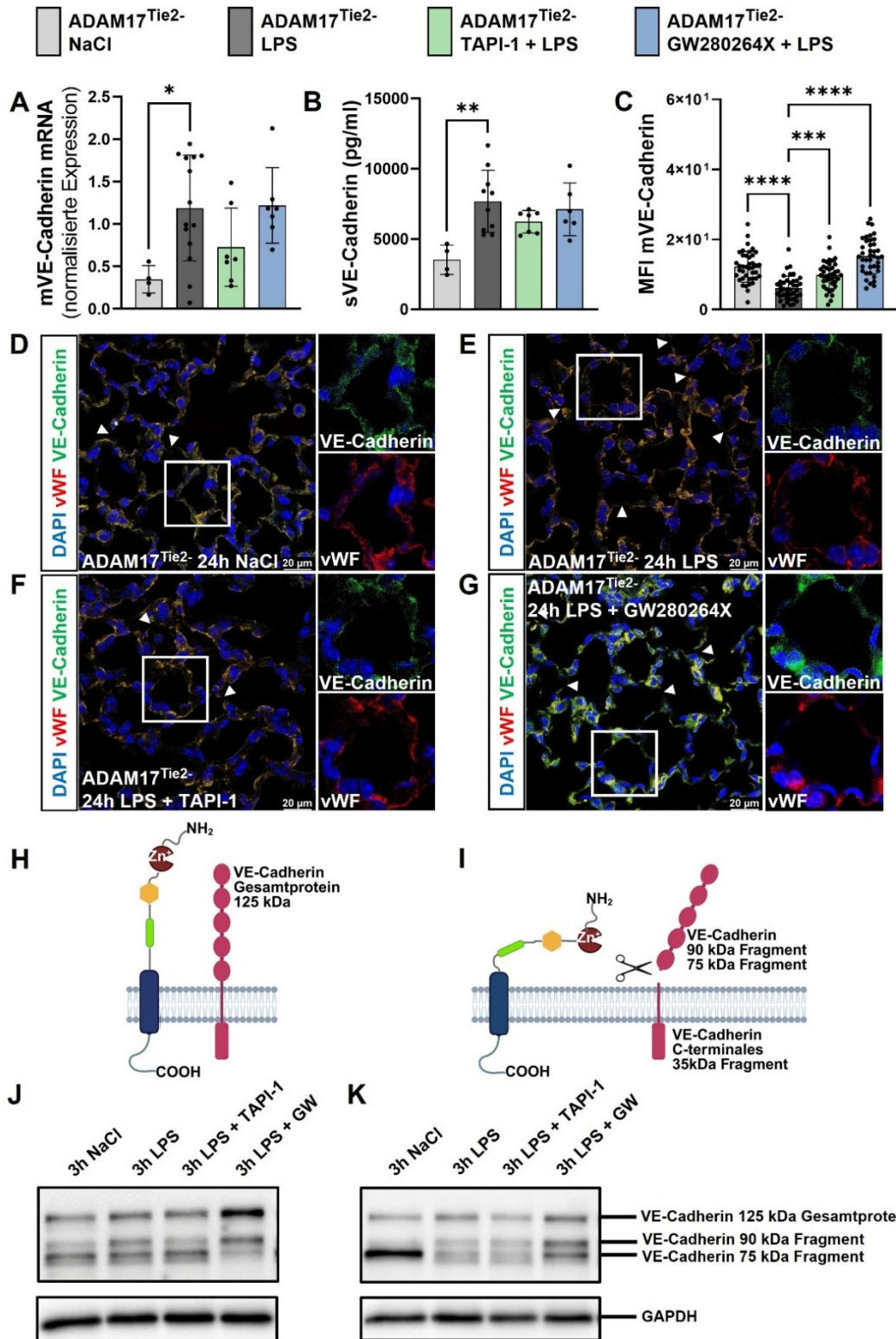


Abbildung 4.14: Modulation von VE-Cadherin im Lungengewebe durch die systemische ADAM17-Inhibition. (A) Genexpression von *vascular endothelial* (VE)-Cadherin in murinem (m) Lungengewebe von ADAM17^{Tie2}- Tieren drei Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation mittels RT-qPCR (n=4/14/7/7). (B) Proteinkonzentration von löslichem sVE-Cadherin in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von ADAM17^{Tie2}- Tieren drei Stunden nach LPS-Exposition mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (n=4/10/7/6). (C) Oberflächenexpression von VE-Cadherin auf pulmonalen Endothelzellen mittels Immunfluoreszenzfärbung 24 Stunden nach LPS-Inhalation (n=4 Tiere pro Gruppe mit 10 Messungen je

Aufnahme). (D-G) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen der Proteinexpression von VE-Cadherin auf Endothelzellen im Lungengewebe von ADAM17^{Tie2-} Tieren zu den genannten Bedingungen (Originalvergrößerung: x63). Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau), die Endothelzellen mit von-Willebrand-Faktor (vWF) (rot) und VE-Cadherin (grün) angefärbt. (H) Schematische Darstellung von inaktivem *A Disintegrin and Metalloproteinase 17/10* (ADAM17/10) und von membranständigem VE-Cadherin als Gesamtprotein mit einem Molekulargewicht von 125 Kilodalton (kDa). Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/d1gnmlt>). (I) Proteolytische Spaltung von VE-Cadherin durch ADAM17/10 an der Ektodomäne in die extrazellulären Fragmente mit 90 kDa und 75 kDa sowie in das membranständige C-terminale Fragment mit 35kDa. Eigene Darstellung, erstellt mit Biorender.com (<https://BioRender.com/0vjy034>). (J-K) Western Blot-Analyse zur Bestimmung der VE-Cadherin Spaltprodukte zu den genannten Bedingungen (n=4). Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tiere als Positivkontrolle mit der Natriumchlorid-(NaCl)-Negativkontrolle und den beiden Inhibitorgruppen. Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.14 C-G).

4.9. Deletion von endotheliale ADAM17 in der konditionalen Knockout-Mauslinie ADAM17^{Tie2+}

Die im ersten Teil untersuchte systemische Inhibition von ADAM17 sowie die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 führten zu einer reduzierten Migration von PMNs in das entzündete Lungengewebe. Dabei wurden insbesondere die Regulation von Adhäsionsmolekülen auf PMNs und Endothelzellen sowie das Ausmaß der mikrovaskulären Permeabilität beeinflusst. ADAM17 scheint somit eine zentrale Rolle bei der Interaktion von PMNs mit dem Endothel einzunehmen. Die Inhibition von ADAM17 zeigte protektive Effekte im Hinblick auf den Erhalt der endothelialen Barrierefunktion, was die reduzierte PMN-Migration erklären könnte.

Zur weiteren Untersuchung dieser Annahme wurde eine konditionale Knockout-Mauslinie (ADAM17^{Tie2+}) mit einer gewebespezifischen Deletion von ADAM17 in Endothelzellen generiert. Im Sinne des 3R-Prinzips nach Russell und Burch wurde zur Reduktion der Versuchstierzahl in dieser Arbeit sowohl im ersten Abschnitt (Analyse der systemischen Inhibition) als auch im zweiten Abschnitt (Analyse der endothelialen ADAM17-Deletion) dieselbe ADAM17^{Tie2-} Kohorte als NaCl-Negativ- und LPS-Positivkontrolle verwendet. Zur Wahrung der Transparenz wird im zweiten Abschnitt an den jeweiligen Stellen unter Angabe der entsprechenden Seitenzahl explizit auf die bereits im ersten Teil dargestellten Daten verwiesen.

Zur Verifizierung der erfolgreichen Deletion von endotheliale ADAM17 in der generierten Knockoutlinie wurde die Expression der Protease zunächst im gesamten Lungengewebe (Abbildung 4.15) und anschließend gewebespezifisch (Abbildung 4.16) auf pulmonalen Endothelzellen (A) sowie vergleichend auf PMNs (B) und Thrombozyten (C) untersucht. Abbildung 4.15 zeigt die ADAM17-Expression im gesamten Lungengewebe im

Vergleich zwischen ADAM17^{Tie2⁻} und ADAM17^{Tie2⁺} Tieren. Unter physiologischen Bedingungen bestanden in den NaCl-Kontrollen beider Linien keine Unterschiede in der ADAM17-mRNA-Expression (A). Drei Stunden nach LPS-Inhalation war die ADAM17-mRNA-Expression in der Lunge von ADAM17^{Tie2⁺} Tieren im Vergleich zur ADAM17^{Tie2⁻}-Kontrolle um 77,5 % reduziert. Die statistische Auswertung der ADAM17-Proteinexpression im Lungengewebe (B) sowie die zugehörigen repräsentativen z-Stack-Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung (C) zeigten 24 Stunden nach LPS-Inhalation ein signifikant reduziertes Proteinlevel der Protease.

Insgesamt ergab die Charakterisierung eine signifikant reduzierte Expression von ADAM17 in der Knockoutlinie ADAM17^{Tie2⁺} im gesamten Lungengewebe. Die 77,5-prozentige Reduktion der ADAM17-mRNA durch den endothelzellspezifischen Knockout unterstreicht die zentrale Bedeutung des endothelialen ADAM17 in der Lunge. Darauf aufbauend wurde die Hypothese formuliert, dass endotheliales ADAM17 in der akuten pulmonalen Inflammation eine Schlüsselrolle bei der Regulation der mikrovaskulären Permeabilität und der PMN-Migration in das entzündete Lungengewebe einnimmt.

Der erfolgreiche gewebespezifische Knockout von ADAM17 in Endothelzellen wurde durchflusszytometrisch bestätigt (Abbildung 4.16). Hierzu wurden ADAM17^{Tie2⁺} Tiere mit ADAM17^{Tie2⁻} Kontrollen verglichen. Ergänzend wurden die Expressionsdaten der ADAM17^{Tie2⁻} Tiere mit systemischer Inhibition dargestellt und der LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2⁻} Positivkontrolle gegenübergestellt. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Inhibitoren ihre Wirkung primär über die Blockade der enzymatischen Aktivität und sekundär über die Modulation der Protease-Expression entfalten. Die ADAM17-Expression auf pulmonalen Endothelzellen wurde anhand der MFI quantifiziert (A). In der ADAM17^{Tie2⁺} Linie zeigte sich eine signifikant reduzierte Oberflächenexpression von ADAM17 im Vergleich zur ADAM17^{Tie2⁻} Kontrolle, womit die erfolgreiche Deletion des endothelialen ADAM17 bestätigt wurde. Im Gegensatz dazu wiesen PMNs (B) und Thrombozyten (C) in Blut, Lunge und BAL der ADAM17^{Tie2⁺} Tiere im Vergleich zur ADAM17^{Tie2⁻} Kontrolle keine reduzierte ADAM17-Expression auf, was den gewebespezifischen Charakter des Knockouts belegt.

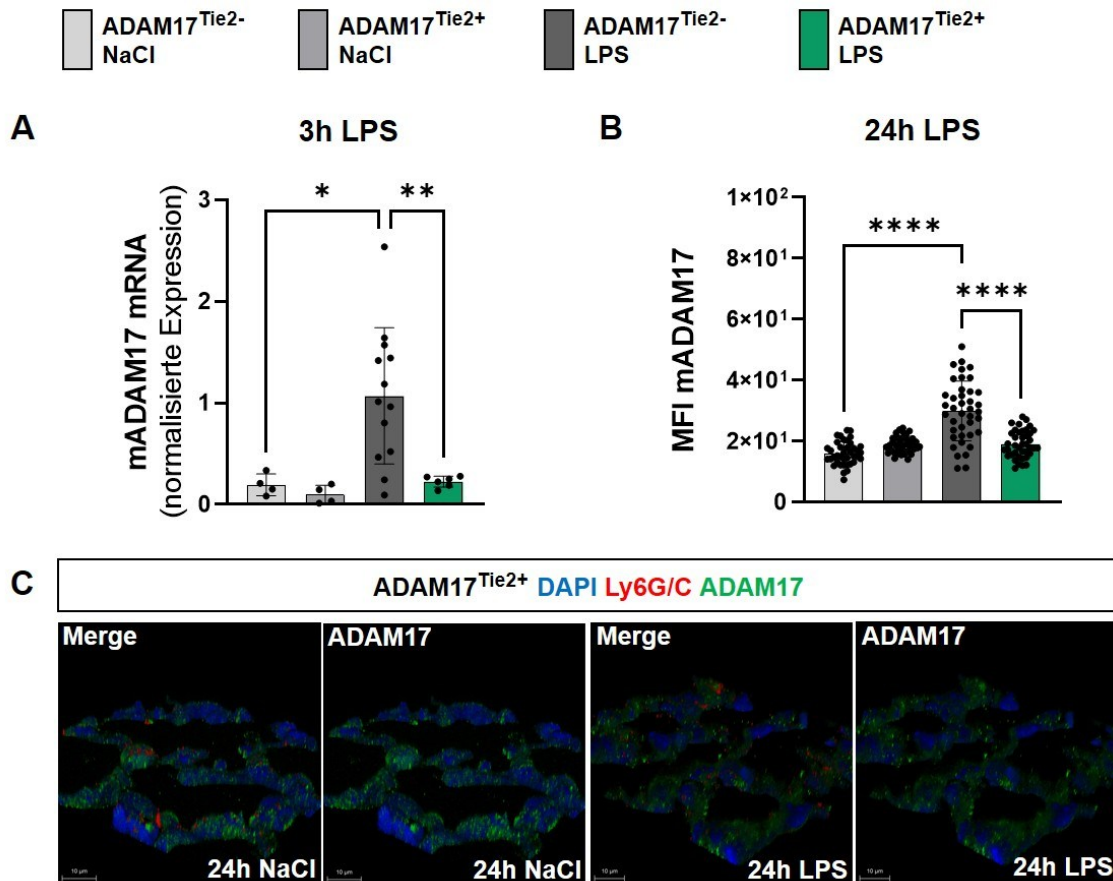


Abbildung 4.15: Gen- und Proteinexpression von ADAM17 in murinem Lungengewebe der Knockout-Mauslinie ADAM17^{Tie2+}. (A) Genexpression von *A Disintegrin and Metalloproteinase 17* (ADAM17) in murinem Lungengewebe drei Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation (n=4/4/13/6). Die Expressionsdaten wurden durch Normalisierung auf die ADAM17^{Tie2-} LPS-Positivkontrolle quantifiziert, deren Mittelwert zur Vergleichbarkeit auf den Wert 1 gesetzt wurde. (B) Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von ADAM17 mittels Immunfluoreszenzanalyse (n=4 Tiere pro Gruppe mit 10 Messungen je Aufnahme). (C) Repräsentative z-Stack Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung muriner Lungen von ADAM17^{Tie2+} Tieren zu den genannten Bedingungen. Je Kondition sind eine *Merge*-Aufnahme und die ADAM17-Expression dargestellt. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau), die Neutrophile mit Ly6G/C (rot) und ADAM17 (grün) angefärbt. Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tiere mit den Natriumchlorid-(NaCl)-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tieren und den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren. Zusätzlich wurden die NaCl- und LPS-Gruppen der ADAM17^{Tie2+} Tiere und die beiden NaCl-Negativkontrollen untereinander verglichen. Die dargestellten Daten der ADAM17^{Tie2-} Kontrolltiere wurden bereits in Abbildung 4.1 auf S. 73 gezeigt (Reduktion der Versuchstierzahl gemäß 3R-Prinzip). Die Daten werden als Mittelwerte $\pm$ SD dargestellt. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.15 A-C).

Auf PMNs in der Lunge und BAL sowie auf Thrombozyten in der BAL wurde eine kompensatorische Hochregulation von ADAM17 beobachtet. Die systemische Inhibition mit TAPI-1 und GW280264X beeinflusste mit Ausnahme der MFI von ADAM17 auf pulmonalen Endothelzellen die Expressionslevel auf PMNs und Thrombozyten weitgehend nicht.

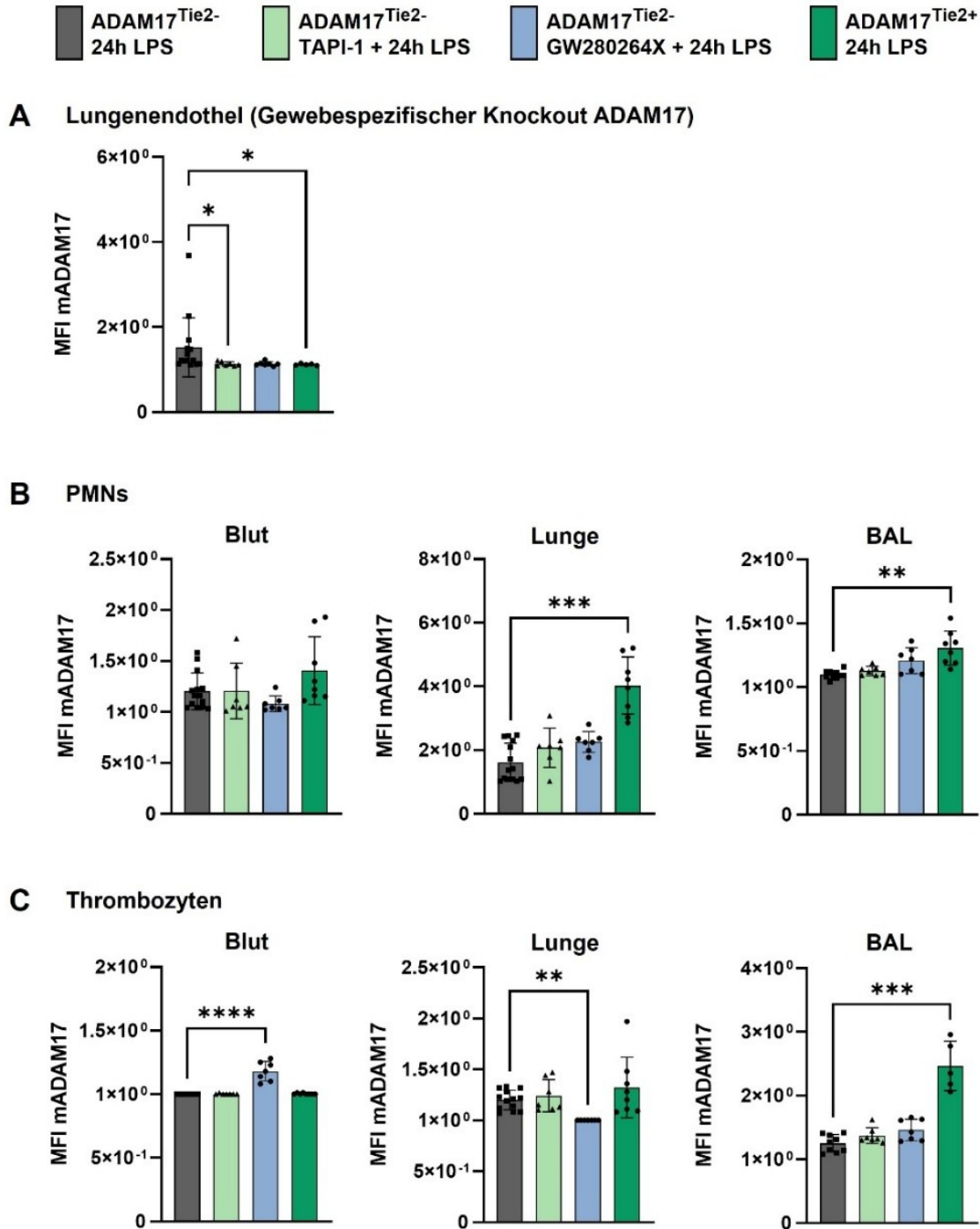


Abbildung 4.16: Nachweis des konditionalen Knockouts von ADAM17 auf Endothelzellen im Vergleich zu PMNs und Thrombozyten. (A) Durchflusszytometrische Quantifizierung der Oberflächenexpression von *A Disintegrin and Metalloproteinase 17* (ADAM17) auf pulmonalen Endothelzellen zu den genannten Versuchsbedingungen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von ADAM17 auf (B) polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) und (C) Thrombozyten in Blut, Lunge und bronchoalveolären Lavage (BAL) wurde ergänzend vergleichend analysiert. Verglichen wurde die Lipopolysaccharid-(LPS)-stimulierte ADAM17^{Tie2-} Kontrolle mit den LPS-stimulierten Tieren der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie und den ADAM17^{Tie2-} Inhibitorgruppen. Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt (n=8-14/7/7/5-8). *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.16 A-C jeweils ausschließlich der Vergleich der LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Kontrolle mit den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren).

4.10. Einfluss von endothelialem ADAM17 auf die inflammatorischen TNFR1/2- und IL-6R-Signalwege in vivo

Die systemische Inhibition von ADAM17 zeigte deutliche Hinweise auf ein komplexes Zusammenspiel zwischen der Protease und den Signalwegen von TNFR1 und IL-6R. Beide Rezeptoren waren im Lungengewebe nach systemischer ADAM17-Inhibition reduziert. Die in vitro durchgeführte siRNA-Analyse deutete darauf hin, dass zwischen ADAM17 und diesen beiden Rezeptoren eine bidirektionale Rückkopplungsschleife besteht. Insbesondere erfolgte die Regulation der Protease über den TNFR1-Signalweg, der über die Signalproteine TRADD, JNK, CREB, NF- κ B, JAK1 und STAT3 moduliert wird.

Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß endotheliales ADAM17 die inflammatorischen TNFR- und IL-6R-Signalwege beeinflusst, wurde eine zur ersten Analyse methodisch identische Genexpressionsuntersuchung durchgeführt (Abbildung 4.17A). Nach LPS-Inhalation zeigte sich in ADAM17^{Tie2+} Tieren eine signifikante Reduktion der TNFR1-Genexpression im Vergleich zur ADAM17^{Tie2-} Kontrolle, während das TNFR2-Transkriptionsniveau durch den endothelspezifischen Knockout nicht signifikant verändert wurde. Innerhalb des TNFR-Signalwegs wiesen die Genexpressionsdaten signifikante Reduktionen der Gene NF- κ B, JNK, TRADD und CREB auf.

Der endothelspezifische Knockout von ADAM17 führte darüber hinaus zu einer signifikanten Abnahme der IL-6R-Genexpression. Die durch LPS induzierten Gene JAK1 und STAT3 waren in der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie ebenfalls signifikant vermindert. Die Transport- und Reifungsproteine von ADAM17 (iRhom2, AT1R und iTAP) zeigten drei Stunden nach der LPS-Inhalation eine erhöhte Expression, die durch die endotheliale ADAM17-Deletion jedoch unbeeinflusst blieb. Der durch LPS aktivierte TLR4-Signalweg wies ebenfalls eine erhöhte Expression der Gene TRIF und TRAM auf. Nach LPS-Inhalation blieben deren Transkriptionslevel in ADAM17^{Tie2+} Tieren unverändert hoch.

