

Aus der

Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

**Der Einfluss der Interaktion von Semaphorin 4D und
Plexinen auf die Migration neutrophiler Granulozyten
während einer akuten Lungenentzündung**

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

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

vorgelegt von

Blaha, Maximilian Klaus

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Rosenberger
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. J. Hetzel

Tag der Disputation: 18.09.2023

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
Glossar.....	7
Abbildungsverzeichnis.....	13
Tabellenverzeichnis.....	15
1 Einleitung.....	17
1.1 <i>Merkmale einer Entzündungsreaktion</i>	<i>17</i>
1.2 <i>Adhäsionsmechanismen neutrophiler Granulozyten</i>	<i>22</i>
1.3 <i>Das Acute Respiratory Distress Syndrome und die Acute Lung Injury.....</i>	<i>23</i>
1.4 <i>Neuronale guidance Proteine im Immunsystem</i>	<i>26</i>
1.5 <i>Semaphorine und Plexine.....</i>	<i>28</i>
1.5.1 <i>Struktureller Aufbau von Semaphorinen und Plexinen</i>	<i>28</i>
1.5.2 <i>Beispiele für Semaphorin-Plexin-Interaktion im Immunsystem.....</i>	<i>31</i>
1.6 <i>Bisher bekannte Funktionen von SEMA4D im Immunsystem</i>	<i>32</i>
1.7 <i>Wissenschaftliche Hypothese und Ziel dieses Projektes.....</i>	<i>35</i>
2 Materialien und Methoden.....	36
2.1 <i>Allgemeine Materialien.....</i>	<i>36</i>
2.2 <i>Humane Zelllinien</i>	<i>38</i>
2.2.1 <i>Materialien.....</i>	<i>38</i>
2.2.2 <i>Verwendete Zellen</i>	<i>39</i>
2.2.3 <i>Stimulation</i>	<i>39</i>
2.3 <i>Tierversuche</i>	<i>40</i>
2.3.1 <i>Versuchstiere</i>	<i>40</i>
2.3.2 <i>Narkose der Versuchstiere.....</i>	<i>40</i>
2.4 <i>LPS-Inhalationsmodell</i>	<i>41</i>
2.4.1 <i>Materialien.....</i>	<i>41</i>
2.4.2 <i>LPS-Inhalation.....</i>	<i>41</i>
2.4.3 <i>Organentnahme</i>	<i>42</i>
2.5 <i>Durchflusszytometrie</i>	<i>43</i>

2.5.1	Materialien.....	43
2.5.2	Durchführung	45
2.5.3	Analyse und Gating-Strategie	46
2.6	<i>Histologie</i>	47
2.6.1	Materialien.....	47
2.6.2	Paraffinschnitte	49
2.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	50
2.6.4	Immunhistochemisches PMN-Staining	51
2.6.5	Immunfluoreszenz-Färbung	53
2.7	<i>Bronchoalveoläre Lavage</i>	54
2.7.1	Materialien.....	54
2.7.2	Durchführung	54
2.8	<i>Zellzahlbestimmung</i>	55
2.8.1	Materialien.....	55
2.8.2	Durchführung	55
2.9	<i>Quantitative Bestimmung von Myeloperoxidase und Protein</i>	56
2.9.1	Materialien.....	56
2.9.2	MPO-Versuch.....	56
2.9.3	Proteinbestimmung	57
2.10	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i>	58
2.10.1	Materialien.....	58
2.10.2	Durchführung	58
2.11	<i>Quantitative Real-Time-PCR</i>	60
2.11.1	Materialien und Primer	60
2.11.2	Durchführung und Genquantifizierung	62
2.12	<i>Flusskammer</i>	64
2.12.1	Materialien.....	64
2.12.2	Aufbau der Flusskammern und Durchführung des Versuches	65
2.12.3	Analyse und Zelltracking	66
2.13	<i>Intravitalmikroskopie</i>	67
2.13.1	Materialien.....	67
2.13.2	Durchführung	68
2.13.3	Analyse	69
2.14	<i>Stimulation von humanem Vollblut</i>	70
2.14.1	Materialien.....	70
2.14.2	Durchführung	70

2.15	<i>Magnetische PMN-Isolation und Chemotaxis-Versuch</i>	71
2.15.1	Materialien.....	71
2.15.2	Isolation von PMNs	73
2.15.3	Chemotaxis-Versuch.....	75
2.15.4	Analyse	77
3	Ergebnisse	78
3.1	<i>Der Einfluss eines proinflammatorischen Stimulus auf die Expression von SEMA4D und PlexinB1</i>	78
3.1.1	Bestimmung der Expression von SEMA4D und PlexinB1 in humanen Zelllinien nach proinflammatorischer Stimulation	78
3.1.2	Vergleich der zellulären und humoralen Konzentration von SEMA4D nach Stimulation humanen Vollblutes mit TNF- α	81
3.2	<i>Die Reaktion von isolierten humanen Immunzellen auf die Exposition mit SEMA4D unter physiologischen Bedingungen</i>	82
3.2.1	Die Inkubation von PMNs mit rhSEMA4D führt zu einer dem SEMA4D-Gradienten entgegengerichteten Migrationsbewegung	82
3.2.2	Die Blockade verschiedener Rezeptoren für SEMA4D besitzt einen unterschiedlichen Einfluss auf das Migrationsverhalten der isolierten PMNs	86
3.3	<i>Die Blockade von SEMA4D mit einem spezifischen Antikörper führt zu einer fehlenden Änderung der Rollgeschwindigkeit bei stärkerem Adhäsionsreiz</i>	90
3.4	<i>Der genetische Knockout von Sema4d beeinflusst das Adhäsionsverhalten von PNCs bei muriner Inflammation</i>	93
3.5	<i>Der Einfluss fehlenden Sema4d's auf die Aktivität von Immunzellen bei Mäusen</i>	96
3.5.1	Analyse der histologischen Lungenproben	96
3.5.2	In der bronchoalveolären Lavage besteht nach der LPS-Inhalation kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und Sema4d ^{-/-} -Mäusen.....	100
3.6	<i>Entzündung durch LPS-Inhalation führt in den Lungen von Sema4d^{-/-} zu einer erhöhten mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine</i>	102
3.7	<i>Sema4d beeinflusst bei Mäusen die zelluläre Expression von Zelladhäsionsmolekülen</i>	104
3.7.1	Sema4d ^{-/-} -Mäuse zeigen nach LPS-Inhalation eine geringere Anzahl von PNCs im Blut und eine geringere Expression von Adhäsionsmolekülen	104
3.7.2	Die Behandlung von WT-Mäusen mit rmSema4d führt zu einer erhöhten Zahl an PNCs	107
3.7.3	Die Blockade von Sema4d in WT-Mäusen führt zu einer signifikant geringeren Menge von Zelladhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von PNCs.....	109

4	Diskussion.....	111
5	Zusammenfassung	123
6	Referenzen.....	125
7	Anhang.....	130
7.1	<i>Danksagung.....</i>	<i>130</i>
7.2	<i>Erklärung zum Eigenanteil</i>	<i>132</i>

Glossar

*	„analog für sämtliche Subtypen der betreffenden Proteinfamilie“
18S	Ribosom-Untereinheit mit dem Sedimentationskoeffizient 18, dient in den PCR-Versuchen als Housekeeping-Gen
ABC	Avidin-Biotin complex
ABTS	2,2'-azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
Ag	Antigen (hier als Bezeichnung des jeweiligen Zielmoleküls eines Antikörpers)
Ak	Antikörper
ALI	Acute Lung I
ANCA	Anti Neutrophil cellular antibody
Angriffst.	Angriffsstelle
anti-h/m[Ag]	Nomenklatur der in diesem Projekt verwendeten Antikörper gegen humane (h) oder murine (m) Zielmoleküle bzw. ohne Bezug auf eine spezielle Spezies, ausgenommen sind Produktnamen sowie einige in der IHC oder IF Histologie verwendete Antikörper einer anderen Spezies.
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCA	Bicinchoninsäure
BE	Blutentnahme
BSA	Bovines Serumalbumin
Bzw.	Beziehungsweise
C3aC5a	Komplex aus den aktivierten Komplementfaktoren C3 und C5
CD	Cluster of differentiation
CD11b	Cluster of differentiation 11b = Integrin α -M
CD14	Cluster of differentiation 14
CD15	Cluster of differentiation 15

CD18	Cluster of differentiation 18 = β_2 -Integrin
CD4	Cluster of differentiation 4
CD42b	Cluster of differentiation 42b = Glycoprotein Ib
CD62E	Cluster of differentiation 62E = E-Selektin
CD62L	Cluster of differentiation 62L = L-Selektin
CD62P	Cluster of differentiation 62P = P-Selektin
CD72	Cluster of differentiation 72
cDNA	Komplementäre DNA
CRP	C-reaktives Protein
CTLA4	Cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4
Ctla4	Cytotoxic t-lymphocyte-associated protein 4 (Abkürzung im Zusammenhang mit in diesem Projekt ermittelten murinen Daten)
CXCL1	C-X-C motif chemokine Ligand 1
CXCL2	C-X-C motif chemokine Ligand 2
Cxcl2	C-X-C motif chemokine Ligand 2 (Abkürzung im Zusammenhang mit in diesem Projekt ermittelten murinen Daten)
DAMP	Damage associated molecular pattern
DAPI	4',6-Diamin-2-Phenylindol
DNA	Desoxy ribonucleic acid
E-Sel	E-Selektin
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS™	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	Kristallines Antikörperfragment
FCS	Fetales Kälberserum
FiO ₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion

Fix.	Fixieren
FMI	Forward migration index
fMLP	N-Formylmethionin-Leucyl-Phenylalanin
fps	Frames per second (Bilder pro Sekunde)
FSC	Forward Scatter
FSGO	Fish Skin Gelatin Oil
G	Gauge
g	Gramm
GAP	GTPase activating Protein
GPI	Glucosylphosphatidylinositol
GTPase	Guanosintriphosphat spaltendes Enzym
h	Stunde(n)
H.E.	Hämatoxylin-Eosin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HMEC	Human microvascular endothelial cells
i.v.	Intravenös
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1 = CD54
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL*	Interleukin
Il*	Interleukin (Abkürzung im Zusammenhang mit in diesem Projekt ermittelten murinen Daten)
IPT	Immunoglobulin-like-fold, Plexins, Transcription factors
Jh.	Jahrhundert
JON/A	Antikörper gegen GPIIb/IIIa (Klon JON/A; murin)
KC	Keratinocytes-derived chemokine = murines CXCL1

kgKG	Kilogramm Körpergewicht
LBP	LPS binding protein
LDH	Laktatdehydrogenase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1 = CD11b/CD18
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6G	Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D
Ly6G/6C	Lymphocyte antigen 6 complex, Locus G/Locus C
M.	Musculus
Mac-1	Macrophage-1 antigen = CD11b/CD18
MFI	Mean Fluorescence Intensity
mg	Milligramm
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Messenger ribonucleic acid
NaCl	Isotonische Kochsalzlösung
Neg./neg.	Negativ
NET	Neutrophil extracellular trap
NF- κ B	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NGP	Neuronal guidance Protein
nm	Nanometer
ns	Nicht signifikant
PaO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase chain reaction
PDZ	Akronym, benannt nach den ersten Proteinen, in denen diese Domäne festgestellt wurde: Post synaptic density

	protein 95, Drosophila disc large tumor suppressor, Zonula occludens 1
PEEP	Positive endexpiratory pressure
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PLXNB1*	PlexinB1
PMN	Polymorphonuclear Leucocytes (Granulozyten)
PNC	Platelet-Neutrophil Complex
pos.	Positiv
PRR	Pattern recognition receptor
PSI	Plexin-Semaphorin-Integrin
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate
Ras	Rat sarcoma (Proto-Onkogen)
RBC	Red blood cell = Erythrozyt
RGMb	Repulsive guidance molecule b
Rho	Ras-homologue GTPase
rhSEMA4D	Rekombinantes humanes Semaphorin 4D
rmSema4d	Rekombinantes murines Semaphorin 4D
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of interest
ROS	Reactive oxygen species (reactive Sauerstoffspezies)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-qPCR	Quantitative Reverse-Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
Sema4d	Semaphorin 4D (Abkürzung im Zusammenhang mit in diesem Projekt ermittelten murinen Daten)
<i>Sema4d</i> ^{-/-}	Homozygoter Semaphorin 4D Knockout bei Mäusen
SEMA4D*	Semaphorin 4D
SSC	Sidewards Scatter
sSEMA4D	Soluble (gelöstes) SEMA4D

TBST	Tris-buffered saline with TWEEN20
Thromb.	Thrombozyten
TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
Tnf- α	Tumornekrosefaktor-alpha (Abkürzung im Zusammenhang mit in diesem Projekt ermittelten murinen Daten)
TNF- α^*	TNF(Tumornekrosefaktor)-alpha
TWEEN	Polysorbat 20
vs.	Versus
vWF	Von-Willebrand-Faktor
WR	Working reagent
WT	Wildtyp
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Signalkaskade einer durch Zellnekrose ausgelösten Entzündung	19
Abbildung 2	Darstellung einer LPS induzierten Entzündungsreaktion aus [12]	21
Abbildung 3	Schematische Darstellung der Struktur von Klasse 4 Semaphorinen und Klasse B Plexinen [35, 36, 38]	30
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Präparation der Blutproben für die Durchflusszytometrie (BE = Blutentnahme).....	45
Abbildung 5	Gatingstrategie der Durchflusszytometrie zur Untersuchung der PNCs	46
Abbildung 6	Aufbau einer Flusskammer (Flow Chamber).....	65
Abbildung 7	Schematische Darstellung der PMN-Isolation mit magnetischen Antikörpern	75
Abbildung 8	Schematische Darstellung der Gradienten des Chemotaxis-Versuches.....	76
Abbildung 9	Gesteigerte SEMA4D Expression auf der Zelloberfläche von Epithel- und Endothelzellen nach proinflammatorischer Stimulation.....	79
Abbildung 10	RT-qPCR-Analyse von humanen Endothelzellen.....	80
Abbildung 11	Zeitlicher Verlauf der Konzentration von SEMA4D in den zellulären und nicht zellulären Blutbestandteilen.....	81
Abbildung 12	Repräsentative Trackingstrecken-Darstellungen in µm aus dem Chemotaxis and Migration Tool in ImageJ	83
Abbildung 13	Analyse des Chemotaxis-Versuches in Bezug auf die direkte Wirkung von rhSEMA4D auf nicht aktivierte neutrophile Granulozyten – rhSEMA4D wirkt chemorepulsiv.....	85
Abbildung 14	Chemotaxis Versuches unter Blockade von PlexinB1 und PlexinB2	87
Abbildung 15	Vergleichsgruppen der Signifikanzanalyse des Chemotaxis-Versuches.....	89

Abbildung 16	Flusskammer-Versuch unter Blockade von SEMA4D mit einem spezifischen Antikörper	91
Abbildung 17	Intravitalmikroskopisches Zelltracking	93
Abbildung 18	Rollgeschwindigkeit und Migrationsverhalten der Granulozyten in der IVM nach i.v. LPS-Applikation	94
Abbildung 19	Lungen-IF-Färbung von WT-Mäusen nach NaCl- oder LPS-Inhalation	97
Abbildung 20	Hämatoxylin-Eosin Färbung von Lungenschnitten der Versuchstiere nach NaCl- oder LPS-Inhalation und vier Stunden Inkubation (repräsentative Bilder).....	98
Abbildung 21	Immunhistochemische PMN-Färbung von Lungenschnitten der Versuchstiere nach NaCl- oder LPS-Inhalation mit anschließender vierstündiger Inkubationszeit. Vergrößerung 400x (große Bilder) und 630x (kleine Bilder)	99
Abbildung 22	Ergebnisse der bronchoalveolären Lavage bei Mäusen nach NaCl- oder LPS-Inhalation.....	101
Abbildung 23	Bestimmung von proinflammatorischen Zytokinen mittels RT-qPCR	103
Abbildung 24	Durchflusszytometrie von murinem Vollblut nach LPS-Inhalation	105
Abbildung 25	Durchflusszytometrie von murinem Vollblut nach intravenöser Applikation von rmSema4d in WT-Mäusen	108
Abbildung 26	Durchflusszytometrie von murinem Vollblut nach SEMA4D-Blockade mit einem anti-mSema4d Antikörper	110

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Historische Entwicklung der Definition einer Entzündung [2] .	17
Tabelle 2	Diagnosekriterien eines ARDS nach der Berlin Definition der ARDS Definition Task Force von 2011 [18]	23
Tabelle 3	Häufig verwendete Materialien	37
Tabelle 4	Material für Zellpflege	38
Tabelle 5	Rezepturen der Zellmedien für die humanen Zelllinien	39
Tabelle 6	Material für den LPS-Inhalationsversuch und die Aufbewahrung von Organproben.....	41
Tabelle 7	Material für die Durchflusszytometrie	44
Tabelle 8	Antikörpergemisch 1 des Durchflusszytometrie-Experimentes	44
Tabelle 9	Antikörpergemisch 2 des Durchflusszytometrie-Experimentes	44
Tabelle 10	Material für das Anfertigen von Paraffinschnitten, HE-Färbung, IHC-Färbung und IF-Färbung	49
Tabelle 11	Rezepturen für die IHC-PMN-Färbung	52
Tabelle 12	Rezepturen für die IF-Färbung	53
Tabelle 13	Material für die BAL	54
Tabelle 14	Material für die mikroskopische Zellzahlbestimmung	55
Tabelle 15	Material für die quantitative MPO- und Proteinbestimmung ...	56
Tabelle 16	ELISA-Kits	58
Tabelle 17	Material für die Bestimmung der Genexpression mittels RT- qPCR	61
Tabelle 18	Primerliste für die RT-qPCR	61
Tabelle 19	Protokoll des T1000 Thermal Cyclers zur cDNA-Synthese....	62
Tabelle 20	Protokoll der RT-qPCR.....	63
Tabelle 21	Material für die Flusskammer-Versuche.....	64
Tabelle 22	Material für die Intravitalmikroskopie	68

Tabelle 23	Für die Stimulation der humanen Zellen verwendetes TNF- α - Präparat.....	70
Tabelle 24	Material für die magnetische Zellisolation und den Chemotaxis- Versuch	73
Tabelle 25	Rezepturen für die im Chemotaxis-Versuch verwendete Zellmedium und den Waschpuffer für die Zellisolation.....	73

1 Einleitung

1.1 Merkmale einer Entzündungsreaktion

Bei einer körperlichen Untersuchung wird eine Entzündung häufig durch ein oder mehrere ihrer fünf Kardinalzeichen erkennbar: Dolor, Rubor, Calor, Tumor und Functio laesa [1]. Die heutige Definition und Beschreibung einer Entzündung geht jedoch weit über diese Ausgangsdefinition hinaus. Es existieren ebenso Entzündungen, die äußerlich nicht direkt sichtbar sind.

Autor und Zeitpunkt	Entwicklung
Celsius im 1. Jh. n. Chr.	Erste Beschreibung einer Entzündung anhand klinischer Symptome: „rubor et tumor cum calore et dolore“
Galen im 3. Jh. n. Chr.	Entdeckung der unterstützenden Rolle einer Entzündungsreaktion bei der Wundheilung
Virchow im Jahr 1871	Charakterisierung der Entzündung als eine zelluläre Reaktion aufgrund einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand
Cohnheim im Jahr 1873	Leukozytendiapedese
Metchnikoff im Jahr 1908	Beschreibung der Fähigkeit von Phagozyten, die Ursache der Entzündung zu bekämpfen
Lewis im Jahr 1927	Beschreibung einer neurogenen Komponente der Entzündung
Rocha e Silva im Jahr 1974	Beschreibung der Rolle von Entzündungsmediatoren, biochemische Definition einer Entzündung

Tabelle 1 Historische Entwicklung der Definition einer Entzündung [2]

Eine Entzündung wird von Medzhitov generell als eine Immunantwort beschrieben, die das Überleben während einer Infektion sicherstellt. Somit gewährleistet die Entzündungsreaktion die Homöostase verschiedener Gewebe, welche einer oder mehreren Noxen ausgesetzt sind. Medzhitov beschreibt vier Komponenten einer Entzündung. Zum einen die Noxe selbst, zum anderen den Detektor, der die Noxe als solche erkennt. Des Weiteren zählt Medzhitov die so freigesetzten Entzündungsmediatoren und deren Zielorgane zu den vier Komponenten der Entzündung. Den Beginn einer Entzündungsreaktion stellt die Freisetzung von Entzündungsmediatoren dar. Entzündungsmediatoren lösen beispielsweise die Freisetzung des Akuten-Phase-Proteins CRP aus Hepatozyten oder die Freisetzung von PGE_2 aus den Endothelzellen der Hirngefäße aus [1]. Eine nicht durch eine spezifische Noxe ausgelöste Entzündungsreaktion trägt außerdem zur Wundheilung bei [3]. Als Folgeerscheinung eines Apoplex trägt eine Entzündungsreaktion zur Protektion des nicht direkt von dem ischämischen Ereignis betroffenen Gewebes bei. In diesen Fällen spricht man von einer sterilen Entzündung [4]. Nekrotische Zellen aktivieren unter anderem das Komplementsystem. Außerdem werden bei einer Zellnekrose oder einem anders gearteten Zellschaden DAMPs freigesetzt. Rezeptoren für DAMPs befinden sich beispielsweise auf Leukozyten [5], Abbildung 1. Durch die Bindung von DAMPs an DAMP-Rezeptoren werden proinflammatorische Zytokine freigesetzt und Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise NF- κ B aktiviert [6]. Weitere in diesem Zusammenhang wichtige Transkriptionsfaktoren sind außerdem AP-1 (activator protein 1) und STAT (Signal transducers and activators of transcription) [7].