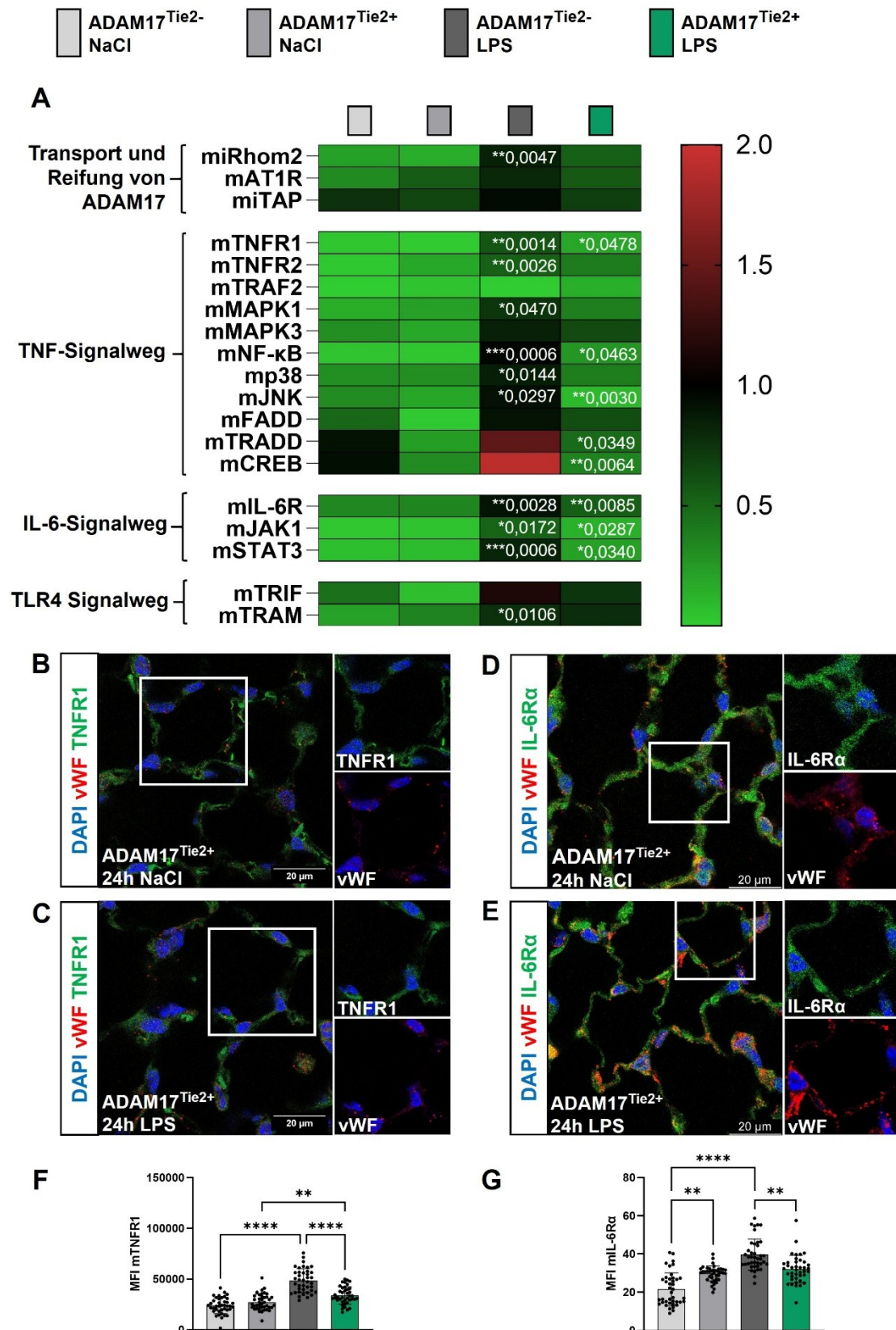


Abbildung 4.17: Gen- und Proteinexpressionsanalyse der proinflammatorischen TNFR1/2- und IL-6R-Signalwege nach Deletion von endothelialem ADAM17. (A) Genexpressionsanalyse in murinem Lungengewebe drei Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation mittels RT-qPCR folgender Gene (m=murin): inaktives Rhomboid-Protein 2 (iRhom2), Angiotensin-II-Typ-1-Rezeptor (AT1R), *iRhom2*-

interacting protein (iIAP), Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1), Tumornekrosefaktor-Rezeptor 2 (TNFR2), *tumor necrosis factor receptor-associated factor 2* (TRAF2), Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1 (MAPK1), Mitogen-aktivierte Proteinkinase 3 (MAPK3), *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B), p38-MAP-Kinasen (p38), c-Jun-N-terminale Kinase (JNK), *fas-associated protein with death domain* (FADD), *tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein* (TRADD), *cAMP response element-binding protein* (CREB), Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R), Januskinase 1 (JAK1), *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β* (TRIF), *TRIF-related adaptor molecule* (TRAM) (n=4/4/10-14/6-8). Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tiere mit den Natriumchlorid-(NaCl)-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tieren und den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren. Zusätzlich wurden die NaCl- und LPS-Gruppen der ADAM17^{Tie2+} Tiere verglichen. Die dargestellten Daten der ADAM17^{Tie2-} Kontrolltiere wurden bereits in Abbildung 4.2 auf S. 75 gezeigt (Reduktion der Versuchstierzahl gemäß 3R-Prinzip). Repräsentative Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbung von (B-C) TNFR1 und (D-E) IL-6R α im Lungenendothel der ADAM17^{Tie2+} Linie jeweils mit NaCl- bzw. LPS-Inhalation (Originalvergrößerung: x63). Die zugehörigen Aufnahmen der ADAM17^{Tie2-} Kontrollen sind Abbildung 4.3 auf S. 77 zu entnehmen. Gefärbt wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI-1) (blau), die Endothelzellen mit von-Willebrand-Faktor (vWF) (rot) und TNFR1 bzw. IL-6R α (grün). Statistische Quantifizierung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von (F) TNFR1 und (G) IL-6R α in pulmonalen Endothelzellen (n=4 Tiere pro Gruppe mit 10 Messungen je Aufnahme). Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tiere mit den NaCl-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tieren und den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren. Zusätzlich wurden die NaCl- und LPS-Gruppen der ADAM17^{Tie2+} Tiere und die beiden NaCl-Negativkontrollen verglichen. Die dargestellten Daten der ADAM17^{Tie2-} Kontrolltiere wurden bereits in Abbildung 4.3 auf S. 77 gezeigt (Reduktion der Versuchstierzahl gemäß 3R-Prinzip). Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.17 A-G).

Abbildung 4.17 zeigt repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen von TNFR1 (B–C) und IL-6R α (D–E) im Lungengewebe der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie 24 Stunden nach LPS-Inhalation. Die entsprechenden Aufnahmen der ADAM17^{Tie2-} Kontrollen sind in Abbildung 4.3 auf S. 77 dargestellt. Die statistische Auswertung der MFI von TNFR1 (F) und IL-6R α (G) ergab eine signifikant verminderte Proteinexpression beider Rezeptoren nach endothelzellspezifischer ADAM17-Deletion im Vergleich zur ADAM17^{Tie2-} Kontrolle. Die NaCl-Negativkontrolle der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie zeigte im Vergleich zur NaCl-Negativkontrolle der ADAM17^{Tie2-} Tiere eine signifikant erhöhte basale Expression von IL-6R α im Lungengewebe.

Die Gen- und Proteinexpressionsanalyse der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie bestätigte einen signifikanten Einfluss von endothelalem ADAM17 auf die TNFR1- und IL-6R-Signalwege in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation. Der endothelzellspezifische Knockout von ADAM17 führte zu einer signifikanten Reduktion der Gen- und Proteinexpression von TNFR1 und IL-6R α . Darüber hinaus verringerte die endotheliale ADAM17-Deletion die Transkriptionslevel der Signalmediatoren NF- κ B, JNK, TRADD, CREB, JAK1 und STAT3 signifikant. Im Vergleich zur systemischen ADAM17-Inhibition zeigte der endotheliale Knockout einen deutlich ausgeprägteren Effekt auf die genannten Gene.

4.11. In-vivo-Migration von PMNs in der ADAM17^{Tie2+}

Knockoutlinie

Die systemische Inhibition von ADAM17 führte zu einer reduzierten Migration von PMNs in das entzündete Lungengewebe, wobei insbesondere die Transmigration in das Interstitium signifikant verringert war. Die kombinierte Inhibition von ADAM17/ADAM10 bewirkte eine verstärkte Akkumulation von PMNs am Endothel und eine signifikant reduzierte Migration in das Interstitium und den Alveolarraum. Die neutrophile Freisetzung von MPO und ELA2 in die BAL blieb durch die systemische Inhibition weitgehend unbeeinflusst. Die nach ADAM17-Inhibition verbesserte Endothelbarrierefunktion sowie die Regulation relevanter Adhäsionsmoleküle wurden daher als mögliche Ursachen der reduzierten PMN-Migration identifiziert.

Die endothelzellspezifische Deletion von ADAM17 in der konditionalen ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie ermöglichte eine detaillierte Untersuchung der vermuteten Schlüsselrolle von endothelialem ADAM17 bei der PMN-Migration in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation. Die Graphen A–D in Abbildung 4.18 zeigen die Anzahl der PMNs im Blut (A), adhären am Endothel (B), im Interstitium (C) und im Alveolarraum (D). Die Ergebnisse verdeutlichen einen hochsignifikanten Einfluss von endothelialem ADAM17 auf die Rekrutierung von PMNs in das entzündete Lungengewebe. Im Blut zeigte sich kein Unterschied in der PMN-Anzahl zwischen der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie und der ADAM17^{Tie2-} Kontrolle (A). Der Knockout von ADAM17 führte jedoch zu einer signifikant erhöhten Akkumulation von PMNs am Gefäßendothel (B) und einer entsprechend signifikant reduzierten Migration in das Interstitium (C) und den Alveolarraum (D).

Die in Abbildung 4.18 E–F dargestellten repräsentativen immunhistochemischen Aufnahmen veranschaulichen die durchflusszytometrisch erhobenen Befunde, wobei die braun gefärbten PMNs durch rote Pfeile markiert sind. Die zugehörigen Aufnahmen der ADAM17^{Tie2-} Kontrollen sind in Abbildung 4.10 auf S. 90 dargestellt. Die statistische Auswertung der PMNs pro Sichtfeld bestätigte die durchflusszytometrischen Ergebnisse und zeigte ebenfalls eine signifikant reduzierte PMN-Zahl im entzündeten Lungengewebe der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie im Vergleich zur ADAM17^{Tie2-} Kontrolle (G).

Die neutrophile Freisetzung von MPO und ELA2 in die BAL gilt als etablierter Marker der PMN-Aktivierung. In ADAM17^{Tie2-} Tieren wurde drei Stunden nach LPS-Inhalation eine signifikant erhöhte Freisetzung beider Enzyme in die BAL nachgewiesen. Der

endotheliale Knockout von ADAM17 führte dagegen zu einer hochsignifikanten Reduktion der Freisetzung von MPO (H) und ELA2 (I).

Zusammenfassend zeigen die Daten einen hochsignifikanten Einfluss von endothelialem ADAM17 auf die Aktivierung und Transmigration von PMNs in die entzündeten Lungenstrukturen. Durch das Fehlen der endothelialen Protease verblieben die PMNs adhären am Endothel und waren aktiv an der Transmigration in das Interstitium und in die Alveolen gehindert. Diese Ergebnisse belegen die zentrale Bedeutung von endothelialem ADAM17 für die Transmigration durch das Endothel und unterstreichen seine Schlüssel-funktion in der Interaktion zwischen Endothelzellen und PMNs. Zudem führte die Deletion von endothelialem ADAM17 zu einer signifikanten Reduktion der PMN-Aktivierung.

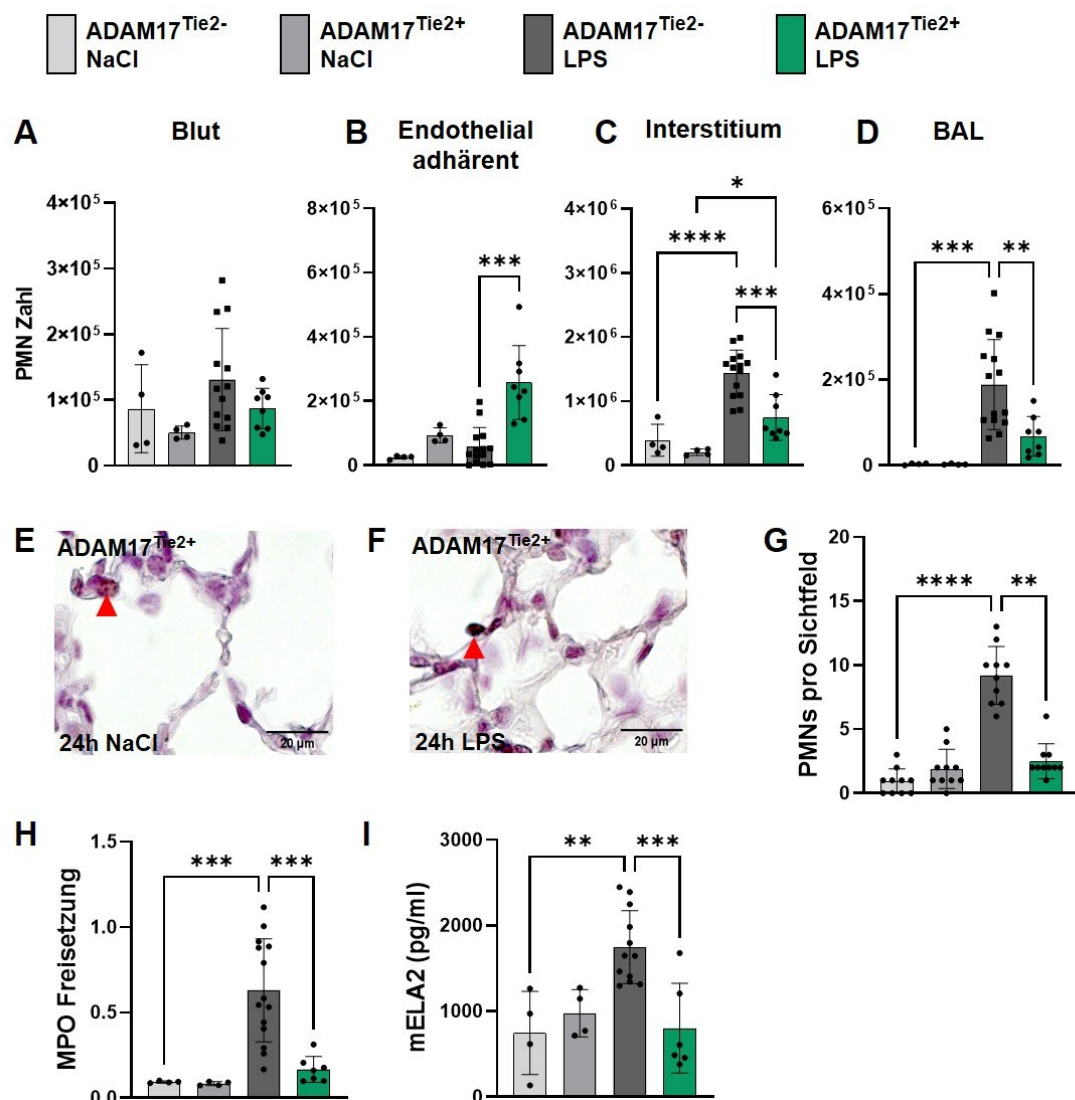


Abbildung 4.18: Bedeutung von endothelialem ADAM17 für die Aktivierung und in-vivo-Migration von PMNs in die entzündeten Lungenstrukturen. (A) Durchflusszytometrische Analyse der Migration von polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) in die verschiedenen Lungenstrukturen 24 Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation: (A) im Blut, (B) adhären am Endothel, (C) im Interstitium und (D) im

Alveolarraum. (E-F) Repräsentative Aufnahmen der immunhistochemischen PMN-Färbung (braun, markiert mit rotem Pfeil) im Lungengewebe (rosa, Gegenfärbung mit Mayer's Hämalaun) von ADAM17^{Tie2+} Tieren (Originalvergrößerung: x20). Die zugehörigen Aufnahmen der ADAM17^{Tie2-} Kontrollen sind der Abbildung 4.10 auf S. 90 zu entnehmen. (G) Statistische Auswertung der PMN-Zahl pro Sichtfeld (n=4 Tiere pro Gruppe und 10 ausgezählte Aufnahmen). Aktivierung der alveolären PMNs 24 Stunden nach LPS-Inhalation durch (H) Freisetzung von Myeloperoxidase (MPO) mittels semiquantitativer Analyse und (I) Konzentration der neutrophilen Elastase (ELA2) mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) in der bronchoalveolären Lavage (BAL). Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tiere mit den Natriumchlorid-(NaCl)-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tieren und den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren. Zusätzlich wurden die NaCl- und LPS-Gruppen der ADAM17^{Tie2+} Tiere und die beiden NaCl-Kontrollgruppen verglichen. Die dargestellten Daten der ADAM17^{Tie2-} Kontrollen wurden bereits in Abbildung 4.10 auf S. 90 gezeigt (Reduktion der Versuchstierzahl gemäß 3R-Prinzip). Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt (n=4/4/12-14/6-8). *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.18 A-I).

4.12. Regulation der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf PMNs durch den Knockout von ADAM17 auf Endothelzellen

Die Ergebnisse der in-vivo-Migrationsanalyse der PMNs in der Lunge der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie zeigten, dass ADAM17 auf der Oberfläche von Endothelzellen mit PMNs interagiert und deren Aktivierung moduliert. Für die Ausbildung stabiler Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen und PMNs sind Adhäsionsmoleküle wie L-Selektin (CD62L), PSGL-1 (CD162), VLA-4 (CD49d) und CD11b von zentraler Bedeutung, die bereits im ersten Teil der Arbeit nach systemischer ADAM17-Inhibition untersucht wurden. Die Auswirkung der endothelialen ADAM17-Deletion auf die Oberflächenexpression dieser neutrophilen Adhäsionsmoleküle wurde durchflusszytometrisch analysiert. Die Bestimmung der MFI von CD62L (A–C), CD162 (D–F), CD49d (G–I) und CD11b (J–L) erfolgte 24 Stunden nach LPS-Inhalation auf der PMN-Oberfläche in Blut, Lunge und BAL der ADAM17^{Tie2+} Knockouttiere (Abbildung 4.19).

CD62L war auf der Oberfläche vaskulärer PMNs der ADAM17^{Tie2+} Tiere im Vergleich zur ADAM17^{Tie2-} Kontrolle signifikant reduziert (A). In der Lunge zeigte sich kein verändertes Proteinexpressionsniveau (B), während in der BAL eine signifikant erhöhte Expression auf den PMNs der ADAM17^{Tie2+} Tiere nachgewiesen wurde (C). CD162 (PSGL-1) zeigte nach endothelialer ADAM17-Deletion eine signifikant erhöhte Oberflächenexpression auf PMNs in der Lunge und BAL (E-F). Im Vergleich zur Kontrolle war CD49d auf PMNs der ADAM17^{Tie2+} Tiere in allen drei untersuchten Kompartimenten, Blut, Lunge und BAL, signifikant erhöht (G-I). CD11b war infolge des endothelialen ADAM17-Knockouts auf der PMN-Oberfläche in der Lunge signifikant reduziert (K), während in Blut und BAL keine Veränderungen beobachtet wurden (J, L).

Das Fehlen von ADAM17 auf Endothelzellen beeinflusste insbesondere die Regulation der Adhäsionsmoleküle CD49d und PSGL-1 und zeigte hierbei Parallelen zur systemischen Inhibition mit GW280264X. Die hochsignifikante Hochregulation von CD49d und PSGL-1 korreliert mit der verstärkten Akkumulation von PMNs am Gefäßendothel und der damit einhergehenden reduzierten Migration in das Lungengewebe.

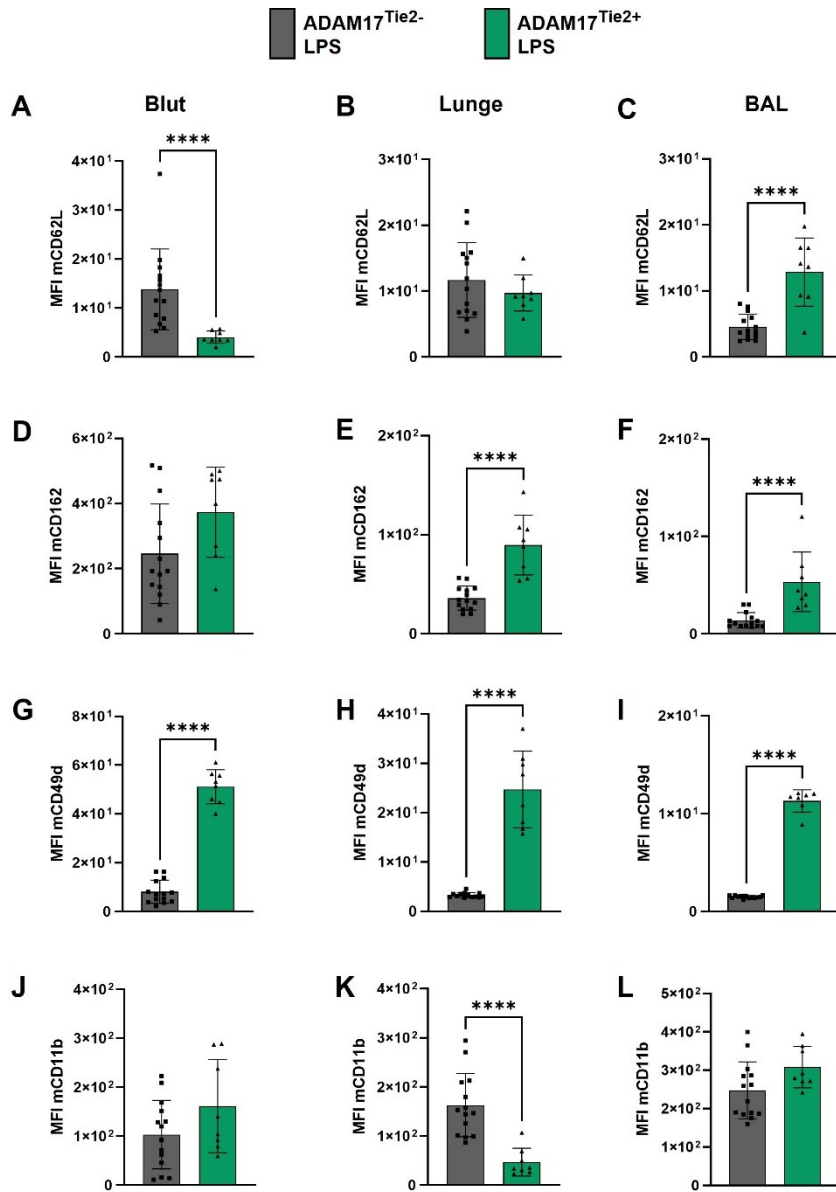


Abbildung 4.19: Regulation der neutrophilen Oberflächenexpression von CD62L, CD162, CD49d und CD11b nach endothelialer Deletion von ADAM17. Analyse der Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf polymorphkernigen Neutrophilen (PMNs) mittels Durchflusszytometrie in Blut, Lunge und bronchoalveolären Lavage (BAL). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) folgender muriner (m) Adhäsionsmoleküle: (A-C) CD62L (L-Selektin), (D-F) CD162 (PSGL-1), (G-I) CD49d (VLA-4) und (J-L) CD11b. Verglichen wurden jeweils die Lipopolysaccharid-(LPS)-stimulierten ADAM17^{Tie2}⁻ Tiere mit den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2}⁺ Tieren. Die dargestellten Daten der ADAM17^{Tie2}⁻ Kontrolltiere wurden bereits in Abbildung 4.11 auf S. 93 gezeigt (Reduktion der Versuchstierzahl gemäß 3R-Prinzip). Die Daten werden als Mittelwert ± SD dargestellt (n=13-14/7-8). ****p ≤ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.19 D-I).

4.13. Regulation der Zytokinfreisetzung in der ADAM17^{Tie2+}

Knockoutlinie

Abgesehen von der reduzierten Freisetzung von CXCL2/3 beeinflusste die systemische Inhibition mit TAPI-1 und GW280264X die Zytokinfreisetzung nicht. Aktiviertes Endothel steuert Entzündungsreaktionen, indem es die Barrierefunktion reguliert, Adhäsionsmoleküle und Chemokine exprimiert und freisetzt, mit Immunzellen interagiert und dadurch die Zytokinproduktion sowie das Ausmaß und die Dauer der Inflammation bestimmt.

Um zu untersuchen, in welchem Ausmaß endotheliales ADAM17 die Zytokin- und Chemokinfreisetzung in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation beeinflusst, wurde die ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie analysiert (Abbildung 4.20). Hierzu erfolgte die Quantifizierung der Zytokine (A) TNF- α , (B) IL-1 β , (C) CXCL2/3, (D) CX3CL1, (E) IL-6, (F) IL-10 sowie der löslichen ADAM17-Substrate (G) sIL-6R α und (H) sCD62L in der BAL drei Stunden nach LPS-Inhalation mittels ELISA.

Die durch LPS induzierte Freisetzung der Zytokine IL-1 β , CXCL2/3, IL-6 sowie des löslichen Rezeptors sIL-6R α war in den ADAM17^{Tie2+} Tieren im Vergleich zur ADAM17^{Tie2-} Kontrolle unverändert. Da LPS in der Knockoutlinie eine vergleichbare Freisetzung der proinflammatorischen Mediatoren induzierte, spielt endotheliales ADAM17 für die Regulation dieser Mediatoren offenbar keine wesentliche Rolle.

Drei Stunden nach LPS-Inhalation stieg die Proteinkonzentration von TNF- α in der BAL der ADAM17^{Tie2-} Tiere hochsignifikant an. Die endotheliale ADAM17-Deletion führte dagegen zu einer signifikant reduzierten Freisetzung von TNF- α in die BAL. Diese Daten zeigen, dass der endotheliale ADAM17-Knockout die Spaltung von membranständigem TNF- α hemmt und dadurch die Konzentration des löslichen TNF- α vermindert. Endotheliales ADAM17 spielt somit eine zentrale Rolle bei der Freisetzung von TNF- α während der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation.

Die Proteinkonzentration von CX3CL1 war in LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren im Vergleich zur stimulierten ADAM17^{Tie2-} Kontrolle signifikant erhöht. Die gesteigerte Freisetzung des löslichen Chemokins in die BAL weist auf eine Kompensation durch andere Proteasen, beispielsweise ADAM10, hin. Zudem könnte ADAM17 in anderen Zelltypen an der Spaltung und Freisetzung von CX3CL1 beteiligt sein.

Die Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 war in LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren im Vergleich zur ADAM17^{Tie2-} Kontrolle signifikant erhöht. Da IL-10

überschießende Immunreaktionen abschwächen und Gewebeschädigungen begrenzen kann, deutet die endotheliale ADAM17-Deletion auf einen zusätzlichen protektiven Effekt im Sinne einer Begrenzung der pulmonalen Inflamationsreaktion hin.

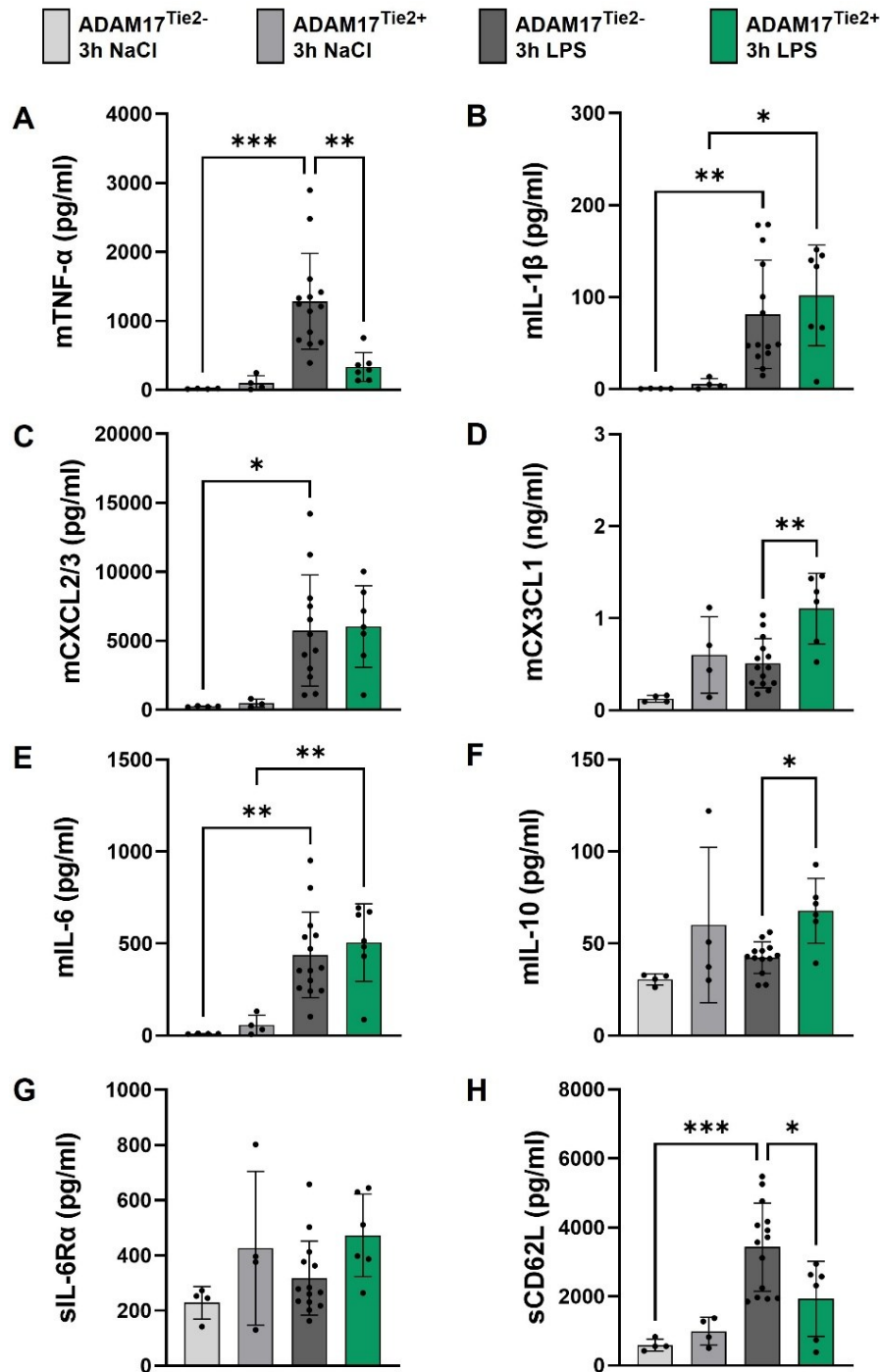


Abbildung 4.20: Auswirkung des Knockouts von endothelialem ADAM17 auf die Freisetzung von Zytokinen und ADAM17-Substraten in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation. Zum Zeitpunkt drei Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation wurde die Freisetzung folgender muriner (m) Zytokine und *A Disintegrin and Metalloproteinase 17* (ADAM17)-Substrate in die Alveolen über die Konzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL) mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) bestimmt: (A) Tumornekrosefaktor-α (TNF-α), (B) Interleukin-1β (IL-1β), (C) C-X-C Motiv Chemokin Ligand 2/3

(CXCL2/3), (D) Fraktalkin (CX3CL1), (E) Interleukin-6 (IL-6), (F) Interleukin-10 (IL-10), (G) löslicher Interleukin-6-Rezeptor-alpha (sIL-6R α) und (H) lösliches L-Selektin (sCD62L). Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tiere mit den Natriumchlorid-(NaCl)-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tieren und den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren. Zusätzlich wurden die NaCl- und LPS-Gruppen der ADAM17^{Tie2+} Tiere und die beiden NaCl-Kontrollgruppen verglichen. Die dargestellten Daten der ADAM17^{Tie2-} Kontrolltiere wurden bereits in Abbildung 4.12 auf S. 95 gezeigt (Reduktion der Versuchstierzahl gemäß 3R-Prinzip). Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt (n=4/3-4/12-14/6-7). *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.20 A, F, H).

Das Adhäsionsmolekül CD62L wird primär auf der Leukozytenoberfläche exprimiert und ist für das Rollen auf dem Gefäßendothel essenziell. Die ADAM17-vermittelte Spaltung von membranständigem CD62L ermöglicht das Auswandern von Leukozyten aus der Blutbahn in das entzündete Gewebe. Nach LPS-Inhalation wurde in ADAM17^{Tie2-} Tieren eine signifikant erhöhte Freisetzung von löslichem sCD62L in die BAL beobachtet. Im Vergleich dazu war die Freisetzung von sCD62L in LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren nach Deletion von endothelialem ADAM17 signifikant reduziert. Die verminderte Spaltung von CD62L könnte die im in-vivo-Migrationsversuch beobachtete verstärkte Akkumulation von PMNs am Gefäßendothel in ADAM17^{Tie2+} Tieren erklären. Endotheliales ADAM17 ist somit von zentraler Bedeutung für die Spaltung von CD62L und für die Transmigration von PMNs aus der Blutbahn in das entzündete Lungengewebe.

Zusammenfassend führte der Knockout von ADAM17 in Endothelzellen zu einer reduzierten Freisetzung von TNF- α und löslichem CD62L. Zudem erhöhte die Deletion von endothelialem ADAM17 die Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Diese Befunde korrelieren direkt mit der reduzierten Aktivierung und Transmigration von PMNs in die entzündeten Lungenstrukturen. Die verminderte Spaltung von CD62L könnte zusätzlich die erhöhte Akkumulation von PMNs am Endothel erklären.

4.14. Bedeutung von endothelialem ADAM17 auf die Regulation der mikrovaskulären Permeabilität und endothelialer Adhäsionsmoleküle

Die systemische Inhibition von ADAM17 beeinflusste die Regulation neutrophiler und endothelialer Adhäsionsmoleküle sowie das Ausmaß der mikrovaskulären Permeabilität und zeigte damit einen protektiven Effekt auf den Erhalt der endothelialen Barrierefunktion. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde daher die Hypothese formuliert, dass endotheliales ADAM17 in der akuten pulmonalen Inflammation eine Schlüsselrolle bei der Regulation der mikrovaskulären Permeabilität und der PMN-Migration in das entzündete

Lungengewebe einnimmt. Die Bedeutung von endotheliale ADAM17 für die PMN-Migration wurde bereits in Kapitel 4.11 untersucht. Zur Analyse seiner Rolle bei der Regulation der endothelialen Barriere (Abbildung 4.21) wurden folgende komplementäre Untersuchungen durchgeführt: die Gesamtproteinbestimmung in der BAL (A), die histologische Analyse der Septendicke (B–D), die Bestimmung der JAM-A-Expression (E), der Evans Blue Extravasations-Assay (F-G) sowie die Analyse der VE-Cadherin-Expression (Abbildung 4.22).

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in der BAL erfolgte 24 Stunden nach LPS-Inhalation mittels BCA-Assay (A). LPS induzierte in ADAM17^{Tie2-} Tieren im Vergleich zur NaCl-Negativkontrolle eine signifikant erhöhte Gesamtproteinkonzentration in der BAL. Der endotheliale Knockout von ADAM17 führte in LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren im Vergleich zur Kontrolle zu einem signifikant reduzierten Austritt von Plasmaproteinen aus der Blutbahn in den Alveolarraum, was auf eine stabilisierte Barrierefunktion hinweist.

Die Lungenarchitektur der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie wurde anhand der Septendicke mittels Mayer's Hämalaun-Färbung untersucht und mit der ADAM17^{Tie2-} Kontrolle verglichen. In Abbildung 4.21 B-C sind repräsentative Aufnahmen muriner Lungenschnitte der ADAM17^{Tie2+} Tiere dargestellt. Die entsprechenden Aufnahmen der ADAM17^{Tie2-} Kontrollen befinden sich in Abbildung 4.13 auf S. 99. Die histologischen Analysen und die zugehörige Statistik (D) zeigten, dass es in LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren weder zu einer Destruktion der Lungenarchitektur noch zu einer Verdickung der Alveolarsepten kam. Die Messung der Septendicke ergab eine hochsignifikante Reduktion in der Knockoutlinie (D).

Endotheliales JAM-A spielt eine zentrale Rolle bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten zwischen Endothelzellen. Seine Regulation ist sowohl für die Aufrechterhaltung der Endothelbarriere als auch für die Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität entscheidend. Die Oberflächenexpression von JAM-A auf pulmonalen Endothelzellen wurde 24 Stunden nach LPS-Inhalation durchflusszytometrisch bestimmt (E). Die MFI von JAM-A war in ADAM17^{Tie2-} Tieren infolge von LPS signifikant erhöht, während der Knockout von endotheliale ADAM17 zu einer signifikant reduzierten Expression führte.

Der Evans Blue Extravasations-Assay wurde, wie in Kapitel 4.8 auf S. 97 beschrieben, sechs Stunden nach LPS-Inhalation durchgeführt. Unter physiologischen Bedingungen

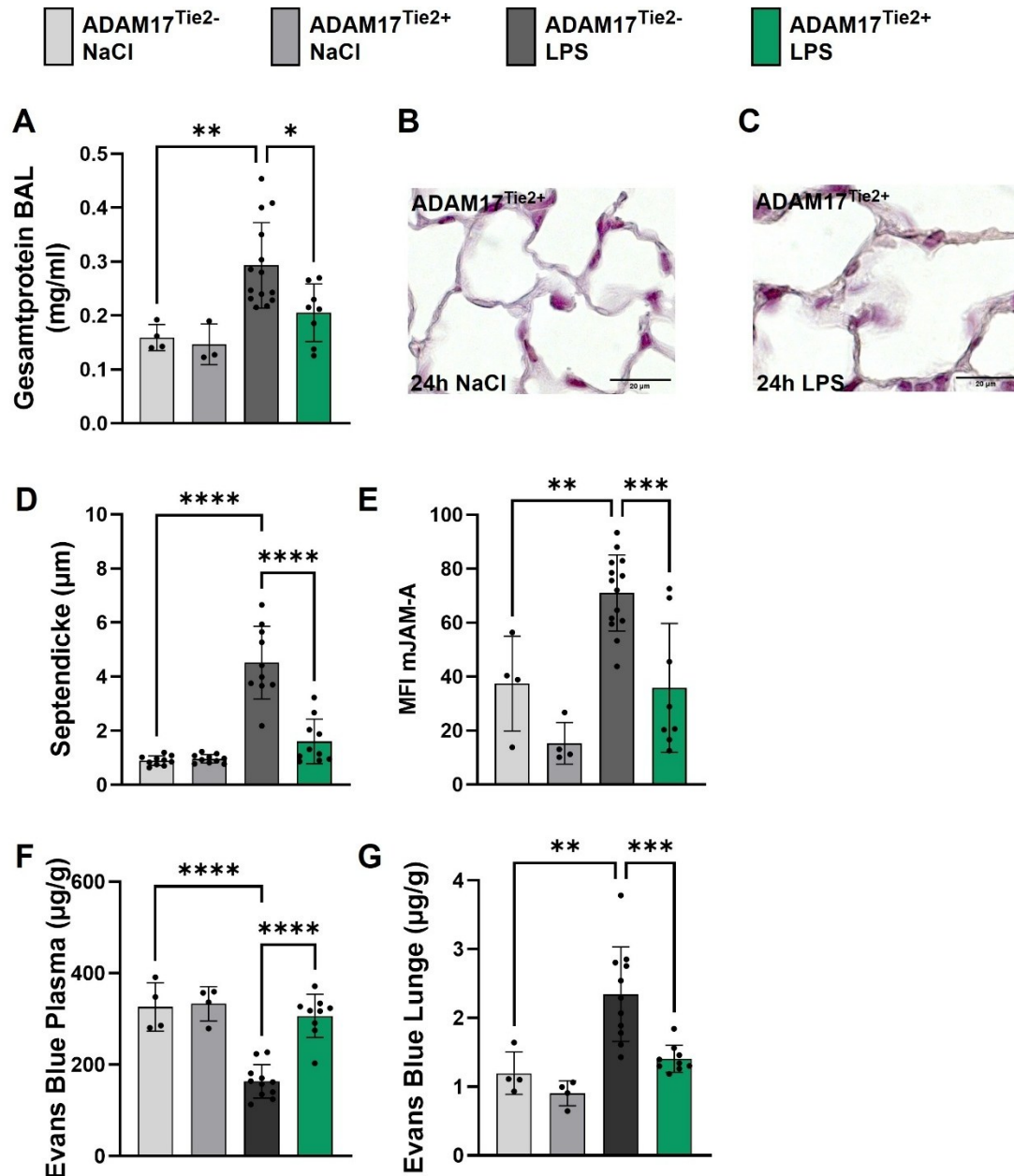


Abbildung 4.21: Bedeutung von endothelialem ADAM17 auf die mikrovaskuläre Permeabilität. (A) Gesamtproteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage (BAL) 24 Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation bestimmt mittels *bicinchoninic acid*-(BCA)-Assay. (B-C) Repräsentative Aufnahmen immunhistologischer Färbungen von murinem Lungengewebe (Mayer's Hämalaun) zur Visualisierung der Lungenarchitektur und Alveolarseptendicke von ADAM17^{Tie2+} Tieren. Die zugehörigen Aufnahmen der ADAM17^{Tie2-} Kontrollen sind in Abbildung 4.13 auf S. 99 dargestellt. (D) Statistische Auswertung der Septendicke mittels ImageJ (n=4 Tiere pro Gruppe mit jeweils 10 Messungen). (E) Durchflusszytometrische Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von murinem (m) *junctional adhesion molecule A* (JAM-A) auf pulmonalen Endothelzellen 24 Stunden nach LPS-Inhalation. Photometrische Quantifizierung von Evans Blue im (F) Plasma und (G) Lungengewebe sechs Stunden nach LPS-Inhalation. Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tiere mit den Natriumchlorid-(NaCl)-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tieren und den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+} Tieren. Zusätzlich wurden die NaCl- und LPS-Gruppen der ADAM17^{Tie2+} Tiere und die NaCl-Kontrollen verglichen. Die dargestellten Daten der ADAM17^{Tie2-} Kontrolltiere wurden bereits in Abbildung 4.13 auf S. 99 gezeigt (Reduktion der Versuchstierzahl gemäß 3R-Prinzip). Die Daten werden als Mittelwert ± SD dargestellt (n=4/3-4/11-14/8-9). *p ≤ 0,05, **p ≤ 0,01, ***p ≤ 0,001, ****p ≤ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.21 A-G).

zeigten ADAM17^{Tie2-} und ADAM17^{Tie2+} Tiere in der NaCl-Kontrolle keine Unterschiede in der Evans-Blue-Konzentration in Plasma und Lunge. Sechs Stunden nach LPS-Inhalation war die Evans-Blue-Konzentration im Plasma der ADAM17^{Tie2-} Kontrolltiere im Vergleich zu den NaCl-Kontrollen signifikant reduziert, während sie in ADAM17^{Tie2+} Tieren unverändert blieb (Abbildung 4.21 F). Entsprechend stieg die Konzentration von extravasierten Evans Blue im Lungengewebe der ADAM17^{Tie2-} Kontrolltiere signifikant an, während in ADAM17^{Tie2+} Tieren signifikant weniger Evans Blue in das Lungengewebe extravasierte (Abbildung 4.21 G).

Abbildung 4.22 zeigt, wie das Fehlen von ADAM17 in Endothelzellen die Gen- und Proteinexpression des Adhäsionsmoleküls VE-Cadherin beeinflusst. Drei Stunden nach LPS-Inhalation war die Genexpression von VE-Cadherin im Lungengewebe von ADAM17^{Tie2-} Tieren im Vergleich zur NaCl-Negativkontrolle signifikant erhöht (A). In der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie war das Transkriptionsniveau von VE-Cadherin im Vergleich zu den Kontrolltieren nach LPS-Inhalation signifikant reduziert.

In den Kontrolltieren induzierte LPS eine verstärkte Spaltung von VE-Cadherin, die über eine erhöhte Konzentration von löslichem sVE-Cadherin in der BAL quantifiziert wurde (B). Drei Stunden nach LPS-Inhalation führte der endotheliale Knockout von ADAM17 im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikant reduzierten Proteinkonzentration von sVE-Cadherin in der BAL, was auf eine verminderte proteolytische Spaltung des Adhäsionsmoleküls hinweist.

Die statistische Auswertung der VE-Cadherin-Proteinexpression auf pulmonalen Endothelzellen (C) sowie die repräsentativen Immunfluoreszenzaufnahmen (D–E) der ADAM17^{Tie2+} Tiere bestätigen die mittels ELISA gewonnenen Ergebnisse. Die entsprechenden Aufnahmen der ADAM17^{Tie2-} Kontrollen sind in Abbildung 4.14 auf S. 101 dargestellt. Die LPS-Inhalation führte in ADAM17^{Tie2-} Tieren zu einer signifikant reduzierten Expression von VE-Cadherin auf pulmonalen Endothelzellen im Vergleich zur NaCl-Kontrolle. Der Knockout von endotheliale ADAM17 resultierte hingegen in einer signifikant erhöhten VE-Cadherin-Proteinexpression und einer deutlich verminderten *Gap-Formation* zwischen Endothelzellen im Vergleich zu den stimulierten Kontrollen. Auffällig war, dass die Oberflächenexpression von VE-Cadherin in ADAM17^{Tie2+} Tieren nach LPS-Inhalation sogar signifikant höher war als in der NaCl-Negativkontrolle.

Die Spaltprodukte von VE-Cadherin wurden ergänzend mittels Western Blot-Analyse untersucht. Dabei zeigten sich zwei unterschiedliche Spaltungszustände von VE-Cadherin

im Lungengewebe (F–G). Diese Unterschiede könnten auf eine proteolytische Spaltung durch andere Proteasen wie ADAM10 oder auf eine ADAM17-vermittelte Spaltung in anderen Zelltypen des Lungengewebes zurückzuführen sein. In der NaCl-Negativkontrolle der ADAM17^{Tie2-} Tiere war neben dem Gesamtprotein (125 kDa) auch die Spaltung in 90 kDa- und 75 kDa-Fragmente nachweisbar, wobei insbesondere das 75 kDa-Fragment stark exprimiert war. LPS induzierte eine verstärkte proteolytische Spaltung von VE-Cadherin und führte zu einer deutlich reduzierten Expression aller Fragmente.

Die NaCl-Kontrolle der ADAM17^{Tie2+} Tiere zeigte entweder eine hohe Expression der 75 kDa-Bande oder des Gesamtproteins (125 kDa) ohne nachweisbare Spaltung. Das Fehlen von ADAM17 auf Endothelzellen resultierte somit in einer Hemmung der Spaltung von VE-Cadherin, was sich in einer ausgeprägten Expression des Gesamtproteins (125 kDa) zeigte (F). In anderen Fällen waren das 90 kDa- und 75 kDa-Fragment vorhanden, jedoch deutlich stärker exprimiert als in den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-} Tieren (G). Das C-terminale Fragment (35 kDa) war auf den Western Blots nicht detektierbar und wurde daher nicht dargestellt. Die vollständigen Membranen sind im Anhang in Abbildung 8.1 auf S. 167 dokumentiert.

Die Ergebnisse der Permeabilitätsanalysen belegen einen hochsignifikanten Einfluss von endothelalem ADAM17 auf die Regulation der Endothelbarriere und die mikrovaskuläre Permeabilität. In der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation war das Fehlen von endothelalem ADAM17 mit einer deutlich geringeren mikrovaskulären Permeabilität und dem Erhalt der Endothelbarriere assoziiert. In ADAM17^{Tie2+} Tieren führte die LPS-Inhalation weder zu einer Destruktion der Lungenarchitektur mit aufgeschwemmten Alveolarsepten noch zur Ausbildung eines ausgeprägten proteinreichen Lungenödems. Zudem war die Regulation von JAM-A und VE-Cadherin auf Endothelzellen in den ADAM17^{Tie2+} Tieren protektiv beeinflusst.

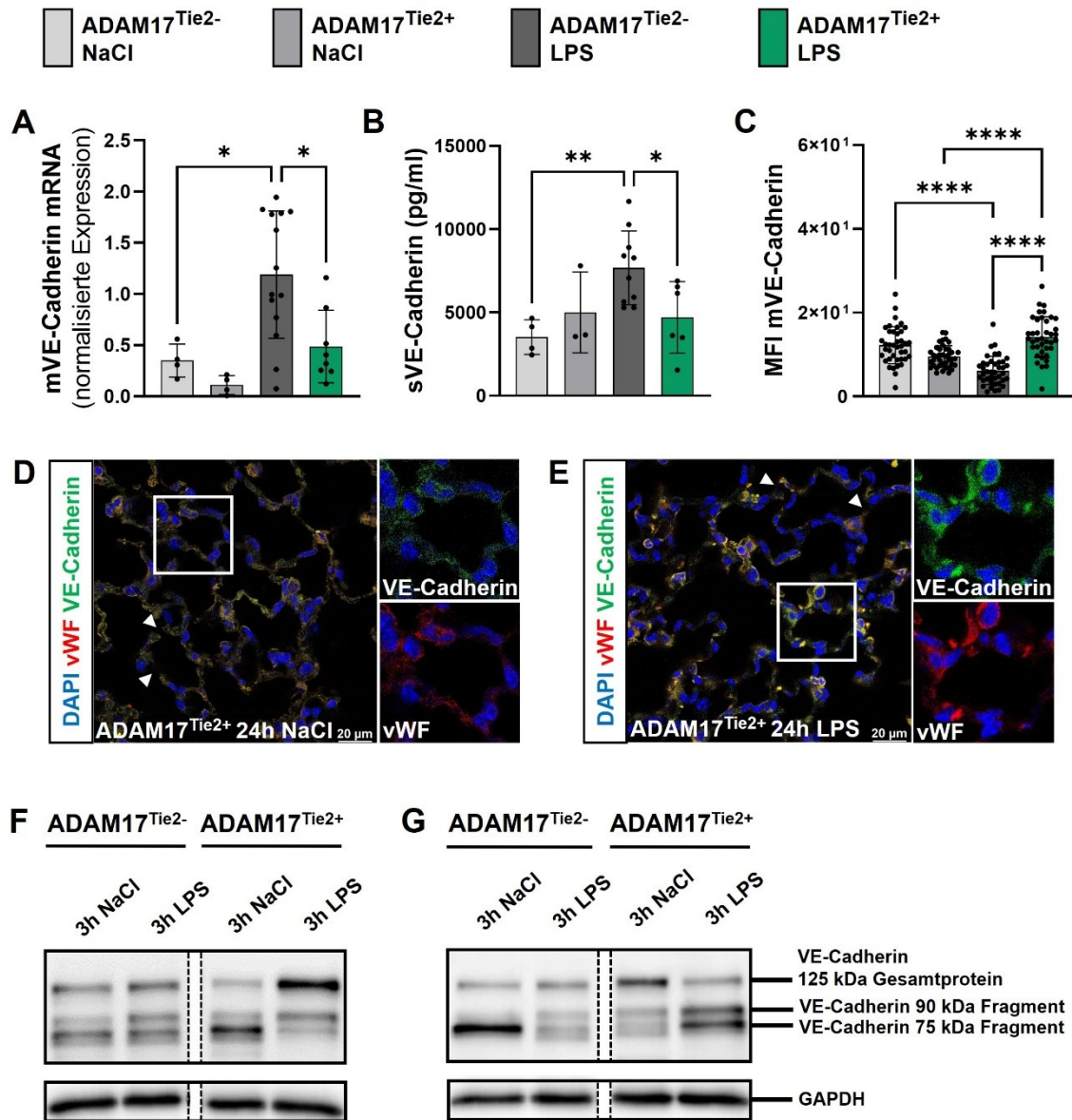


Abbildung 4.22: Modulation von VE-Cadherin auf Endothelzellen im Lungengewebe durch endotheliales ADAM17. (A) Genexpression von *vascular endothelial*-(VE)-Cadherin in murinem Lungengewebe von ADAM17^{Tie2-/-} Tieren und ADAM17^{Tie2+/-} Tieren drei Stunden nach Lipopolysaccharid-(LPS)-Inhalation mittels RT-qPCR (n=4/4/14/8). (B) Proteinexpression von löslichem sVE-Cadherin in der bronchoalveolären Lavage (BAL) drei Stunden nach LPS-Exposition mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) (n=4/3/10/6). (C) Oberflächenexpression von VE-Cadherin auf pulmonalen Endothelzellen mittels Immunfluoreszenzfärbung zum Zeitpunkt 24 Stunden nach induzierter LPS-Entzündung (n=4 Tiere pro Gruppe mit 10 Messungen je Aufnahme). (D-E) Repräsentative Immunfluoreszenzaufnahmen der Proteinexpression von VE-Cadherin auf Endothelzellen im Lungengewebe von ADAM17^{Tie2+/-} Tieren zu den genannten Bedingungen (Originalvergrößerung: x63). Die zugehörigen Aufnahmen der ADAM17^{Tie2-/-} Kontrollen sind der Abbildung 4.14 auf S. 101 zu entnehmen. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (blau), die Endothelzellen mit von-Willebrand-Faktor (vWF) (rot) und VE-Cadherin (grün) angefärbt. (F-G) Western Blot-Analyse zur Bestimmung der VE-Cadherin Spaltprodukte zu den genannten Bedingungen (n=4). Verglichen wurden jeweils die LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2-/-} Tiere mit den Natriumchlorid-(NaCl)-stimulierten ADAM17^{Tie2-/-} Tieren und den LPS-stimulierten ADAM17^{Tie2+/-} Tieren. Zusätzlich wurden die NaCl- und LPS-Gruppen der ADAM17^{Tie2+/-} Tiere und die NaCl-Kontrollen verglichen. Die dargestellten Daten der ADAM17^{Tie2-/-} Kontrolltiere wurden bereits in Abbildung 4.14 auf S. 101 gezeigt (Reduktion der Versuchstierzahl gemäß 3R-Prinzip). Die Daten werden als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt. *p $\leq$ 0,05, **p $\leq$ 0,01, ***p $\leq$ 0,001, ****p $\leq$ 0,0001. (Vermerk: Artikel „Endothelial ADAM17 Promotes Neutrophil Migration and Pulmonary Microvascular Permeability in Acute Respiratory Distress Syndrome“ in Vorbereitung mit Inhalt Abbildung 4.22 A-E).