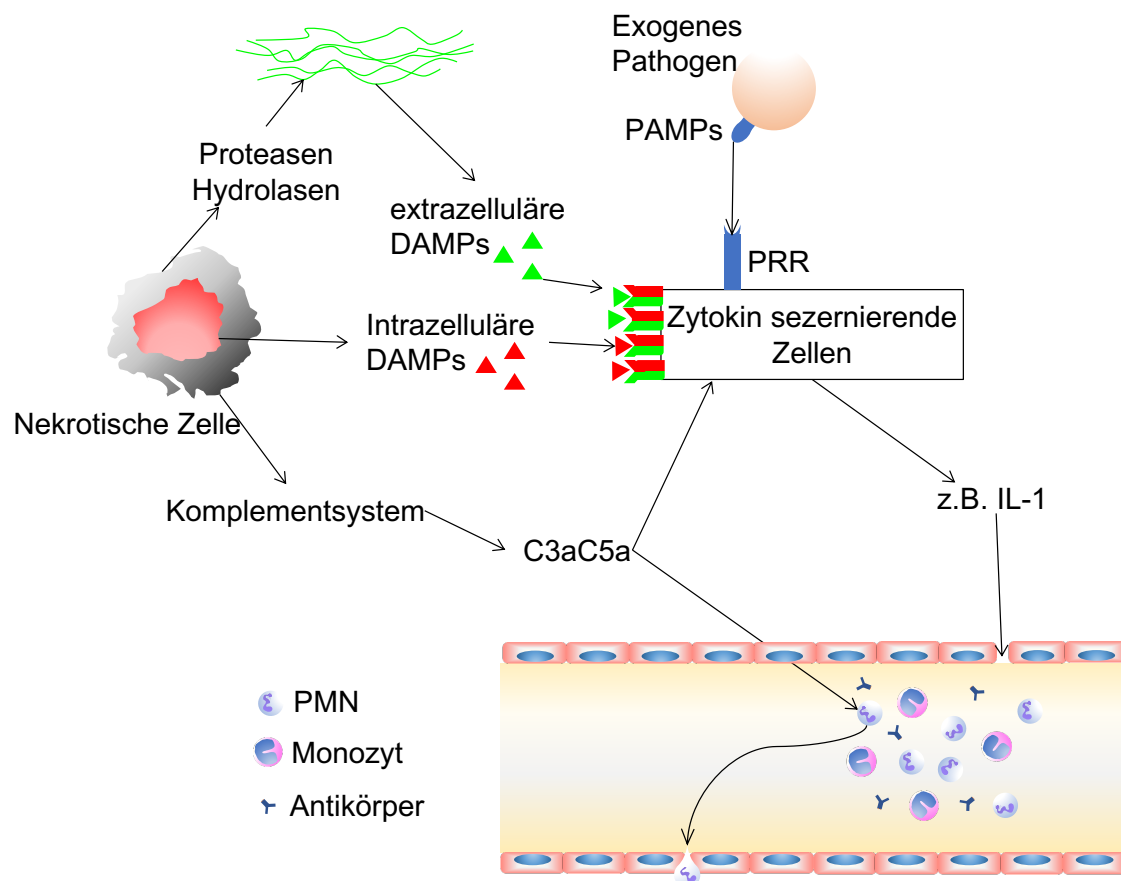


Abbildung 1 Signalkaskade einer durch Zellnekrose ausgelösten Entzündung

Die Immunzellen werden durch verschiedene Arten von molekularen Mechanismen aktiviert. Hierzu zählen das Komplementsystem und DAMPs, die durch die Schädigung der Zellmembran freigesetzt werden. Außerdem werden durch die Freisetzung von Proteasen und Hydrolasen extrazelluläre DAMPs auf Grundlage von Molekülen der ECM (Extrazellulärmatrix) gebildet. Die Bindung von DAMPs an DAMP-Rezeptoren führen zur Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. Diese stimulieren einerseits PMNs und Makrophagen und regen die Produktion von Antikörpern an und führen andererseits zu einer Auflockerung der Endothelbarriere. [1, 8]

Grundsätzlich wird zwischen einer akuten und einer chronischen Entzündung unterschieden, die durch die Freisetzung unterschiedlicher Entzündungsmediatoren gekennzeichnet sind. Während einer akuten Entzündung werden zusätzlich zu den im vorherigen Absatz genannten Zytokinen außerdem IL-8, IL-11, G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor) und GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony stimulating factor) freigesetzt. Feghali et al. teilen die chronische Entzündung in eine humorale und eine zelluläre Komponente auf. Während die humorale Komponente vor allem durch IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 und IL-13 vermittelt wird, wird die zelluläre Komponente vor

allem auch durch diverse Interleukine und außerdem durch Interferone, TGF- β (Transforming growth factor beta) sowie TNF- α und β ausgelöst [9].

Kann eine chronische Entzündung nicht abklingen, können beispielsweise Gewebefibrose oder maligne Wachstumsprozesse die Folge sein. Letztere stehen eng mit der chronischen Entzündung in Verbindung [7].

Um die Chronifizierung und eine überschießende Entzündung zu vermeiden, folgt auf die akute Entzündungsreaktion die sogenannte Resolution. Die Resolution ist durch eine Konzentrationsabnahme der proinflammatorischen Zytokine, beispielsweise durch Abspaltung dieser von Zellmembranen, gekennzeichnet. Des Weiteren bindet ein Teil der Zytokine an sogenannte Atypical Chemokine Receptors (ACKRs), die keinen proinflammatorischen Effekt besitzen, sondern die Zytokine aus der Umgebung der Zellen durch Bindung entfernen. Außerdem werden proinflammatorische Zytokine auch durch MMPs (Matrix-Metalloproteasen) inaktiviert. Laut dem Review von Sugimoto führt ein Ausbleiben der Resolution möglicherweise zu Pathologien wie Morbus Alzheimer, Atherosklerose, kardiovaskulären Erkrankungen und malignen Tumoren. Die gleichen Stoffe, die die Initiation einer Entzündung auslösen, finden sich auch in der Aktivierungskaskade der Resolution. Dies führt zu einer Balance zwischen pro- und antiinflammatorischen Vorgängen. Als Beispiel für einen solchen Faktor führt Sugimoto den Transkriptionsfaktor NF- κ B an, der sowohl an der Entstehung einer Entzündungsreaktion als auch an deren Abklingen beteiligt ist. Generell ist während der Resolution die Migration der unspezifischen Entzündungszellen vermindert [10].

Dieses Projekt beschäftigt sich mit der akuten Entzündung und insbesondere mit den Vorgängen während einer akuten Entzündungsreaktion in der Lunge im Sinne eines ARDS. Im Mausmodell wurde ein akuter Lungenschaden durch die Inhalation von LPS aus *E. coli* herbeigeführt. Lipopolysaccharide lösen eine TLR gesteuerte Entzündungsreaktion aus [11, 12]. Diese Reaktion wird in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

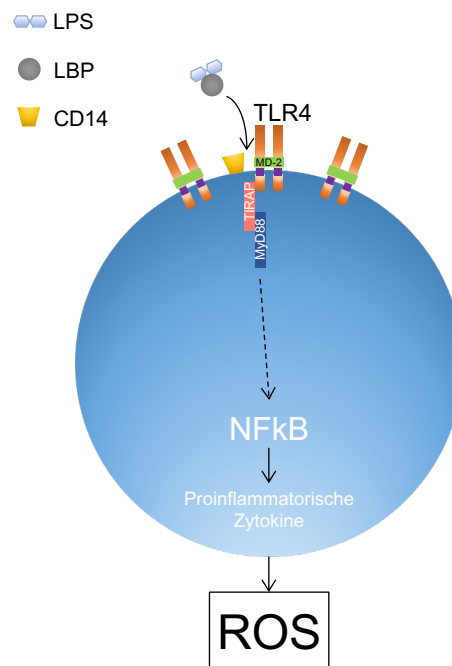


Abbildung 2 Darstellung einer LPS induzierten Entzündungsreaktion aus [12]

Die Präsenz von bakteriellen Zellwandbestandteilen in Gestalt von LPS verursacht nach Bindung eines Komplexes aus LPS, LBP über den Co-Rezeptor CD14 eine Aktivierung des TLR4 Rezeptors. Ebenso wie der DAMP Rezeptor verursacht dies eine Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [12].

Bei den proinflammatorischen Zytokinen, die in diesem Projekt betrachtet wurden, handelt es sich um $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , KC sowie CXCL2.

Bei $\text{TNF-}\alpha$ handelt es sich um ein unspezifisches proinflammatorisches Molekül, das von Makrophagen freigesetzt wird und durch IL-1 Freisetzung unter anderem Fieber auslöst [13]. $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 werden ebenfalls in der unspezifischen Phase der Entzündung sezerniert. KC oder CXCL1 und CXCL2 sind an der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten beteiligt. Deren Wirkung zeigt sich laut De Filippo et al. bereits während einer sehr frühen Phase der Entzündung [13]. Außerdem wurde CTLA4 betrachtet, das zwar auch bei der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle spielt, jedoch primär als Kontrollprotein gegen eine überschießende Immunreaktion bekannt ist [14].

1.2 Adhäsionsmechanismen neutrophiler Granulozyten

Dieses Projekt beschäftigt sich zu einem großen Teil mit dem Verhalten von neutrophilen Granulozyten (PMNs) unter verschiedenen Bedingungen. PMNs gehören zu den ersten Zellen, die während einer Entzündung aktiviert werden und ins Gewebe emigrieren. Kommt es zu einer Entzündungsreaktion, interagieren neutrophile Granulozyten mit Thrombozyten in so genannten Platelet Neutrophil complexes (PNCs). Diese Interaktion wird vor allem über β 2-Integrine und P-Selektin initiiert. Auf PNCs zeigt sich eine erhöhte Expression von CD11b auf der Zelloberfläche [15]. Generell bezeichnet die Abkürzung PMN sämtliche Arten von Granulozyten, in dieser Dissertation steht die Abkürzung PMN spezifisch für neutrophile Granulozyten.

Die parazelluläre Diapedese von PMNs durch die Endothelbarriere unterscheidet sich in verschiedenen Geweben. Die Migration durch postkapilläre Venolen besteht aus mehreren Phasen (lockere Bindung, Rollen, Verstärkung der Bindung, Kriechen und Durchschreiten der Endothelbarriere), die durch die Interaktion verschiedener Zelladhäsionsmoleküle charakterisiert sind. Die Initiation des Vorganges wird hauptsächlich den Selektinen zugeschrieben. Auf der Endothelseite sind hier P-Selektin und E-Selektin sowie PSGL-1 (P-Selektin-Glykoprotein Ligand 1) zu erwähnen. Auf Seiten der PMNs spielt in der Initiation der Diapedese vor allem L-Selektin eine Rolle. Die Rollbewegung erfordert zusätzlich zur Aktivität der Selektine auch eine Bindung der Integrine ICAM-1 und dem β 2-Integrin LFA-1. Eine weitere Festigung der Bindung sowie das Kriechen der neutrophilen Granulozyten wird durch die zusätzliche Bindung von endothelialelem ICAM-1 und dem β 2-Integrin Mac-1 auf den PMNs vermittelt. Diese Moleküle spielen zusammen mit zahlreichen anderen auch während des Durchtrittes der PMNs durch die Endothelbarriere eine Rolle, wobei hier zusätzlich unter anderem Tight-Junction-Proteine Einfluss nehmen. In den Lungenkapillaren besteht außerdem die Möglichkeit, dass auch β 1-Integrine an der Diapedese beteiligt sind [16, 17].

1.3 Das Acute Respiratory Distress Syndrome und die Acute Lung Injury

Bei einem ARDS handelt es sich primär um eine überschießende Immunreaktion. Grundsätzlich sind die pathophysiologischen Vorgänge des ARDS und der ALI ähnlich. Der Unterschied zwischen den beiden Krankheitsbildern besteht lediglich in ihrem Schweregrad. Deswegen wird in dieser Dissertation der Begriff ALI stellvertretend für beide Krankheitsbilder verwendet. Die ursprüngliche Definition eines ARDS anhand der Atlanta-Kriterien wurde mittlerweile durch die 2011 erarbeitete Berlin Definition ersetzt [18].

Kriterium	Beschreibung
Hypoxie (laborchemisch)	Einteilung in drei Schweregrade anhand des Horovitz-Quotienten bei PEEP >5cmH ₂ O: 300-201 mmHg mild 200-101 mmHg moderat <100 mmHg schwer
Zeitpunkt	Auftreten der respiratorischen Beschwerden spätestens eine Woche nach einem spezifischen Ereignis
Atemmechanik	respiratorische Insuffizienz, die weder durch eine kardiale Ursache noch durch eine Volumenüberladung erklärbar ist
Radiologie	bilaterale, diffuse Infiltrate ohne spezifisch diagnostizierbare Ursache

Tabelle 2 Diagnosekriterien eines ARDS nach der Berlin Definition der ARDS Definition Task Force von 2011 [18]

Der Horovitz-Quotient ist ein aus Messwerten errechneter Marker zur Einschätzung der Oxygenierung eines Patienten und errechnet sich aus dem Quotienten des arteriellen Sauerstoffpartialdruckes P_aO_2 und der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration F_iO_2 . [19].

Die möglichen Ursachen für eine ALI, die in Tabelle 2 als spezifische Ereignisse bezeichnet werden, gliedern sich in pulmonale und nicht pulmonale Ursachen. Zu den pulmonalen Ursachen zählen direkt lungenschädigende Ereignisse wie eine Pneumonie, die Aspiration bzw. Inhalation etwaiger Noxen oder Magensaftes, eine Lungenkontusion, ein embolisches Ereignis, das Beinaheertrinken, ein Barotrauma oder ein Inhalationstrauma. Nicht pulmonale Ursachen für eine ALI sind Ereignisse, die für den Körper einen großen Stressfaktor darstellen. Hierzu zählen Sepsis, (Poly-)Trauma, hoher Transfusionsbedarf, schwere Intoxikationen und andere schwere Entzündungen im Körper wie zum Beispiel die akute Pankreatitis [20].

Der Entstehung einer ALI liegen mehrere pathophysiologische Mechanismen zugrunde. Durch die erhöhte Permeabilität der Blut-Luft-Schranke kommt es zu einem vermehrten Austritt von Flüssigkeit in das umliegende Gewebe und somit zu einem proteinreichen Lungenödem. Einerseits ist die erhöhte Permeabilität eine Folge der vermehrten Durchlässigkeit der Endothelbarriere, die bei jeglicher Art von Entzündungsreaktion auftritt. Andererseits stellt die Schädigung des Alveolarepithels in Gestalt der Typ-I-Pneumozyten eine weitaus gravierendere Kompromittierung der Blut-Luft-Schranke dar. Dies führt zu Zellnekrosen [21]. Eine Schädigung des Alveolarepithels bedingt außerdem eine Beeinträchtigung der Funktion von Typ-II-Pneumozyten und somit eine verminderte Produktion von Surfactant. Eine geringere Menge an Surfactant führt zu einer erhöhten Oberflächenspannung in den Alveolen und verursacht somit Atelektasen und ein Absinken der Lungencompliance [22]. Außerdem spielen die Aktivierung von PMNs, die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und eine überschießende Produktion reaktiver Sauerstoffspezies eine Rolle in der Pathophysiologie der Entstehung einer ALI.

Der klinische Verlauf eines manifesten ARDS gliedert sich in drei Phasen. Initial tritt die oben beschriebene exsudative Phase ein. Die anschließende proliferative Phase kennzeichnet sich durch ausgeprägte Regenerationsvorgänge des Lungengewebes [23].

Grundsätzlich ist ein folgenloses Abklingen eines ARDS im Bereich des Möglichen, allerdings mündet die proliferative Phase bei einem hohen Anteil der Patienten in eine irreversible Lungenfibrose [21].

Es existieren verschiedene Ansätze zur Reduktion der Mortalität eines ARDS. Huppert erwähnt in seiner Publikation aus dem Jahre 2019 zunächst die lungenprotektive Beatmung mit niedrigeren Tidalvolumina. Außerdem verspricht ein konsequentes Flüssigkeitsmanagement eine Verbesserung der Prognose. Die aktuelle S3-Leitlinie „Invasive Beatmung und Einsatz extrakorporaler Verfahren bei akuter respiratorischer Insuffizienz“ sieht außerdem die Bauchlagerung zur Prognoseverbesserung vor [24].

Eine antiinflammatorische Therapie zeigt lediglich bei einem Teil der ARDS-Patienten Wirkung. Außerdem wurden vielversprechende Studien mit mesenchymalen Stromazellen durchgeführt [25].

1.4 Neuronale guidance Proteine im Immunsystem

NGPs sind seit Anfang der 1990er Jahre bekannt [26] und deren vielfältige Rolle in der neuronalen Entwicklung ist in zahlreichen Publikationen beschrieben. Darüber hinaus existieren einige Studien, die den Einfluss von NGPs auf das Wachstum und die Invasivität von Tumoren und die Angiogenese belegen.

Bereits 1992 zeigte eine Studie von Bougeret, dass NGPs auch im Immunsystem eine Rolle spielen [27]. Die Wirkung der NGPs wird vor allem durch Konzentrationsgradienten erzielt, wobei diese Proteine nicht nur in einer membrangebundenen Form vorliegen, sondern auch von der Zelloberfläche abgespalten werden können [26].

Zu den NGPs, die einen direkten Einfluss auf die Zellmigration haben, zählt beispielsweise Netrin-1. Während einer ALI wirkt Netrin-1 inhibierend auf die Migration von PMNs aus dem Gefäßsystem ins Gewebe. Im Mausmodell konnte eine NF- κ B-abhängige antiinflammatorische Wirkung dieses Proteins nachgewiesen werden. Außerdem verringert Netrin-1 über Bindung an den A2B Adenosin-Rezeptor auch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen. Diese Wirkung zeigt sich während einer ALI abgeschwächt, da während der akuten Entzündungsreaktion weniger Netrin-1 freigesetzt wird [28].

Diese Funktion von Netrin-1 konnte unlängst in einer weiteren ALI-Studie bestätigt werden. Hier wurden Mäuse einer hypobaren Umgebung ausgesetzt. Anschließend wurde der Lungenschaden untersucht, wobei festgestellt werden konnte, dass die intravenöse Applikation von Netrin-1 einen protektiven Effekt auf die Versuchstiere hatte [29].

Weiter zeigte eine Studie aus dem Jahr 2016, dass Netrin-1 eine inhibierende Wirkung auf die durch das Komplementsystem hervorgerufene Chemotaxis von Monozyten und Makrophagen hat. Die Inhibierung der Zellmigration geschieht durch Bindung an UNC5b (Uncoordinated 5 netrin receptor b). Dies konnte mittels der spezifischen Blockade dieses Rezeptors nachgewiesen werden [30].

Ein weiteres Beispiel für ein NGP, das ebenso eine wichtige Rolle im Immunsystem spielt, ist Neogenin. Neogenin verursacht durch die Bindung an RGMb eine Hyperreaktivität des Immunsystems in den Atemwegen. In einer

Studie aus 2019 konnte eine Beteiligung dieses Mechanismus an der Entstehung einer allergeninduzierten Entzündungsreaktion der Atemwege nachgewiesen werden. Die Blockade von RGMb resultierte in einer geringeren Freisetzung von IL-13, IL-33 und IL-4. Letzteres hat Anteil an der Entstehung der Überempfindlichkeit des Immunsystems gegenüber Allergenen. Somit hat Neogenin einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung eines allergischen Asthmas [31].

Neogenin spielt ebenso eine Rolle bei der Entstehung eines ischämischen Gewebes Schadens. Die Entzündung, die durch eine kontrollierte Ischämie der Leber ausgelöst wurde, zeigte sich in Neogenin-Knockout-Mäusen geringer ausgeprägt. Es konnten im Knockout Modell geringere Mengen proinflammatorischer Zytokine gemessen werden. Außerdem wurden geringere LDH-Werte gemessen, was für einen generell geringer ausgeprägten Zellschaden spricht [32].

Auch während einer ALI zeigt sich der Einfluss von Neogenin auf das Immunsystem. So verstärkt Neogenin die Migration von neutrophilen Granulozyten aus dem Gefäßsystem in den Alveolarraum. Generell wurde in Neogenin Knockout Mäusen eine geringer ausgeprägte Entzündungsreaktion während der ALI gemessen. Die Betreffende Studie wurde mit einem VILI (Ventilator-induced Lung Injury)-Modell durchgeführt. Der genetische Knockout von Neogenin führte sowohl zu einer etwa um die Hälfte verminderten Zellzahl im Alveolarraum als auch zu einer geringeren Freisetzung proinflammatorischer Zytokine [33].

1.5 Semaphorine und Plexine

Ebenso wie die oben bereits genannten Proteine zählen Semaphorine und Plexine zu den immunologisch wirksamen NGPs.

1.5.1 Struktureller Aufbau von Semaphorinen und Plexinen

Semaphorine gliedern sich anhand der verschiedenen C-Termini in insgesamt acht Klassen, wobei Klasse 8 ausschließlich in Viren exprimiert wird und nur für die Klassen 3-7 ein Vorkommen in Wirbeltieren belegt ist. Beispiele für eine Differenzierung auf C-terminaler Seite sind ein Thrombospondin-Repeat in Klasse 5 oder eine GPI-Anker-Domäne in Klasse 7. Generell können sie membrangebunden oder im Blutplasma gelöst vorliegen. Der N-Terminus dieser Proteine ist die cysteinreiche sogenannte Sema-Domäne, die aus ungefähr 500 Aminosäuren besteht. Sind Semaphorine an eine Zellmembran gebunden, stellt der N-Terminus den membranfernen Abschnitt dar. Strukturanalysen legen nahe, dass die Sema-Domäne propellerartig aufgebaut ist. Die sieben sprichwörtlichen Blätter dieses Propellers weisen einen sehr hohen Anteil an β -Faltblatt-Strukturen auf, weshalb diese molekulare Konfiguration auch als β -Propeller bezeichnet wird. Allen Semaphorinen gemein ist außerdem die darauffolgende cysteinreiche, knotenartig aufgebaute Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI)-Domäne, die diesen Namen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu der β -Kette in Integrinen besitzt. Nach aktuellem Stand der Forschung verfügen nicht alle Semaphorine über eine Transmembrandomäne. Die Klassen 2 und 3 existieren ausschließlich ungebunden, während die Klasse 7 an die Zellmembran gebunden vorliegt. Die Klassen 1, 4, 5 und 6 weisen jeweils unterschiedliche Transmembrandomänen auf [34].

Semaphorine der Klasse 4 besitzen als strukturelle Besonderheit außerdem eine intrazelluläre PDZ-Domäne, die sie befähigt, nicht nur als Ligand, sondern auch als Rezeptormolekül zu fungieren [35].

Grundsätzlich verfügt jedes Semaphorin Molekül über eine einzelne Sema-Domäne und hat als solches auch das Potential, an seinen jeweiligen Rezeptor zu binden. Allerdings liegen Semaphorine in ihrer funktionalen Form normalerweise als Homodimere vor. Nur im Falle einer Bindung eines

Semaphorin Homodimers an seinen Rezeptor kommt es auch tatsächlich zur Signaltransduktion am Rezeptor [36].

Die prominenteste Rezeptorklasse für Semaphorine sind Plexine. Insgesamt sind neun Plexine bekannt, die sich in vier Klassen (A-D) aufteilen. Bei Plexinen handelt es sich im Allgemeinen um Transmembranrezeptoren [37].