4.15. Zusammenfassung der Ergebnisse

Während der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation wurde die transkriptionelle und translationale ADAM17-Expression im Lungengewebe deutlich hochreguliert. Die systemische Inhibition mit TAPI-1 und GW280264X führte zu einer reduzierten Proteinexpression von ADAM17. Die Kombination aus in-vivo-Genexpressionsanalyse und in-vitro-siRNA-Transfektionsstudien in HMVEC-L zeigte, dass zwischen ADAM17 und den Rezeptoren TNFR1 bzw. IL-6R α vermutlich eine bidirektionale Rückkopplungsschleife besteht. ADAM17 modulierte in diesen Signalwegen die nachgeschalteten Gene NF- κ B, JNK, TRADD, CREB, JAK1 und STAT3.

Die in-vitro-Inhibition von ADAM17 führte zu einer reduzierten PMN-Migration in einem fMLP-Gradienten sowie zu einer verminderten Transmigration durch eine Endothel- und Epithelzellschicht. Die Interaktion der PMNs mit vorbehandelten Zellschichten verringerte deren Aktivierung, was sich in einer reduzierten MPO-Freisetzung und einer veränderten Expression der Adhäsionsmoleküle CD62L, CD44, CD11b und JAM-A widerspiegelte.

In vivo zeigte die systemische ADAM17-Inhibition eine reduzierte PMN-Migration in das Interstitium, während die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 den Effekt verstärkte, was sich in einer erhöhten PMN-Akkumulation am Endothel und einer signifikant verminderten Migration in das Interstitium und den Alveolarraum äußerte. Die Freisetzung von MPO und ELA2 in die BAL blieb weitgehend unbeeinflusst. Die durch GW280264X induzierte erhöhte Oberflächenexpression von PSGL-1 und CD49d korrelierte mit der beobachteten verstärkten PMN-Akkumulation am Gefäßendothel und der reduzierten Migration in die Lunge.

Die systemische ADAM17-Inhibition beeinflusste die Zytokinfreisetzung mit Ausnahme von CXCL2/3 nicht, zeigte jedoch einen direkten Effekt auf die mikrovaskuläre Permeabilität. Die Inhibition verhinderte eine Destruktion der Lungenarchitektur mit aufgeschwemmten Alveolarsepten und die Ausbildung eines proteinreichen Lungenödems. Zudem modulierte ADAM17 die Adhäsionsmoleküle JAM-A und VE-Cadherin auf pulmonalen Endothelzellen.

Nach erfolgreicher Validierung des gewebespezifischen Knockouts in der generierten ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie wurde der Einfluss von endothelialem ADAM17 auf die TNFR1- und IL-6R α -Signalwege untersucht. Im Vergleich zur systemischen Inhibition zeigte die endotheliale ADAM17-Deletion einen verstärkten Effekt auf die Regulation der

Transkriptionslevel von TNFR1, IL-6R α und deren nachgeschalteter Gene (NF- κ B, JNK, TRADD, CREB, JAK1, STAT3).

Die in-vivo-Migrationsanalyse belegte die zentrale Rolle von endothelialem ADAM17 bei der Aktivierung und Transmigration von PMNs durch das Endothel in die entzündeten Lungenstrukturen. Das Fehlen von ADAM17 auf Endothelzellen führte dazu, dass PMNs am Endothel verblieben und aktiv an der Transmigration in das Interstitium und die BAL gehindert wurden. Gleichzeitig war die Freisetzung der neutrophilen Aktivitätsmarker MPO und ELA2 in die BAL signifikant reduziert.

Die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle CD49d und PSGL-1 zeigte Parallelen zur systemischen Inhibition und korrelierte mit der verstärkten PMN-Akkumulation am Gefäßendothel sowie der reduzierten Migration in das Lungengewebe. Darüber hinaus belegen die Daten, dass endotheliales ADAM17 einen direkten Einfluss auf die Freisetzung von TNF- α und löslichem CD62L ausübt und somit ebenfalls die PMN-Transmigration reguliert. Die Permeabilitätsanalysen zeigten einen hochsignifikanten Einfluss von endothelialem ADAM17 auf die Regulation der Endothelbarriere und die mikrovaskuläre Permeabilität. Endotheliales ADAM17 begünstigte die Destruktion der Lungenarchitektur, die Verdickung der Alveolarsepten und die Ausbildung eines proteinreichen Lungenödems. Dagegen wirkte das Fehlen von ADAM17 auf Endothelzellen über die Regulation von JAM-A und VE-Cadherin protektiv.

Zusammenfassend führte die Deletion von ADAM17 auf Endothelzellen im Vergleich zur systemischen Inhibition in allen untersuchten Parametern zu einer deutlich abgeschwächten Ausprägung der Hauptmerkmale der akuten pulmonalen Inflammation. Die erhobenen Daten belegen nachweislich folgende Kernergebnisse:

- ADAM17 wird in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation hochreguliert.
- Die systemische ADAM17-Inhibition reduziert die LPS-induzierte pulmonale Inflammation.
- ADAM17 reguliert über TNFR1 und IL-6R α .
- Endotheliales ADAM17 verstärkt die PMN-Migration in das Interstitium und den bronchoalveolären Raum.
- Endotheliales ADAM17 fördert den Verlust der endothelialen Barriere und die Entstehung eines proteinreichen Lungenödems.
- Endotheliales ADAM17 verstärkt die pulmonale Inflammation in den Alveolen.

5. Diskussion

5.1. ADAM17-Expression in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation

ADAM17 wird in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation hochreguliert. Im hier verwendeten murinen Modell des ARDS induzierte LPS eine Hochregulierung der ADAM17-mRNA-Expression im gesamten Lungengewebe. Darüber hinaus zeigte sich nach LPS-Applikation eine verstärkte Proteinexpression von pulmonalem ADAM17. Über die Regulation der ADAM17-Transkription ist in der akuten pulmonalen Inflammation bislang wenig bekannt. Dennoch stellt sie neben der Modulation der Enzymaktivität einen zentralen Mechanismus der Proteaseregulation dar. Eine erhöhte ADAM17-Expression kann zu einer verstärkten Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren und Adhäsionsmoleküle beitragen und somit die Entzündungsreaktion intensivieren.

Eine Expressionsstudie zeigte, dass ADAM17 in humanem Lungengewebe weit verbreitet exprimiert ist und die Expression in den chronisch-entzündlichen Lungenerkrankungen Asthma und COPD hochreguliert wird (Dijkstra et al., 2009). In vitro detektierten Dreymueller et al. in HMVEC-L einen Anstieg der ADAM17-mRNA-Expression, wobei LPS neben der erhöhten Transkription auch eine verstärkte *Shedding*-Aktivität induzierte (Dreymueller et al., 2012a). In Übereinstimmung mit den murinen Daten dieser Arbeit zeigten Dreymueller et al. nach intranasaler LPS-Applikation eine erhöhte ADAM17-mRNA-Expression in Kontrollmäusen. Die ADAM10-Transkription blieb hingegen unbeeinflusst, weshalb die Autoren die Hypothese aufstellten, dass ADAM17 als regulierende Protease bei LPS-induzierten Entzündungsreaktionen eine übergeordnete Rolle spielt (Dreymueller et al., 2012a).

Weitere Studien zeigen, dass ADAM17 häufig in Tumoren oder unter inflammatorischen Bedingungen überexprimiert ist. In den humanen promyelozytären Leukämiezellen HL-60 sowie in adhärennten Milzzellen führte LPS ebenfalls zu einer erhöhten ADAM17-mRNA-Expression (Ding et al., 2001). In humanen Alveolarmakrophagen wurde eine LPS-induzierte Hochregulierung von ADAM17 durchflusszytometrisch nachgewiesen und eine Korrelation zwischen Proteinexpression und katalytischer Aktivität der Protease belegt (Armstrong et al., 2006).

Auch in Endothelzellen induzierte LPS eine Hochregulierung der Protease, wobei in humanen primären Endothelzellen aus Nabelschnurblut eine erhöhte ADAM17-Expression

nachgewiesen werden konnte (He et al., 2025). Darüber hinaus führten die proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 β in murinen Endothelzellen ebenfalls zu einer gesteigerten ADAM17-Expression (Wawro et al., 2019).

Die genannten Studien stützen und erweitern die Beobachtungen einer LPS-induzierten Hochregulierung von ADAM17 im entzündeten Lungengewebe.

5.2. Einfluss von ADAM17 auf Mechanismen der akuten pulmonalen Inflammation

ADAM17 beeinflusste die Mechanismen der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation auf mehreren Ebenen: die Aktivierung der proinflammatorischen TNF- und IL-6-Signalwege, die Chemotaxis und Rekrutierung von PMNs, die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren sowie die Regulation der mikrovaskulären Permeabilität. Der Einfluss von ADAM17 auf diese Prozesse wurde in vivo im murinen ARDS-Modell mittels systemischer Inhibition durch TAPI-1 (ADAM17-Inhibitor) und GW280264X (ADAM17/ADAM10-Inhibitor) untersucht. Ergänzend erfolgten in vitro siRNA-Analysen sowie Chemotaxis- und Transmigrationsassays.

In der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation modulierte ADAM17 die Aktivierung der proinflammatorischen TNF- und IL-6-Signalwege, was sich nach ADAM17-Inhibition in einer reduzierten mRNA-Transkription und Proteinexpression der zugehörigen Rezeptoren manifestierte. Die in-vivo-Genexpressionsanalyse und die in-vitro-siRNA-Transfektion in HMVEC-L zeigten, dass zwischen ADAM17 und TNFR1 bzw. IL-6R α vermutlich eine bidirektionale Rückkopplungsschleife besteht und dass die Protease diese Signalwege über die Gene NF- κ B, JNK, TRADD, CREB, JAK1 und STAT3 moduliert. Die LPS-Applikation erhöhte die Expression von TNFR1 und IL-6R α in murinem Lungengewebe und HMVEC-L. TNFR1 vermittelt die proinflammatorischen Signale von TNF- α und trägt wesentlich zur Entwicklung der LPS-induzierten pulmonalen Entzündungsreaktion bei (Skerrett et al., 1999). Mehrere Studien zeigen, dass LPS die TNFR1-Expression in verschiedenen Zelltypen hochreguliert (Wang et al., 2024, Skurski et al., 2020), unter anderem in murinen Lungenorganoiden (Li et al., 2024) und besonders in Makrophagen (Lively et al., 2018). Neben TNF- α setzen Alveolarmakrophagen nach Stimulation auch große Mengen IL-6 frei, welches nach Bindung an membranständige oder lösliche IL-6R sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte vermitteln kann. IL-6 bindet an sIL-6R und bildet einen Komplex, der an Zelltypen ohne mIL-6R an das

Signalmolekül gp130 bindet. Da nur wenige Zelltypen mIL-6R exprimieren, erweitert das sogenannte *Trans-Signaling* das Wirkspektrum von IL-6 erheblich, insbesondere auf Endothelzellen (Scheller et al., 2011b, Montgomery et al., 2021). Das *Trans-Signaling* über den sIL-6R gilt als treibende Kraft überschießender Entzündungsreaktionen in der Lunge (Le et al., 2014). ADAM17 vermittelt das proteolytische *Shedding* von mTNFR1 und mIL-6R, wodurch die Rezeptoren von der Zellmembran abgespalten und in löslicher Form freigesetzt werden. Dies reduziert zunächst den Anteil membrangebundener Rezeptoren, während LPS gleichzeitig die Gesamtmenge dieser Rezeptoren auf Transkriptions- und Proteinebene hochreguliert. Demnach wäre nach Hemmung des ADAM17-vermittelten *Sheddings* durch TAPI-1 bzw. GW280264X eher eine unveränderte oder erhöhte Rezeptorexpression nach LPS-Stimulation zu erwarten (Dusterhoft et al., 2014, Riethmueller et al., 2016, Zunke et al., 2017, Fritsch et al., 2021). Tatsächlich waren mRNA- und Proteinexpression jedoch reduziert. Diese zunächst unerwartete Beobachtung lässt sich durch eine insgesamt abgeschwächte Entzündungsreaktion nach ADAM17-Inhibition erklären (Schumacher et al., 2022, Saad et al., 2024, Zunke et al., 2017). Da ADAM17 über das *Shedding* nur die Proteinexpression, nicht aber direkt die mRNA-Transkription der Rezeptoren beeinflusst, ist die verminderte mRNA-Expression vermutlich sekundär auf eine reduzierte Zellaktivierung im Rahmen der abgeschwächten Inflammation zurückzuführen. Die in-vitro-siRNA-Analyse in HMVEC-L ergab zudem, dass ADAM17 insbesondere über TNFR1 reguliert und diesen Signalweg über TRADD, JNK, CREB, NF- κ B, JAK1 und STAT3 moduliert. Nach Hemmung von IL-6R α blieben die durch ADAM17-Inhibition vermittelten Reduktionen der mRNA-Expression der untersuchten Gene bestehen. Dies spricht dafür, dass ADAM17 nicht ausschließlich oder primär über diesen Rezeptor reguliert. Das Fehlen von IL-6R α könnte z. B. durch TNFR1 nach dem Prinzip der Signalweg-Redundanz kompensiert worden sein, sodass ADAM17 weiterhin die reduzierte Genexpression der genannten Faktoren induzieren konnte. Vergleichbare Literatur existiert für Teilaspekte dieser Schlussfolgerung, etwa dass TNF α über TNFR1 einzelne der genannten Adaptorproteine aktiviert (Webster et al., 2020, Gough et al., 2020, Li et al., 2025). Die Beobachtung, dass nach IL-6R α -Hemmung ADAM17 weiterhin über TNFR1 die mRNA-Reduktion dieser Faktoren bewirkt, ist derzeit nicht in einer vergleichbaren Studie publiziert.

ADAM17 beeinflusste die Chemotaxis und Rekrutierung humaner und muriner PMNs in vitro und in vivo. Die in-vitro-Inhibition von ADAM17 bzw. die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 auf der Oberfläche humaner PMNs reduzierte deren Migrationsverhalten in einem fMLP-Gradienten eines eindimensionalen Chemotaxis-Assays. Es liegen

nur wenige in-vitro-Studien zum Einfluss von ADAM17 auf das PMN-Migrationsverhalten vor. Pruessmeyer et al. zeigten eine verringerte CCL2-induzierte Chemotaxis von THP-1-Zellen nach Vorbehandlung mit TAPI-1 (Pruessmeyer et al., 2014). In einer weiteren Studie zeigten Pruessmeyer et al., dass ADAM10 und ADAM17 die transendotheliale Migration von Neutrophilen beeinflussen. In vitro reduzierte GW280264X die IL-8-induzierte Transmigration um 70 % (Dreymueller et al., 2012a). Diese Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit durch einen dreidimensionalen Transmigrationsassay ergänzt, in dem ein Doppellayer aus Endothel- und Epithelzellen mit den jeweiligen Inhibitoren vorbehandelt wurde. Die Inhibitionsexperimente zeigten, dass sowohl ADAM17 als auch ADAM10 die transendotheliale PMN-Migration in vitro fördern. Die Interaktion der PMNs mit dem behandelten Zelllayer führte zu einer reduzierten Aktivierung der Immunzellen, die sich in einer verminderten MPO-Freisetzung und der Regulation essenzieller Adhäsionsmoleküle für die Transmigration, z.B. CD11b, manifestierte. fMLP ist ein starker Neutrophilen-Aktivator (Dewald et al., 1985), der mit einer erhöhten CD11b-Expression assoziiert ist (Kolaczowska et al., 2013). Neben der MPO-Freisetzung (Rizo-Tellez et al., 2022) gilt CD11b als etablierter Aktivierungsmarker (Kolaczowska et al., 2013). Nach Aktivierung wird CD11b aus intrazellulären Vesikeln an die Zelloberfläche transloziert und dadurch die Expression erhöht (Sandilands et al., 2005). Eine gesteigerte CD11b-Oberflächenexpression korreliert mit einer erhöhter Adhäsions- und Migrationsfähigkeit von Neutrophilen (Arnaout, 1990, Azcutia et al., 2021). Die ADAM17-Inhibition auf dem Zelllayer reduzierte die CD11b-Oberflächenexpression der interagierenden PMNs und stützt damit die beobachtete verringerte Transmigration.

Die anschließende in-vivo-Migrationsanalyse im murinen ARDS-Modell belegte ebenfalls einen direkten Einfluss von ADAM17 auf die PMN-Migration. Die systemische ADAM17-Inhibition reduzierte die Migration in das entzündete Lungengewebe, insbesondere in das Interstitium. Die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 verstärkte diesen Effekt und führte zu einer erhöhten PMN-Akkumulation am Endothel sowie zu einer signifikant verminderten Migration in das Interstitium und den Alveolarraum. Diese Ergebnisse werden von Dreymueller et al. unterstützt, die nach intranasaler LPS-Applikation eine erhöhte PMN-Zahl in der BAL detektierten und eine 50-prozentige Reduktion der Rekrutierung durch GW280264X beobachteten (Dreymueller et al., 2012a). Die im gesamten Lungengewebe detektierte PMN-Zahl war nach LPS-Applikation um den Faktor 2,2 erhöht und wurde durch GW280264X nahezu vollständig supprimiert (Dreymueller et al., 2012a). Eine aktuelle Studie zeigte zudem, dass TAPI-1, verabreicht über neutrophile-mimetische Nanopartikel (Neu-LNPs), nach Myokardinfarkt bei Ratten

verschiedene Immunzelltypen, einschließlich Neutrophile, im periinfarktären Bereich signifikant reduzierte (Chen et al., 2025). Demgegenüber stehen zwei Studien im Peritonitis-Modell mit divergenten Effekten einer pharmakologischen ADAM17-Inhibition auf die Leukozytenmigration. Diese beschreiben eine beschleunigte und erhöhte Migration in die Peritonitishöhle nach unspezifischer ADAM-/MMP-Inhibition mit GM6001 und ADAM17-Inhibition mit BMS566394 (Tang et al., 2011, Mishra et al., 2015). Die Vergleichbarkeit ist jedoch aufgrund des unterschiedlichen Modells, unspezifischer Inhibitoren und variierender Zeitpunkte der Datenerhebung eingeschränkt.

Zahlreiche Faktoren können das Migrationsverhalten von PMNs unter inflammatorischen Bedingungen verändern. ADAM17 kann insbesondere über das *Shedding* von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen eingreifen. Vor allem die kombinierte systemische Hemmung von ADAM17/ADAM10 beeinflusste die Oberflächenexpression von Adhäsionsmolekülen auf migrierenden PMNs. Die durch GW280264X erhöhte Oberflächenexpression von PSGL-1 und CD49d liefert Hinweise auf die zuvor beobachtete verstärkte PMN-Akkumulation am Gefäßendothel und die daraus resultierende reduzierte Migration in die Lunge. PSGL-1 vermittelt über die Bindung an endotheliale Selektine das Rollen von Leukozyten am aktivierten Endothel (Moore et al., 1995) und CD49d die feste Bindung von Leukozyten an endotheliales VCAM-1 (Liesveld et al., 1993). Da PSGL-1 und CD49d keine ADAM17-Substrate *per se* sind, ist ein indirekter Einfluss auf deren Oberflächenexpression im Rahmen der insgesamt abgeschwächten Entzündungsreaktion naheliegend. Dazu passend zeigten Drexhage et al., dass die Inhibition von ADAM17 mit GM6001 sowie die kombinierte ADAM17/ADAM10-Hemmung mit GW280264X die PSGL-1-Oberflächenexpression auf apoptotischen CEM-Zellen aufrechterhielt (Drexhage et al., 2024). Hashizume et al. berichteten, dass nach siRNA-vermitteltem ADAM10-Knockout in neutrophil-ähnlichen HL-60-Zellen die durch GM-CSF und IL-8 verringerte CD162-Expression aufgehoben wurde (Hashizume et al., 2011). Beide Studien unterstützen die Beobachtung, dass ADAM17 und ADAM10 die PSGL-1-Expression beeinflussen und deren Inhibition zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression führt. Vergleichbare Untersuchungen zur VLA-4-Oberflächenexpression liegen nicht vor, jedoch wurde gezeigt, dass die CCL2-induzierte Hochregulation der $\alpha 5$ -Integrinuntereinheit des verwandten VLA-5 auf THP-1-Zellen durch ADAM10-Inhibition mit GI254023X reduziert wurde (Pruessmeyer et al., 2014). Daten von Huang et al. deuten zudem darauf hin, dass verschiedene ADAMs, einschließlich ADAM17, die spezifische $\alpha 4\beta 1$ - und $\alpha 5\beta 1$ -Integrin-vermittelte Zellmigration teilweise über ihre Disintegrin-ähnliche Domäne modulieren können (Huang et al., 2005).

Abgesehen von der reduzierten Freisetzung von CXCL2/3 beeinflusste die systemische ADAM17-Inhibition die Zytokinfreisetzung nicht. CXCL2 und CXCL3 gelten als funktionale Homologe des humanen IL-8, die von Monozyten, Epithel- und Endothelzellen ausgeschüttet werden und als potente chemotaktische Faktoren für Neutrophile wirken (Hol et al., 2010, Belperio et al., 2005, Baggiolini et al., 1992). Der CXCL2-Rezeptor CXCR2 ist nach aktuellem Kenntnisstand kein ADAM17-Substrat. Allerdings kann CXCR2 auf Neutrophilen durch ADAM17-Aktivität moduliert und nach LPS-Stimulation stark herabreguliert werden (Mishra et al., 2015). Mishra et al. zeigten, dass die systemische ADAM17-Inhibition mit BMS566394 oder der konditionale Knockout die stimuli-induzierte CXCR2-Herabregulierung verhinderten. Da CXCL3 ebenfalls über CXCR2 wirkt (Piotrowska et al., 2019), könnte die ADAM17-vermittelte Modulation des Rezeptors indirekt auch CXCL3 beeinflussen (Mishra et al., 2015). Bemerkenswert ist, dass die systemische Inhibition die Freisetzung von TNF- α , CX3CL1, sIL-6R α und sCD62L nicht beeinflusste, obwohl es sich um direkte ADAM17-Substrate handelt. Frühere Arbeiten zeigten eine Reduktion dieser Mediatoren nach systemischer ADAM17-Hemmung (Dreymueller et al., 2012a, Trifilieff et al., 2002, Hirayama et al., 2017, Garton et al., 2001, Wang et al., 2010, Müllberg J, 1995, Hedges et al., 2022). Die hier präsentierten Ergebnisse legen nahe, dass zusätzliche Faktoren, etwa weitere Enzyme, beteiligt sein könnten (Armstrong et al., 2006). Dreymueller et al. fanden eine erhöhte CX3CL1- und TNF- α -Freisetzung in die BAL, die durch GW280264X signifikant reduziert wurde. Die unvollständige Hemmung der TNF- α -Freisetzung erklärten sie mit der Tatsache, dass TNF- α an zahlreichen Stellen und von vielen Zelltypen freigesetzt wird, die für den Inhibitor schwer zugänglich sein könnten (Dreymueller et al., 2012a).

Die Inhibitionsversuche zeigten schließlich, dass ADAM17 direkt die erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität des Lungengewebes in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation beeinflusst. Die Hemmung von ADAM17 verhinderte die Destruktion der Lungengarchitektur mit aufgeschwemmten Alveolarsepten und die Ausbildung eines proteinreichen Lungenödems. LPS führte zu einer verstärkten Evans Blue-Extravasation aus dem Blut in das Lungengewebe, die durch TAPI-1 und GW280264X aufgehoben wurde. Diese Befunde werden durch Dreymueller et al. gestützt, die eine Reduktion der Endotoxin-induzierten mikrovaskulären Permeabilität und Ödembildung durch GW280264X zeigten. Intranasales LPS erhöhte den Protein-Influx in die BAL und die *Wet-Dry-Ratio* des Lungengewebes, wobei beide Parameter durch GW280264X normalisiert wurden (Dreymueller et al., 2012a). Bolik et al. berichteten in einem Tumor-Extravasationsmodell mittels FITC-Dextran-Messung, dass die systemische ADAM17-Inhibition mit TAPI-1

und einem hochspezifischen ADAM17 PD die pathologisch gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität effektiv reduzierte (Bolik et al., 2022). In einem murinen Modell des LPS-induzierten akuten Lungenschadens wurde zwar keine direkte Gefäßpermeabilitätsmessung durchgeführt, jedoch zeigte sich histologisch eine deutliche Abnahme der mikrovaskulären Schädigung und der Ödembildung im Interstitium nach GW280264X-Behandlung (Atak et al., 2024). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten, dass die Adhäsionsmoleküle JAM-A und VE-Cadherin auf pulmonalen Endothelzellen durch ADAM17 moduliert und weniger interzelluläre Gaps ausgebildet wurden. Konsistent zeigten Schulz et al. per Western Blot, dass TAPI-1 und GW280264X die Freisetzung von löslichem VE-Cadherin aus humanen Endothelzellen der Nabelschnur senkten (Schulz et al., 2008). Morsing et al. berichteten über eine geringere Freisetzung von löslichem VE-Cadherin durch ADAM10-Inhibition auf Neutrophilen bei unveränderter Expression des ungespaltenen VE-Cadherins (Morsing et al., 2021).

5.3. Einfluss von endotheliale ADAM17 auf die transendotheliale PMN-Migration und die mikrovaskuläre Permeabilität

Die systemische Inhibition von ADAM17 und die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 verringerten die PMN-Migration in das entzündete Lungengewebe. Gleichzeitig modulierten TAPI-1 und GW280264X die Expression von Adhäsionsmolekülen auf PMNs und Endothelzellen und reduzierten die mikrovaskuläre Permeabilität. Diese Ergebnisse deuten auf eine zentrale Rolle von ADAM17 in der Interaktion zwischen PMNs und Endothel hin. Die ADAM17-Inhibition stabilisierte die endotheliale Barriere und trug damit wesentlich zur verminderten PMN-Rekrutierung bei. Um die Funktion von endotheliale ADAM17 in der akuten pulmonalen Inflammation gezielt zu analysieren, wurde die konditionale Knockout-Mauslinie ADAM17^{Tie2+} generiert. Die spezifische Deletion von ADAM17 in Endothelzellen reduzierte nach LPS-Stimulation die ADAM17-mRNA-Expression im gesamten Lungengewebe um 77,5% und unterstreicht damit die zentrale Bedeutung von endotheliale ADAM17 im pulmonalen Gewebe. Die Beobachtung, dass LPS in den ADAM17^{Tie2+} Knockoutmäusen keine erhöhte ADAM17-mRNA-Expression im Lungengewebe induzierte, wird durch Dreymueller et al. gestützt, die ein identisches Ergebnis in ihren Tie2-adam17^{-/-} beschreiben (Dreymueller et al., 2012a).

Die Spezifität des Tie2-Promotors für Endothelzellen wurde zwischenzeitlich diskutiert, da der Promotor auch in Monozyten und Neutrophilen aktiv sein könnte (Pucci et al.,

2009). Daraufhin bestätigten eine gründliche Charakterisierung und Überprüfung der Tie2-adam17^{-/-} Mäuse das Fehlen von ADAM17 in Endothelzellen (Weskamp et al., 2010). Dreymueller et al. zeigten darüber hinaus eine unveränderte ADAM17-mRNA-Expression in peripheren Blutzellen sowie eine normale TNF- α -Produktion in alveolaren Makrophagen von Tie2-adam17^{-/-} Mäusen (Dreymueller et al., 2012a). Die Charakterisierung der gezüchteten und in dieser Arbeit verwendeten konditionalen Knockoutlinie ADAM17^{Tie2+} belegte ebenfalls, dass ADAM17 ausschließlich auf Endothelzellen fehlt und nicht auf PMNs und Thrombozyten.

5.3.1. Endotheliales ADAM17 reguliert über TNFR1 und IL-6R α

Endotheliales ADAM17 zeigte im Vergleich zur systemischen Inhibition einen verstärkten Effekt auf die Regulation der Transkriptionslevel der Rezeptoren TNFR1 und IL-6R. Die Genexpression von TNFR1 war in ADAM17^{Tie2+} Tieren nach LPS-Inhalation im Vergleich zur ADAM17^{Tie2-} Kontrolle signifikant reduziert, während das TNFR2-Transkriptionslevel durch die Deletion nicht beeinflusst wurde. Innerhalb des TNFR-Signalwegs zeigte die Genexpressionsanalyse nach endotheliale ADAM17-Knockout eine signifikante Reduktion der Expressionslevel von NF- κ B, JNK, TRADD und CREB.

Moss et al. beschrieben 1997 erstmals, dass ADAM17 die TNF- α - und TNFR1-Level reguliert (Moss et al., 1997a). Die Bedeutung von endotheliale ADAM17 für das TNFR1-*Shedding* wurde erstmals von Rowlands et al. gezeigt. Sie demonstrierten, dass das ADAM17-vermittelte *Shedding* von TNFR1 das Ausmaß der TNF- α -induzierten Entzündungsreaktion in der Lunge bestimmt (Rowlands et al., 2011). Eine neuere Studie belegte zudem, dass die TNFR1-abhängige endotheliale Nekroptose von der ADAM17-Aktivität abhängt und dass das ADAM17-vermittelte TNFR1-*Shedding* für Tumor-Extravasation und Metastasierung entscheidend ist (Bolik et al., 2022). Diese Ergebnisse unterstützen die Beobachtung, dass endotheliales ADAM17 die Verfügbarkeit von TNFR1 auf der Zelloberfläche reguliert und damit den TNF- α -Signalweg beeinflusst.

Allerdings zeigten Bolik et al., dass die siRNA-vermittelte Inhibition von ADAM17 in HUVECs aufgrund des reduzierten TNFR1-*Sheddings* zu einer erhöhten Proteinexpression von TNFR1 führte. In der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie wurde nach LPS-Inhalation hingegen eine reduzierte Proteinexpression von TNFR1 beobachtet, die vermutlich indirekt durch die insgesamt abgeschwächte Entzündungsreaktion infolge der endothelialen ADAM17-Deletion erklärbar ist. Die genannten Studien untersuchten überwiegend das ADAM17-vermittelte *Shedding* von TNFR1, indem sie die Proteinexpression von

membranständigem und löslichem TNFR1 analysierten und sich somit auf posttranslationale Regulation konzentrierten. Die fehlende Analyse des löslichen TNFR1 stellt eine Limitierung der vorliegenden Arbeit dar. Vergleichbare Untersuchungen zur TNFR1-mRNA-Expression nach endothelialem ADAM17-Knockout liegen bisher nicht vor. Veränderungen der TNFR1-mRNA erfolgen nicht primär über das ADAM17-vermittelte *Shedding* selbst, sondern sekundär über Feedbackmechanismen infolge einer reduzierten Inflamationsreaktion. Somit erlaubt die beobachtete mRNA-Reduktion indirekte Rückschlüsse auf den Einfluss von ADAM17 auf den TNFR1-Signalweg und das Ausmaß der Entzündung, jedoch keine direkte Aussage über das TNFR1-*Shedding*.

Nach LPS-Inhalation zeigten die signifikant reduzierten mRNA-Expressionen von IL-6R, JAK1 und STAT3 sowie die verminderte Proteinexpression von IL-6R α eine abgeschwächte Aktivierung des IL-6-Signalwegs in der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie. Vergleichbare Studien belegen, dass ADAM17 das *Shedding* des membrangebundenen IL-6R kontrolliert und dadurch das IL-6-*Trans-Signaling* maßgeblich beeinflusst (de Queiroz et al., 2020, Saad et al., 2019, Schmidt et al., 2018, Schumacher et al., 2022). ADAM17 reguliert dabei die Verfügbarkeit des löslichen IL-6R, der nach IL-6-Bindung den Trans-Signalweg über JAK1 und STAT3 aktiviert (Schumacher et al., 2019). In Übereinstimmung mit der durchgeführten Genexpressionsanalyse zeigten Schmidt et al., dass STAT3 in Abwesenheit von ADAM17 reduziert aktiviert wird (Schmidt et al., 2018). In einem humanen Modell mit primären bronchialen Epithelzellen von COPD-Patienten regulierte ADAM17 die durch Zigarettenrauch induzierte Hochregulierung von IL-6R und belegte diesen Zusammenhang ebenfalls im pulmonalen Kontext (Stolarczyk et al., 2016).

Vergleichsweise führte die Deletion von ADAM17 auf Leukozyten in einem murinen LPS-Modell der akuten pulmonalen Inflammation nur zu einer 25-prozentigen Reduktion des alveolären IL-6R-Spiegels (Arndt et al., 2011). Dies deutet laut Arndt et al. darauf hin, dass leukozytäres ADAM17 nicht die primäre Sheddase des IL-6R ist.

5.3.2. Endotheliales ADAM17 verstärkt die PMN-Migration in das Interstitium und den bronchoalveolären Raum

Die in-vivo-Migrationsanalyse belegte eindrücklich, dass endotheliales ADAM17 eine Schlüsselrolle bei der transendothelialen Migration von PMNs durch das Endothel in die entzündeten Lungenstrukturen spielt. Fehlt ADAM17 auf Endothelzellen, akkumulieren PMNs am Gefäßendothel und ihre Transmigration in das Interstitium und den

bronchoalveolären Raum wird signifikant reduziert. Diese ausgeprägte PMN-Akkumulation am Endothel korreliert mit der detektierten Hochregulation der Adhäsionsmoleküle CD49d und PSGL-1.

In Übereinstimmung damit zeigte eine vergleichbare Studie von Dreymueller et al., dass die endotoxininduzierte pulmonale Leukozytenrekrutierung in endothelialen Tie2-*adam17*^{-/-} Knockout-Mäusen deutlich reduziert ist (Dreymueller et al., 2012a). Mittels durchflusszytometrischer Analyse wiesen sie eine signifikant geringere Anzahl an Gesamtleukozyten und PMNs in der BAL und im Lungengewebe 24 Stunden nach intranasaler LPS-Applikation in den Knockout-Tieren nach. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzte durchflusszytometrische Analyse ermöglichte eine detailliertere Aufschlüsselung der Lungenkompartimente und erweiterte die Ergebnisse von Dreymueller et al. um die differenzierte Erkenntnis einer verstärkten PMN-Akkumulation am Endothel und einer reduzierten Transmigration ins Interstitium. Dreymueller et al. bestätigten die reduzierte Transmigration ebenfalls histologisch und zeigten, dass endotheliales ADAM17 über das *Shedding* der Adhäsionsmoleküle JAM-A und CX3CL1 die PMN-Migration reguliert.

Durch das *Shedding* zahlreicher Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1, VCAM-1, JAM-A und PECAM-1 steuert ADAM17 die Adhäsions- und Deadhäsionsprozesse an der Endotheloberfläche und moduliert dadurch die transendotheliale Migration von Neutrophilen (Mishra et al., 2017). Der spezifische Einfluss von endothelialelem ADAM17 auf die Leukozytenmigration wurde bislang jedoch nur in der Studie von Dreymueller et al. mithilfe eines gewebespezifischen Knockoutmodells untersucht. Andere Arbeiten konzentrierten sich auf die Bedeutung von leukozytärem ADAM17 (Pruessmeyer et al., 2014, Arndt et al., 2011, Mishra et al., 2015).

In einem murinen Modell der akuten pulmonalen Inflammation war 24 Stunden nach intranasaler LPS-Applikation die alveoläre Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten bei hämatopoetisch ADAM17-defizienten Mäusen (Vav-ADAM17^{-/-}) vorübergehend erhöht, während sie bei ADAM10-defizienten Mäusen (Vav-ADAM10^{-/-}) dauerhaft reduziert blieb (Pruessmeyer et al., 2014). Arndt et al. zeigten in Vav-ADAM17^{-/-}-Mäusen, dass die Neutrophilenrekrutierung in die Alveolen nach LPS-Inhalation zwar früher erfolgte, insgesamt jedoch die Zahl alveolärer Neutrophilen und das Ausmaß der Lungenentzündung nach acht Stunden reduziert waren (Arndt et al., 2011). In einem murinen Peritonitis-Modell war die Neutrophilenzahl in der Peritonealhöhle vier Stunden nach intraperitonealer LPS-Applikation in Vav-ADAM17^{-/-}-Mäusen erhöht (Mishra et al.,

2015). Da in dieser Studie jedoch keine späteren Zeitpunkte untersucht wurden, lassen sich, im Gegensatz zu Arndt et al., keine Aussagen über eine dynamische Regulation im weiteren Verlauf der Entzündungsreaktion treffen. Aufgrund der unterschiedlichen Cre-Mauslinien, Entzündungsmodelle, LPS-Applikationsformen und Untersuchungszeitpunkte sind die genannten Studien nur eingeschränkt mit der vorliegenden in-vivo-Migrationsanalyse vergleichbar.

5.3.3. Endotheliales ADAM17 fördert den Verlust der endothelialen Barriere und die Entstehung eines proteinreichen Lungenödems

Endotheliales ADAM17 beeinflusste maßgeblich die Regulation der Endothelbarriere und die mikrovaskuläre Permeabilität. Die auf Endothelzellen exprimierte Protease begünstigte eine Destruktion der Lungenarchitektur mit aufgeschwemmten Alveolarsepten und die Ausbildung eines proteinreichen Lungenödems. Der LPS-induzierte Anstieg der Gesamtproteinkonzentration in der BAL, der als indirekter Hinweis auf eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität gilt, blieb in Abwesenheit von endothelialelem ADAM17 aus. In Übereinstimmung beschrieben Dreymueller et al., dass die basalen Proteinlevel in Tie2-adam17^{-/-} Mäusen im Vergleich zu den Kontrollen unverändert waren, während der LPS-induzierte Proteininflux aufgehoben und die Ödembildung vollständig inhibiert wurde (Dreymueller et al., 2012a). Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in der BAL-Flüssigkeit kann auf eine erhöhte Permeabilität der Alveolarkapillarmembran hinweisen, sollte jedoch nicht als alleiniges Maß für deren Beurteilung herangezogen werden (Matute-Bello et al., 2011).

Zur Validierung und Ergänzung der Gesamtproteinkonzentrationsbestimmung wurde ein Evans Blue Extravasations-Assay zur spezifischen Quantifizierung der Gefäßpermeabilität eingesetzt. Die LPS-induzierte Erhöhung der mikrovaskulären Permeabilität führte zu einer Extravasation von Evans Blue in das entzündete Lungengewebe, die in ADAM17^{Tie2+} Mäusen vollständig aufgehoben war. Nach aktuellem Kenntnisstand liegt keine weitere Studie vor, die den Einfluss von endothelialelem ADAM17 auf die Gefäßpermeabilität in Tie2-adam17^{-/-} Mäusen unter Verwendung von Evans Blue oder FITC-Dextran untersucht hat. Im Einklang mit unseren histologischen Befunden zeigte die Arbeit von Dreymueller et al. ebenfalls, dass LPS eine ausgeprägte Gewebeschädigung der Lunge mit Verlust der parenchymalen Architektur und Verdickung der interalveolären Septen induzierte, während das Lungengewebe der Tie2-adam17^{-/-} Mäuse strukturell intakt blieb und somit geschützt war.

In der vorliegenden Studie wirkte sich das Fehlen von endotheliale ADAM17 protektiv auf die Regulation der Adhäsionsmoleküle JAM-A und VE-Cadherin aus. Unter physiologischen Bedingungen ist JAM-A vor allem an den Tight Junctions der Endothelzellen lokalisiert (Hartmann et al., 2020) und trägt dort zur Aufrechterhaltung der Zell-Zell-Kontakte und zur Integrität der Endothelbarriere bei. Unter inflammatorischen Bedingungen wird JAM-A von den lateralen Zell-Zell-Kontakten zur apikalen Zelloberfläche umverteilt, um als Adhäsionsmolekül für Leukozyten deren Transmigration durch das Endothel zu erleichtern (Stamatovic et al., 2012, Schmitt et al., 2014). Diese Umverteilung löst die Zell-Zell-Kontakte zwischen Endothelzellen auf, wodurch die Barriereintegrität verloren geht und die mikrovaskuläre Permeabilität steigt. Die durch LPS-induzierte Umverteilung von JAM-A zur apikalen Zelloberfläche äußerte sich in einer erhöhten Proteinoberflächenexpression auf pulmonalen Endothelzellen, die in ADAM17^{Tie2+} Mäusen nicht beobachtet wurde. Zusätzlich induziert LPS eine parazelluläre *Gap-Formation* durch das *Shedding* von *Junction*-Proteinen, einschließlich JAM-A und Cadherinen (Nonas et al., 2006). Das Ausschalten von ADAM17 wird mit einem reduzierten *Shedding* von JAM-A auf Endothel- und Epithelzellen in Verbindung gebracht (Koenen et al., 2009). In vitro reduzierte das *Silencing* von ADAM17 mit shRNA die LPS-induzierte FITC-Dextran-Diffusion in gleichem Maße wie die Behandlung mit GW280264X (Dreymueller et al., 2012a). Diese Studie identifizierte ADAM17 als primäre Sheddase für die durch LPS erhöhte Freisetzung von JAM-A. Entsprechend war 24 Stunden nach LPS-Applikation das lösliche JAM-A in der BAL von Tie2-adam17^{-/-} Mäusen reduziert.

VE-Cadherin stellt ein zentrales Adhäsionsmolekül für die Ausbildung endothelialer Zell-Zell-Kontakte sowie für die Aufrechterhaltung der Barriereintegrität dar (Vestweber, 2008). VE-Cadherin wird primär durch ADAM10 proteolytisch gespalten (Schulz et al., 2008, Pruessmeyer et al., 2009). Eine Studie von Weskamp et al. widerspricht jedoch dieser Annahme und deutet darauf hin, dass ADAM17 unter bestimmten zellulären Kontexten ebenfalls am *Shedding* von VE-Cadherin beteiligt ist. Das konstitutive und PMA-stimulierte *Shedding* von VE-Cadherin war in ADAM17-defizienten Mäusefibroblasten reduziert (Weskamp et al., 2010). Die beobachtete reduzierte Freisetzung von löslichem VE-Cadherin sowie die erhöhte Oberflächenexpression in ADAM17^{Tie2+} Mäusen verdeutlichen den Einfluss von endotheliale ADAM17 auf die *Gap-Formation* und die mikrovaskuläre Permeabilität. Der beobachtete Effekt auf das VE-Cadherin-*Shedding* könnte entweder zelltypspezifisch bedingt sein oder sekundär durch die insgesamt abgeschwächte Entzündungsreaktion infolge der endothelialen ADAM17-Deletion vermittelt werden.

5.3.4. Endotheliales ADAM17 verstärkt die pulmonale Inflammation in den Alveolen

Endotheliales ADAM17 beeinflusste die Freisetzung von Zytokinen und Entzündungsmediatoren. Die Daten belegen, dass endotheliales ADAM17 einen direkten Einfluss auf die Freisetzung von TNF- α , löslichem CD62L, MPO und ELA2 hat und hierüber die pulmonale Inflammation in den Alveolen verstärkt. Durch das *Shedding* der proinflammatorischen Mediatoren TNF- α und CD62L kann endotheliales ADAM17 sowohl die Neutrophilenrekrutierung als auch die mikrovaskuläre Permeabilität modulieren (Cicha et al., 2015, Tedder et al., 1995, Ley et al., 2007).

In Übereinstimmung beschrieben Dreymueller et al. in Tie2-adam17^{-/-} Mäusen ebenfalls eine reduzierte TNF- α -Freisetzung in die BAL, allerdings zu einem späteren Zeitpunkt von 24 Stunden nach LPS-Inhalation (Dreymueller et al., 2012a). Wie auch von Dreymueller et al. gezeigt, führte die endotheliale Deletion von ADAM17 zu einer deutlichen Reduktion der TNF- α -Freisetzung in die BAL, jedoch nicht zu einer vollständigen Aufhebung, wie sie in anderen Studien mit weniger spezifischen Inhibitoren beobachtet wurde (Trifilieff et al., 2002). Diese Differenz lässt sich dadurch erklären, dass TNF- α überwiegend von Epithelzellen und alveolären Makrophagen sezerniert wird (Ward, 2003) und dass andere Proteasen, etwa ADAM9, ADAM10 und ADAM19, in bestimmten Kontexten zur Spaltung beitragen können (Armstrong et al., 2006). Die in ADAM17^{Tie2+} Mäusen beobachtete reduzierte Neutrophilenrekrutierung könnte zudem eine Abnahme der Zytokinfreisetzung bedingen.

Dreymueller et al. berichteten, dass Endothelhyperpermeabilität und Leukozytenrekrutierung bei Tie2-adam17^{-/-} Mäusen unabhängig davon auftraten, ob die pulmonale Inflammation durch LPS oder TNF- α induziert wurde. Dies deutet darauf hin, dass die bei Tie2-adam17^{-/-} Mäusen beobachtete reduzierte Entzündungsreaktion nicht allein auf die TNF- α -Freisetzung zurückzuführen ist, sondern dass endotheliales ADAM17 auf mehreren Ebenen der inflammatorischen Regulation wirkt (Dreymueller et al., 2012a). Vergleichbare Befunde existieren für ADAM17-Knockout-Modelle anderer Zelltypen. Die Ausschaltung von ADAM17 in hämatopoetischen Zellen führte zu einer reduzierten TNF- α -Freisetzung zwei und acht Stunden nach LPS-Inhalation (Arndt et al., 2011), während nach 24 Stunden kein Unterschied zur Kontrollgruppe mehr erkennbar war (Pruessmeyer et al., 2014). In einem Peritonitis-Modell war die TNF- α -Freisetzung in die Peritoneallavage bei ADAM17 Vav-Cre Mäusen nach vier Stunden ebenfalls reduziert (Long et al., 2010).

Im Gegensatz zu den Beobachtungen von Dreymueller et al. zeigte sich im verwendeten Modell keine Reduktion der IL-6-Freisetzung. Auch die Freisetzung von sIL-6R in die BAL wurde durch das Fehlen von endothelialem ADAM17 nicht beeinflusst, während Arndt et al. zwei und vier Stunden nach LPS-Inhalation eine reduzierte Freisetzung in der BAL von ADAM17 Vav-Cre Tieren beschrieben. Die Freisetzung von sIL-6R in das Lungengewebe blieb auch dort durch hämatopoetisches ADAM17 unbeeinflusst (Arndt et al., 2011). Unveränderte Serumspiegel von sIL-6R in ADAM17-hypomorphen Mäusen können durch kompensatorische Spaltung durch andere Proteasen, etwa ADAM10, ADAM8 oder ELA2, erklärt werden, die zur eindeutigen Bestimmung ausgeschlossen werden müssen (Schumacher et al., 2015).

CD62L wird von ruhenden Neutrophilen in hoher Dichte konstitutiv exprimiert und nach deren Aktivierung von der Zelloberfläche abgespalten (Kishimoto et al., 1989, Wang et al., 2010). Die durch LPS-induzierte Freisetzung von CD62L in die BAL war in ADAM17^{Tie2+} Tieren nach drei Stunden reduziert und korrelierte damit mit einer geringeren Neutrophilenaktivierung. Da CD62L primär auf Leukozyten exprimiert ist, bezieht sich die Mehrzahl der Studien auf die Bedeutung von leukozytärem ADAM17 beim *Shedding* von L-Selektin (Li et al., 2006, Chen et al., 1995, Venturi et al., 2003). In der Literatur finden sich jedoch keine eindeutigen Hinweise darauf, dass endotheliales ADAM17 direkt die Freisetzung von CD62L auf Leukozyten beeinflusst. Unsere Daten zeigen, dass die Deletion von ADAM17 in Endothelzellen ein reduziertes *Shedding* von CD62L bewirkt. Diese Beobachtung legt nahe, dass endotheliales ADAM17 während der Interaktion von Leukozyten mit dem aktivierten Endothel in der Lage ist, leukozytäres CD62L zu spalten.