Der N-Terminus besitzt strukturell eine große Ähnlichkeit zu den Semaphorinen. Plexine verfügen ebenfalls über die N-terminale Sema-Domäne gefolgt von einer variablen Anzahl an PSI-Domänen. Klasse B Plexine besitzen außerdem C-terminal der PSI-Domänen eine Angriffsstelle für eine Convertase, die die Möglichkeit bietet, diese Plexine von der Zellmembran abzuspalten. Nahe der Zellmembran befindet sich in allen Plexinklassen außerdem eine Reihe aus sechs IPT-Domänen (Ig-like, plexins, transcription factors domain). Die intrazelluläre Komponente aller vier Plexinklassen besteht aus einer GAP-Domäne [38] (Abbildung 3).

Je nach Zelltyp werden somit unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Mechanismen ausgelöst. Beispielweise besitzen Plexine einen Einfluss auf intrazelluläre Ras- und RhoGTPasen. Extrazellulär sind beispielweise Interaktionen mit den Rezeptortyrosinkinasen ErbB (Erythroblastic oncogene B)2, Met (Mesenchymal Epithelial Transition) und Ron (Recepteur d'origine natais) bekannt [37].

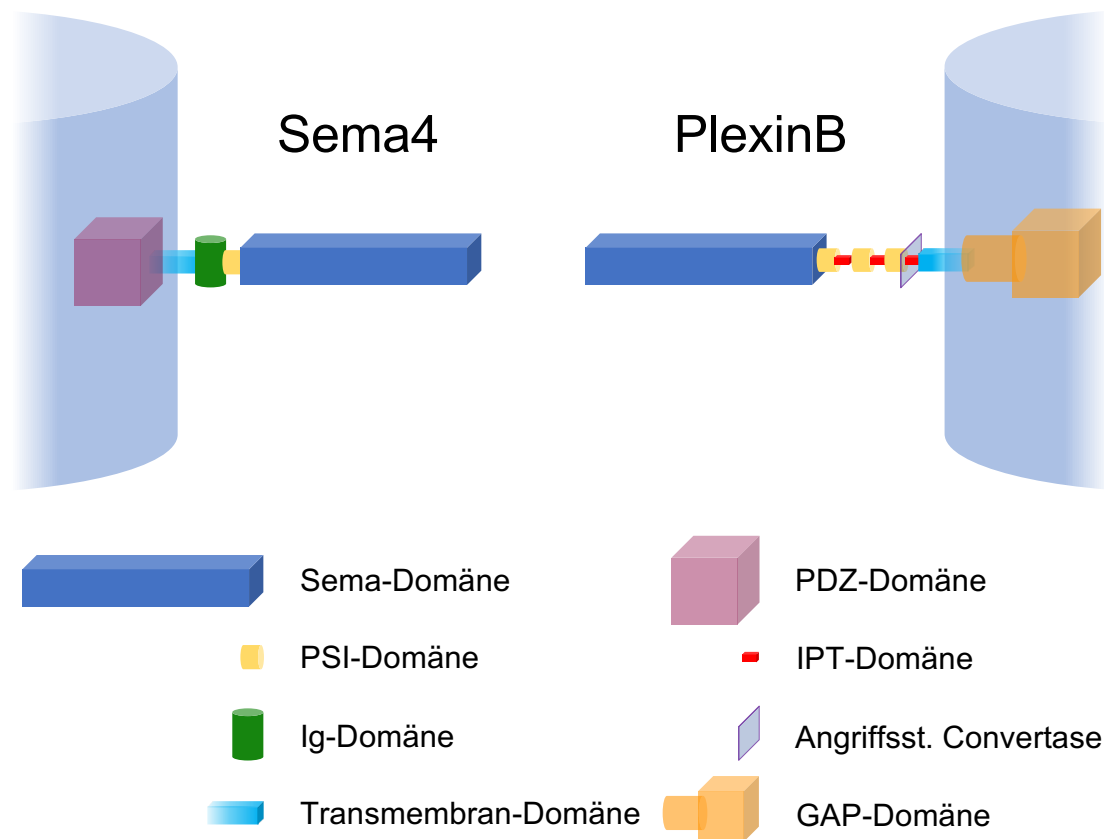


Abbildung 3 *Schematische Darstellung der Struktur von Klasse 4 Semaphorinen und Klasse B Plexinen [35, 36, 38]*

Die PDZ-Domäne und die GPI-Domäne befinden sich jeweils intrazellulär.

Der Ligand-Rezeptor Komplex liegt in einer trans-Konfiguration mit Bindung von Blatt 1 und 2 des Semaphorin-Propellers mit Blatt 5 des Plexin-Propellers vor. Das strukturelle Korrelat der semaphorin-vermittelten Plexinaktivierung ist ebenso wie die zuvor erwähnte Homodimerisierung der Semaphorine eine Dimerisierung und in der Folge eine intramembranöse Clusterbildung der Plexin Rezeptoren. Während der Dimerisierung kommt es zu einer Cis-Interaktion von jeweils zwei Plexin-Molekülen und zur Konformationsänderung. Des Weiteren erfolgt eine Interaktion der intrazellulären Domänen der Plexine [36].

1.5.2 Beispiele für Semaphorin-Plexin-Interaktion im Immunsystem

Dass Semaphorine eine direkt proinflammatorische Wirkung entfalten können zeigt beispielsweise die Untersuchung der Interaktion von SEMA7A mit seinem Rezeptor PlexinC1. Eine diesbezügliche Studie zeigt, dass das Blockieren von PlexinC1 den Gewebeschaden nach einer Leberischämie vermindert. Außerdem zeigte sich die Migration von PMNs nach der Blockade von PlexinC1 signifikant vermindert. Eine geringere Freisetzung proinflammatorischer Zytokine impliziert außerdem eine generell hemmende Wirkung auf die Entzündungsreaktion[39]. Darüber hinaus zeigte eine MIRI (Myocardial ischemia reperfusion injury) - Studie unlängst, dass die intravenöse Applikation mit einer unmittelbaren Prognoseverschlechterung eines Herzinfarktes einhergeht. Mäuse, die mit SEMA7A behandelt wurden, wiesen sowohl eine höhere absolute Zahl an PNCs als auch einen höheren Gewebeschaden auf, der anhand eines signifikant erhöhten Troponin-I-Wertes belegt werden konnte [40].

Auch während einer ALI zeigt die SEMA7A-PlexinC1 Achse eine eindeutig proinflammatorische Wirkung. Eine durch die Aspiration von Meerwasser ausgelöste ALI verursacht eine HIF-1 (Hypoxia-Inducible-Factor-1) gesteuerte vermehrte Expression von SEMA7A [41].

Eine Fortführung dieser Studie zeigte weiterhin, dass eine Blockade von PlexinC1 eine geringere Endothelpermeabilität zur Folge hat. SEMA7A zeigt ebenso eine direkte Interaktion mit β 1-Integrin. Die Blockade von β 1-Integrin führte in dieser Studie zu erniedrigten proinflammatorischen Zytokinen und zu einer Hemmung der NF- κ B-Aktivierung [42].

Semaphorine spielen allerdings nicht nur in der unspezifischen Abwehr eine Rolle. SEMA4A beispielsweise ist maßgeblich an der Differenzierung von T-Helferzellen beteiligt und findet sich auf jeglicher Art von dendritischen Zellen. Bei Aktivierung des T-Zell Rezeptors konnten in den ersten 24 Stunden erhöhte SEMA4A-Werte gemessen werden. Außerdem ist es CD4-positiven T-Zellen mit fehlendem SEMA4A nicht möglich, zu IFN γ produzierenden Zellen zu differenzieren. Experimente konnten weiterhin einen direkten Einfluss von SEMA4A auf die Produktion von IL-2 durch naive T-Zellen zeigen. Frei gelöstes

SEMA4A verursachte bei Aktivierung des T-Zell Rezeptors eine erhöhte Produktion diese Zytokins [43].

1.6 Bisher bekannte Funktionen von SEMA4D im Immunsystem

Für SEMA4D sind bislang drei Rezeptoren bekannt. Hierbei handelt es sich um PlexinB1, PlexinB2 und CD72.

Der CD72-Rezeptor spielt vor allem bei der adaptiven Immunabwehr, bei Tumorerkrankungen sowie bei Autoimmunerkrankungen eine Rolle. Zelltypen, auf die die SEMA4D-CD72-Achse Einfluss nimmt, sind beispielsweise Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen [44-47].

Generell sind für SEMA4D sowohl migrationsfördernde als auch migrationshemmende Funktionen bekannt [34].

Ähnlich wie für SEMA4A konnte auch für SEMA4D eine Förderung der T-Zell-Differenzierung nachgewiesen werden. So beeinflusst Sema4D die Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Dendritischen Zellen und T-Zellen [48]. Eine Blockade von SEMA4D führt zu einer geringeren Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus antigenpräsentierenden Zellen [49].

Sema4D entfaltet seine Wirkung auch in eosinophilen Granulozyten, auf deren Zellmembran es ebenfalls exprimiert wird. In einer Studie aus 2015 wurde ein Zusammenhang zwischen der Schwere von allergischem Asthma und SEMA4D festgestellt. Dieser besteht in der Aggravation des Asthmas durch SEMA4D, während die BAL Befunde bei fehlendem SEMA4D sich signifikant verbesserten [50].

Es wurden bereits zahlreiche Studien zu SEMA4D im Zusammenhang mit malignen Tumorerkrankungen durchgeführt. Exemplarisch sei hier eine Studie zu SCC (Squamous cell carcinoma) - Zellen genannt. Diese kommt zu dem Ergebnis, dass die SEMA4D-PlexinB1-Achse die Invasivität dieser Zellen steigert [51].

In einer weiteren Studie wurde festgestellt, dass Zelladhäsionskontakte durch die Aktivierung von PlexinB1 aufgelöst werden. Außerdem legen die Daten aus dieser Studie nahe, dass β 1-Integrine durch die Wirkung von SEMA4D von der

Zelloberfläche zurück in die Zelle gezogen werden [52].

So ist es nicht verwunderlich, dass PlexinB1 laut Ch'ng und Kumanogoh in zahlreichen Krebsarten überexprimiert ist und eine Rolle bei Invasivität und Metastasierung spielt [53]. SEMA4D ist darüber hinaus in der Lage, in der Blut-Hirn-Schranke endotheliale Tight-junctions aufzulösen [54].

Die SEMA4D-PlexinB1-Achse besitzt neben ihrem Einfluss auf Zellkontakte auch Einfluss auf morphologische Vorgänge in den Zellen selbst. So wirkt PlexinB1 über Rac und Rho auch auf das Aktin-Zytoskelett. Die Aktivierung von PlexinB1 kann auf diesem Wege zu einer Zellkontraktion führen [55].

Bezüglich manifester Entzündungen werden SEMA4D sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Wirkmuster zugeschrieben. Grundsätzlich muss stets zwischen membrangebundenem SEMA4D und dem im Blutplasma gelösten sSEMA4D unterschieden werden. SEMA4D wird in zahlreichen Kontexten von der Zelloberfläche abgespalten. Betrachtet man beispielsweise ruhende Thrombozyten, so liegt SEMA4D membrangebunden vor. Kommt es jedoch zu einer Thrombozyten-Aktivierung, dissoziieren Calmodulin und SEMA4D aus ihrer Bindung und SEMA4D wird abgespalten [56].

Bei der rheumatoiden Arthritis besitzt sSEMA4D beispielsweise eindeutig proinflammatorische Eigenschaften [57]. Während einer akuten Hantavirus-Infektion wurden weiterhin erhöhte sSEMA4D-Werte gemessen und eine Korrelation mit der Krankheitsaktivität festgestellt [58].

Ein weiterer Beleg für eine fördernde Wirkung von SEMA4D auf das Immunsystem findet sich bei der Betrachtung von immunkompromittierten Patienten. Eine Studie von Vadasz et al. stellte 2018 fest, dass Patienten mit chronischer HIV-Infektion niedrigere SEMA4D-Spiegel aufwiesen [59].

Die Zellmigration betreffend besitzt SEMA4D wie bereits erwähnt kontextabhängig verschiedene Eigenschaften. So kam eine Studie von Delaire et al. 2001 zu dem Ergebnis, dass sSEMA4D auf Monozyten und B-Zellen eine migrationshemmende Wirkung ausübt, während dieser Effekt bei T-Zellen nicht beobachtet werden konnte [60]. Ebenso verringert das Blockieren von SEMA4D

während einer Autoimmunenzephalomyelitis die Gewebeinvasion von mononukleären Zellen [61]. Im Gegensatz dazu konnte in einem Zellmigrationsversuch festgestellt werden, dass die Interaktion von SEMA4D mit auf Endothelzellen befindlichem PlexinB1 über PI3K (Phosphoinositid 3 Kinase) die Migration von Endothelzellen verstärkt [62].

Eine Studie von Luque et al. untersuchte den Einfluss von PlexinB1 und PlexinB2 auf die Adhäsion von Immunzellen am Gefäßendothel. Es konnte nachgewiesen werden, dass SEMA4D sich auf dem Endothel befindet und dass eine Aktivierung der Endothelzellen zur Abspaltung von SEMA4D führt. Laut Luque et al. befindet sich PlexinB2 auf Monozyten, Makrophagen und Schaumzellen. Des Weiteren kommt dieselbe Studie zu dem Schluss, dass die Aktivierung von PlexinB1 und PlexinB2 als Rezeptor an der Adhäsion von Monozyten am Gefäßendothel beteiligt ist [63].

In Bezug auf PMNs kommen Nishide et al. in einer Publikation aus 2017 zu dem Schluss, dass SEMA4D sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Eigenschaften besitzt. Auf der Zellmembran von PMNs befindliches SEMA4D wirkt einer Aktivierung dieser Zellen im physiologischen Zustand entgegen und die Interaktion mit auf Endothelzellen befindlichem PlexinB2 hemmt die Bildung von NETs. Gleichwohl bewirkte eine Behandlung mit rekombinantem PlexinB2 über die intrazelluläre PDZ-Domäne von SEMA4D eine Rac1-Inhibition, was sich ebenfalls hemmend auf die NET-Bildung und die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies auswirkte. Im Gegensatz zu den Effekten von membrangebundenem SEMA4D konnten Nishide et al. zeigen, dass sSEMA4D eine Markerfunktion bezüglich der PMN-Aktivierung ausübt und durch die Metalloprotease ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease domain 17) von der Zelloberfläche entsteht. Des Weiteren implizieren auch die Ergebnisse dieser Studie einen proinflammatorischen Effekt von sSEMA4D an der Endothelzellschicht, deren Permeabilität gesteigert wurde [64].

1.7 Wissenschaftliche Hypothese und Ziel dieses Projektes

Semaphorin 4D zeigt sich in verschiedenen Studien als ein Protein mit äußerst vielfältigen Eigenschaften. Ihm werden einerseits protektive Eigenschaften zugeschrieben [65], andererseits zeigt es sich insbesondere nach Abspalten von der Zellmembran von seiner proinflammatorischen Seite. Als erstes klassifiziertes Immunsemaphorin [34] ist es bereits seit langer Zeit Gegenstand verschiedener Forschungsansätze. Publikationen, die SEMA4D betreffen, stammen zum großen Teil aus der onkologischen Forschung und oder beziehen sich auf den Einfluss von Sema4D auf die adaptive Immunabwehr der B- und T-Lymphozyten. Auch Makrophagen waren als Vertreter der unspezifischen Immunabwehr bereits Gegenstand einiger Projekte. Im Gegensatz hierzu wurde die Wirkung von SEMA4D auf PMNs zwar in Bezug auf eine ANCA-assoziierte Vaskulitis erforscht, allerdings nicht während einer ALI.

Eine relevante Funktion von NGPs bei Auftreten einer ALI wurde bereits in einem Forschungsprojekt bezüglich der Funktion von SEMA7A in einem Mausmodell dargestellt. SEMA7A wird während einer ALI eine generell proinflammatorische und in Bezug auf PMNs eine migrationsfördernde Rolle zugeschrieben [66].

Da die überschießende Migration von PMNs in den Alveolarraum Bestandteil einer ALI und des ARDS ist, besteht die Möglichkeit, dass SEMA4D hier Einfluss auf den Pathomechanismus nimmt. Ziel dieses Forschungsprojektes ist, sofern vorhanden, einen Einfluss von SEMA4D auf den Schweregrad einer ALI aufzudecken.

2 Materialien und Methoden

2.1 Allgemeine Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	D8537-500ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Eppendorf® Safe-Lock Tubes, 0,5ml	30121023	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf® Safe-Lock Tubes, 1,5ml	30120086	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf® Safe-Lock Tubes, 2,0ml	30120094	Eppendorf (Hamburg, D)
Eppendorf® Tubes 5,0ml mit Schnappdeckel	30119401	Eppendorf (Hamburg, D)
F25		Julabo (Seelbach, D)
Falcon™ Zentrifugenröhrchen 15ml + 50ml		Corning (Corning, NY, USA)
Heraeus Medifuge™		Thermo Electron GmbH (Langenseibold, D)
Injekt® in versch. Vol.		Braun (Melsungen, D)
Isotonische Kochsalzlösung E NaCl 0,9	19II30WC	Fresenius (Bad Homburg v.d.H., D)
Microlance™ 3	302200	BD (San Jose, CA, USA)
MultiGuard™ Barrier Tips		Sorenson BioScience (Wembley, WA, AUS)
PCR Tubes, PCR clean, 0,2ml	30124332	Eppendorf (Hamburg, D)
PCR Tubes, PCR clean, 0,2ml, 8er-Streifen	30124359	Eppendorf (Hamburg, D)

PCR Tubes, PCR clean, 0,5ml	30124537	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipetboy acu 2		Integra (Hudson, NH, USA)
Pipetman® in versch. Vol.		Glison (Middleton, WI, USA)
Plastipak™ 1ml	300013	BD (San Jose, CA, USA)
S-Monovette® 4,9ml	41.926.001	Sarstedt (Nümbrecht, D)
S-Monovette® 3 ml, Citrat 3,2% (1:10), 75x13 mm, grün EU-Code, Papieretikett	41.919.001	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Safety-Kanüle 21Gx1½	851.162.200	Sarstedt (Nümbrecht, D)

Tabelle 3 **Häufig verwendete Materialien**

2.2 Humane Zelllinien

2.2.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
A549 (ATCC® CCL-185™)-Zellen		ATCC, LGC Standards Ltd. (Teddington, UK)
Accutase	L11-007	PAA Cell Culture Company (Cambridge, UK)
Antibiotic Antimycotic Solution (100×), Stabilized	A5955-100ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Corning® Epidermal Growth Factor (EGF), Human Recombinant, 100µg, 1/Pack	354052	BD (San Jose, CA, USA)
Fetal Bovine Serum "GOLD" EU approved	A15-151	PAA Cell Culture Company (Cambridge, UK)
Gibco™ MCDB131 Medium, ohne Glutamin	10372019	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Ham's F-12 Nutrient Mix	21765	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
HMEC-1 Zellen		PhD. Sean Colgan (CU Denver, CO, USA)
Hydrocortisone	H-0888	Sigma (St. Louis, MO, USA)
L-Glutamine (200 mM)	25030024	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
T75 Flask	156499	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)

Tabelle 4 *Material für Zellpflege*

HMEC-1-Medium	500ml MCDB 50ml FCS 250µl EGF = 5µg 100µl Hydrocortison = 500µg 25ml L-Glutamin = 10mM 5ml Antibiotic Antimycotic Solution
A549-Medium	500ml F-12 50ml FCS 5ml Antibiotic Antimycotic Solution 2,5ml L-Glutamin = 1mM

Tabelle 5 *Rezepturen der Zellmedien für die humanen Zelllinien*

2.2.2 Verwendete Zellen

In diesem Projekt wurden humane HMEC-1-Zellen sowie A549-Zellen verwendet. Bei HMEC-1 Zellen handelt es sich um immortalisierte humane Endothelzellen aus den Kapillaren der Dermis [67].

A549-Zellen dienten als Modell für das respiratorische Epithel. Diese Zellen wurden ursprünglich aus einem Adenokarzinom der Lunge gewonnen [68].

2.2.3 Stimulation

Um die Auswirkungen einer Entzündungsreaktion auf die Expression von SEMA4D auf der Oberfläche von Epithelzellen und Gefäßendothelzellen in vitro untersuchen zu können, wurden die Zellen durch die Zugabe von 10µg/ml TNF- α stimuliert und für 4 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die in Kapitel 2.6.5 beschriebene Immunfluoreszenzfärbung angewandt.

2.3 Tierversuche

2.3.1 Versuchstiere

Sämtliche Tierversuche besitzen eine Genehmigung durch das Regierungspräsidium Tübingen und wurden demnach entsprechend des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Für die dieser Dissertation zugrunde liegenden Experimente wurden Mäuse mit dem genetischen Hintergrund BALB/c verwendet.

Die homozygoten *Sema4d*^{-/-}-Mäuse (C.129P2-Sema4d^{tm1Kik}) und die kongenialen Kontrollen entstammen der laboreigenen Zucht. Zusätzlich wurden Wildtyp-Mäuse von der Firma Charles River bezogen.

Die Haltung der Mäuse erfolgte unter spezifischen pathogenfreien Bedingungen im Versuchstiergebäude des Universitätsklinikums Tübingen. Zum Versuchszeitpunkt betrug das Alter der Mäuse jeweils 6 bis 12 Wochen bei einem durchschnittlichen Körpergewicht von 25g.

2.3.2 Narkose der Versuchstiere

Die Narkose der Versuchstiere bestand bei jedem Experiment aus intraperitoneal appliziertem Pentobarbital mit einer Dosierung von 80mg/kgKG.

2.4 LPS-Inhalationsmodell

2.4.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
Formaldehyd 37% SOLUTION	F1268	Sigma (St. Louis, MO, USA)
LPS from E.Coli 026:B6	L8274-10MG	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Paraffinöl dickflüssig	8904.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Percellys® Lysing Kit - Empty 2mL Reinforced tubes and caps	P000943- LYSK0-A	Bertin Technologies (Paris, F)
U22 Microair Taschen- Inhalator		Omron (Kyoto, JP)
Wattestäbchen, steril	825120	MSP Schmeiser (Horb a. N., D)

Tabelle 6 *Material für den LPS-Inhalationsversuch und die Aufbewahrung von Organproben*

2.4.2 LPS-Inhalation

Das angewendete LPS-Inhalationsmodell diente dazu, bei Mäusen einen vergleichbaren, reproduzierbaren Lungenschaden zu verursachen. Das LPS wurde mit einer Konzentration von 0,5mg/ml in NaCl gelöst. Die Behandlung mit rmSema4d oder anti-mSema4d erfolgte 15 Minuten vor Beginn der Inhalation per intravenöser Applikation. Die Dosis betrug sowohl für den Antikörper als auch für das rekombinante Protein 0,08mg/kgKG. In der Inhalationskammer wurden bis zu maximal vier Mäuse mit LPS oder mit reinem NaCl (Kontrolle) behandelt. Die Inhalationskammer besteht aus einer auf beiden Seiten mit einem Schlauchanschluss versehenen geschlossenen Plexiglasröhre. Die LPS-Lösung wurde mithilfe eines tragbaren Inhalators vernebelt und über einen Schlauch in die Inhalationskammer geleitet. Über einen zweiten Schlauch, der am anderen Ende der Kammer befestigt ist, wurde im Innenraum ein konstanter Unterdruck erzeugt, um einen kontinuierlichen Fluss des Inhalates zu gewährleisten. Die Inhalationszeit betrug 45 Minuten mit jeweils ca. 15-20ml LPS-Lösung oder NaCl-Lösung. Als Inkubationszeit betrug vier Stunden.

2.4.3 Organentnahme

Zur Entnahme der Lunge und zur Blutentnahme wurde eine Thorakotomie durchgeführt. Aus dem rechten Ventrikel der Maus wurde mit einer 1ml-Spritze und einer 22G-Kanüle Blut zur Durchführung von Durchflusszytometrie-Versuchen oder zur Gewinnung von Blutplasma abgenommen. Zur Separation des Blutplasmas von den zellulären Blutbestandteilen wurden die Blutproben mit 500xg für 5 Minuten zentrifugiert und nach dem Zentrifugieren mit flüssigem Stickstoff fixiert. Um Organe für die Histologie und die RT-qPCR zu entnehmen, wurde das gesamte Blutvolumen entnommen. Dies erfolgte über einen Schnitt in die linke oder rechte A. femoralis und die anschließende Injektion von NaCl in den linken Herzventrikel der Maus. Für die histologische Aufbereitung wurden die Organe der Versuchstiere in 4%igem Fomaldehyd in Einbettkassetten für 8-18 Stunden fixiert.

Für die RT-qPCR wurden die Organe in Percellys® lysing kit-Gefäßen umgehend nach deren Entnahme in flüssigem Stickstoff fixiert. Die Aufbewahrung der mit flüssigem Stickstoff fixierten Organe und des Blutplasmas erfolgte bei -80°C.

2.5 Durchflusszytometrie

Der Name des Durchflusszytometrieverfahrens, das in diesem Projekt angewandt wurde, lautet Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS™). Entwickelt wurde dieses Verfahren von BD Biosciences. FACS™ macht es möglich, durch die Inkubation mit spezifischen fluoreszierenden Detektionsantikörpern bestimmte Zielmoleküle in und auf bestimmten Zellen sichtbar zu machen. Jede Zelle der betreffenden Probe wird hierbei einzeln mit von mehreren Lasern, die jeweils Licht mit unterschiedlicher Wellenlänge emittieren, bestrahlt und die Streuung in verschiedenen Sichtachsen detektiert. Es erfolgt zunächst eine Sortierung der Zellen nach Größe und Granularität. Diese ergibt sich durch die Detektion des nach vorne gestreuten Lichtes (Forward-Scatter; FSC; Größe) und durch die Detektion des seitwärts gestreuten Lichtes (Sidewards-Scatter; SSC; Granularität). Außerdem werden die Zellen dem Licht von Lasern mit unterschiedlichen Wellenlängen ausgesetzt. Je nach Farbstoff des Antikörpers kann so Fluoreszenz und somit das betreffende Zielmolekül detektiert und quantifiziert werden.

2.5.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
CellFix™	340181	BD (San Jose, CA, USA)
Combitips® Advanced 5mL, sterile	30089561	Eppendorf (Hamburg, D)
FACSCanto™ II		BD (San Jose, CA, USA)
FACSDiva™ Software		BD (San Jose, CA, USA)
FACS™ Lysing Solution 10X Concentrate	349202	BD (San Jose, CA, USA)
Falcon® 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube	352052	Corning (Corning, NY, USA)
FlowJo™ Software		BD (San Jose, CA, USA)
Heraeus Multifuge™ X1R		Thermo Electron GmbH (Langenseibold, D)

Original Model 4780 Repeating Pipette	EP4780-500	Eppendorf (Hamburg, D)
--	------------	------------------------

Tabelle 7 Material für die Durchflusszytometrie

Antikörper	Farbe	Artikelnummer	Hersteller
anti-mouse CD42b	FITC	#M040-1	Emfret (Eibelstadt, D)
anti-mouse Ly6G/6C	PECy7	108416	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-mouse LFA-1	PE	141006	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-mouse CD11b	BV421	101236	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-mouse CD62P	APC	563674	BD (San Jose, CA, USA)

Tabelle 8 Antikörpergemisch 1 des Durchflusszytometrie-Experimentes

Antikörper	Farbe	Artikelnummer	Hersteller
anti-mouse CD42b	FITC	#M040-1	Emfret (Eibelstadt, D)
anti-mouse Ly6G/6C	PECy7	108416	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-mouse JON/A	PE	M023-2	Emfret (Eibelstadt, D)
anti-mouse CD62L	BV510	104441	BioLegend (San Diego, CA, USA)
anti-mouse PlexinB1	APC	28372	Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA)

Tabelle 9 Antikörpergemisch 2 des Durchflusszytometrie-Experimentes

2.5.2 Durchführung

Die Inkubation der Blutproben erfolgte in einem Reaktionsgefäß bei 37°C für 15 Minuten. Das Volumen betrug 100µl und es wurde jeweils 1µl von jedem Antikörper verwendet. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Erythrozyten mit der BD FACS™ Lysing Solution lysiert und fünf Minuten bei 500xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend erfolgte eine Resuspension in 1ml BD CellFix™. Die Zellen wurden erneut fünf Minuten bei 500xg und Raumtemperatur zentrifugiert und die Zelllösung auf ein Volumen von 500µl in BD CellFix™ aufkonzentriert. Die Daten wurden mit dem BD FACSCanto™ II und der BD FACSDiva™ Software erhoben.

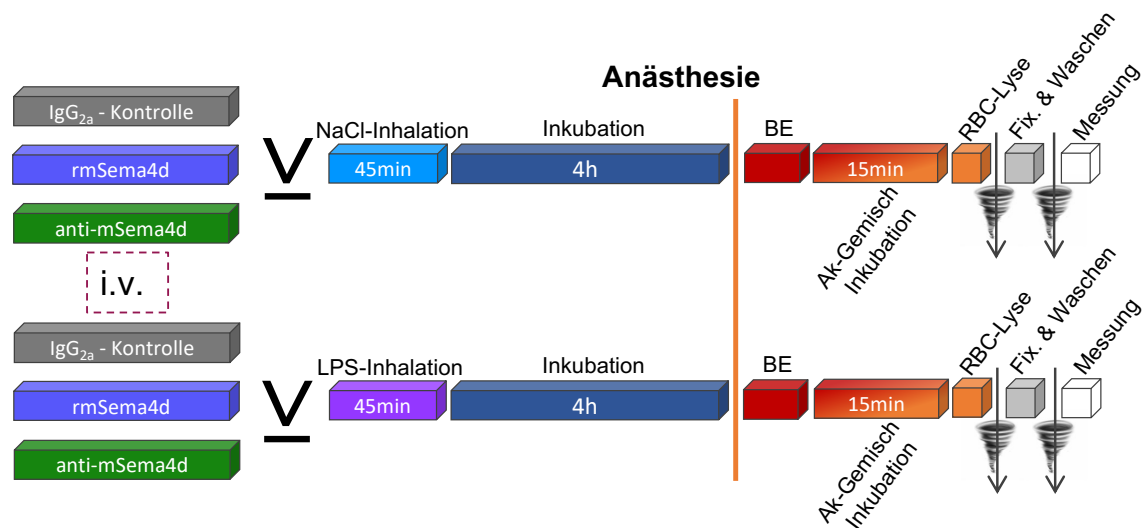


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Präparation der Blutproben für die Durchflusszytometrie (BE = Blutentnahme)

2.5.3 Analyse und Gating-Strategie

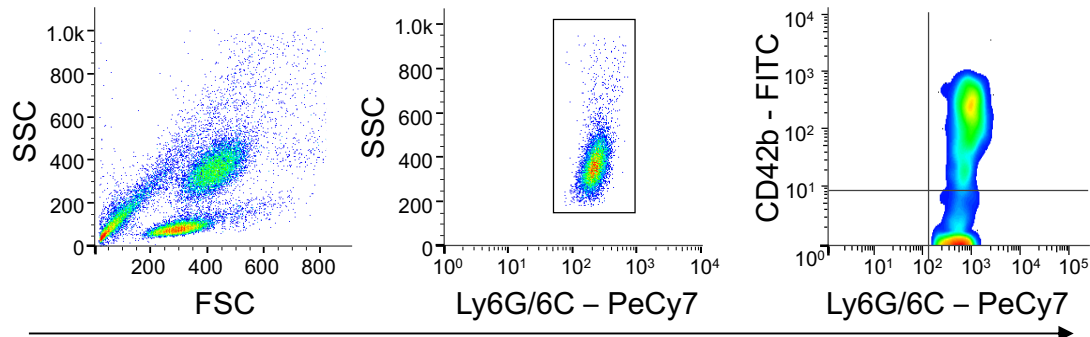


Abbildung 5 Gating-Strategie der Durchflusszytometrie zur Untersuchung der PNCs

Zur Analyse der Daten aus der BD FACSDiva™-Software wurde FlowJo™ verwendet. Um die detektierte Fluoreszenz genauer auf die im Fokus des Interesses liegenden Zellen, in diesem Fall PNCs, zu spezifizieren, wurde die in Abbildung 5 gezeigte Gating-Strategie angewandt. Zur Markierung von PMNs wurde ein anti-mLy6G/6C-Antikörper verwendet, CD42b wurde als Oberflächenmarker für Thrombozyten genutzt.

Mittels FSC und SSC wurden zunächst große, stark granulierte Zellen vorselektiert. Innerhalb der gewählten Zellpopulation wurde nur die Fluoreszenz der Objekte berücksichtigt, die sich sowohl Ly6G/6C als auch CD42b positiv darstellten. Die Fluoreszenz der übrigen Antikörper wurde in Bezug auf die selektierte Zellpopulation bestimmt.

2.6 Histologie

2.6.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
AnalaR® Normapur® Acetic acid 100%	20.104.298	VWR Chemicals (Radnor, PA, USA)
Anti-Ly6g antibody [RB6-8C5]	ab25377	abcam (Cambridge, UK)
Antigen Unmasking Solution, Citrate-Based	H-3300	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Avidin/Biotin Blocking Kit	SP-2001	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
AxioCam MRc		Zeiss (Oberkochen, D)
AxioVision		Zeiss (Oberkochen, D)
Cytokeratin 12 Antikörper (L-15)	sc-17101	Santa Cruz Biotechn. (Dallas, TX, USA)
DAPI	D-9542	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Deckgläser 24x60mm	01-2460/x	R. Langenbrinck (Emmendingen, D)
DM IRB		Leica (Wetzlar, D)
Donkey anti-Goat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594	A-11058	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
EG1150C		Leica (Wetzlar, D)
EG1150H		Leica (Wetzlar, D)
Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	X883.2	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Esel F(ab') ₂ anti-Maus IgG (H+L)-Alexa Fluor 488	715-546-151	Dianova (Hamburg, D)
Ethanol 99% vollständig vergällt	ETO-10000-99-1	SAV Liquid Production (Flintsbach am Inn)
Eukitt® Quick-hardening	03989-100ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)

Formaldehyd 37% SOLUTION	F1268	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Gelatin from cold water fish skin (FSGO)	G7765	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 594	A-11012	Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)
HI 1210		Leica (Wetzlar, D)
HI 1220		Leica (Wetzlar, D)
HISTOPRIME® HistoGreen, HRP-Substrate-Kit	E-109	Linaris (Dossenheim, D)
Human Semaphorin 4D/CD100 Antibody	MAB7470	R&D (Minneapolis, MN, USA)
Mayer's hemalum solution	1092490500	Merck (Darmstadt, D)
Microtome Blade Stainless Steel R35	02.075.00.000	Feather (Osaka, JP)
Molecular Probes™ ProLong™ Gold Antifade Mountant	P36931	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Mouse Semaphorin 4D/CD100 Antibody	AF5235	R&D (Minneapolis, MN, USA)
Normal Rabbit Serum Blocking Solution	S-5000	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
normal rat IgG	sc-2026	Santa Cruz Biotechn. (Dallas, TX, USA)
Rabbit Anti-Rat IgG Antibody (H+L), Biotinylated	BA-4000	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Rabbit Anti-Sheep IgG H&L (DyLight® 650)	ab96946	abcam (Cambridge, UK)

RM2235 Manual Rotary Microtome for Routine Sectioning	9.511.546	Leica (Wetzlar, D)
ROTILABO® Einbettkassetten	K114.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Salzsäure-Alkohol: Salzsäure 25% 2,0l Ethanol vergällt 99,8% 45,0kg		Universitäts-Apotheke Tübingen
SuperFrost® Plus Objektträger geschnitten	03-0060	R. Langenbrinck (Emmendingen, D)
TP 1020		Leica (Wetzlar, D)
Trizma® base	93362-250G	Sigma (St. Louis, MO, USA)
TWEEN® 20	P9416-50ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
VECTASTAIN® ABC-HRP Kit, Peroxidase (Standard)	PK-4000	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Vector® Nuclear Fast Red Counterstain	H-3403	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
VWF Antikörper (C-20)	sc-8068	Santa Cruz Biotechn. (Dallas, TX, USA)
Xylene, mixture of isomers	1317691612	AppliChem (Darmstadt, D)
β-Actin Antikörper (N-21)	sc-130656	Santa Cruz Biotechn. (Dallas, TX, USA)

Tabelle 10 *Material für das Anfertigen von Paraffinschnitten, HE-Färbung, IHC-Färbung und IF-Färbung*

2.6.2 Paraffinschnitte

Für die in diesem Projekt angefertigten Färbungen wurden ausschließlich Paraffinschnitte verwendet. Die Organe wurden in 4%igem Formaldehyd fixiert. Um die Probe vom wässrigen Milieu des Formaldehyds in Paraffin zu überführen, erfolgte die Gewebeeinfiltration mit dem Leica TP1020-Infiltrationsautomaten. Die Dehydratation des Gewebes wurde mit einer aufsteigenden Alkohol-

Konzentrationsreihe durchgeführt. Insgesamt durchliefen die Proben sechs Konzentrationsstufen von 96% bis 100%. Anschließend wurden die Organe in Xylol und nachfolgend in flüssiges Paraffin eingelegt.

Ist das Paraffin vollständig in das Gewebe eingedrungen, können die Proben in Paraffinblöcke eingebettet werden. Nach vollständigem Auskühlen der Blöcke wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in Eiswasser und anschließend in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 37°C gelegt. Auf einem Objektträger wurden jeweils drei Schnitte platziert. Die Trocknung der Schnitte erfolgte bei 40°C auf einer Heizplatte.

2.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Zur mikroskopischen Betrachtung des Lungengewebes wurde zunächst eine H.E.-Färbung angefertigt.

In der hier verwendeten Hämalaun-Lösung nach Mayer befindet sich der Farbstoff im sauren Milieu. Das basische Hämalaun bindet an basophile Strukturen wie DNA und das raue Endoplasmatische Retikulum. Hierdurch entsteht zunächst eine rötlichbraune Färbung. Das Überführen des Hämalauns in seine natürliche blaue Färbung, auch als Bläuen bezeichnet, erfolgt durch eine Erhöhung des pH-Wertes auf 6-7. Durch das saure Eosin werden alle basischen (eosinophilen) Strukturen der Zelle rot gefärbt. Hierzu zählen das glatte Endoplasmatische Retikulum, Mitochondrien, Zellplasmae, Kollagen und Keratin.

Die Schnitte wurden mit Xylol entparaffiniert und 3x7 Minuten in Xylol eingelegt. Anschließend erfolgte eine Rehydratisierung durch Einlegen der Objektträger in absteigend konzentrierte, wässrige Ethanol-Lösungen (100%, 100%, 96%, 70% und 50%). Pro Konzentrationsstufe wurde eine Zeit von fünf Minuten benötigt. Die Reaktionszeit der Hämalaun-Lösung nach Mayer betrug zehn Minuten. Es folgten zwei kurze Spülschritte mit destilliertem Wasser und HCl-Alkohol. Das Bläuen des Hämalaun-Farbstoffes erfolgte durch kontinuierliches Umspülen der Schnitte mit Leitungswasser für 15 Minuten. Anschließend erfolgte ein kurzer

Färbevorgang mit Eosin für eine Minute und eine kurze Spülung mit 70%igem Alkohol. Die Dehydratisierung erfolgte mittels Umkehren der vorherigen Ethanol-Konzentrationsreihe. Die Objektträger wurden anschließend 2x3 Minuten in Xylol eingelegt und mit Eukitt® eingedeckelt.

Nach Durchlaufen dieser Färbereihe erscheinen Zellkerne dunkelblau oder violett, Zytoplasma und Interzellulärsubstanz rot und Erythrozyten gelblich-orange.

2.6.4 Immunhistochemisches PMN-Staining

Ein spezifisches Anfärben der PMNs in Lungenschnitten erlaubt Rückschlüsse auf die im Gewebe stattfindende Entzündungsreaktion sowie eine Visualisierung der Zellen aus der bronchoalveolären Lavage. Die Schnitte wurden für 30 Minuten in eine Peroxidase-Block-Lösung eingelegt. Die Antigendemaskierung erfolgte in einer Mikrowelle für sieben Minuten bei 750 Watt mit einem Demaskierungspuffer. Um unspezifisches Binden der Primärantikörper zu vermeiden, wurde das Avidin/Biotin Blocking Kit von Vector Laboratories verwendet. Der Inkubation mit dem Primärantikörper ging ein 60-minütiger Avidin-Block voraus. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (anti-mLy6G) und dem Biotin-Block inkubiert. Auf jedem Objektträger befand sich je ein Schnitt als IgG-Kontrolle (IgG-rat), eine Negativkontrolle (nur Biotin-Block) sowie ein Schnitt mit dem Ly6G rat anti-mouse-Antikörper. Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter rabbit anti-rat-Antikörper mit einer Inkubationszeit von 40 Minuten verwendet. Die Detektion des Biotins auf dem Sekundärantikörper erfolgte mithilfe des VECTASTAIN® ABC-HRP Kits von Vector Laboratories. Als Substrat für die Peroxidase wurde Histogreen mit einer Färbezeit von einer Minute verwendet. Danach wurde das Gewebe für fünf Minuten mit Nuclear Fast Red von Vector Laboratories eingefärbt und die Schnitte anschließend mit Eukitt® eingedeckelt.

Peroxidase-Block	75ml Methanol 600µl H ₂ O ₂
Demaskierungspuffer	150ml A. dest 1,4ml Vector Antigen Unmasking Solution
Avidin-Block	1ml PBS- (0,5% FSGO) 4 Tr. Avidin-Blocking-Solution 100µl Normal Rabbit Serum
Primärantikörper mit Biotin-Block	1ml PBS- (0,5% FSGO) 4 Tr. Biotin-Blocking-Solution 100µl Normal Rabbit Serum in 3 Teile aufgeteilt (400µl) Teil 1: Anti-Ly6g antibody 1µg (entspr. 2µl) Teil 2: normal rat IgG 1µg (entspr. 2,5µl) Teil 3: nur Biotin-Block (neg. Kontrolle)
ABC-Solution	1,3ml PBS- 13µl Sol. A aus Vector Kit 13µl Sol. B aus Vector Kit 30 Minuten im Dunkeln mischen
Histogreen-Kit	1,5ml Puffer 3 Tr. Chromogen 3 Tr. H ₂ O ₂

Tabelle 11 Rezepturen für die IHC-PMN-Färbung

2.6.5 Immunfluoreszenz-Färbung

Mithilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie sollte der Einfluss von proinflammatorischen Stimuli auf die Expression von Semaphorin 4D auf den Oberflächen verschiedener Zellarten dargestellt werden. Entparaffinierung und Rehydratisierung erfolgten analog zur H.E.-Färbung mit nachfolgend 30-minütigem Einlegen in PBS⁻. Die Antigene wurden nach dem Einlegen in Citrat-Puffer mittels Erhitzens in einer Mikrowelle für fünf Minuten bei 700 Watt demaskiert. Nach dem Abkühlen der Schnitte wurden diese für 10-30 Minuten mit Blocking-Solution (5% skim milk in TBST 0,1%) inkubiert. Die Inkubationszeit des Primärantikörpers (gelöst in Blocking-Solution) betrug 30 Minuten. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte über eine 30-minütige Lagerung der Schnitte im Dunkeln. Je nach Anzahl der angefärbten Zielmoleküle wurden diese Schritte mehrmals wiederholt und die Proben nach jedem Färbeschritt mit 3x100µl PBS⁻ gewaschen. Das Eindeckeln erfolgte mit dem DAPI-haltigen Molecular Probes™ ProLong™ Gold Antifade Mountant von Thermo Fisher.

Citrat-Puffer	pH=4,2 1M Zitronensäure=26,3g 1M Natriumcitrat=36,8g 250 Aqua dest.
Tris-Buffered Saline (TBS) 10X Stock Solution	2,4g Trizma® base 8,8g NaCl pH auf 7,6 titriert mit A. dest. auf 100ml aufgefüllt
1X Tris-Buffered Saline, 0.1% Tween 20 Detergent (TBST)	10ml TBS 10X Stock Solution 90ml A.dest. 0,1ml TWEEN® 20

Tabelle 12 *Rezepturen für die IF-Färbung*

2.7 Bronchoalveoläre Lavage

2.7.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
Insyte™ Intravascular Catheter	381223	BD (San Jose, CA, USA)
Centrifuge 5415 R		Eppendorf (Hamburg, D)
Mersilk 7-0	NW5334	Ethicon (Somerville, NJ, USA)

Tabelle 13 *Material für die BAL*

2.7.2 Durchführung

Die bronchoalveoläre Lavage diente dem direkten Nachweis von Zellen und Enzymen im intraalveolären Raum. Um diese durchführen zu können, wurden die Versuchstiere narkotisiert und tracheotomiert. Über den Tubus wurden pro Maus jeweils 3 x 0,6ml PBS⁻ appliziert und anschließend wieder entnommen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte gemäß der Methode in 2.8. Die Proben wurden nach Fixierung mittels flüssigen Stickstoffes zunächst bei -80°C eingefroren, da die Messung von Proteingehalt und MPO-Konzentration nicht unmittelbar erfolgten.