Aktivierte alveolare Neutrophile degranulieren und setzen die zytotoxischen Enzyme MPO und ELA2 frei (Segura et al., 1998). Über den respiratorischen Burst sind Neutrophile zusätzlich in der Lage, zytotoxische ROS zu produzieren (Kruger et al., 2015). Die Degranulation und Bildung von NETs dienen der Pathogenabwehr, können aber bei verstärkter PMN-Akkumulation und exzessiver ROS-Freisetzung eine anhaltende und übermäßige Entzündung verursachen (Mittal et al., 2014, Aratani et al., 2012), die wiederum zu massiven Gewebeschädigungen und schwerer Ödembildung führt (Mittal et al., 2014). Für die in ADAM17^{Tie2+} Tieren beobachtete reduzierte Freisetzung von MPO und ELA2 in die BAL liegen bislang keine vergleichbaren Studien vor. Da die Freisetzung beider Enzyme intrinsisch in Neutrophilen reguliert wird, ist sie nicht unmittelbar von endothelialem ADAM17 abhängig. Die verminderte Freisetzung von MPO und ELA2 weist

daher auf eine reduzierte neutrophile Aktivierung und eine abgeschwächte alveoläre Entzündungsreaktion in Abwesenheit von endothelialem ADAM17 hin.

5.4. Methodik und Limitierungen der Studie

Das murine Modell der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation eignet sich hervorragend zur Untersuchung der Bedeutung von ADAM17 im ARDS, da es die zentralen pathophysiologischen Mechanismen der Entzündungsreaktion, Neutrophilenrekrutierung und pulmonalen Gefäßpermeabilität zuverlässig abbildet (Matute-Bello et al., 2008). Dieses Modell liefert hoch reproduzierbare Ergebnisse mit geringer Variabilität, wodurch die Anzahl der benötigten Versuchstiere pro Behandlungsgruppe minimiert werden kann. Die Verabreichung von vernebeltem LPS ist technisch unkompliziert, erfordert keine Narkose der Versuchstiere und wird in diesem wissenschaftlichen Kontext weit verbreitet eingesetzt, was eine gute Vergleichbarkeit mit anderen Studien gewährleistet.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass die Applikationsform von LPS den Schweregrad der Lungenverletzung, den Phänotyp sowie die Reproduzierbarkeit des Modells beeinflusst (Kuhar et al., 2025). Die transtracheale Applikation induzierte eine ausgeprägtere Neutrophilenrekrutierung in die Alveolen und eine stärkere Ödembildung bei gleichzeitig geringerer Variabilität als die nicht-chirurgischen intranasalen oder intratrachealen Applikationen. Darüber hinaus führte sie zu einer stärker lokalisierten Verteilung des Evans Blue Farbstoffs in der Lunge. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete LPS-Inhalation wurde zwar nicht direkt mit den genannten Methoden verglichen, ist jedoch funktionell am ehesten mit der intranasalen Applikation vergleichbar. Beide Verfahren verabreichen LPS über die natürlichen Atemwege ohne invasiven Zugang und bilden somit eine inhalative Exposition nach, während intratracheale und transtracheale Applikationen einen invasiven Zugang erfordern. Die von Kuhar et al. beschriebenen Vorteile der transtrachealen Applikation hinsichtlich des Ausmaßes der Entzündungsreaktion müssen gegenüber dem höheren technischen Aufwand und der zusätzlichen Belastung der Versuchstiere abgewogen werden. Da die LPS-Inhalation im verwendeten Modell eine ausreichende Inflammationsreaktion mit signifikanter Neutrophilenrekrutierung und erhöhter mikrovaskulärer Permeabilität induzierte, wird diese Applikationsform als geeignet für die vorliegende Forschungsfrage bewertet.

Neben der Applikationsform identifizierten Kuhar et al. auch das Geschlecht der Versuchstiere als relevanten Faktor für das Ausmaß der Lungenschädigung. Ihren Daten

zufolge zeigten männliche Mäuse eine schwerere Lungenschädigung und höhere Proteinkonzentrationen in der BAL als weibliche Tiere (Kuhar et al., 2025). In der vorliegenden Arbeit wurden zur Reduktion überzähliger Zuchttiere beide Geschlechter eingesetzt. Die von Kuhar et al. beschriebenen geschlechtsspezifischen Unterschiede sollten jedoch bei der Planung zukünftiger Studien berücksichtigt werden.

Die vorgelagerten in-vitro-Experimente mit humanen Endothel- und Epithelzelllinien sowie primären humanen Neutrophilen ermöglichten eine gezielte Untersuchung zellulärer und molekularer Mechanismen unter kontrollierten Bedingungen, frei von komplexen Systeminteraktionen und bei hoher Reproduzierbarkeit. Zudem konnte die ADAM17-Inhibition mit TAPI-1 sowie die kombinierte Hemmung von ADAM17/ADAM10 mit GW280264X direkt an den relevanten Zelltypen getestet werden. Gleichzeitig fehlen diesen in-vitro-Ansätzen die komplexen Gewebe- und Organinteraktionen des Lungengewebes sowie die systemische Dynamik der Inflammation. Darüber hinaus kann die LPS-Stimulation in vitro eine andere Intensität und zeitliche Dynamik der Entzündungsreaktion aufweisen als im Tiermodell (Lund et al., 2006, Tawfik et al., 2020, Dorresteijn et al., 2010).

Obwohl die in-vitro-Modelle das komplexe murine Modell der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation nur eingeschränkt abbilden, ermöglichen sie dennoch eine gezielte mechanistische Analyse und tragen zur Translation der Ergebnisse auf humane Zellen und damit zur angewandten Forschung bei.

5.5. Klinische Relevanz und Ausblick

Die vorliegende Arbeit identifizierte endotheliales ADAM17 als Schlüsselregulator der mikrovaskulären Permeabilität und PMN-Migration in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation und trägt damit wesentlich zum Verständnis der Pathomechanismen des ARDS bei. Die Daten belegen, dass ADAM17, insbesondere in endothelialen Zellen, durch das *Shedding* von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen und Rezeptoren zentrale Entzündungsmechanismen des ARDS steuert.

Im Kontext einer pulmonalen Hyperinflammation während des ARDS stellt endotheliales ADAM17 ein potenzielles therapeutisches Ziel dar. Wie bereits in Kapitel 1.3.4 beschrieben, erfordert die Vielzahl physiologisch und pathophysiologisch relevanter ADAM17-Substrate jedoch die Vermeidung von Breitband-Inhibitoren und Hydroxamat-basierten Verbindungen, da diese ein hohes Risiko für systemische Nebenwirkungen bergen

(Dreymueller et al., 2015). Zukünftige Ansätze sollten daher auf eine räumlich und zeitlich begrenzte Anwendung spezifischer Inhibitoren durch lokal zielgerichtete Applikation fokussieren (Li et al., 2009a, Li et al., 2009b, Buckley et al., 2005, Ludwig A, 2012, Dreymueller et al., 2015, McCaskill et al., 2013, Dahlman et al., 2014, Chen et al., 2025). Gelingt es, diese Hürden zu überwinden, könnte das Targeting von endotheliale ADAM17 eine antiinflammatorische Behandlungsstrategie ermöglichen, die den Erhalt der Endothelbarriere unterstützt und die Entstehung eines Zytokinsturms sowie einer exzessiven Neutrophilenmigration verhindert.

Als potenziell unerwünschter Effekt ist zu berücksichtigen, dass eine verminderte Freisetzung löslicher Antagonisten mit einer verstärkten vaskulären PMN-Adhäsion und Akkumulation am Gefäßendothel einhergehen könnte, was eine lokale vaskuläre Inflammation begünstigen kann (Pruessmeyer et al., 2009).

Weiterführende Forschungsarbeiten sollten sich auf die gezielte Inhibition von ADAM17 in pulmonalen Endothelzellen konzentrieren. Als mögliches Folgeprojekt bietet sich die Untersuchung von endotheliale ADAM17, als vielversprechendem Schlüsselregulator der ARDS-Pathophysiologie, in weiteren Modellen mit höherer klinischer Relevanz an. Dazu zählen insbesondere Modelle der sterilen, ventilatorinduzierten akuten Lungenschädigung durch Überdruckbeatmung, ebenso wie Modelle der bakteriellen Pneumonie, etwa mit *Streptococcus pneumoniae* oder *Klebsiella pneumoniae* (Matute-Bello et al., 2008).

Zudem sollten zukünftige Untersuchungen durch eine Blutgasanalyse ergänzt werden, um klinisch relevante Parameter wie den arteriellen Sauerstoffpartialdruck (pO_2), den Kohlendioxidpartialdruck (pCO_2) und den Blut-pH-Wert zu bestimmen. Diese Analysen würden ermöglichen, den Gasaustausch sowie die respiratorische Lungenfunktion zu beurteilen und zu quantifizieren, inwieweit endotheliales ADAM17 die respiratorische Insuffizienz, Hypoxie und den Schweregrad der Inflammation beeinflusst.

Als weitere klinisch relevante Ergänzung sollte zudem die Bestimmung der Lungencompliance mithilfe des FlexiVent-Systems erfolgen. Die Messung der dynamischen und statischen Compliance, des Atemwegswiderstands und der Volumenänderungen ermöglicht eine präzise Beurteilung pathophysiologischer Veränderungen des Lungengewebes sowie des Schweregrades der pulmonalen Erkrankung (Bonnardel et al., 2019, Robichaud et al., 2021).

5.6. Schlussfolgerung

Zusammenfassend hat diese Arbeit die Bedeutung von ADAM17 für zentrale Entzündungsmechanismen des ARDS untersucht und endotheliales ADAM17 als Schlüsselregulator identifiziert. In einem standardisierten murinen Modell der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation konnte gezeigt werden, dass ADAM17 im entzündeten Lungengewebe hochreguliert wird. Die systemische Inhibition von ADAM17 führte zu einer Reduktion der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation. Sowohl TAPI-1 als auch GW280264X hemmten das *Shedding* relevanter neutrophiler und endothelialer Adhäsionsmoleküle, wodurch die LPS-induzierte Transmigration von Neutrophilen signifikant vermindert wurde.

Darüber hinaus zeigte die systemische Inhibition einen direkten Einfluss von ADAM17 auf die mikrovaskuläre Permeabilität des Lungengewebes. Die Hemmung von ADAM17 verhinderte eine Destruktion der Lungenarchitektur mit aufgeschwemmten Alveolarsepten und die Ausbildung eines proteinreichen Lungenödems.

Der gewebespezifische Knockout von ADAM17 in Endothelzellen von ADAM17^{Tie2+} Tieren führte zu einer 77,5-prozentigen Reduktion der ADAM17-mRNA-Expression im gesamten Lungengewebe und verdeutlichte damit die zentrale Bedeutung von endotheliale ADAM17 in der Lunge. Nachfolgende Analysen der ADAM17^{Tie2+} Knockoutlinie identifizierten endotheliales ADAM17 als Schlüsselfaktor in der Regulation der akuten pulmonalen Inflammation.

Die Daten belegten, dass endotheliales ADAM17 die PMN-Migration in das Interstitium und den Alveolarraum erhöht, den Verlust der Endothelbarriere und die Entstehung eines proteinreichen Lungenödems fördert und die Inflammation in den Alveolen verstärkt. Künftige Forschungsarbeiten sollten sich auf die Entwicklung einer gezielten Inhibition von ADAM17 in pulmonalen Endothelzellen sowie auf weiterführende Untersuchungen in klinisch relevanten Modellen konzentrieren, um die therapeutische Relevanz einer endothelialen ADAM17-Modulation im Kontext des ARDS weiter zu untersuchen.

6. Zusammenfassung

Die akute pulmonale Inflammation entsteht häufig infolge einer überschießenden Immunreaktion auf pathogene Reize wie Mikroorganismen, Toxine oder Allergene. Obwohl Entzündungsreaktionen für die Bekämpfung von Infektionen und die Einleitung der Gewebereparatur unerlässlich sind, kann eine exzessive Inflammation zu erheblichen Gewebeschäden, einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion und in schweren Fällen zu lebensbedrohlichen Zuständen wie dem ARDS führen. Trotz Fortschritten in der unterstützenden Behandlungsstrategie liegt die Sterblichkeitsrate in schweren Fällen weiterhin bei bis zu 40 % (Rubenfeld et al., 2005, Villar et al., 2011, Bellani et al., 2016). Das ARDS ist durch einen hyperinflammatorischen Zustand gekennzeichnet, der mit einer exzessiven Infiltration von Neutrophilen und der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren einhergeht, welche die mikrovaskuläre Permeabilität erhöhen, die Ödembildung fördern und den Gasaustausch beeinträchtigen.

Die Entzündungsreaktion wird durch verschiedene Mechanismen reguliert, wobei Proteasen der ADAM-Familie, insbesondere ADAM17, über das *Shedding* von Adhäsionsmolekülen und Entzündungsmediatoren eine zentrale Rolle einnehmen. Da das ADAM17-vermittelte *Shedding* zahlreicher Substrate kontextabhängig sowohl pro- als auch antiinflammatorische Effekte haben kann, ist der Einsatz systemischer Breitbandinhibitoren problematisch. Eine detaillierte Untersuchung der Rolle von ADAM17 in der Regulation der Neutrophilenrekrutierung und der Integrität der Endothelbarriere ist daher von entscheidender Bedeutung. Hierfür wurde ein murines in-vivo-Modell der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation eingesetzt und durch ergänzende in-vitro-Analysen mit humanen Neutrophilen sowie Epithel- und Endothelzelllinien erweitert.

Die Expression von ADAM17 war in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation deutlich erhöht und wurde durch die systemische Inhibition mit TAPI-1 und GW280264X reduziert. Die Aktivierung und Regulation inflammatorischer Signalwege spielen in diesem Kontext eine zentrale Rolle. Eine umfassende in-vivo-Genexpressions- und in-vitro-siRNA-Transfektionsanalyse in HMVEC-L zeigten, dass zwischen ADAM17 und TNFR1 bzw. IL-6R vermutlich eine bidirektionale Rückkopplungsschleife besteht und dass ADAM17 diese Signalwege über die Gene NF- κ B, JNK, TRADD, CREB, JAK1 und STAT3 moduliert. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ADAM17 einen unmittelbaren Einfluss auf die Neutrophilenrekrutierung hat. In vitro führte die ADAM17-Inhibition zu einer reduzierten PMN-Migration in einem fMLP-

Gradienten und zu einer verminderten Transmigration durch eine Endothel- und Epithelschicht. In vivo resultierte die systemische ADAM17-Inhibition in einer reduzierten PMN-Migration ins Interstitium. Die kombinierte Hemmung von ADAM17/ ADAM10 verstärkte diesen Effekt und führte zu einer erhöhten PMN-Akkumulation am Endothel sowie zu einer signifikant reduzierten Migration in das Interstitium und den Alveolarraum. Die nach Inhibition erhöhte Oberflächenexpression der Adhäsionsmoleküle PSGL-1 und CD49d auf Neutrophilen könnte diese Beobachtung erklären. Zudem belegen die Daten einen direkten Einfluss von ADAM17 auf die Integrität der Endothelbarriere und eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität. Die ADAM17-Inhibition schützte vor einer Destruktion der Lungenarchitektur mit aufgeschwemmten Alveolarsepten und vor der Ausbildung eines proteinreichen Lungenödems. Ebenso wurden die Adhäsionsmoleküle JAM-A und VE-Cadherin auf pulmonalen Endothelzellen durch ADAM17 moduliert und nach Inhibition eine reduzierte *Gap-Formation* detektiert. Diese Beobachtungen legen nahe, dass insbesondere ADAM17 in Endothelzellen eine entscheidende Rolle spielt.

Die gewebespezifische Deletion von endothelialem ADAM17 in der konditionalen Knock-outlinie ADAM17^{Tie2+} führte zu einer 77,5-prozentigen Reduktion der ADAM17-mRNA-Expression im gesamten Lungengewebe. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass endotheliales ADAM17 in der akuten pulmonalen Inflammation eine Schlüsselrolle bei der Regulation der mikrovaskulären Permeabilität und der PMN-Migration in das entzündete Lungengewebe einnimmt.

In vivo verstärkte endotheliales ADAM17 die Neutrophilenrekrutierung in das Interstitium und den Alveolarraum. Durch das Fehlen von ADAM17 auf Endothelzellen wurden PMNs infolge einer erhöhten Expression von PSGL-1 und CD49d am Endothel zurückgehalten und aktiv an der Transmigration in das Interstitium und die Alveolen gehindert. Darüber hinaus förderte endotheliales ADAM17 den Verlust der endothelialen Barriere und die Entstehung eines proteinreichen Lungenödems. Die erhöhte Freisetzung von TNF- α , löslichem CD62L, MPO und ELA2 in die BAL verdeutlichte zusätzlich, dass endotheliales ADAM17 die pulmonale Inflammation in den Alveolen verstärkt. Die vorliegende Arbeit identifizierte endotheliales ADAM17 als Schlüsselregulator der mikrovaskulären Permeabilität und der Neutrophilenmigration in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation. Diese Erkenntnisse tragen zum besseren Verständnis der Pathomechanismen des ARDS bei und bilden die Grundlage für die Entwicklung einer gezielten ADAM17-Inhibition in pulmonalen Endothelzellen sowie für weiterführende Untersuchungen in klinisch relevanten Modellen.

7. Literaturverzeichnis

Acute Respiratory Distress Syndrome, N., Brower, R.G., Matthay, M.A., et al. 2000. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 342, 1301-8, 10.1056/NEJM200005043421801.

Adhikari, N.K., Dellinger, R.P., Lundin, S., et al. 2014. Inhaled nitric oxide does not reduce mortality in patients with acute respiratory distress syndrome regardless of severity: systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med*, 42, 404-12, 10.1097/CCM.0b013e3182a27909.

Adrain, C., Zettl, M., Christova, Y., et al. 2012. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science*, 335, 225-8, 10.1126/science.1214400.

Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., et al. 2005. Comparative analysis of the ADAM and ADAMTS families. *J Proteome Res*, 4, 881-8, 10.1021/pr0500096.

Angus, D.C. 2012. The acute respiratory distress syndrome: what's in a name? *JAMA*, 307, 2542-4, 10.1001/jama.2012.6761.

Aratani, Y., Miura, N., Ohno, N., et al. 2012. [Role of neutrophil-derived reactive oxygen species in host defense and inflammation]. *Med Mycol J*, 53, 123-8, 10.3314/mmj.53.123.

Armstrong, L., Godinho, S.I., Uppington, K.M., et al. 2006. Contribution of TNF-alpha converting enzyme and proteinase-3 to TNF-alpha processing in human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 34, 219-25, 10.1165/rcmb.2005-0087OC.

Arnaout, M.A. 1990. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*, 75, 1037-1050, 10.1182/blood.V75.5.1037.1037.

Arndt, P.G., Strahan, B., Wang, Y., et al. 2011. Leukocyte ADAM17 regulates acute pulmonary inflammation. *PLoS One*, 6, e19938, 10.1371/journal.pone.0019938.

Arribas, J. & Borroto, A. 2002. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev*, 102, 4627-38, 10.1021/cr010202t.

Ashbaugh, D.G., Bigelow, D.B., Petty, T.L., et al. 1967. Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, 2, 319-23,10.1016/s0140-6736(67)90168-7.

Atak, M., Yigit, E., Huner Yigit, M., et al. 2024. Synthetic and non-synthetic inhibition of ADAM10 and ADAM17 reduces inflammation and oxidative stress in LPS-induced acute kidney injury in male and female mice. *Eur J Pharmacol*, 983, 176964,10.1016/j.ejphar.2024.176964.

Avci, A.B., Feist, E. & Burmester, G.R. 2024. Targeting IL-6 or IL-6 Receptor in Rheumatoid Arthritis: What Have We Learned? *BioDrugs*, 38, 61-71,10.1007/s40259-023-00634-1.

Azcutia, V., Kelm, M., Luissint, A.C., et al. 2021. Neutrophil expressed CD47 regulates CD11b/CD18-dependent neutrophil transepithelial migration in the intestine in vivo. *Mucosal Immunol*, 14, 331-341,10.1038/s41385-020-0316-4.

Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392, 565-8,10.1038/33340.

Baggiolini, M. & Clark-Lewis, I. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*, 307, 97-101,10.1016/0014-5793(92)80909-z.

Barber, R.E. & Hamilton, W.K. 1970. Oxygen toxicity in man. A prospective study in patients with irreversible brain damage. *N Engl J Med*, 283, 1478-84,10.1056/NEJM197012312832702.

Baumgarth, N. & Roederer, M. 2000. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *J Immunol Methods*, 243, 77-97,10.1016/s0022-1759(00)00229-5.

Bellani, G., Laffey, J.G., Pham, T., et al. 2016. Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA*, 315, 788-800,10.1001/jama.2016.0291.

Belperio, J.A., Keane, M.P., Burdick, M.D., et al. 2005. Role of CXCR2/CXCR2 ligands in vascular remodeling during bronchiolitis obliterans syndrome. *J Clin Invest*, 115, 1150-62,10.1172/JCI24233.

Bernard, G.R., Artigas, A., Brigham, K.L., et al. 1994. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*, 149, 818-24,10.1164/ajrccm.149.3.7509706.

Bhardwaj, T. & Giri, R. 2023. Potential of ADAM 17 Signal Peptide To Form Amyloid Aggregates in Vitro. *ACS Chem Neurosci*, 14, 3818-3825,10.1021/acscchemneuro.3c00424.

Bhatia, M., Zemans, R.L. & Jeyaseelan, S. 2012. Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 46, 566-72,10.1165/rcmb.2011-0392TR.

Biedritzky, A., Zhang, Y., Fuhr, A., et al. 2025. Modulation of Neutrophil Recruitment and Inflammatory Signaling in Acute Respiratory Distress Syndrome by Leukotriene Inhibitors Montelukast and Zileuton. *FASEB J*, 39, e70934,10.1096/fj.202501684R.

Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., et al. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*, 385, 729-33,10.1038/385729a0.

Blanchot-Jossic, F., Jarry, A., Masson, D., et al. 2005. Up-regulated expression of ADAM17 in human colon carcinoma: co-expression with EGFR in neoplastic and endothelial cells. *J Pathol*, 207, 156-63,10.1002/path.1814.

Blaydon, D.C., Biancheri, P., Di, W.L., et al. 2011. Inflammatory skin and bowel disease linked to ADAM17 deletion. *N Engl J Med*, 365, 1502-8,10.1056/NEJMoa1100721.

Blobel, C.P. 2005. ADAMs: key components in EGFR signalling and development. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 32-43,10.1038/nrm1548.

Blobel, C.P., Wolfsberg, T.G., Turck, C.W., et al. 1992. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. *Nature*, 356, 248-52,10.1038/356248a0.

Bode, W., Gomis-Ruth, F.X. & Stockler, W. 1993. Astacins, serralyins, snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the 'metzincins'. *FEBS Lett*, 331, 134-40,10.1016/0014-5793(93)80312-i.

Bolik, J., Krause, F., Stevanovic, M., et al. 2022. Inhibition of ADAM17 impairs endothelial cell necroptosis and blocks metastasis. *J Exp Med*, 219, 10.1084/jem.20201039.

Bonnardel, E., Prevel, R., Campagnac, M., et al. 2019. Determination of reliable lung function parameters in intubated mice. *Respir Res*, 20, 211,10.1186/s12931-019-1177-9.

Boyle, E.M., Jr., Pohlman, T.H., Johnson, M.C., et al. 1997. Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the systemic inflammatory response. *Ann Thorac Surg*, 63, 277-84,10.1016/s0003-4975(96)01061-2.

Broccard, A., Shapiro, R.S., Schmitz, L.L., et al. 2000. Prone positioning attenuates and redistributes ventilator-induced lung injury in dogs. *Crit Care Med*, 28, 295-303,10.1097/00003246-200002000-00001.

Broermann, A., Winderlich, M., Block, H., et al. 2011. Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo. *J Exp Med*, 208, 2393-401,10.1084/jem.20110525.

Buckley, C.A., Rouhani, F.N., Kaler, M., et al. 2005. Amino-terminal TACE prodomain attenuates TNFR2 cleavage independently of the cysteine switch. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 288, L1132-8,10.1152/ajplung.00429.2004.

Caescu, C.I., Jeschke, G.R. & Turk, B.E. 2009. Active-site determinants of substrate recognition by the metalloproteinases TACE and ADAM10. *Biochem J*, 424, 79-88,10.1042/BJ20090549.

Chalaris, A., Adam, N., Sina, C., et al. 2010. Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice. *J Exp Med*, 207, 1617-24,10.1084/jem.20092366.

Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., et al. 2011. The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol*, 90, 484-94,10.1016/j.ejcb.2010.10.007.

Chen, A., Engel, P. & Tedder, T.F. 1995. Structural requirements regulate endoproteolytic release of the L-selectin (CD62L) adhesion receptor from the cell surface of leukocytes. *J Exp Med*, 182, 519-30,10.1084/jem.182.2.519.

Chen, Q., Yu, Y., Tong, L., et al. 2025. Targeted delivery of TAPI-1 via biomimetic nanoparticles ameliorates post-infarct left ventricle function and remodelling. *Cardiovasc Res*, 121, 760-774,10.1093/cvr/cvaf039.

Cicha, I. & Urschel, K. 2015. TNF- α ; in the cardiovascular system: from physiology to therapy. *International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research*, 10.2147/ijicmr.S64894.