2.8 Zellzahlbestimmung

2.8.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
DM IRB		Leitz (Grenchen, CH)
Trypan blue solution	T8154	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Zählkammer C-Chip Neubauer improved	PK36.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)

Tabelle 14 *Material für die mikroskopische Zellzahlbestimmung*

2.8.2 Durchführung

Um die Zellkonzentration einer Zellsuspension pro ml zu bestimmen, wurden jeweils 10 µl der betreffenden Suspension in 90 µl Trypanblau 0,4% gelöst. Anschließend wurden 10 µl dieser Verdünnung in einer Neubauer-Zählkammer unter einem Mikroskop betrachtet, die Zellzahl bestimmt und mithilfe folgender Formel auf die Konzentration pro ml umgerechnet:

$$\frac{n}{0,1 \times 4} \times 1000 \times 10 = \text{Zellen}/_{ml}$$

2.9 Quantitative Bestimmung von Myeloperoxidase und Protein

2.9.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
96 well-plate		
ABTS Enhancer	A1277-10ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
H ₂ O ₂	1.08597	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)
Infinite® 200 Pro		TECAN (Männedorf, CH)
Magellan™ Software		TECAN (Männedorf, CH)
Natriumcitrat	S1804	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Pierce™ BCA Protein-Assay Kit	23227	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Zitronensäure	818707	Merck Millipore (Burlington, MA, USA)

Tabelle 15 *Material für die quantitative MPO- und Proteinbestimmung*

2.9.2 MPO-Versuch

Bei der Myeloperoxidase handelt es sich um ein Enzym, welches von PMNs freigesetzt wird. Demensprechend kann anhand einer im Vergleich zum physiologischen Zustand nach erfolgter LPS-Inhalation steigenden oder sinkenden Konzentration in der BAL auf eine erhöhte oder erniedrigte Aktivität von PMNs geschlossen werden. Somit ergeben sich Rückschlüsse auf den Schweregrad der Inflammation im Gewebe. [69].

Zunächst wurden jeweils 50µl der Proben mit 50µl Citrat-Puffer (pH=4,2, 1M Zitronensäure=26,3g + 1M Natriumcitrat=36,8g in 250 Aqua dest.) angesäuert und anschließend mit 100µl ABTS-Lösung verdünnt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit wurden die Proben als Doppelwerte in eine 96-Well-Plate

pipettiert und die optische Dichte der Proben bei 405nm mit dem TECAN plate reader gemessen.

2.9.3 Proteinbestimmung

Die Protein-Messung erfolgte mithilfe des Pierce™ BCA Protein-Assay Kits von Thermo Fisher nach Standard-Protokoll des Herstellers in einer 96-Well-Plate (Verhältnis von Probe bzw. Standard zu WR (working reagent) 1:8). Sowohl die Standardwerte als auch die Proben wurden jeweils als Doppelwerte pipettiert. Die Konzentrationen der Standardreihe betrugen 0,32-2,0mg/ml. Das verwendete Volumen betrug jeweils 25µl. Anschließend wurden zu jeder Probe und zu jedem Standardwert 200µl WR pipettiert und 30 Sekunden durch Schütteln gemischt. Nach 25 Minuten Inkubation bei 37°C im Dunkeln wurde mittels TECAN plate reader bei einer Wellenlänge von 562nm die optische Dichte der Proben bestimmt.

2.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

2.10.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
ELISA Kit for Semaphorin 4D (SEMA4D)	SEB430Hu	Cloud-Clone Corp. (Houston, TX, USA)
Mouse CXCL1/KC DuoSet ELISA	DY453	R&D (Minneapolis, MN, USA)
Mouse CXCL2/MIP-2 DuoSet ELISA	DY452	R&D (Minneapolis, MN, USA)
Mouse IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA	DY401	R&D (Minneapolis, MN, USA)
Mouse IL-6 DuoSet ELISA	DY406	R&D (Minneapolis, MN, USA)
Mouse TNF-alpha DuoSet ELISA	DY410	R&D (Minneapolis, MN, USA)

Tabelle 16 **ELISA-Kits**

2.10.2 Durchführung

Die quantitative Bestimmung von Zytokinen mittels ELISA wurde sowohl mit humanen Blutproben als auch mit Proben der bronchoalveolären Lavagen aus den LPS-Inhalationsversuchen durchgeführt. Sämtliche benötigten Reagenzien sowie 96-Well-Plates sind in den in Tabelle 16 aufgeführten Kits enthalten. Es wurde stets das vom Hersteller vorgeschlagene Standardprotokoll angewandt.

Die Durchführung der BAL findet sich in Punkt 2.7.2, das humane Vollblut wurde mit TNF- α stimuliert und anschließend für 1h, 2h, 4h oder 6h inkubiert. Nach Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Proben bei Raumtemperatur für 30 Minuten bei 2.500xg zentrifugiert und die zellulären Bestandteile für die ELISA-Messungen analog zu den PCR-Proben homogenisiert (Punkt 2.11.2).

Die Platten aus den R&D-Kits mussten am Tag vor der Messung mittels Beschichtens mit dem Capture-Antibody vorbereitet werden. Das Cloud-Clone-Kit wird bereits vorbereitet verkauft. Die Inkubation mit dem Capture-Antibody erfolgte über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Platten nach dreimaligem Waschen mit jeweils 400µl washing buffer pro well mit dem Reagent Diluent geblockt und erneut gewaschen.

Die Protokolle der beiden Hersteller unterscheiden sich zwar teilweise bezüglich der Inkubationszeiten, der Pipettier Volumina und der Namensgebung der Reagenzien, folgen allerdings dem gleichen Prinzip. Beide Protokolle sehen die Applikation einer Probe oder des Standards sowie eine Inkubation bei 37°C und einen Waschschrift vor. In der Folge finden drei Reaktionsschritte mit Inkubationen bei 37°C und jeweils vorangehenden Waschschriften statt. Nach Applikation der Stop-Solution empfiehlt das R&D-Protokoll eine sofortige Messung und das Cloud-Clone-Protokoll eine weitere Inkubation von 10-20 Minuten bei 37°C

Die Absorptionswerte der Proben wurden mit dem TECAN plate reader bei 450nm gemessen.

2.11 Quantitative Real-Time-PCR

2.11.1 Materialien und Primer

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
Precellys® 24		Bertin (Bretonneux, F)
Percellys® Lysing Kit - Empty 2mL Reinforced tubes and caps	P000943-LYSK0-A	Bertin (Bretonneux, F)
peqGOLD TriFast™	30-2010	VWR Chemicals (Radnor, PA, USA)
Chloroform	C2432-25ML	Honeywell (Charlotte, NC, USA)
Heraeus Fresco™ 17		Thermo Electron GmbH (Langenseibold, D)
2-Propanol	I9516-25ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Ethanol absolute for molecular biology	A3678,1000	AppliChem (Darmstadt, D)
Water for molecular biology	A7398,0500	AppliChem (Darmstadt, D)
NanoDrop™ 2000		Thermo Electron GmbH (Langenseibold, D)
iScript™ cDNA Synthesis Kit	1708890	BIO-RAD (Hercules, CA, USA)
T100™ Thermal Cycler		BIO-RAD (Hercules, CA, USA)
CFX-96™ Real-Time System + CFX Connect™ Real-Time System		BIO-RAD (Hercules, CA, USA)
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix, 5ml	172-5124	BIO-RAD (Hercules, CA, USA)
Multiplate™ PCR Plates 96-well, clear	MLL9601	BIO-RAD (Hercules, CA, USA)

Microseal® 'B' seal Seals	MSB1001	BIO-RAD (Hercules, CA, USA)
Primer s. unten		Biomers.net GmbH (Ulm, D)
1.4mm Zirconium oxide beads	P000927-LYSK0-A	Bertin (Bretonneux, F)

Tabelle 17 Material für die Bestimmung der Genexpression mittels RT-qPCR

Gen	Sequenz	Hersteller
18S (murin)	f: 5'gtaacccggtgaacccatt3' r: 5'ccatccaatcggttagtagcg3'	Biomers.net GmbH (Ulm, D)
PLEXINB1 (human)	f: 5'gcacgggacattccccggtac3' r: 5'ctatagatctgtgacctgttttc3'	Biomers.net GmbH (Ulm, D)
SEMA4D (human)	f: 5'actcagcgccacttccctt3' r: 5'cctttgccatcttcatttttc3'	Biomers.net GmbH (Ulm, D)
Ctla4 (murin)	f: 5'atgaacgctacacactgcatc3' r: 5'ccatcctttgccagttcctc3'	Biomers.net GmbH (Ulm, D)
Il-1β (murin)	f: 5'cattgtggctgtggagaagctg3' r: 5'gggaacgtcacacaccagcagg3'	Biomers.net GmbH (Ulm, D)
Il-6 (murin)	f: 5'gaggataccactcccaacag3' r: 5'aacgcactaggtttgccgag3'	Biomers.net GmbH (Ulm, D)
KC (murin)	f: 5'tttgtagccctgctcactct3' r: 5'ctgaagggtgggtcacctgta3'	Biomers.net GmbH (Ulm, D)
Plexinb1 (murin)	f: 5'aagcccagcctactaacaacc3' r: 5'cagccccactgtactgactg3'	Biomers.net GmbH (Ulm, D)
Sema4d (murin)	f: 5'tcaaagcagacggaatgccta3' r: 5'ccccaacctgactgatgtgta3'	Biomers.net GmbH (Ulm, D)
Tnf-α (murin)	f: 5'cgtagtagcaaaccaccaag3' r: 5'gaacctgggagtagacaagg3'	Biomers.net GmbH (Ulm, D)

Tabelle 18 Primerliste für die RT-qPCR

2.11.2 Durchführung und Genquantifizierung

Um aus den bei -80°C eingefrorenen Lungenproben cDNA zu gewinnen, wurde zunächst die RNA aus den Proben isoliert. Als Reagenz wurde peqGOLD TriFast™ verwendet. Die Proben wurden im Precellys® 24 Tissue Homogenizer homogenisiert. Die RNA-Pellets wurden in 80µl nukleasefreiem Wasser gelöst und bei -80°C eingefroren.

Um aus der isolierten RNA cDNA zu synthetisieren, wurde zunächst die Konzentration RNA mithilfe des Thermo NanoDrop™ 2000 gemessen. Eine optische Dichte von 1,0 (OD₂₆₀=1,0) entspricht einer RNA-Konzentration von 40µg/ml. Somit lässt sich die genaue Konzentration berechnen:

$$c_{RNA} \left[\frac{\mu g}{ml} \right] = OD_{260} \times 40 \frac{\mu g}{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die Synthese der cDNA wurde mit dem iScript™ cDNA Synthesis Kit im T1000 Thermal Cycler durchgeführt. Es werden 4µl des iScript™ Reaction Mix sowie 1µl der iScript™ Reversen Transkriptase benötigt. Der T100TM Thermal Cycler wurde mit folgendem Protokoll verwendet:

Zeit	Temperatur
5 Min.	25°C
30 Min.	42°C
5 Min.	85°C
∞	4°C

Tabelle 19 *Protokoll des T1000 Thermal Cyclers zur cDNA-Synthese*

Die humanen und murinen Primer für die Expressionsanalyse finden sich in Tabelle 18. Die ribosomale 18S-Untereinheit fungierte als Housekeeping-Gen zur Standardisierung humaner als auch muriner Proben. Die eigentliche Polymerase-Kettenreaktion wurde mit dem BioRad CFX-96™ Real-Time System durchgeführt. Die Genamplifikation fand in 40 Zyklen statt. Das Protokoll für den iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix von BioRad ist in der folgenden Tabelle dargestellt. Die Annealing-Temperatur betrug 65,5°C für alle murinen und

60,5°C für die humanen Primer, die für die PCR-Versuche mit den HMEC-1 Zellen verwendet wurden.

Zeit	Temperatur	
30 Sekunden	95,0°C	
5 Sekunden	95,0°C	
20 Sekunden	jeweilige Annealing-Temperatur	40x
10 Sekunden	95,0°C	
5 Sekunden pro 0,5°C	65,0°C-95,0°C	Melting-curve in 0,5°C-Schritten

Tabelle 20 **Protokoll der RT-qPCR**

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode angewandt. Der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert stellt die relative Expression des jeweiligen Zielgens in Bezug auf das Housekeeping-Gen abzüglich einer Negativkontrolle in Form von nukleasefreiem Wasser dar.

2.12 Flusskammer

2.12.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
5 Min. Epoxy Harz & Härter	155105 & 155110	R&G Faserverbundwerkstoffe GmbH (Waldenbuch, D)
Casein Blocking Buffer 10x	B6429-500ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Deckgläser 24x32mm	9.161.032	Menzel Gläser (Braunschweig, D)
Heparin-Natrium-25000- ratiopharm		Ratiopharm (Ulm, D)
Human Semaphorin 4D/CD100 Antibody	MAB74701	R&D (Minneapolis, MN, USA)
Intramedic™ PE Tubing	1417012P	BD (San Jose, CA, USA)
Isotonische Kochsalzlösung E NaCl 0,9	19II30WC	Fresenius (Bad Homburg v.d.H., D)
NIS-Elements		Nikon (Minato, JP)
Objekttäger geschnitten- Mattrand	03-0004	R. Langenbrinck (Emmendingen, D)
Orca®-R2		Hamamatsu (Hamamatsu, JP)
Orthoplan		Leitz
Recombinant Human E- Selectin/CD62E Fc Chimera Protein	724-ES	R&D (Minneapolis, MN, USA)
Recombinant Human ICAM- 1/CD54 Fc Chimera Protein	720-IC-200	R&D (Minneapolis, MN, USA)
VirtoTubes™ Rectangle Boro Tubing 0,02x0,20mm	5002-600	VitroCom (Mountain Lakes, NJ, USA)

Tabelle 21 *Material für die Flusskammer-Versuche*

2.12.2 Aufbau der Flusskammern und Durchführung des Versuches

Der Grundaufbau der Flusskammern bestand aus einem Objektträger, zwei aufeinander geklebten Deckgläsern, einer dazwischen liegenden 3,5 cm langen Glaskapillare sowie einem dünnen Plastikschauch. Dieser wurde mit NaCl befüllt, um einen gleichmäßigen Unterdruck und somit eine konstante Flussgeschwindigkeit des Blutes durch die Kapillare zu gewährleisten. Zum Abdichten der Verbindungsstelle zwischen Glaskapillare und Plastikschauch wurde ein Zwei-Komponenten-Epoxidharzkleber verwendet. Nach dem Aushärten des Klebers wurden die Flusskammern mit je E-Selektin bzw. E-Selektin+ICAM-1 beschichtet. ($c_{\text{E-Sel}}=100\mu\text{g/ml}$, $c_{\text{ICAM-1}}=40\mu\text{g/ml}$). Die jeweilige Bezeichnung der Gruppen findet sich weiter unten. Es folgte eine Inkubationszeit von zwei Stunden. Als nächstes wurde ein Casein-Block (1x) in die Kammern eingebracht und das Experiment nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit gestartet.

Es wurde das Blut von fünf gesunden Probanden verwendet. Die Blutentnahme erfolgte mit 2ml Blut in Sarstedt Monovetten® neutral, vorbereitet mit 200µl 1:10 verdünntem Ratiopharm Heparin 25000U zur Antikoagulation. Nach der Blutentnahme wurden die Proben mit einem anti-hSEMA4D-Antikörper behandelt oder unbehandelt verwendet ($c_{\text{anti-hSEMA4D}}=15\mu\text{g/ml}$). Die Inkubationszeit betrug 15 Minuten.

Anschließend wurde der Blutfluss mithilfe eines Mikroskops und der Orca®-R2 mit der Software NIS-Elements der Firma Nikon aufgezeichnet. Es wurden Videos mit 15fps und einer Länge von 10 Sekunden aufgezeichnet und folgende Gruppen benannt: E-Sel + unbehandelt, E-Sel + ICAM-1 + unbehandelt, E-Sel + anti-hSEMA4D-Behandlung, E-Sel + ICAM-1 + anti-hSEMA4D-Behandlung.

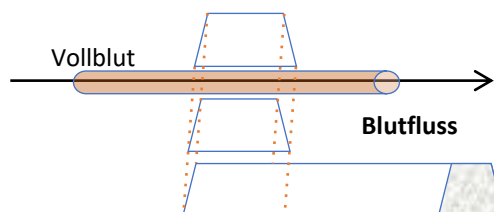


Abbildung 6 Aufbau einer Flusskammer (Flow Chamber)

2.12.3 Analyse und Zelltracking

Die Analyse der Videos wurde mit der Tracking-Funktion der Analyse-Version von NIS-Elements durchgeführt. Videos, die große Ansammlungen von PMNs aufwiesen, wurden von der Analyse ausgeschlossen, um einer Verfälschung des Flussbildes vorzubeugen. Zunächst wurden eine oder mehrere sogenannte ROIs (regions of interest) definiert. Deren geometrisches Zentrum diente als Referenzpunkt für das Tracking. Die ROIs stellen die Zellen im Video dar, die sich für das Tracking eignen. Die Zellen sollten eine möglichst konstante Bewegung ohne größere Sprünge aufweisen und über einen ausreichend langen Zeitraum zu sehen sein. Nach Definieren aller ROIs wurde das nachfolgende Frame des Videos betrachtet. Das Zelltracking erfolgte frame für frame über drag and drop. Die beobachtete Strecke, auf der sich die Zellen bewegten, wies stets eine Länge von ca. 100µm auf. Aus dem zuvor definierten Maßstab des Videos wurden so die Trackingdaten errechnet.

2.13 Intravitalmikroskopie

2.13.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	D8537-500ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
DyLight® 488 Mouse Plt labelling	#X488	Emfret (Eibelstadt, D)
Eclipse Ci Mikroskop		Nikon (Minato, JP)
Heizmatte		Thermocoax (Heidelberg, D)
Intensilight	C-HGFIE	Nikon (Minato, JP)
Isotonische Kochsalzlösung E NaCl 0,9	19II30WC	Fresenius (Bad Homburg v.d.H., D)
KL 1500 LCD Kaltlichtquelle		Olympus Life Science (München, D)
LPS from E. Coli 026:B6	L8274-10MG	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Mersilk 7-0	NW5334	Ethicon (Somerville, NJ, USA)
NIS-Elements		Nikon (Minato, JP)
Optosplit II Bypass Image Splitter		Cairn Research (Faversham, UK)
Orca®-Flash4.0		Hamamatsu (Hamamatsu, JP)
Paraffinöl dickflüssig	8904.1	Carl Roth (Karlsruhe, D)
PE Anti-Mouse Ly-6G	127608	BioLegend (San Diego, CA, USA)
PLAN FLUOR 20X Mimm DIC N2 Objektiv		Nikon (Minato, JP)
Polyethylene Tubing PE50	427411	Intramedic (Neu-Isenburg, D)
SP10017 Syringe Pump		World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA)

Standard-Batterie kauter Hochtemperatur	H4 0140	Bovie Medical Corporation (Melville, NY, USA)
SuperFrost® Weiß ohne Druck	03-0001	R. Langenbrinck (Emmendingen, D)
Wattestäbchen, steril	825120	MSP Schmeiser (Horb a. N., D)

Tabelle 22 Material für die Intravitalmikroskopie

2.13.2 Durchführung

Diese Methode sollte als Schnittstelle zwischen den ex vivo und den in vivo Experimenten dienen, da sie einen direkten Blick auf den Blutfluss im lebendigen Gewebe ermöglicht. Statt nach einer histologischen Aufbereitung oder einer Stimulation von Vollblut konnte mittels Intravitalmikroskopie die direkte Reaktion eines Mausorganismus auf die intravenöse Injektion von LPS beobachtet werden.

Zunächst wurden die Versuchstiere durch peritoneale Applikation von Pentobarbital betäubt, auf einem beheizten Objektisch (37°C) ausgerichtet und ein zentralvenöser Katheter eingebracht und mit Nähten fixiert. Hierzu wurde die rechte Vena jugularis der Maus freipräpariert. Anschließend wurde der M. cremaster der Maus auf einem Objektträger im Objektisch präpariert. Nach einer Inzision medial des linken Hinterbeines wurde die oberflächliche Faszie gespalten und der Musculus cremaster freigelegt. Um den Blutfluss unter dem Mikroskop betrachten zu können, wurde der Muskelsack mithilfe des Kauters aus Tabelle 22 längs aufgetrennt. Anschließend wurde der Muskel mit Fäden auf einem Objektträger fixiert. Das freiliegende Gewebe wurde mittels kontinuierlicher Benetzung mit PBS⁻ durch eine Spritzenpumpe feucht gehalten.

Vor der Mikroskopie wurden die PMNs und die Thrombozyten der Versuchstiere mit spezifischen Antikörpern markiert. In der Intravitalmikroskopie wurden die Fluoreszenz-Antikörper PE anti-mouse Ly-6G von BioLegend und DyLight® 488 Mouse Plt labelling von Emfret verwendet. Als Lichtquelle diente der Nikon

Intensilight Epi-Fluoreszenz-Illuminator.

Zur Betrachtung des Gewebes wurde das PLAN FLUOR 20X MImm DIC N2 Objektiv von Nikon verwendet, das speziell für Mikroskopie im wässrigen Milieu konstruiert wurde. Die Aufnahmen erfolgten mit der Software NIS-Elements von Nikon und der Orca®-Flash4.0 Kamera von Hamamatsu. Vor der Kamera wurde der Optosplit Image Splitter installiert um zu ermöglichen, zwei Farbkanäle gleichzeitig optisch getrennt aufzuzeichnen. Die Aufnahmen besaßen eine Framerate von 30fps und eine Länge von jeweils 10 Sekunden. Von jedem Versuchstier wurden Aufnahmen vor und nach der intravenösen Applikation von LPS angefertigt. Der Zeitpunkt 0 Minuten stellt jeweils den Zeitpunkt direkt nach der Präparation des Muskels bzw. direkt nach der Injektion dar. Des Weiteren wurden Aufnahmen durchgeführt, die den Zustand 15 Minuten nach dem Verabreichen des LPS darstellen.

2.13.3 Analyse

Die Ermittlung der Rollgeschwindigkeit der Zellen mittels Tracking in NIS-Elements erfolgte analog zu der Methode aus Kapitel 2.12.3. Auch für die Intravitalmikroskopie wurde das Analysetool von NIS-Elements eingesetzt. Außerdem wurde die Zahl der an der Gefäßwand adhären PMNs, die Zahl der ins Gewebe emigrierten PMNs sowie deren zurückgelegte Migrationsstrecke erhoben.

2.14 Stimulation von humanem Vollblut

2.14.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
TNF- α , human	C-63721	PromoCell (Heidelberg, D)

Tabelle 23 Für die Stimulation der humanen Zellen verwendetes TNF- α -Präparat

2.14.2 Durchführung

Die Stimulation von humanem Vollblut diente der Bestimmung des zeitlichen Verlaufes der Konzentration von SEMA4D in den festen und flüssigen Bestandteilen des Blutes.

Es wurde ausschließlich Blut von gesunden Probanden verwendet. Jedem Probanden wurden zunächst 10ml Blut abgenommen und anschließend mit TNF- α (10 μ g/ml) stimuliert. Nach Inkubationszeiten von einer, zwei, vier und sechs Stunden wurden die jeweiligen Proben fünf Minuten bei 500xg zentrifugiert, das Blutplasma abpipettiert und die festen Bestandteile homogenisiert.

Die Konzentration von SEMA4D im Blutplasma und in den festen Blutbestandteilen wurde anschließend mittels ELISA gemessen.

2.15 Magnetische PMN-Isolation und Chemotaxis-Versuch

Der Chemotaxis-Versuch diente dazu, den Einfluss eines bestimmten Stoffes auf die Migrationsrichtung verschiedener Blutzellen, in diesem Fall PMNs, zu untersuchen. Die Isolation der humanen PMNs erfolgte über ein Trennungsverfahren, das auf sogenannten magnetic beads basiert (siehe 2.15.2). Der Versuch wurde mit rekombinant humanem SEMA4D (rhSEMA4D) als Chemotaxin, fMLP als Positivkontrolle sowie reinem Zellmedium als Negativkontrolle durchgeführt. Außerdem wurden mithilfe von Antikörpern bei in der Chemotaxis-Kammer vorhandenem SEMA4D dessen Rezeptoren PLEXINB1 und PLEXINB2, oder beide blockiert. Die Konzentration der Antikörper betrug jeweils 1µg/ml.

2.15.1 Materialien

Produktname	Artikelnummer	Hersteller
Antibiotic Antimycotic Solution (100x), Stabilized	A5955-100ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Axiocam MRm Observer.Z1		Zeiss (Oberkochen, D)
Bovine Serum Albumin 7,5%	A8412-100ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
CD15 MicroBeads, human	130-046-601	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
CELLSTAR® CELL CULTURE DISHES 145/20mm	639160	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Chemotaxis and Migration Tool		Ibidi, (Gräfelfing, D)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	D8537-500ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt solution 0,5M	E7990-100ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
FACS™ Lysing Solution 10X Concentrate	349202	BD (San Jose, CA, USA)

Fetal Bovine Serum, Research Grade	F0804-50ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Heraeus Cytoperm™ 2		Thermo Electron GmbH (Langenseibold, D)
Human Plexin B1 Antibody	MAB3749	R&D (Minneapolis, MN, USA)
Human Plexin B2 Antibody	AF5329	R&D (Minneapolis, MN, USA)
ImageJ		National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)
L-Glutamine solution	G7513-100ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)
LS Columns	130-042-401	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
LSM 510		Zeiss (Oberkochen, D)
MACS® Multistand	130-042-303	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
MidiMACS™ Separator	130-042-302	Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, D)
N-Formyl-Met-Leu-Phe	47729-10MG-F	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Parafilm™ "M" Laboratorx Film	PM-996	Bemis (Oshkosh, WI, USA)
Plan-APOCHROMAT 20X10,8	420650-9901	Zeiss (Oberkochen, D)
Recombinant Human Semaphorin 4D Fc Chimera Protein	7470-S4	R&D (Minneapolis, MN, USA)
RPMI-1640 Medium	R7509-500ML	Sigma (St. Louis, MO, USA)

S-Monovette® 3 ml, Citrat 3,2% (1:10), 75x13 mm, grün EU-Code, Papieretikett	41.919.001	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Zählkammer nach Neubauer doppelt	HCT 40441702	Assistent (Altnau TG, AUT)
Zen Software		Zeiss (Oberkochen, D)
μ-Slide Chemotaxis	80326	Ibidi (Gräfelfing, D)

Tabelle 24 Material für die magnetische Zellisolation und den Chemotaxis-Versuch

PMN-Medium	500ml RPMI-1640 Medium 5ml L-Glutamin 5ml Antibiotic Antimycotic Solution 50ml FCS
BSA-Puffer	500ml PBS- mit pH=7,2 33,3ml BSA = 0,5% 2ml EDTA = 2mM

Tabelle 25 Rezepturen für die im Chemotaxis-Versuch verwendete Zellmedium und den Waschpuffer für die Zellisolation

2.15.2 Isolation von PMNs

Nach erfolgter Blutabnahme bei vier gesunden Probanden wurden die PMNs aus deren Blut isoliert. Hierzu wurden sogenannte magnetic beads der Firma Miltenyi Biotech verwendet. Diese binden spezifisch an das Epitop CD15 und verfügen über ein magnetisches Fc-Fragment, welches es ermöglicht, die jeweiligen mit den Antikörpern markierten Zellen durch Einbringen in ein starkes Magnetfeld aus der Lösung zu isolieren.

Hierzu wurden die MACS® Columns LS der Firma Miltenyi Biotech verwendet. Prinzipiell bestehen diese aus einer Spritze mit verlängertem Konus. Im Konus befinden sich ferromagnetische Kügelchen, die zusätzlich eine zellschonende Beschichtung besitzen.

Der für die Verwendung mit den LS Columns vorgesehene MidiMACS™

Separator enthält einen starken Magneten, der das Magnetfeld der Kügelchen im Spritzenkonus um den Faktor 1.000 verstärkt. So können die markierten Zellen im Spritzenkonus gehalten werden, während der Rest der Lösung abfließt.

Für diesen Versuch wurden ein Zellmedium sowie ein BSA-Puffer benötigt. Die Rezeptur des Mediums und des Puffers finden sich in Tabelle 24 und Tabelle 25.

Zur Blutentnahme wurden die 2ml S-Monovetten aus Tabelle 24 verwendet. Zunächst wurden die Erythrozyten im Blut mit 40ml der Lysing Solution der Firma BD in einem Eppendorf®-Gefäß bei 37°C lysiert. Nach dem Lyseschritt erfolgte ein Zentrifugationsschritt mit 500xg bei Raumtemperatur für 5 Minuten. Der Überstand wurde abpipettiert. Zur Resuspension dienten 2ml des Zellmediums mit einer Temperatur von 37°C. Mittels Zentrifuge wurde die Lösung auf 1ml Volumen aufkonzentriert und die Konzentration der Zellen wie in Kapitel 2.8.2 beschrieben ermittelt. Nach der Zellzahlbestimmung wurde die Lösung auf 80µl aufkonzentriert. Mit 20µl der Microbeads Lösung können bis zu 10^7 Zellen markiert werden. Dementsprechend wurde das benötigte Volumen der Microbeads Lösung für jeden Durchgang des Versuches entsprechend der berechneten Zellzahl neu bestimmt. Die Microbeads benötigen nach Zugabe zur Zelllösung eine Inkubationszeit von 15 Minuten. Anschließend erfolgte ein Waschschrift und eine Resuspension der Zellen in BSA-Puffer. Es wurden 500µl BSA-Puffer pro 10^8 Zellen verwendet. Zur Vorbereitung der LS Columns wurden diese mit 2ml BSA-Puffer befüllt und die Zelllösung anschließend ohne Druck in den Zylinder der Spritze appliziert. Die überschüssigen Komponenten der Zelllösung wurden mit 2x3ml BSA-Puffer ausgewaschen. Um die isolierten Zellen aus dem Spritzenkonus zu entnehmen, wurde die LS Column aus dem Magnetfeld entfernt und mit 5ml BSA-Puffer befüllt. Der Inhalt der LS Column wurde unter Verwendung des beiliegenden Spritzenstempels in ein 5ml Eppendorf-Gefäß überführt und anschließend nach erneuter Zellzahlbestimmung auf eine Endkonzentration von 3×10^6 Zellen/ml gebracht.

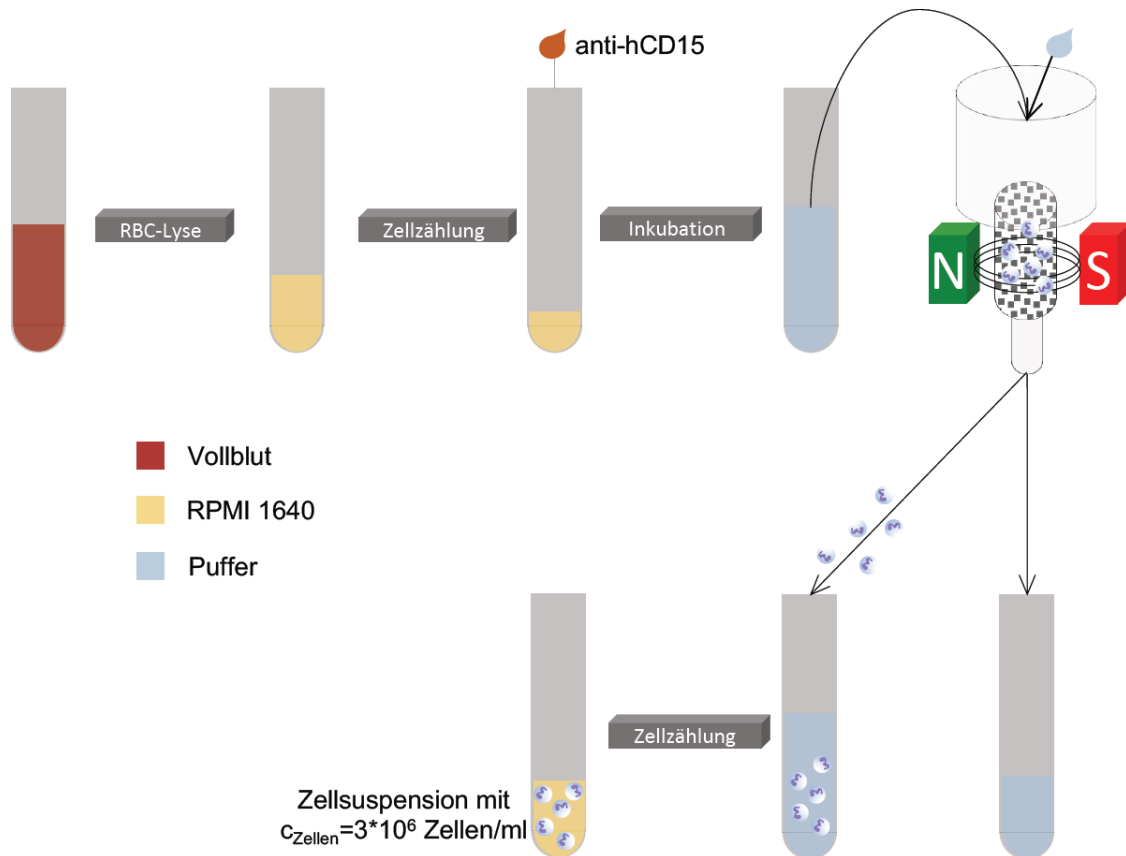


Abbildung 7 Schematische Darstellung der PMN-Isolation mit magnetischen Antikörpern

2.15.3 Chemotaxis-Versuch

Der Chemotaxis-Versuch wurde mit den ibidi μ -Slides Chemotaxis durchgeführt. Das Protokoll des Herstellers sieht dabei eine Vorgehensweise unter semisterilen Bedingungen vor.

Der ausgepackte μ -Slide wurde zusammen mit angefeuchteten Tüchern in einer Petrischale mit einem Durchmesser von 10cm platziert. Der μ -Slide verfügt über sechs Öffnungen, zwei über der Zellkammer und jeweils zwei über den beiden Kammern, in die später die Stimulanzien eingebracht wurden. Während eines Pipettierschrittes nicht benötigte Öffnungen, wurden stets mithilfe der mitgelieferten Pins verschlossen. Die Applikation der Flüssigkeiten erfolgte teils durch Auftropfen der betreffenden Flüssigkeit auf eine bestimmte Öffnung und Aspiration desselben Volumens auf der Gegenseite und teils über direkte Applikation.

Zunächst wurden 6µl Medium in die Zellkammer eingebracht und anschließend jeweils 65µl Medium in die beiden Chemotaxin-Kammern direkt appliziert. Danach wurden die jeweiligen Chemotaxine und zum Schluss die Zellen in die Zellkammern eingebracht. Vor der Betrachtung unter dem Mikroskop wurden alle Öffnungen ebenfalls mit den Pins verschlossen.

Die Konzentration des Ansatzes der fMLP-Lösung betrug 10µg/ml und die der SEMA4D-Lösung 5µg/ml. Somit ergaben sich innerhalb der Kammern des µ-Slides Konzentrationen von 5µg/ml fMLP und 2,5 µg/ml SEMA4D. Die Aufzeichnung wurde am LSM 510 Mikroskop mittels der Axiocam MRm der Firma Zeiss durchgeführt, wobei das Objektiv Zeiss Plan-APOCHMAT 20x/0,8 verwendet wurde. In der Steuerungssoftware wurden sämtliche Punkte, an denen das Mikroskop Bilder aufzeichnen sollte, vorher definiert. Die Dauer der Aufzeichnung betrug 8-12 Stunden. Die Daten wurden mit der ZEN-Software der Firma Zeiss erhoben. Jeweils im Abstand von 5 Minuten wurde jeder vorab definierte Punkt angesteuert und ein einzelnes Bild aufgezeichnet. Hieraus entstanden in der Folge mithilfe der Software NIS-Elements von Nikon Zeitraffer-Videos, die mit der Software ImageJ ausgewertet wurden.

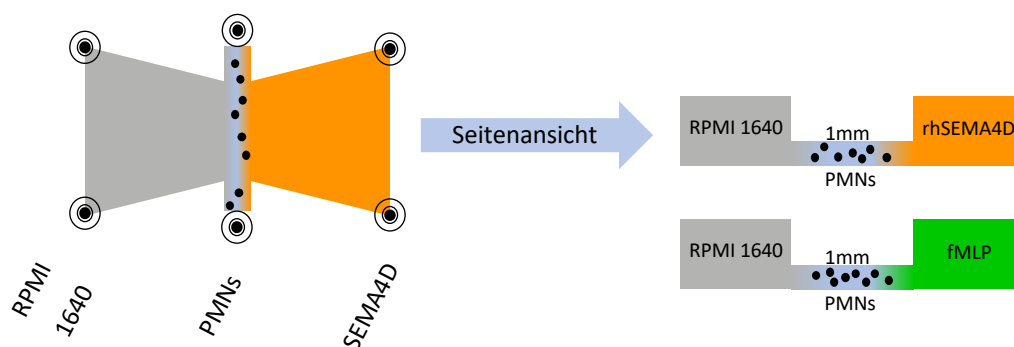


Abbildung 8 Schematische Darstellung der Gradienten des Chemotaxis-Versuches

2.15.4 Analyse

Um die Informationen aus dem Zelltracking zu den im Ergebnisteil dargestellten Daten zu konvertieren, wurde das „Chemotaxis and Migration Tool“ von ibidi verwendet. Untersucht wurden die generelle Migrationsrichtung der Zellen sowie die Migrationsgeschwindigkeit, der Forward Migration Index (FMI) und die Richtungskonstanz der Zellmigration (in der Software als Directionality bezeichnet). Mithilfe des FMI und der Richtungskonstanz lässt sich eine Aussage darüber treffen, wie stark sich die Beeinflussung der untersuchten Zellpopulationen durch den jeweils eingesetzten Stoff darstellt. Die Directionality bzw. Directness berechnet sich aus dem Quotienten der euklidischen Distanz und der tatsächlichen Länge der Trackingstrecke. Somit gibt sie Auskunft über die Strecke, die eine Zelle in Relation zur Entfernung vom Ursprung der Trackingstrecke zurücklegt.

Der Forward Migration Index (FMI) teilt sich in einen x_{FMI} (x-Richtung) und einen y_{FMI} (y-Richtung) auf. Da die Objektträger im Mikroskop konstruktionsbedingt um 90° gedreht werden mussten, stellt hier der y_{FMI} den zum Chemotaxingradienten parallel verlaufenden Index dar. Dieser berechnet sich aus dem Quotienten des y-Endpunktwertes und der Länge der Trackingstrecke. Dies gibt dementsprechend zusätzlich Aufschluss über die Entfernung in einer bestimmten Richtung ausgehend vom Anfangspunkt und somit über die Stärke der Chemotaxis.

3 Ergebnisse

3.1 Der Einfluss eines proinflammatorischen Stimulus auf die Expression von SEMA4D und PlexinB1

3.1.1 Bestimmung der Expression von SEMA4D und PlexinB1 in humanen Zelllinien nach proinflammatorischer Stimulation

In verschiedenen Studien wurde bereits nachgewiesen, dass während einer Entzündungsreaktion des menschlichen Körpers die Konzentration von im Blutplasma gelösten SEMA4D eine steigende Tendenz aufweist. Besonders hervorgehoben sei an dieser Stelle die Studie von Liu et al. aus dem Jahr 2013, in der unter anderem die Konzentration von sSEMA4D während einer akuten Entzündungsreaktion auf eine Hantavirus-Infektion untersucht wurde [58].

Die Expression von SEMA4D auf der Zelloberfläche von Epithel- und Endothelzellen wurde mittels Immunfluoreszenzmikroskopie visualisiert. Hierzu wurden die Zellen nach Stimulation mit IL-6 oder TNF- α stimuliert mikroskopiert. Beide Stimulantien führten zu einer verstärkten Fluoreszenz auf Epithel- und Endothelzellen in Bezug auf SEMA4D (Abbildung 9).

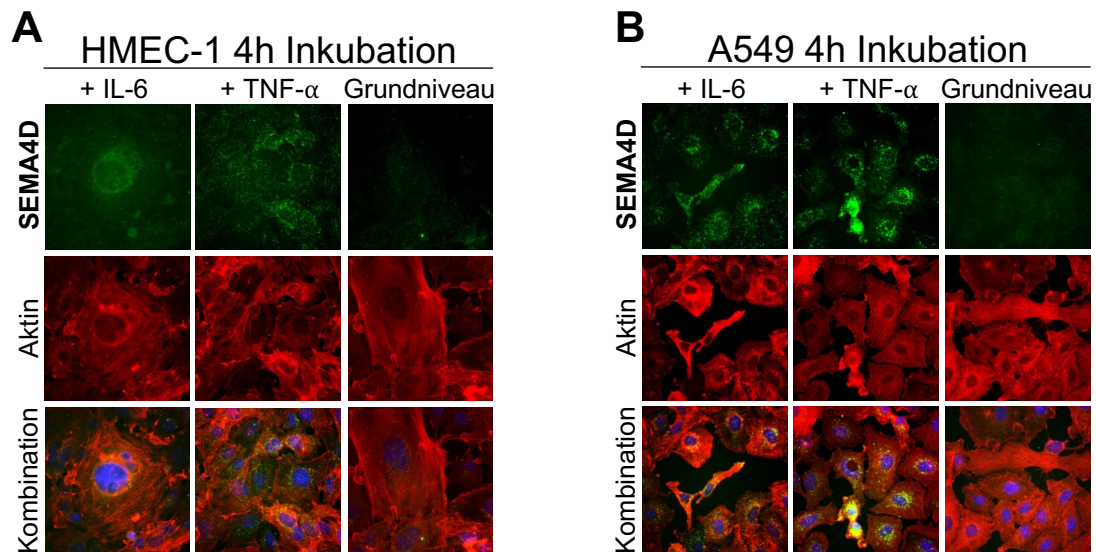


Abbildung 9 Gesteigerte SEMA4D Expression auf der Zelloberfläche von Epithel- und Endothelzellen nach proinflammatorischer Stimulation

Zellen aus den humanen Zelllinien HMEC-1 und A549 wurden mittels Gabe von IL-6 oder TNF- α einem proinflammatorischen Stimulus ausgesetzt und nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden IF-gefärbt und mikroskopiert.

A: HMEC-1-Zellen sind eine Endothelzelllinie. Sowohl die Stimulation mit IL-6 als auch mit TNF- α führte zu einer deutlich sichtbar vermehrten Fluoreszenz des spezifischen anti-hSEMA4D-Antikörpers.

B: A549-Zellen stellen das Modell für Lungenepithelzellen dar. Auch auf der Epithelseite zeigte sich unter proinflammatorischen Bedingungen eine deutlich höhere Expression von SEMA4D auf der Zelloberfläche.

Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung der mRNA-Expression der für SEMA4D und PlexinB1 in Endothelzellen (HMEC-1) mittels RT-qPCR. Weder die Stimulation mit IL-6 noch Stimulation mit TNF- α führte zu einer signifikanten Änderung der Genexpression für PlexinB1. Die Expression von SEMA4D wurde durch IL-6 ebenfalls nicht signifikant beeinflusst. Die proinflammatorische Stimulation mit TNF- α hingegen erbrachte eine signifikant erhöhte SEMA4D-Expression (Abbildung 10).

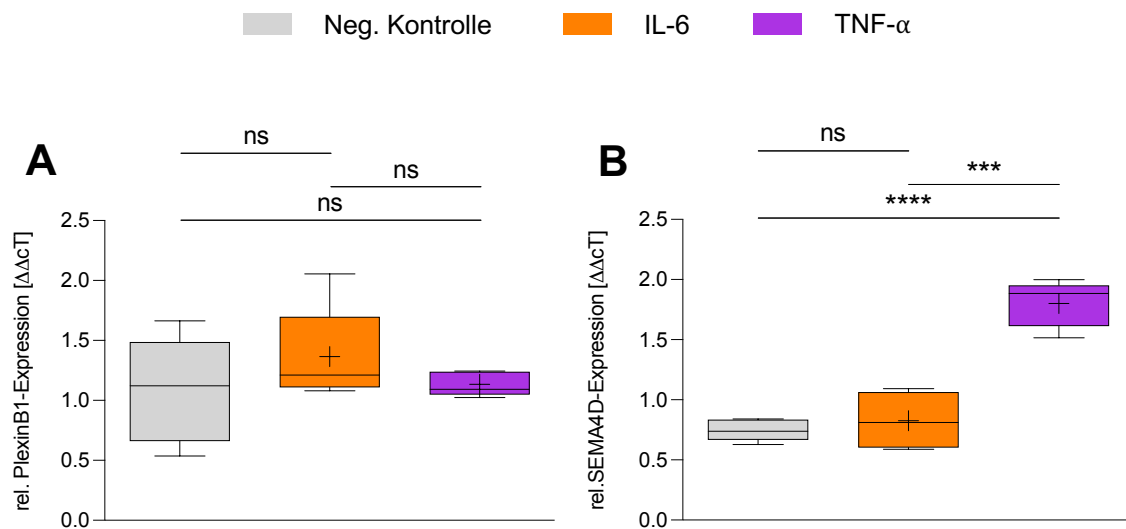


Abbildung 10 RT-qPCR-Analyse von humanen Endothelzellen

Es erfolgte eine proinflammatorische Stimulation der HMEC-1 Zellen mit TNF- α und IL-6. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden wurden die Zellen homogenisiert und die Genexpression mittels RT-qPCR bestimmt.