Cisse, M., Duplan, E., Guillot-Sestier, M.V., et al. 2011. The extracellular regulated kinase-1 (ERK1) controls regulated α -secretase-mediated processing, promoter transactivation, and mRNA levels of the cellular prion protein. *J Biol Chem*, 286, 29192-29206, 10.1074/jbc.M110.208249.

Dahlman, J.E., Barnes, C., Khan, O., et al. 2014. In vivo endothelial siRNA delivery using polymeric nanoparticles with low molecular weight. *Nat Nanotechnol*, 9, 648-655, 10.1038/nnano.2014.84.

Dang, M., Armbruster, N., Miller, M.A., et al. 2013. Regulated ADAM17-dependent EGF family ligand release by substrate-selecting signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 9776-81, 10.1073/pnas.1307478110.

De Queiroz, T.M., Lakkappa, N. & Lazartigues, E. 2020. ADAM17-Mediated Shedding of Inflammatory Cytokines in Hypertension. *Front Pharmacol*, 11, 1154, 10.3389/fphar.2020.01154.

Dewald, B. & Baggiolini, M. 1985. Activation of NADPH oxidase in human neutrophils. Synergism between fMLP and the neutrophil products PAF and LTB₄. *Biochem Biophys Res Commun*, 128, 297-304, 10.1016/0006-291x(85)91678-x.

Dijkstra, A., Postma, D.S., Noordhoek, J.A., et al. 2009. Expression of ADAMs ("a disintegrin and metalloprotease") in the human lung. *Virchows Arch*, 454, 441-9, 10.1007/s00428-009-0748-4.

Ding, T., Li, L., Zhu, K., et al. 2001. Relationship between the increase of secretion of sTNF α induced by lipopolysaccharides and the enhanced expression of TACE mRNA in HL-60 cells and adhesive cells from human spleen. *J Tongji Med Univ*, 21, 265-8, 279, 10.1007/BF02886552.

Ding, X., Yang, L.Y., Huang, G.W., et al. 2004. ADAM17 mRNA expression and pathological features of hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 10, 2735-9, 10.3748/wjg.v10.i18.2735.

Dittrich, G.M. & Heineke, J. 2020. TNF- α signaling: TACE inhibition to put out the burning heart. *PLoS Biol*, 18, e3001037, 10.1371/journal.pbio.3001037.

Dorresteijn, M.J., Draisma, A., Van Der Hoeven, J.G., et al. 2010. Lipopolysaccharide-stimulated whole blood cytokine production does not predict the inflammatory response in human endotoxemia. *Innate Immun*, 16, 248-53,10.1177/1753425909339923.

Dos Santos, C.C. & Slutsky, A.S. 2000. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J Appl Physiol* (1985), 89, 1645-55,10.1152/jappl.2000.89.4.1645.

Drexhage, L.Z., Zhang, S., Dupont, M., et al. 2024. Apoptosis-mediated ADAM10 activation removes a mucin barrier promoting T cell efferocytosis. *Nat Commun*, 15, 541,10.1038/s41467-023-44619-8.

Dreyfuss, D. & Saumon, G. 1998. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*, 157, 294-323,10.1164/ajrccm.157.1.9604014.

Dreymueller, D., Martin, C., Kogel, T., et al. 2012a. Lung endothelial ADAM17 regulates the acute inflammatory response to lipopolysaccharide. *EMBO Mol Med*, 4, 412-23,10.1002/emmm.201200217.

Dreymueller, D., Pruessmeyer, J., Groth, E., et al. 2012b. The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur J Cell Biol*, 91, 472-85,10.1016/j.ejcb.2011.09.003.

Dreymueller, D., Uhlig, S. & Ludwig, A. 2015. ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 308, L325-43,10.1152/ajplung.00294.2014.

Dusterhoft, S., Babendreyer, A., Giese, A.A., et al. 2019. Status update on iRhom and ADAM17: It's still complicated. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1866, 1567-1583,10.1016/j.bbamcr.2019.06.017.

Dusterhoft, S., Hobel, K., Oldefest, M., et al. 2014. A disintegrin and metalloprotease 17 dynamic interaction sequence, the sweet tooth for the human interleukin 6 receptor. *J Biol Chem*, 289, 16336-48,10.1074/jbc.M114.557322.

Dusterhoft, S., Jung, S., Hung, C.W., et al. 2013. Membrane-proximal domain of a disintegrin and metalloprotease-17 represents the putative molecular switch of its shedding activity operated by protein-disulfide isomerase. *J Am Chem Soc*, 135, 5776-81,10.1021/ja400340u.

Edwards, D.R., Handsley, M.M. & Pennington, C.J. 2008. The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med*, 29, 258-89,10.1016/j.mam.2008.08.001.

Englert, J.A., Bobba, C. & Baron, R.M. 2019. Integrating molecular pathogenesis and clinical translation in sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *JCI Insight*, 4, 10.1172/jci.insight.124061.

Ermert, M., Pantazis, C., Duncker, H.R., et al. 2003. In situ localization of TNFalpha/beta, TACE and TNF receptors TNF-R1 and TNF-R2 in control and LPS-treated lung tissue. *Cytokine*, 22, 89-100,10.1016/s1043-4666(03)00117-0.

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11,10.1038/35888.

Fischetti, F. & Tedesco, F. 2006. Cross-talk between the complement system and endothelial cells in physiologic conditions and in vascular diseases. *Autoimmunity*, 39, 417-28,10.1080/08916930600739712.

Force, A.D.T., Ranieri, V.M., Rubenfeld, G.D., et al. 2012. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*, 307, 2526-33,10.1001/jama.2012.5669.

Foreman, K.E., Vaporciyan, A.A., Bonish, B.K., et al. 1994. C5a-induced expression of P-selectin in endothelial cells. *J Clin Invest*, 94, 1147-55,10.1172/JCI117430.

Fox-Dewhurst, R., Alberts, M.K., Kajikawa, O., et al. 1997. Pulmonary and systemic inflammatory responses in rabbits with gram-negative pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 155, 2030-40,10.1164/ajrccm.155.6.9196112.

Frat, J.P., Thille, A.W., Mercat, A., et al. 2015. High-flow oxygen through nasal cannula in acute hypoxemic respiratory failure. *N Engl J Med*, 372, 2185-96,10.1056/NEJMoa1503326.

Fritsch, J., Frankenheim, J., Marischen, L., et al. 2021. Roles for ADAM17 in TNF-R1 Mediated Cell Death and Survival in Human U937 and Jurkat Cells. *Cells*, 10, 10.3390/cells10113100.

Garton, K.J., Gough, P.J., Blobel, C.P., et al. 2001. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem*, 276, 37993-8001,10.1074/jbc.M106434200.

Garton, K.J., Gough, P.J. & Raines, E.W. 2006. Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol*, 79, 1105-16,10.1189/jlb.0106038.

Gooz, M. 2010. ADAM-17: the enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 45, 146-69,10.3109/10409231003628015.

Gough, P. & Myles, I.A. 2020. Tumor Necrosis Factor Receptors: Pleiotropic Signaling Complexes and Their Differential Effects. *Front Immunol*, 11, 585880,10.3389/fimmu.2020.585880.

Grasselli, G., Calfee, C.S., Camporota, L., et al. 2023. ESICM guidelines on acute respiratory distress syndrome: definition, phenotyping and respiratory support strategies. *Intensive Care Med*, 49, 727-759,10.1007/s00134-023-07050-7.

Grell, M., Douni, E., Wajant, H., et al. 1995. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*, 83, 793-802,10.1016/0092-8674(95)90192-2.

Grotzinger, J., Lorenzen, I. & Dusterhoft, S. 2017. Molecular insights into the multilayered regulation of ADAM17: The role of the extracellular region. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864, 2088-2095,10.1016/j.bbamcr.2017.05.024.

Guerin, C., Reignier, J., Richard, J.C., et al. 2013. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 368, 2159-68,10.1056/NEJMoa1214103.

Gumbiner, B.M. 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. *J Cell Biol*, 148, 399-404,10.1083/jcb.148.3.399.

Hafezi-Moghadam, A. & Ley, K. 1999. Relevance of L-selectin shedding for leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med*, 189, 939-48,10.1084/jem.189.6.939.

Hartl, D., May, P., Gu, W., et al. 2020. A rare loss-of-function variant of ADAM17 is associated with late-onset familial Alzheimer disease. *Mol Psychiatry*, 25, 629-639,10.1038/s41380-018-0091-8.

Hartmann, C., Schwietzer, Y.A., Otani, T., et al. 2020. Physiological functions of junctional adhesion molecules (JAMs) in tight junctions. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 1862, 183299,10.1016/j.bbamem.2020.183299.

Hashizume, M., Higuchi, Y., Uchiyama, Y., et al. 2011. IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation. *Cytokine*, 54, 92-9, 10.1016/j.cyto.2011.01.007.

He, J., Shao, Z., Li, Z., et al. 2025. Mechanistic Insights into HOTAIR-Driven ADAM17/NF-KappaB Activation and Endothelial Dysfunction in LPS-Challenged HUVECs. *Immunol Invest*, 1-27, 10.1080/08820139.2025.2503174.

Hedges, J.F., Snyder, D.T., Robison, A., et al. 2022. An ADAM17-Neutralizing Antibody Reduces Inflammation and Mortality While Increasing Viral Burden in a COVID-19 Mouse Model. *Front Immunol*, 13, 918881, 10.3389/fimmu.2022.918881.

Hellebrekers, P., Vrisekoop, N. & Koenderman, L. 2018. Neutrophil phenotypes in health and disease. *Eur J Clin Invest*, 48 Suppl 2, e12943, 10.1111/eci.12943.

Herzenberg, L.A., Sweet, R.G. & Herzenberg, L.A. 1976. Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am*, 234, 108-17, 10.1038/scientificamerican0376-108.

Hinkle, C.L., Sunnarborg, S.W., Loiselle, D., et al. 2004. Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J Biol Chem*, 279, 24179-88, 10.1074/jbc.M312141200.

Hirayama, A., Awano, S., Seta, Y., et al. 2017. ADAM17 regulates TNF-alpha expression upon lipopolysaccharide stimulation in oral keratinocytes. *Biomed Res*, 38, 157-165, 10.2220/biomedres.38.157.

Hol, J., Wilhelmsen, L. & Haraldsen, G. 2010. The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *J Leukoc Biol*, 87, 501-8, 10.1189/jlb.0809532.

Hooper, N.M., Karran, E.H. & Turner, A.J. 1997. Membrane protein secretases. *Biochem J*, 321 (Pt 2), 265-79, 10.1042/bj3210265.

Huang, J., Bridges, L.C. & White, J.M. 2005. Selective modulation of integrin-mediated cell migration by distinct ADAM family members. *Mol Biol Cell*, 16, 4982-91, 10.1091/mbc.e05-03-0258.

Kalliolias, G.D. & Ivashkiv, L.B. 2016. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*, 12, 49-62,10.1038/nrrheum.2015.169.

Katzenstein, A.L., Bloor, C.M. & Leibow, A.A. 1976. Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *Am J Pathol*, 85, 209-28.

Kersten, A. & Cornelissen, C. 2020. [Acute respiratory distress syndrome]. *Pneumologie (Berl)*, 17, 238-248,10.1007/s10405-020-00326-5.

Killock, D.J. & Ivetic, A. 2010. The cytoplasmic domains of TNFalpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) and L-selectin are regulated differently by p38 MAPK and PKC to promote ectodomain shedding. *Biochem J*, 428, 293-304,10.1042/BJ20091611.

Kishimoto, T.K., Jutila, M.A., Berg, E.L., et al. 1989. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*, 245, 1238-41,10.1126/science.2551036.

Koenen, R.R., Pruessmeyer, J., Soehnlein, O., et al. 2009. Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood*, 113, 4799-809,10.1182/blood-2008-04-152330.

Kolaczowska, E. & Kubes, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75,10.1038/nri3399.

Kruger, P., Saffarzadeh, M., Weber, A.N., et al. 2015. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog*, 11, e1004651,10.1371/journal.ppat.1004651.

Kuhar, E., Stewart, D.J., Engelberts, D., et al. 2025. Comparative Evaluation of Lipopolysaccharide Administration Methods to Induce Acute Lung Injury in Murine Models: Efficacy, Consistency, and Technical Considerations. *Crit Care Explor*, 7, e1292,10.1097/CCE.0000000000001292.

Lambrecht, B.N., Vanderkerken, M. & Hammad, H. 2018. The emerging role of ADAM metalloproteinases in immunity. *Nat Rev Immunol*, 18, 745-758,10.1038/s41577-018-0068-5.

Le, T.T., Karmouty-Quintana, H., Melicoff, E., et al. 2014. Blockade of IL-6 Trans signaling attenuates pulmonary fibrosis. *J Immunol*, 193, 3755-68,10.4049/jimmunol.1302470.

Lendeckel, U., Kohl, J., Arndt, M., et al. 2005. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*, 131, 41-8,10.1007/s00432-004-0619-y.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., et al. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-89,10.1038/nri2156.

Ley, K. & Reutershan, J. 2006. Leucocyte-endothelial interactions in health and disease. *Handb Exp Pharmacol*, 97-133,10.1007/3-540-36028-x_4.

Li, D., Kortekaas, R.K., Douglas, K.B.I., et al. 2024. TNF signaling mediates lipopolysaccharide-induced lung epithelial progenitor cell responses in mouse lung organoids. *Biomed Pharmacother*, 181, 117704,10.1016/j.biopha.2024.117704.

Li, X., Perez, L., Pan, Z., et al. 2007. The transmembrane domain of TACE regulates protein ectodomain shedding. *Cell Res*, 17, 985-98,10.1038/cr.2007.98.

Li, X., Yan, Y., Huang, W., et al. 2009a. The study of the inhibition of the recombinant TACE prodomain to endotoxemia in mice. *Int J Mol Sci*, 10, 5442-5454,10.3390/ijms10125442.

Li, X., Yan, Y., Huang, W., et al. 2009b. The regulation of TACE catalytic function by its prodomain. *Mol Biol Rep*, 36, 641-51,10.1007/s11033-008-9224-5.

Li, Y., Brazzell, J., Herrera, A., et al. 2006. ADAM17 deficiency by mature neutrophils has differential effects on L-selectin shedding. *Blood*, 108, 2275-9,10.1182/blood-2006-02-005827.

Li, Y., Ye, R., Dai, H., et al. 2025. Exploring TNFR1: from discovery to targeted therapy development. *J Transl Med*, 23, 71,10.1186/s12967-025-06122-0.

Lichtenthaler, S.F., Lemberg, M.K. & Fluhrer, R. 2018. Proteolytic ectodomain shedding of membrane proteins in mammals-hardware, concepts, and recent developments. *EMBO J*, 37, 10.15252/embj.201899456.

Liesveld, J.L., Winslow, J.M., Frediani, K.E., et al. 1993. Expression of integrins and examination of their adhesive function in normal and leukemic hematopoietic cells. *Blood*, 81, 112-121,10.1182/blood.V81.1.112.112.

Lively, S. & Schlichter, L.C. 2018. Microglia Responses to Pro-inflammatory Stimuli (LPS, IFN γ +TNF α) and Reprogramming by Resolving Cytokines (IL-4, IL-10). *Front Cell Neurosci*, 12, 215,10.3389/fncel.2018.00215.

Loken, M.R., Parks, D.R. & Herzenberg, L.A. 1977. Two-color immunofluorescence using a fluorescence-activated cell sorter. *J Histochem Cytochem*, 25, 899-907,10.1177/25.7.330738.

Long, C., Wang, Y., Herrera, A.H., et al. 2010. In vivo role of leukocyte ADAM17 in the inflammatory and host responses during E. coli-mediated peritonitis. *J Leukoc Biol*, 87, 1097-101,10.1189/jlb.1109763.

Lorenzen, I., Lokau, J., Dusterhoft, S., et al. 2012. The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett*, 586, 1093-100,10.1016/j.febslet.2012.03.012.

Lorenzen, I., Trad, A. & Grotzinger, J. 2011. Multimerisation of A disintegrin and metalloprotease protein-17 (ADAM17) is mediated by its EGF-like domain. *Biochem Biophys Res Commun*, 415, 330-6,10.1016/j.bbrc.2011.10.056.

Ludwig A, M.C., Schumacher J, Hess Fm, Uhlig S, Dreymueller D. 2012. Endothelial ADAM10 and ADAM17 independently promote endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 185: A2630, 10.1164/AJRCCM-CONFERENCE.2012.185.1_MEETINGABSTRACTS.A2630.

Luig, M., Kluger, M.A., Goerke, B., et al. 2015. Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN. *J Am Soc Nephrol*, 26, 1597-607,10.1681/ASN.2014060620.

Lund, S., Christensen, K.V., Hedtjarn, M., et al. 2006. The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. *J Neuroimmunol*, 180, 71-87,10.1016/j.jneuroim.2006.07.007.

Marcello, E., Gardoni, F., Di Luca, M., et al. 2010. An arginine stretch limits ADAM10 exit from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*, 285, 10376-84,10.1074/jbc.M109.055947.

Marini, J.J. 2010. Prone positioning for ARDS: defining the target. *Intensive Care Med*, 36, 559-61,10.1007/s00134-009-1749-0.

Matthay, M.A., Arabi, Y., Arroliga, A.C., et al. 2024. A New Global Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 209, 37-47,10.1164/rccm.202303-0558WS.

Matthay, M.A. & Zemans, R.L. 2011. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*, 6, 147-63,10.1146/annurev-pathol-011110-130158.

Matthay, M.A., Zemans, R.L., Zimmerman, G.A., et al. 2019. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primers*, 5, 18,10.1038/s41572-019-0069-0.

Matute-Bello, G., Downey, G., Moore, B.B., et al. 2011. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 44, 725-38,10.1165/rcmb.2009-0210ST.

Matute-Bello, G., Frevert, C.W. & Martin, T.R. 2008. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 295, L379-99,10.1152/ajplung.00010.2008.

Mccaskill, J., Singhania, R., Burgess, M., et al. 2013. Efficient Biodistribution and Gene Silencing in the Lung epithelium via Intravenous Liposomal Delivery of siRNA. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2, e96,10.1038/mtna.2013.22.

Mcever, R.P. 1994. Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium. *Ann N Y Acad Sci*, 714, 185-9,10.1111/j.1749-6632.1994.tb12043.x.

McIlwain, D.R., Lang, P.A., Maretzky, T., et al. 2012. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against Listeria and responses to LPS. *Science*, 335, 229-32,10.1126/science.1214448.

Mishra, H.K., Long, C., Bahaie, N.S., et al. 2015. Regulation of CXCR2 expression and function by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *J Leukoc Biol*, 97, 447-54,10.1189/jlb.3HI0714-340R.

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, 138,10.3389/fcimb.2017.00138.

Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., et al. 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*, 20, 1126-67,10.1089/ars.2012.5149.

Montgomery, A., Tam, F., Gursche, C., et al. 2021. Overlapping and distinct biological effects of IL-6 classic and trans-signaling in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 320, C554-C565,10.1152/ajpcell.00323.2020.

Moore, K.L., Patel, K.D., Bruehl, R.E., et al. 1995. P-selectin glycoprotein ligand-1 mediates rolling of human neutrophils on P-selectin. *J Cell Biol*, 128, 661-71,10.1083/jcb.128.4.661.

Morsing, S.K.H., Rademakers, T., Brouns, S.L.N., et al. 2021. ADAM10-Mediated Cleavage of ICAM-1 Is Involved in Neutrophil Transendothelial Migration. *Cells*, 10, 10.3390/cells10020232.

Moss, M.L., Jin, S.L., Becherer, J.D., et al. 1997a. Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol*, 72, 127-9,10.1016/s0165-5728(96)00180-4.

Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., et al. 1997b. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, 385, 733-6,10.1038/385733a0.

Moss, M.L., Sklair-Tavron, L. & Nudelman, R. 2008. Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 4, 300-9,10.1038/ncprheum0797.

Müllberg J, D.F., Otten-Evans C, Alderson Mr, Rose-John S, Cosman D, Black Ra, Mohler Km 1995. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor. *J Immunol*.

Mullis, K.B. 2003. The Polymerase Chain Reaction (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition in English*, 33, 1209-1213,10.1002/anie.199412091.

Mullis, K.B. & Faloona, F.A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50,10.1016/0076-6879(87)55023-6.

Murray, J.F., Matthay, M.A., Luce, J.M., et al. 1988. An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 138, 720-3,10.1164/ajrccm/138.3.720.

Murthy, A., Shao, Y.W., Narala, S.R., et al. 2012. Notch activation by the metalloproteinase ADAM17 regulates myeloproliferation and atopic barrier immunity by suppressing epithelial cytokine synthesis. *Immunity*, 36, 105-19, 10.1016/j.immuni.2012.01.005.

National Heart, L., Blood Institute, P.C.T.N., Moss, M., et al. 2019. Early Neuromuscular Blockade in the Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*, 380, 1997-2008, 10.1056/NEJMoa1901686.

Nonas, S., Miller, I., Kawkitinarong, K., et al. 2006. Oxidized phospholipids reduce vascular leak and inflammation in rat model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 173, 1130-8, 10.1164/rccm.200511-1737OC.

Nottebaum, A.F., Cagna, G., Winderlich, M., et al. 2008. VE-PTP maintains the endothelial barrier via plakoglobin and becomes dissociated from VE-cadherin by leukocytes and by VEGF. *J Exp Med*, 205, 2929-45, 10.1084/jem.20080406.

Orme, J., Jr., Romney, J.S., Hopkins, R.O., et al. 2003. Pulmonary function and health-related quality of life in survivors of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 167, 690-4, 10.1164/rccm.200206-542OC.

Ostermann, G., Weber, K.S., Zerneck, A., et al. 2002. JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol*, 3, 151-8, 10.1038/ni755.

Papazian, L., Forel, J.M., Gacouin, A., et al. 2010. Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 363, 1107-16, 10.1056/NEJMoa1005372.

Patel, B., Chatterjee, S., Davignon, S., et al. 2019. Extracorporeal membrane oxygenation as rescue therapy for severe hypoxemic respiratory failure. *J Thorac Dis*, 11, S1688-S1697, 10.21037/jtd.2019.05.73.

Peschon, J.J., Slack, J.L., Reddy, P., et al. 1998. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science*, 282, 1281-4, 10.1126/science.282.5392.1281.

Pföh, E.R., Wozniak, A.W., Colantuoni, E., et al. 2016. Physical declines occurring after hospital discharge in ARDS survivors: a 5-year longitudinal study. *Intensive Care Med*, 42, 1557-1566, 10.1007/s00134-016-4530-1.

Piotrowska, A., Rojewska, E., Pawlik, K., et al. 2019. Pharmacological Blockade of Spinal CXCL3/CXCR2 Signaling by NVP CXCR2 20, a Selective CXCR2 Antagonist, Reduces Neuropathic Pain Following Peripheral Nerve Injury. *Front Immunol*, 10, 2198,10.3389/fimmu.2019.02198.

Porteu, F. & Nathan, C. 1990. Shedding of tumor necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J Exp Med*, 172, 599-607,10.1084/jem.172.2.599.

Pratt, A.J. & Macrae, I.J. 2009. The RNA-induced silencing complex: a versatile gene-silencing machine. *J Biol Chem*, 284, 17897-901,10.1074/jbc.R900012200.

Pruessmeyer, J., Hess, F.M., Alert, H., et al. 2014. Leukocytes require ADAM10 but not ADAM17 for their migration and inflammatory recruitment into the alveolar space. *Blood*, 123, 4077-88,10.1182/blood-2013-09-511543.

Pruessmeyer, J. & Ludwig, A. 2009. The good, the bad and the ugly substrates for ADAM10 and ADAM17 in brain pathology, inflammation and cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 164-74,10.1016/j.semcdb.2008.09.005.

Pucci, F., Venneri, M.A., Biziato, D., et al. 2009. A distinguishing gene signature shared by tumor-infiltrating Tie2-expressing monocytes, blood "resident" monocytes, and embryonic macrophages suggests common functions and developmental relationships. *Blood*, 114, 901-14,10.1182/blood-2009-01-200931.

Pugin, J., Verghese, G., Widmer, M.C., et al. 1999. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 27, 304-12,10.1097/00003246-199902000-00036.

Ranieri, V.M., Pettila, V., Karvonen, M.K., et al. 2020. Effect of Intravenous Interferon beta-1a on Death and Days Free From Mechanical Ventilation Among Patients With Moderate to Severe Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*, 323, 725-733,10.1001/jama.2019.22525.

Ranieri, V.M., Tonetti, T., Navalesi, P., et al. 2022. High-Flow Nasal Oxygen for Severe Hypoxemia: Oxygenation Response and Outcome in Patients with COVID-19. *Am J Respir Crit Care Med*, 205, 431-439,10.1164/rccm.202109-2163OC.

Reddy, P., Slack, J.L., Davis, R., et al. 2000. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*, 275, 14608-14,10.1074/jbc.275.19.14608.

Reiss, K. & Saftig, P. 2009. The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 126-37, 10.1016/j.semcdb.2008.11.002.

Reutershan, J. 2006. CXCR2--the receptor to hit? *Drug News Perspect*, 19, 615-23, 10.1358/dnp.2006.19.10.1068009.

Reutershan, J., Basit, A., Galkina, E.V., et al. 2005. Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 289, L807-15, 10.1152/ajplung.00477.2004.

Riethmueller, S., Ehlers, J.C., Lokau, J., et al. 2016. Cleavage Site Localization Differentially Controls Interleukin-6 Receptor Proteolysis by ADAM10 and ADAM17. *Sci Rep*, 6, 25550, 10.1038/srep25550.

Rizo-Tellez, S.A., Sekheri, M. & Filep, J.G. 2022. Myeloperoxidase: Regulation of Neutrophil Function and Target for Therapy. *Antioxidants (Basel)*, 11, 10.3390/antiox11112302.

Robichaud, A., Fereydoonzad, L., Collins, S.L., et al. 2021. Airway compliance measurements in mouse models of respiratory diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 321, L204-L212, 10.1152/ajplung.00470.2020.

Roemer, A., Schwettmann, L., Jung, M., et al. 2004. Increased mRNA expression of ADAMs in renal cell carcinoma and their association with clinical outcome. *Oncology Reports*, 10.3892/or.11.2.529.

Rose-John, S. 2020. Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Res*, 9, 10.12688/f1000research.26058.1.

Rowlands, D.J., Islam, M.N., Das, S.R., et al. 2011. Activation of TNFR1 ectodomain shedding by mitochondrial Ca²⁺ determines the severity of inflammation in mouse lung microvessels. *J Clin Invest*, 121, 1986-99, 10.1172/JCI43839.

Rubenfeld, G.D., Caldwell, E., Peabody, E., et al. 2005. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*, 353, 1685-93, 10.1056/NEJMoa050333.

Saad, M.I., Alhayyani, S., Mcleod, L., et al. 2019. ADAM17 selectively activates the IL-6 trans-signaling/ERK MAPK axis in KRAS-addicted lung cancer. *EMBO Mol Med*, 11, 10.15252/emmm.201809976.

Saad, M.I. & Jenkins, B.J. 2024. The protease ADAM17 at the crossroads of disease: revisiting its significance in inflammation, cancer, and beyond. *FEBS J*, 291, 10-24, 10.1111/febs.16923.

Saha, N., Lee, S.G., Brockmann, E.C., et al. 2024. Fully human monoclonal antibody targeting the cysteine-rich substrate-interacting region of ADAM17 on cancer cells. *Biomed Pharmacother*, 180, 117605, 10.1016/j.biopha.2024.117605.

Sandilands, G.P., Ahmed, Z., Perry, N., et al. 2005. Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology*, 114, 354-68, 10.1111/j.1365-2567.2004.02114.x.

Scheller, J., Chalaris, A., Garbers, C., et al. 2011a. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol*, 32, 380-7, 10.1016/j.it.2011.05.005.

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., et al. 2011b. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*, 1813, 878-88, 10.1016/j.bbamcr.2011.01.034.

Schlondorff, J., Becherer, J.D. & Blobel, C.P. 2000. Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE). *Biochem J*, 347 Pt 1, 131-8.

Schmidt, S., Schumacher, N., Schwarz, J., et al. 2018. ADAM17 is required for EGF-R-induced intestinal tumors via IL-6 trans-signaling. *J Exp Med*, 215, 1205-1225, 10.1084/jem.20171696.

Schmitt, M.M., Megens, R.T., Zerneck, A., et al. 2014. Endothelial junctional adhesion molecule-a guides monocytes into flow-dependent predilection sites of atherosclerosis. *Circulation*, 129, 66-76, 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004149.

Schulz, B., Pruessmeyer, J., Maretzky, T., et al. 2008. ADAM10 regulates endothelial permeability and T-Cell transmigration by proteolysis of vascular endothelial cadherin. *Circ Res*, 102, 1192-201, 10.1161/CIRCRESAHA.107.169805.

Schumacher, N., Meyer, D., Mauermann, A., et al. 2015. Shedding of Endogenous Interleukin-6 Receptor (IL-6R) Is Governed by A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) Proteases while a Full-length IL-6R Isoform Localizes to Circulating Microvesicles. *J Biol Chem*, 290, 26059-71,10.1074/jbc.M115.649509.

Schumacher, N. & Rose-John, S. 2019. ADAM17 Activity and IL-6 Trans-Signaling in Inflammation and Cancer. *Cancers (Basel)*, 11, 10.3390/cancers11111736.

Schumacher, N. & Rose-John, S. 2022. ADAM17 orchestrates Interleukin-6, TNFalpha and EGF-R signaling in inflammation and cancer. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1869, 119141,10.1016/j.bbamcr.2021.119141.

Schwarz, J., Schmidt, S., Will, O., et al. 2014. Polo-like kinase 2, a novel ADAM17 signaling component, regulates tumor necrosis factor alpha ectodomain shedding. *J Biol Chem*, 289, 3080-93,10.1074/jbc.M113.536847.

Seals, D.F. & Courtneidge, S.A. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev*, 17, 7-30,10.1101/gad.1039703.

Seam, N. & Suffredini, A.F. 2016. Steroids are part of rescue therapy in ARDS patients with refractory hypoxemia: we are not sure. *Intensive Care Med*, 42, 924-927,10.1007/s00134-015-4160-z.

Segura, R.M., Alegre, J., Varela, E., et al. 1998. Interleukin-8 and markers of neutrophil degranulation in pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med*, 157, 1565-72,10.1164/ajrccm.157.5.9711116.

Skerrett, S.J., Martin, T.R., Chi, E.Y., et al. 1999. Role of the type 1 TNF receptor in lung inflammation after inhalation of endotoxin or *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol*, 276, L715-27,10.1152/ajplung.1999.276.5.L715.

Skurski, J., Dixit, G., Blobel, C.P., et al. 2020. The Threshold Effect: Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Primary Macrophages Are Differentially Regulated in an iRhom2-Dependent Manner. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 620392,10.3389/fcimb.2020.620392.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., et al. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150, 76-85,10.1016/0003-2697(85)90442-7.

Sommer, A., Kordowski, F., Buch, J., et al. 2016. Phosphatidylserine exposure is required for ADAM17 sheddase function. *Nat Commun*, 7, 11523,10.1038/ncomms11523.

Song, M., Wang, Y., Annex, B.H., et al. 2023. Experiment-based computational model predicts that IL-6 classic and trans-signaling exhibit similar potency in inducing downstream signaling in endothelial cells. *NPJ Syst Biol Appl*, 9, 45,10.1038/s41540-023-00308-2.

Song, Y., Kim, Y.R., Kim, S.M., et al. 2016. RNAi-mediated silencing of TNF-alpha converting enzyme to down-regulate soluble TNF-alpha production for treatment of acute and chronic colitis. *J Control Release*, 239, 231-41,10.1016/j.jconrel.2016.08.017.

Springer, T.A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-14,10.1016/0092-8674(94)90337-9.

Stamatovic, S.M., Sladojevic, N., Keep, R.F., et al. 2012. Relocalization of junctional adhesion molecule A during inflammatory stimulation of brain endothelial cells. *Mol Cell Biol*, 32, 3414-27,10.1128/MCB.06678-11.

Staub, N.C. 1981. Pulmonary edema due to increased microvascular permeability. *Annu Rev Med*, 32, 291-312,10.1146/annurev.me.32.020181.001451.

Stawikowska, R., Cudic, M., Giulianotti, M., et al. 2013. Activity of ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) is regulated by its noncatalytic domains and secondary structure of its substrates. *J Biol Chem*, 288, 22871-9,10.1074/jbc.M113.462267.

Stolarczyk, M., Amatngalim, G.D., Yu, X., et al. 2016. ADAM17 and EGFR regulate IL-6 receptor and amphiregulin mRNA expression and release in cigarette smoke-exposed primary bronchial epithelial cells from patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Physiol Rep*, 4, 10.14814/phy2.12878.

Stone, A.L., Kroeger, M. & Sang, Q.X. 1999. Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J Protein Chem*, 18, 447-65,10.1023/a:1020692710029.

Takeda, S. 2009. Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol*, 20, 146-52,10.1016/j.semcdb.2008.07.009.

Takeda, S., Igarashi, T., Mori, H., et al. 2006. Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J*, 25, 2388-96,10.1038/sj.emboj.7601131.

Tang, J., Zarbock, A., Gomez, I., et al. 2011. Adam17-dependent shedding limits early neutrophil influx but does not alter early monocyte recruitment to inflammatory sites. *Blood*, 118, 786-94,10.1182/blood-2010-11-321406.

Tawfik, D.M., Lankelma, J.M., Vachot, L., et al. 2020. Comparison of host immune responses to LPS in human using an immune profiling panel, in vivo endotoxemia versus ex vivo stimulation. *Sci Rep*, 10, 9918,10.1038/s41598-020-66695-2.

Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A., et al. 1995. The Selectins - Vascular Adhesion Molecules. *Faseb Journal*, 9, 866-873,DOI 10.1096/fasebj.9.10.7542213.

Thompson, B.T., Chambers, R.C. & Liu, K.D. 2017. Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*, 377, 562-572,10.1056/NEJMra1608077.

Tian, Y., Fopiano, K.A., Buncha, V., et al. 2023. The role of ADAM17 in cerebrovascular and cognitive function in the APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci*, 16, 1125932,10.3389/fnmol.2023.1125932.

Trifilieff, A., Walker, C., Keller, T., et al. 2002. Pharmacological profile of PKF242-484 and PKF241-466, novel dual inhibitors of TNF-alpha converting enzyme and matrix metalloproteinases, in models of airway inflammation. *Br J Pharmacol*, 135, 1655-64,10.1038/sj.bjp.0704616.

Tsukerman, P., Eisenstein, E.M., Chavkin, M., et al. 2015. Cytokine secretion and NK cell activity in human ADAM17 deficiency. *Oncotarget*, 6, 44151-60,10.18632/oncotarget.6629.

Tung, J.W., Parks, D.R., Moore, W.A., et al. 2004. New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data. *Clin Immunol*, 110, 277-83,10.1016/j.clim.2003.11.016.

Vallath, S., Hynds, R.E., Succony, L., et al. 2014. Targeting EGFR signalling in chronic lung disease: therapeutic challenges and opportunities. *Eur Respir J*, 44, 513-22, 10.1183/09031936.00146413.

Van Wart, H.E. & Birkedal-Hansen, H. 1990. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5578-82, 10.1073/pnas.87.14.5578.

Venturi, G.M., Tu, L., Kadono, T., et al. 2003. Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release. *Immunity*, 19, 713-24, 10.1016/s1074-7613(03)00295-4.

Vercesi, V., Pisani, L., Van Tongeren, P.S.I., et al. 2018. External confirmation and exploration of the Kigali modification for diagnosing moderate or severe ARDS. *Intensive Care Med*, 44, 523-524, 10.1007/s00134-018-5048-5.

Vestweber, D. 2008. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 28, 223-32, 10.1161/ATVBAHA.107.158014.

Vestweber, D. 2015. How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol*, 15, 692-704, 10.1038/nri3908.

Villar, J., Anon, J.M., Ferrando, C., et al. 2020a. Efficacy of dexamethasone treatment for patients with the acute respiratory distress syndrome caused by COVID-19: study protocol for a randomized controlled superiority trial. *Trials*, 21, 717, 10.1186/s13063-020-04643-1.

Villar, J., Blanco, J., Anon, J.M., et al. 2011. The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive Care Med*, 37, 1932-41, 10.1007/s00134-011-2380-4.

Villar, J., Ferrando, C., Martinez, D., et al. 2020b. Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome: a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*, 8, 267-276, 10.1016/S2213-2600(19)30417-5.

Wang, K. & Shen, H. 2024. Identification of tumor necrosis factor receptor 1 and its association with LPS-induced apoptosis in *Onchidium reevesii*. *Aquaculture and Fisheries*, 10.1016/j.aaf.2024.03.006.

Wang, Y., Zhang, A.C., Ni, Z., et al. 2010. ADAM17 activity and other mechanisms of soluble L-selectin production during death receptor-induced leukocyte apoptosis. *J Immunol*, 184, 4447-54,10.4049/jimmunol.0902925.

Ward, P.A. 2003. Acute lung injury: how the lung inflammatory response works. *Eur Respir J Suppl*, 44, 22s-23s,10.1183/09031936.03.00000703a.

Ware, L.B., Eisner, M.D., Thompson, B.T., et al. 2004. Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 170, 766-72,10.1164/rccm.200310-1434OC.

Ware, L.B. & Matthay, M.A. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 342, 1334-49,10.1056/NEJM200005043421806.

Wawro, K., Wawro, M., Strzelecka, M., et al. 2019. The role of NF-kappaB and Elk-1 in the regulation of mouse ADAM17 expression. *Biol Open*, 8, 10.1242/bio.039420.

Weber, C., Fraemohs, L. & Dejana, E. 2007. The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol*, 7, 467-77,10.1038/nri2096.

Webster, J.D. & Vucic, D. 2020. The Balance of TNF Mediated Pathways Regulates Inflammatory Cell Death Signaling in Healthy and Diseased Tissues. *Front Cell Dev Biol*, 8, 365,10.3389/fcell.2020.00365.

Weskamp, G., Mendelson, K., Swendeman, S., et al. 2010. Pathological neovascularization is reduced by inactivation of ADAM17 in endothelial cells but not in pericytes. *Circ Res*, 106, 932-40,10.1161/CIRCRESAHA.109.207415.

Wick, K.D., Matthay, M.A. & Ware, L.B. 2022. Pulse oximetry for the diagnosis and management of acute respiratory distress syndrome. *Lancet Respir Med*, 10, 1086-1098,10.1016/S2213-2600(22)00058-3.

Wiener-Kronish, J.P., Albertine, K.H. & Matthay, M.A. 1991. Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. *J Clin Invest*, 88, 864-75,10.1172/JCI115388.

Wolf, J., Rose-John, S. & Garbers, C. 2014. Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine*, 70, 11-20,10.1016/j.cyto.2014.05.024.

Wolfsberg, T.G., Primakoff, P., Myles, D.G., et al. 1995. ADAM, a novel family of membrane proteins containing A Disintegrin And Metalloprotease domain: multipotential functions in cell-cell and cell-matrix interactions. *J Cell Biol*, 131, 275-8,10.1083/jcb.131.2.275.

Wong, E., Maretzky, T., Peleg, Y., et al. 2015. The Functional Maturation of A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM) 9, 10, and 17 Requires Processing at a Newly Identified Proprotein Convertase (PC) Cleavage Site. *Journal of Biological Chemistry*, 290, 12135-12146,10.1074/jbc.M114.624072.

Wyble, C.W., Hynes, K.L., Kuchibhotla, J., et al. 1997. TNF-alpha and IL-1 upregulate membrane-bound and soluble E-selectin through a common pathway. *J Surg Res*, 73, 107-12,10.1006/jsre.1997.5207.

Xu, P. & Derynck, R. 2010. Direct activation of TACE-mediated ectodomain shedding by p38 MAP kinase regulates EGF receptor-dependent cell proliferation. *Mol Cell*, 37, 551-66,10.1016/j.molcel.2010.01.034.

Xu, P., Liu, J., Sakaki-Yumoto, M., et al. 2012. TACE activation by MAPK-mediated regulation of cell surface dimerization and TIMP3 association. *Sci Signal*, 5, ra34,10.1126/scisignal.2002689.

Yap, A.S., Briehner, W.M., Pruschy, M., et al. 1997. Lateral clustering of the adhesive ectodomain: a fundamental determinant of cadherin function. *Curr Biol*, 7, 308-15,10.1016/s0960-9822(06)00154-0.

Zheng, X., Jiang, F., Katakowski, M., et al. 2007. Inhibition of ADAM17 reduces hypoxia-induced brain tumor cell invasiveness. *Cancer Sci*, 98, 674-84,10.1111/j.1349-7006.2007.00440.x.

Zhou, B.B., Peyton, M., He, B., et al. 2006. Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. *Cancer Cell*, 10, 39-50,10.1016/j.ccr.2006.05.024.

Zlotnik, A. & Yoshie, O. 2012. The chemokine superfamily revisited. *Immunity*, 36, 705-16,10.1016/j.immuni.2012.05.008.

Zunke, F. & Rose-John, S. 2017. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864, 2059-2070,10.1016/j.bbamcr.2017.07.001.

8. Anhang

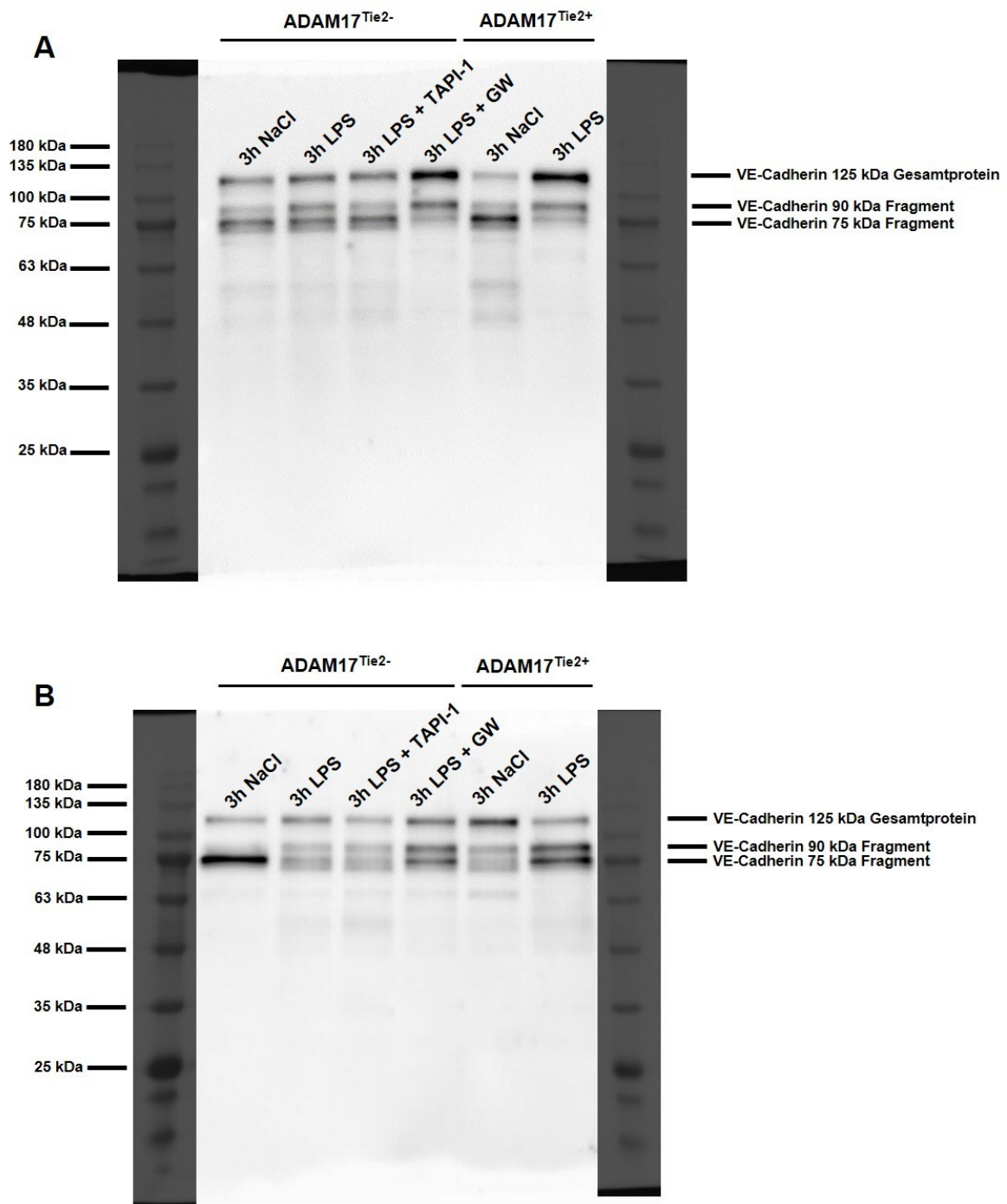


Abbildung 8.1 Vollständige Western Blot-Membranen von VE-Cadherin. Gezeigt sind die vollständigen VE-Cadherin Western Blot-Membranen (A) und (B) zu den in Abbildung 4.14 (J) und (K) sowie Abbildung 4.22 (F) und (G) dargestellten Ausschnitten. Gekennzeichnet sind die Banden des 125 kDa Gesamtproteins sowie der 90 kDa und 75 kDa Fragmente von VE-Cadherin.

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die vorgelegte Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin Tübingen unter der Betreuung von Prof. Dr. Franziska Konrad und Prof. Dr. Michael Köppen durchgeführt.

Die Konzeption und Supervision der Arbeit erfolgten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Franziska Konrad und Prof. Dr. Michael Köppen. Die Einarbeitung erfolgte durch Meike Goerlich. Die Versuche wurden von mir eigenständig durchgeführt. Die Durchführung der in-vivo-Migrationsversuche und des in-vitro-Transmigrationsassays erfolgte in Zusammenarbeit mit Anika Fuhr. Der in-vitro-Chemotaxis-Assay wurde in Zusammenarbeit mit Carolin Kleinmaier durchgeführt. Abbildung 4.8 (B) wurde mit freundlicher Genehmigung von Carolin Kleinmaier (eigene Darstellung, 2024 und in folgender Originalpublikation erstveröffentlicht: (Biedritzky et al., 2025)) übernommen. Die z-Stack Aufnahmen am Stellaris 5 erfolgten ebenfalls in Zusammenarbeit mit Carolin Kleinmaier.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte eigenständig durch mich.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden unter Beachtung der Leitlinien der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum verantwortungsvollen Umgang mit generativer KI-Modelle in der Wissenschaft die KI-Systeme Perplexity AI (Hersteller: Perplexity AI, Inc.) und ChatGPT Plus (Hersteller: Open AI) in begrenztem Umfang verwendet. Perplexity AI kam zu Zwecken der Literatur- und Informationsrecherche (Umfang ca. 15%) zum Einsatz. Perplexity AI und ChatGPT Plus wurden zudem zur sprachlichen Überarbeitung eigenständig verfasster Texte hinsichtlich Rechtschreibung, Grammatik und Ausdruck (Umfang ca. 30%) genutzt. Ich versichere, dass ich den Output der KI-Tools sorgfältig geprüft habe. Die konzeptionelle Entwicklung, inhaltliche Ausarbeitung sowie wissenschaftliche Bewertung der Arbeit erfolgten ausschließlich durch mich.

Hiermit erkläre ich, Anna Biedritzky, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

„Endotheliales ADAM17 als Schlüsselregulator der mikrovaskulären Permeabilität und Neutrophilenmigration in der LPS-induzierten akuten pulmonalen Inflammation“

selbstständig und nur mithilfe der angegebenen Quellen und Hilfsmittel sowie der Beratung durch meine beiden Betreuer verfasst habe. Wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen sind als solche gekennzeichnet. Ich versichere, dass diese Angaben wahr sind.

Die Dissertation wurde keiner anderen Fakultät vorgelegt. Des Weiteren erkläre ich, bisher kein anderes Promotionsverfahren ohne Erfolg beendet zu haben und dass keine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades vorliegt.

Tübingen, den

Anna Biedritzky

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Mein aufrichtiger und herzlicher Dank gilt Frau Prof. Dr. Franziska Konrad, die mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses Projekt in ihrer Arbeitsgruppe zu bearbeiten und meine Dissertation zu diesem Thema zu verfassen. Durch ihre Unterstützung, ihr Vertrauen in mich und ihre wertvollen wissenschaftlichen Impulse wurde nicht nur diese Arbeit ermöglicht, sondern auch meine persönliche und fachliche Entwicklung wesentlich gefördert. Für alles möchte ich mich ganz herzlich bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herr Prof. Dr. Michael Köppen, der als Co-Betreuer einen maßgeblichen Teil der Betreuung dieser Dissertation übernommen hat. Durch seine fachliche Expertise, die konstruktiven Rückmeldungen und seinen wertvollen wissenschaftlichen Austausch hat er meine fachlichen Kompetenzen nochmals erheblich erweitert und diese Arbeit inhaltlich sehr bereichert. Ich schätze seine engagierte Begleitung, seinen großen Einsatz und seine stets unterstützende Art sehr und möchte mich ganz herzlich für alles bedanken.

Ich bedanke mich bei Anika Fuhr, Lisa Herrmann, Jutta Gamper-Tsigaras und Michaela Hoch-Gutbrod für eure wertvolle Unterstützung, eure stetige Hilfsbereitschaft, euren technischen und methodischen Rat sowie die schöne gemeinsame Zeit. Danke, dass ihr immer für mich da gewesen seid. Außerdem danke ich Carolin Kleinmaier, die ich während ihrer medizinischen Doktorarbeit einlernen und unterstützen durfte. Auch vielen Dank für deine große Unterstützung.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meiner Familie, allen voran meiner Mutter, meiner Schwester und meinem Partner, bedanken, die mich während der gesamten Promotionszeit mit großer Geduld, Verständnis und Liebe unterstützt hat. Ohne eure stetige Ermutigung und Rückendeckung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Danke für eure nie endende Motivation und dafür, dass ihr immer an mich geglaubt habt dieses Ziel zu erreichen.