A: Die Genexpression von PlexinB1 wurde durch proinflammatorische Stimulation nicht beeinflusst. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

B: Die relative Expression von SEMA4D zeigte eine signifikante Steigerung durch die Stimulation mit TNF- α . IL-6 führte zu keiner signifikanten Veränderung.

Es wurden jeweils die Daten von fünf unabhängigen Zellpopulationen verwendet, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.1.2 Vergleich der zellulären und humoralen Konzentration von SEMA4D nach Stimulation humanen Vollblutes mit $\text{TNF-}\alpha$

Dass SEMA4D in einer membrangebundenen und einer gelösten Form vorliegt ist bereits seit 1998 durch Delaire et al. bekannt [70]. In diesem Experiment wurde der zeitliche Verlauf der Menge an SEMA4D sowohl im Blutplasma als auch auf den Membranen der Blutzellen untersucht. Humanes Vollblut wurde mit $\text{TNF-}\alpha$ stimuliert und anschließend für eine bestimmte Zeit inkubiert (Abbildung 11). Zelluläre und flüssige Bestandteile des Blutes wurden mittels Zentrifuge getrennt und die Konzentration von SEMA4D mit einem Standard ELISA-Kit bestimmt.

Bereits eine Stunde nach der Stimulation stieg die SEMA4D Konzentration in den zellulären Bestandteilen des Blutes an und erreichte nach zwei Stunden den Höchstwert. Nach vier Stunden stellte sich eine sinkende Tendenz ein.

Im Gegensatz hierzu zeigte die SEMA4D Plasmakonzentration nach zwei Stunden lediglich einen geringen Anstieg und erreichte ihren Maximalwert nach vier Stunden.

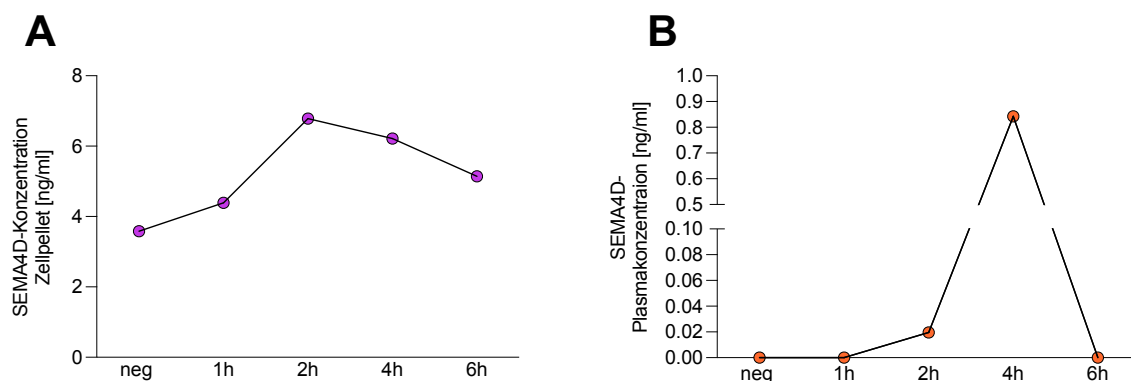


Abbildung 11 Zeitlicher Verlauf der Konzentration von SEMA4D in den zellulären und nicht zellulären Blutbestandteilen

Die Blutproben wurden nach der Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ inkubiert und anschließend zentrifugiert.

A: Die ELISA-Messungen ergaben bereits nach einer Stunde einen Anstieg der SEMA4D Konzentration. Das Absinken des membrangebundenen SEMA4D weist eine zeitliche Korrelation mit dem starken Anstieg der SEMA4D Plasmakonzentration aus B auf.

B: Die ELISA-Messungen wurden mit den flüssigen Bestandteilen derselben Zentrifugate durchgeführt. Der Konzentrationsanstieg beginnt nach zwei Stunden und steigt nach vier Stunden auf ca. 0.9 ng/ml an. Als Negativkontrolle wurde das Blut von zwei gesunden Spendern verwendet, die Inkubationszeiten von 1h, 2h, 4h und 6h wurden mit einem Stichprobenumfang von $n=3$ durchgeführt.

3.2 Die Reaktion von isolierten humanen Immunzellen auf die Exposition mit SEMA4D unter physiologischen Bedingungen

Laut Literatur wirkt membrangebundenes SEMA4D auf PMNs einer Aktivierung dieser Zellen entgegen[64]. Die Chemotaxis-Experimente zeigen den Effekt von SEMA4D auf das Migrationsverhalten nicht aktivierter PMNs.

3.2.1 Die Inkubation von PMNs mit rhSEMA4D führt zu einer dem SEMA4D-Gradienten entgegengerichteten Migrationsbewegung

Für SEMA4D sind sowohl die Zellmigration fördernde als auch migrationsinhibierende Effekte beschrieben. Da der Fokus dieses Projektes unter anderem auf der Untersuchung der Wirkung von SEMA4D auf PMNs liegt, wurde ein ex vivo Chemotaxis-Versuch mit frisch isolierten humanen neutrophilen Granulozyten durchgeführt. Die entstandenen Zeitraffer-Videos erlauben eine Beurteilung der direkten chemotaktischen Wirkung von SEMA4D auf diesen Zelltyp, auch im Hinblick auf die verschiedenen für SEMA4D beschriebenen Rezeptoren PlexinB1 und PlexinB2.

In den Chemotaxis-Versuchen wurden frisch aus humanem Blut isolierte PMNs eingesetzt. Dabei ermöglichen die ibidi μ -Slides einen sich im Verlauf der Session aufbauenden chemotaktischen Gradienten. Die Migrationsstrecken der Zellen wurden anschließend in einer Software aufgezeichnet (Abbildung 12).

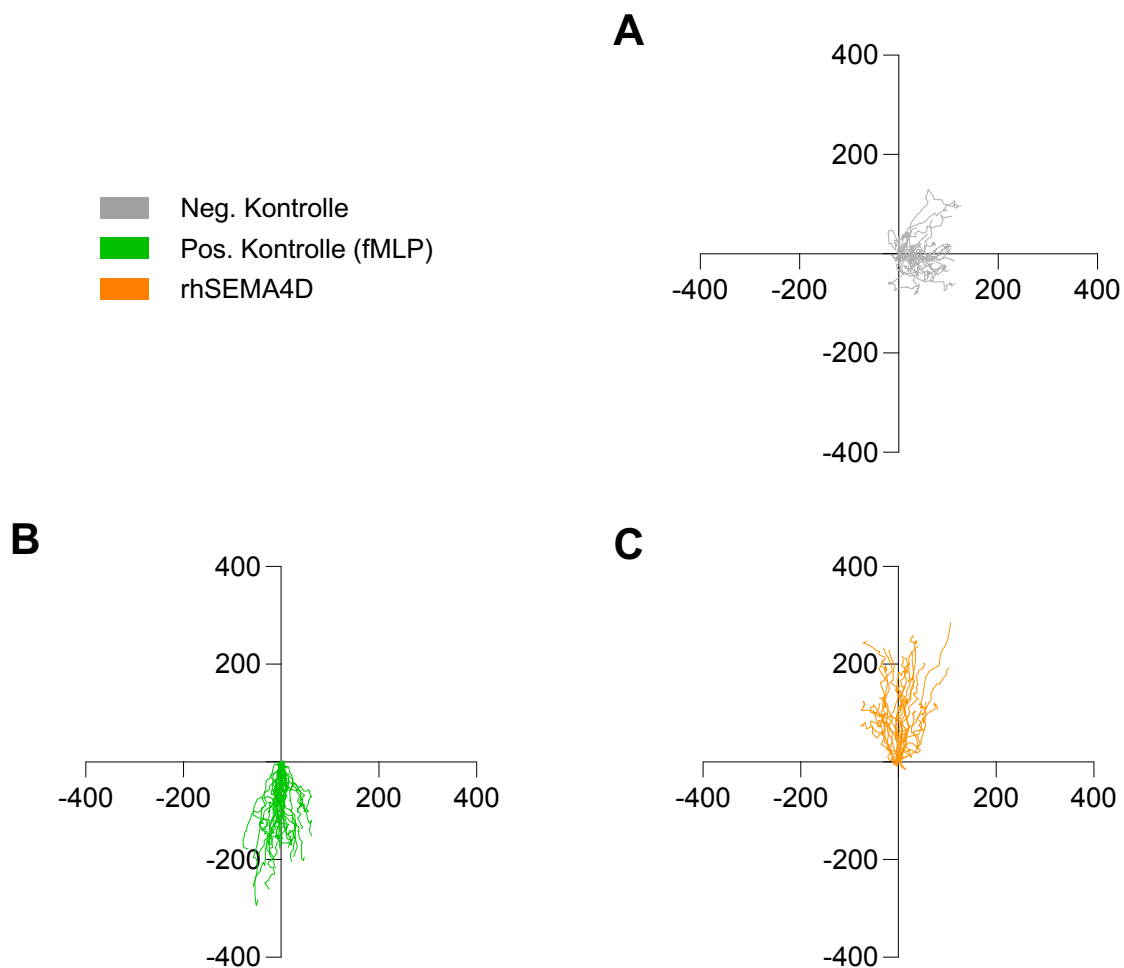


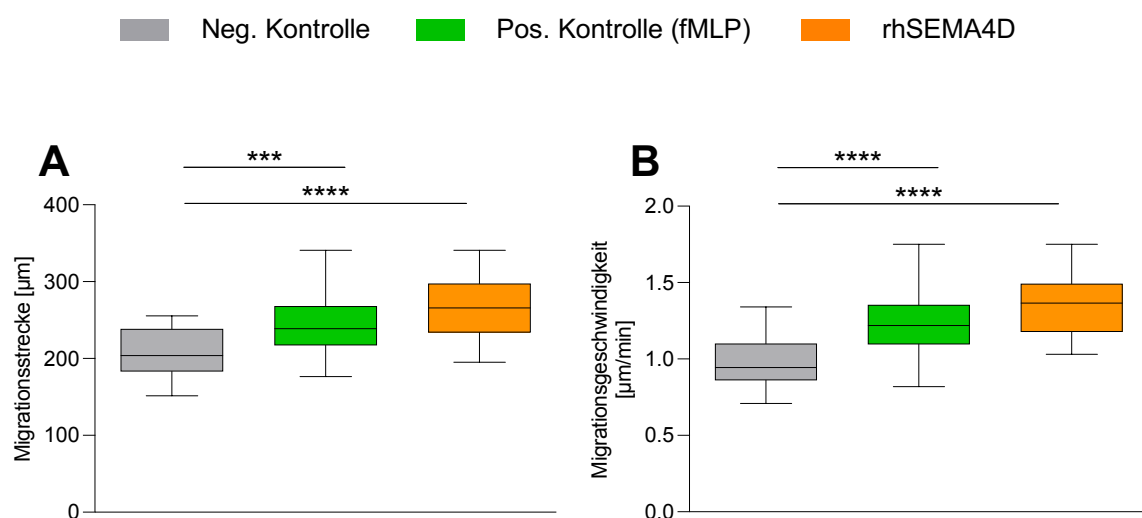
Abbildung 12 Repräsentative Trackingstrecken-Darstellungen in μm aus dem Chemotaxis and Migration Tool in ImageJ

Die PMNs aus dem Blut gesunder Spender wurden in die ibidi μ -Slides pipettiert. In Zeitabständen von fünf Minuten wurden Bilder von den Zellpopulationen aufgenommen und diese anschließend zu einem Zeitraffer-Video zusammengefügt. Die sich über die einzelnen Bilder ändernde Position der Zellen wurde mit dem Tracking Tool in ImageJ in einen Datensatz transformiert. Für jeden Datensatz wurde das Blut von drei gesunden Spendern verwendet. Jede Linie in einem Graphen entspricht dem Migrationsweg einer einzelnen Zelle in Bezug auf ihre Startposition. Die Strecken werden stets in μm angegeben. Dies gilt für alle folgenden Graphen, die den Chemotaxis-Versuch betreffen. **A:** Repräsentativer Verlauf: Darstellung der Negativkontrolle. **B:** Repräsentativer Verlauf: Darstellung der Positivkontrolle. **C:** Repräsentative Darstellung mit rhSEMA4D als chemischem Lockstoff.

Die isolierten PMNs kamen in diesem Versuch unter physiologischen, nicht inflammatorischen Bedingungen mit rhSEMA4D in Kontakt. rhSEMA4D führte im Vergleich zur Negativkontrolle zu einer signifikant höheren zurückgelegten Migrationsstrecke (Abbildung 13A). Die errechnete Migrationsgeschwindigkeit zeigt ein ähnliches Bild und verifiziert somit, dass die Zellen stets über eine konstante Anzahl Frames verfolgt wurden (Abbildung 13B).

Die Directionality ist ein Maß für die Richtungstreue der verfolgten Zellen. Starke Abweichungen von der initial eingeschlagenen Richtung resultieren in einem geringeren prozentualen Richtungskonstanz-Wert. Dementsprechend sind bei der Negativkontrolle in Zusammenschau mit dem γ FMI Rückschlüsse auf eine weniger gerichtete Migration möglich, wohingegen die Migration bei einer Exposition mit rhSEMA4D eine eindeutige Richtungstendenz aufweist (Abbildung 13C, Abbildung 13E).

Der γ FMI kann laut Angaben in den Instruktionen von ibidi als Maß für die Stärke der Chemotaxis gesehen werden (unter <https://ibidi.com/chemotaxis-analysis/171-chemotaxis-and-migration-tool.html> zum Download freigegebenes pdf-Dokument, Stand: 20.03.2022). Die Auftragung unter Berücksichtigung der positiven und negativen γ -Werte erlaubt Rückschlüsse auf die Migrationsrichtung der verfolgten Zellen. Durch den Chemotaxis-Versuch konnten starke Indizien für einen chemorepulsiven Effekt von rhSEMA4D gefunden werden. Das rhSEMA4D verursachte verglichen mit der Positivkontrolle (fMLP) eine dem Gradienten entgegengerichtete Migrationsbewegung. Der Absolutwert des γ FMI erlaubt einen direkten Vergleich der Stärke der Chemotaxis unter den jeweiligen Bedingungen. rhSEMA4D führt bei PMNs somit zu einer statistisch signifikant darstellbaren Chemotaxis (Abbildung 13D).



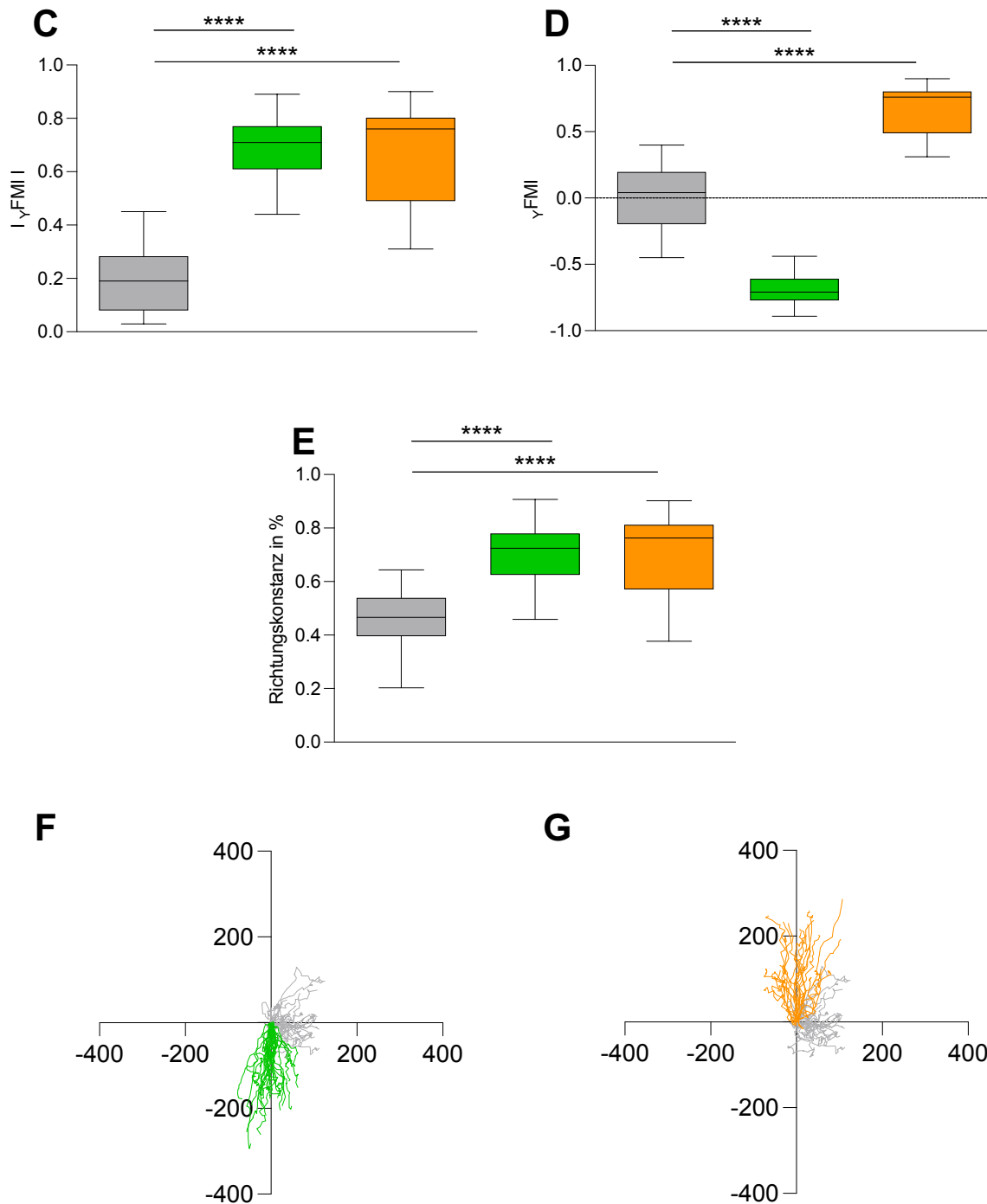


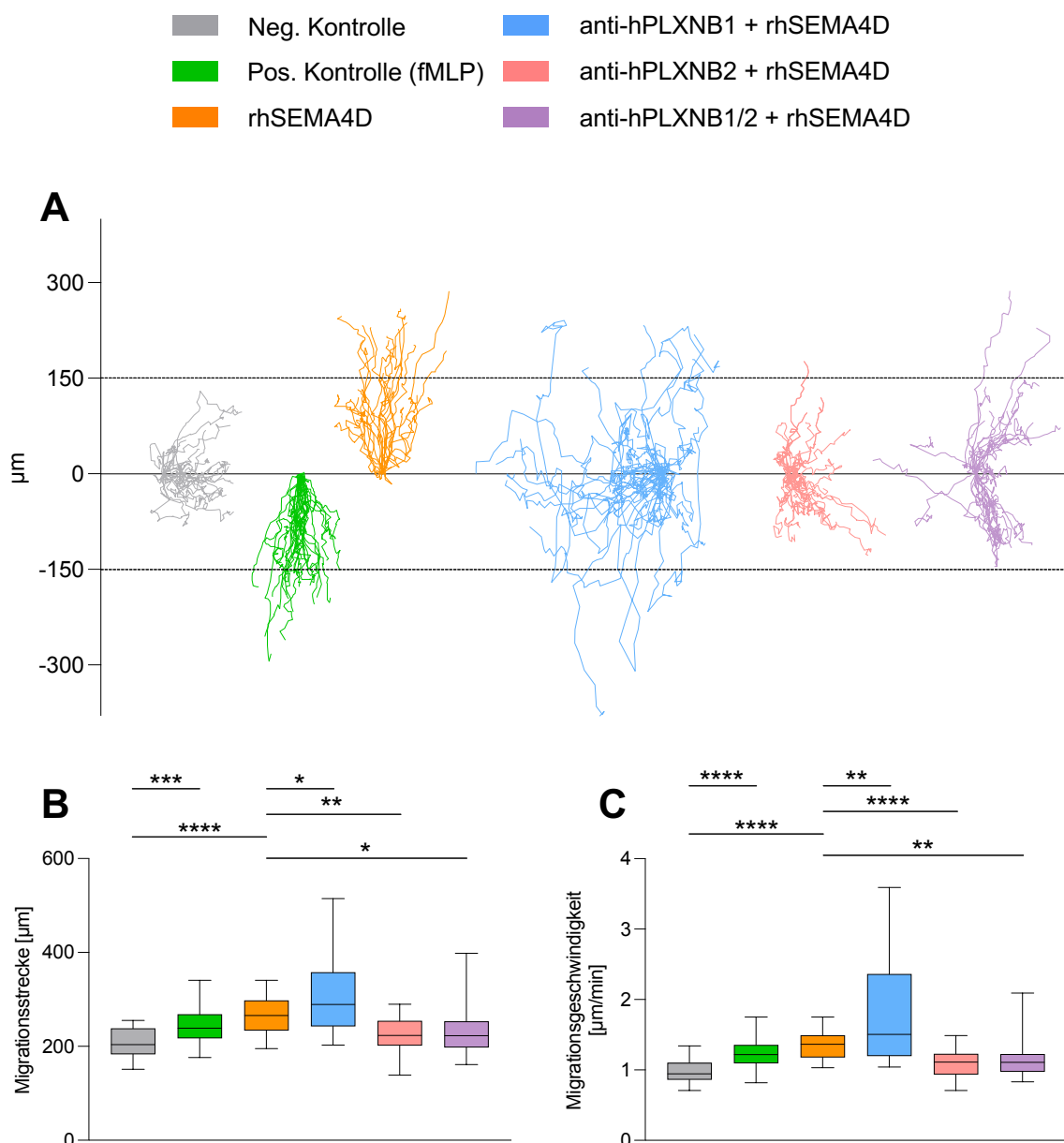
Abbildung 13 Analyse des Chemotaxis-Versuches in Bezug auf die direkte Wirkung von rhSEMA4D auf nicht aktivierte neutrophile Granulozyten – rhSEMA4D wirkt chemorepulsiv

In den seitlichen Kammern der μ -Slides wurde ein Stoffgradient erzeugt, sodass die Chemotaxinkonzentration, der die PMNs ausgesetzt sind, im Laufe des Experimentes ansteigt.

A: Länge der Trackingstrecke als Summe aus allen Zwischenstücken in μm , **B:** Aus der Trackingstrecke errechnete Migrationsgeschwindigkeit in $\mu m/s$ (Ergänzung zu A), **C:** Absolutwert des γFMI , **D:** γFMI , **E:** Richtungskonstanz, **F:** Visualisierung des Vergleiches der Trackingstrecken von Negativkontrolle und fMLP-Positivkontrolle in μm , **G:** Visualisierung des Vergleiches der Trackingstrecken von Negativkontrolle und rhSEMA4D in μm . Für jeden Datensatz wurde das Blut von drei gesunden Spendern in mehreren Ansätzen verwendet, **** $p < 0.0001$.

3.2.2 Die Blockade verschiedener Rezeptoren für SEMA4D besitzt einen unterschiedlichen Einfluss auf das Migrationsverhalten der isolierten PMNs

Im nächsten Schritt wurden die frisch isolierten PMNs vor dem Einbringen in die μ -Slides für 15 Minuten mit einem blockierenden anti-hPlexinB1-Antikörper, einem blockierenden anti-hPlexinB2-Antikörper oder beiden Antikörpern inkubiert. Diese SEMA4D-Rezeptoren wurden ausgewählt, da sich PlexinB2 erwiesenermaßen auf PMNs befindet und PlexinB1 mit der Aktivierung von Thrombozyten in Verbindung gebracht wird [64].



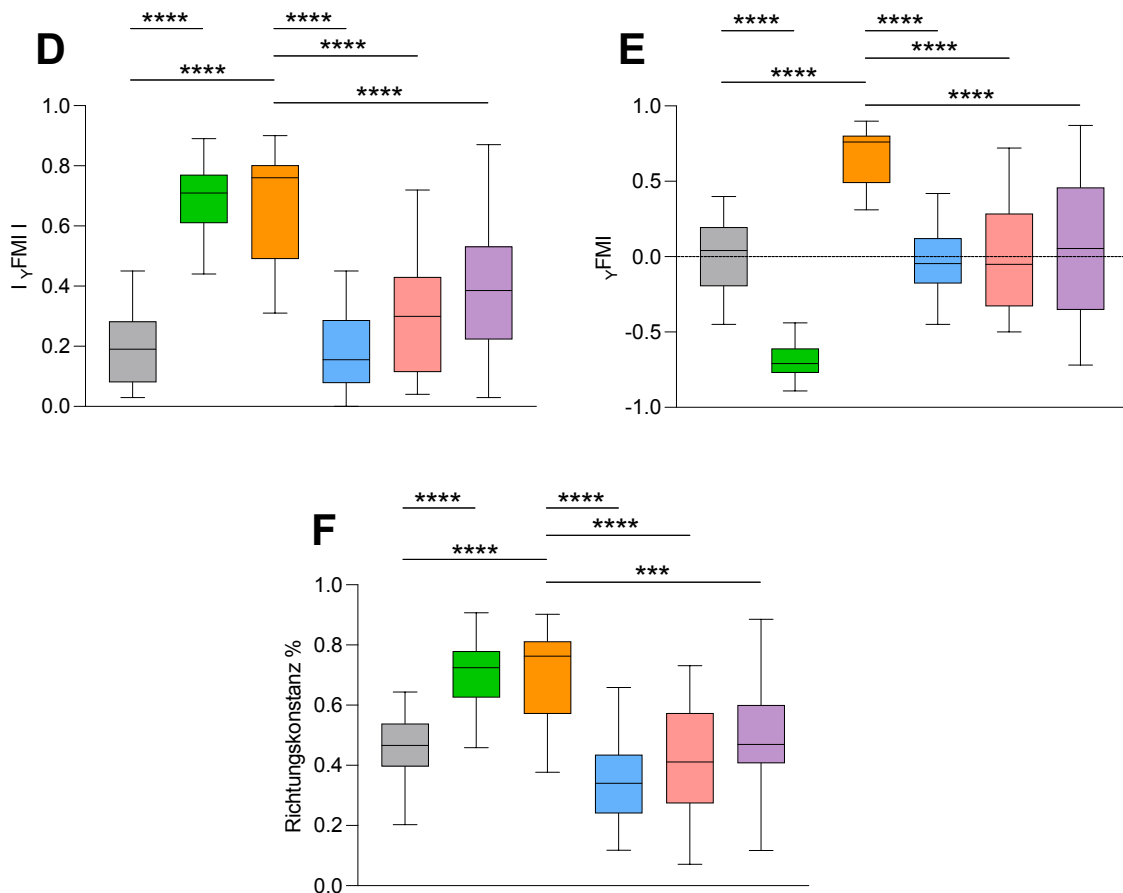


Abbildung 14 Chemotaxis Versuches unter Blockade von PlexinB1 und PlexinB2

Mithilfe verschiedener geometrischer Auswertungsmethoden, die in Punkt 2.15.4 beschrieben werden, wurde die visuelle Darstellung der Unterschiede der Migrationswege der Zellen statistisch erfasst.

A: Gesamtbild des Zelltracking-Ergebnisses, **B:** Migrationsstrecke der Zellen **C:** Aus der Migrationsstrecke in B errechnete Migrationsgeschwindigkeit, **D:** Absolutwert des γFMI , **E:** γFMI , **F:** Richtungskonstanz der verfolgten Zellen

Für jeden Datensatz wurde das Blut von drei gesunden Spendern verwendet, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Die Vergleichsgruppen für die Signifikanzanalysen werden in Abbildung 15 dargestellt.

Aus Abbildung 14C wird ersichtlich, dass die Blockade von PlexinB1 zu einer signifikant höheren Migrationsstrecke führt, wohingegen die PMNs nach Behandlung mit einem blockierenden Antikörper gegen PlexinB2 eine signifikant geringere Strecke zurücklegen. Die gemessene Migrationsstrecke bei der gleichzeitigen Blockade beider Rezeptoren entspricht ungefähr der der PMNs nach Behandlung mit dem blockierenden PlexinB2-Antikörper.

Der γ FMI aus Abbildung 14D weist für alle Antikörperkonditionen signifikante Unterschiede in Bezug auf die Bewegungsrichtung der aufgezeichneten PMNs auf. Während die Zellen, wie bereits in Punkt 3.2.1 beschrieben, ohne Rezeptorblockade eine eindeutige Richtungstendenz zeigen, führen die Antikörper gegen PlexinB1 und PlexinB2 zu Migrationsbewegungen in beide γ -Richtungen. Unter Blockade von PlexinB1 ist der absolute γ FMI-Wert am geringsten und entspricht ungefähr dem der Negativkontrolle. Auch die PMNs mit blockiertem PlexinB2-Rezeptor weisen einen geringeren γ FMI auf. (Abbildung 14E). Betrachtet man die Werte der Richtungskonstanz aus Abbildung 14G, wird ersichtlich, dass die Richtungskonstanz der Zellen mit der PlexinB1-Rezeptorblockade den niedrigsten Gesamtwert aufweist. Dies lässt unter Berücksichtigung der Daten aus Abbildung 14D und Abbildung 14E darauf schließen, dass die Blockade von PlexinB1 zu der am wenigsten gerichteten Migrationsbewegung führt, während die Blockade von PlexinB2 eine generelle Einschränkung der Migration der PMNs bewirkt.

Außerdem weist der starke Unterschied des Verhaltens der PMNs nach der Inkubation mit einem spezifischen anti-hPlexinB1-Antikörper auf eine bisher nicht beschriebene Expression von PlexinB1 auf der Zelloberfläche von PMNs unter physiologischen, nicht inflammatorischen Bedingungen hin.

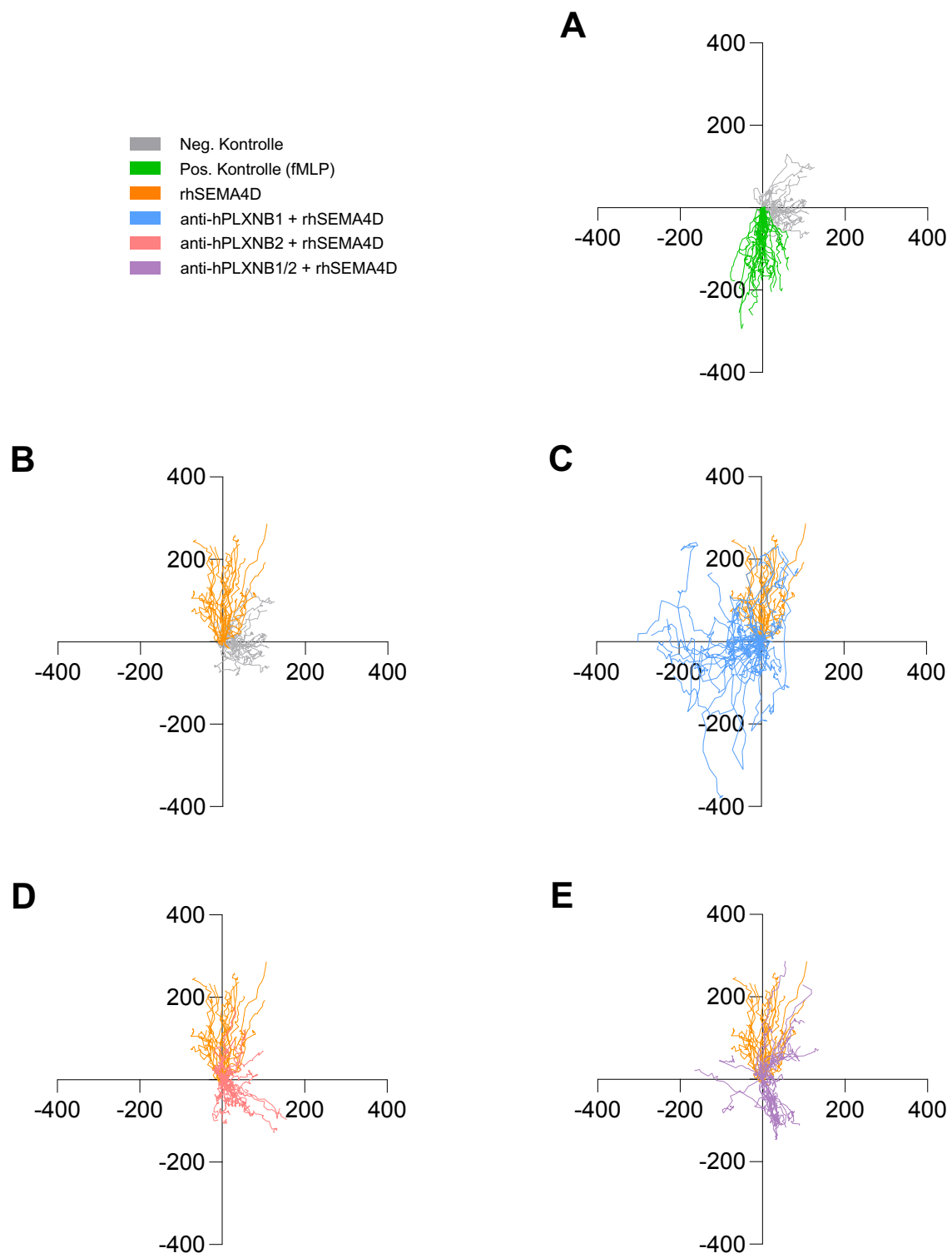


Abbildung 15 Vergleichsgruppen der Signifikanzanalyse des Chemotaxis-Versuches

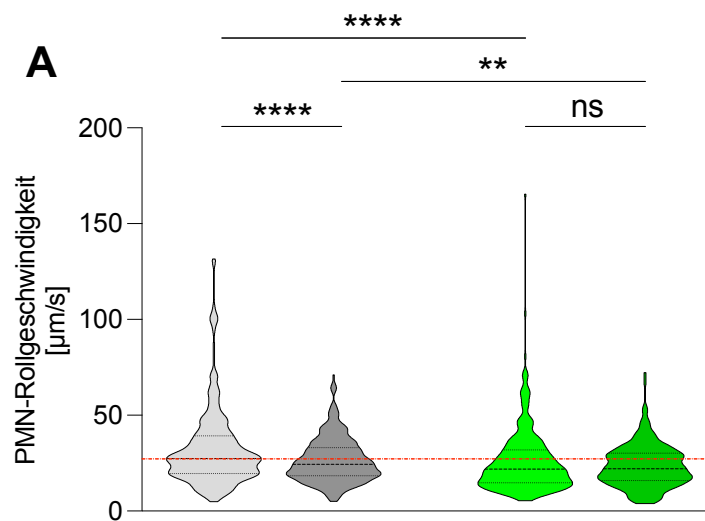
A: Negativkontrolle vs. Positivkontrolle (fMLP), **B:** Negativkontrolle vs. rhSEMA4D, **C:** rhSEMA4D vs. rhSEMA4D + anti-hPlexinB1, **D:** rhSEMA4D vs. rhSEMA4D + anti-hPlexinB2, **E:** rhSEMA4D vs. rhSEMA4D + anti-hPlexinB1+B2, Visualisierung der Migrationsstrecken in μm
Für jeden Datensatz wurde das Blut von drei gesunden Spendern verwendet.

3.3 Die Blockade von SEMA4D mit einem spezifischen Antikörper führt zu einer fehlenden Änderung der Rollgeschwindigkeit bei stärkerem Adhäsionsreiz

Die ex vivo Flusskammer-Versuche dienten zur Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von PMNs bei konstantem Blutfluss. Mittels Software-gestützter Zelltrackinganalyse wurde die Rollgeschwindigkeit der Zellen an der Kapillarwand bestimmt. Um die Eigenschaften einer Endothelzellschicht zu simulieren, wurden die Kapillaren zunächst mit E-Selektin beschichtet. ICAM-1 ist ein Adhäsionsmolekül, das ebenfalls am Haften der PMNs an der Gefäßwand beteiligt ist, und somit zu einer Verlangsamung der Rollgeschwindigkeit führt und mit der Transmigration von Leukozyten durch die Gefäßwand in Verbindung gebracht wird.[71]

Der Versuch wurde zunächst unter nicht inflammatorischen Bedingungen mit unstimuliertem Vollblut durchgeführt. Das Blut wurde mit Heparin antikoaguliert und ein Teil für 15 Minuten mit dem Antikörper gegen SEMA4D inkubiert. Der Blutfluss in der Glaskapillare wurde mit einer Highspeed-Kamera mit 10fps aufgenommen.

■ E-Sel unbehandelt ■ E-Sel + anti-hSEMA4D
 ■ E-Sel + ICAM1 unbehandelt ■ E-Sel + ICAM-1 + anti-hSEMA4D



B

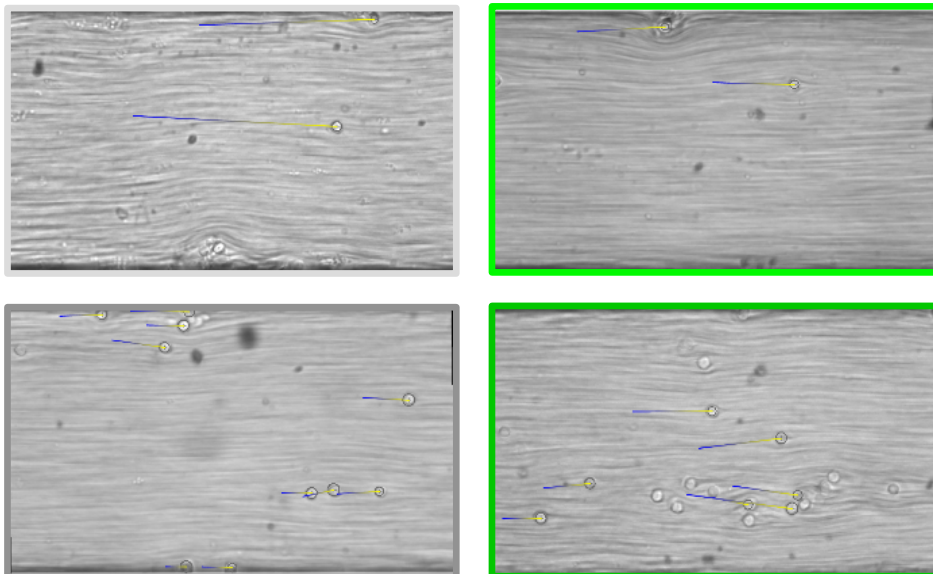


Abbildung 16 Flusskammer-Versuch unter Blockade von SEMA4D mit einem spezifischen Antikörper

In den Flusskammern wurden Videos des Blutflusses durch eine Glaskapillare unter verschiedenen Bedingungen erstellt. Die Kapillaren wurden mit E-Selektin und je nach Gruppe zusätzlich mit ICAM-1 behandelt. Außerdem wurde ein Teil des Blutes 15 Minuten mit einem anti-hSEMA4D Antikörper behandelt. Die Bildfrequenz der Videos betrug 10fps. Die Rollbewegungen der PMNs wurden mit der Software NIS-Elements analysiert und die Rollgeschwindigkeit der PMNs errechnet.

A: Rollgeschwindigkeit der PMNs, **B:** Repräsentative Trackingbilder aus NIS-Elements

Für jeden Datensatz wurde das Blut von vier gesunden Spendern verwendet, $**p < 0.01$; $****p < 0.0001$.

In der Negativkontrolle (unbehandeltes Blut) führte die zusätzliche Beschichtung mit ICAM-1 zu einer Verringerung der gemessenen Rollgeschwindigkeit der

PMNs (Abbildung 16A). Die Blockade von SEMA4D führte trotz der Beschichtung mit einem zusätzlichen Adhäsionsmolekül zu keiner signifikanten Verlangsamung der Zellen. Bei genauer Betrachtung der Werte (Abbildung 16A) zeigt sich auch nach der Behandlung mit dem Antikörper gegen SEMA4D eine leicht abfallende Tendenz in Form einer geringeren Streuung und einem geringeren Minimalwert.

3.4 Der genetische Knockout von Sema4d beeinflusst das Adhäsionsverhalten von PNCs bei muriner Inflammation

Die Intravitalmikroskopie stellt eine Schnittstelle zwischen den ex vivo Versuchen und dem in vivo Mausmodell dar. Die Analyse gestaltet sich analog zum Chemotaxis Versuch und den Flusskammer-Experimenten. Mittels NIS-Elements war ein Livetracking von PMNs und PNCs im lebenden Organismus möglich. Die Fragestellung dieses Versuches beschäftigt sich mit einer möglichen Beeinflussung der inflammatorischen Reaktion von PMNs durch einen genetischen Sema4d-Knockout. Männliche Versuchstiere erhielten eine Narkose mit Pentobarbital. Anschließend wurden fluoreszierende Antikörper und das LPS intravenös appliziert. Der Blutfluss im Musculus cremaster wurde mit einer Highspeed-Kamera (Tabelle 22) mit 30fps aufgezeichnet.

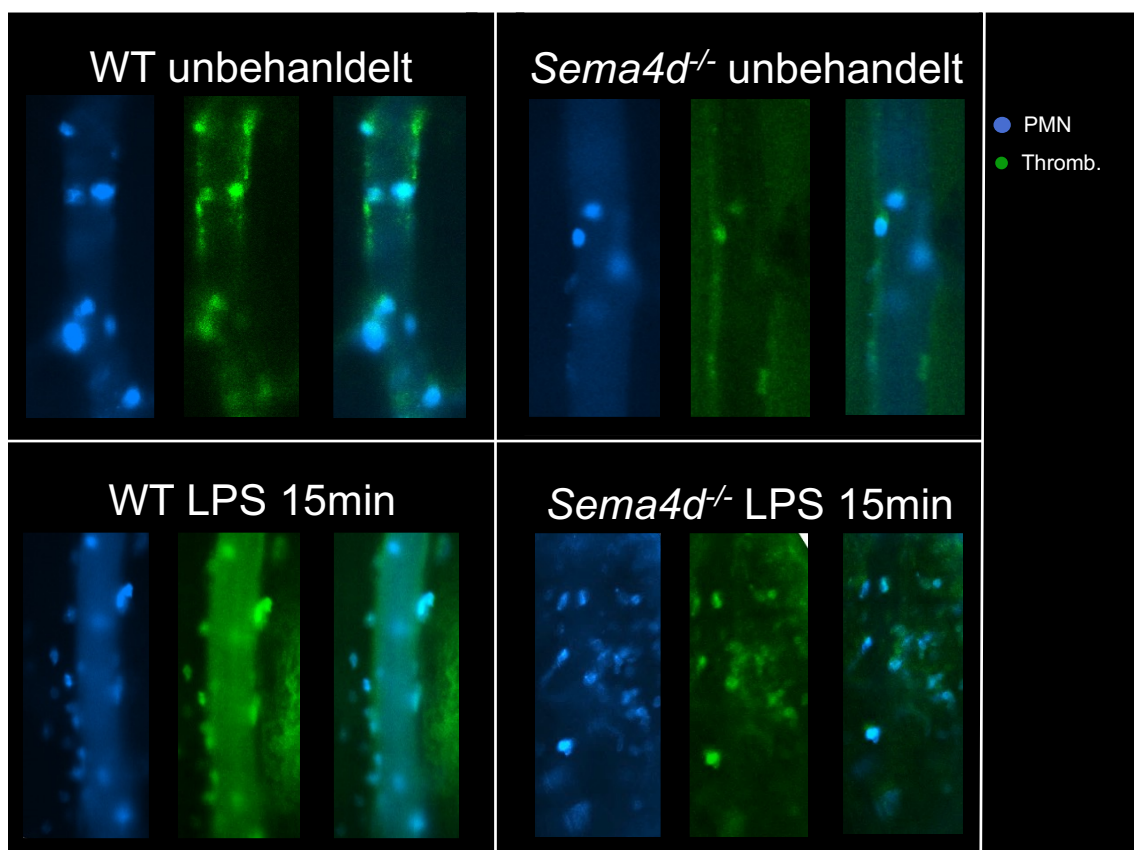


Abbildung 17 Intravitalmikroskopisches Zelltracking

Mittels eines Emissions Image Splitters (Optosplit) wurden die Fluoreszenzsignale der Antikörper für PMNs und Thrombozyten in zwei separate optische Kanäle getrennt. Die PMNs und Thrombozyten wurden zuvor mit fluoreszenzmarkierten oberflächenspezifischen Antikörpern markiert. Durch diese Technik wird eine separate Betrachtung dieser beiden Zelltypen und die sichere Identifizierung von PMNs, Thrombozyten und somit auch PNCs möglich.

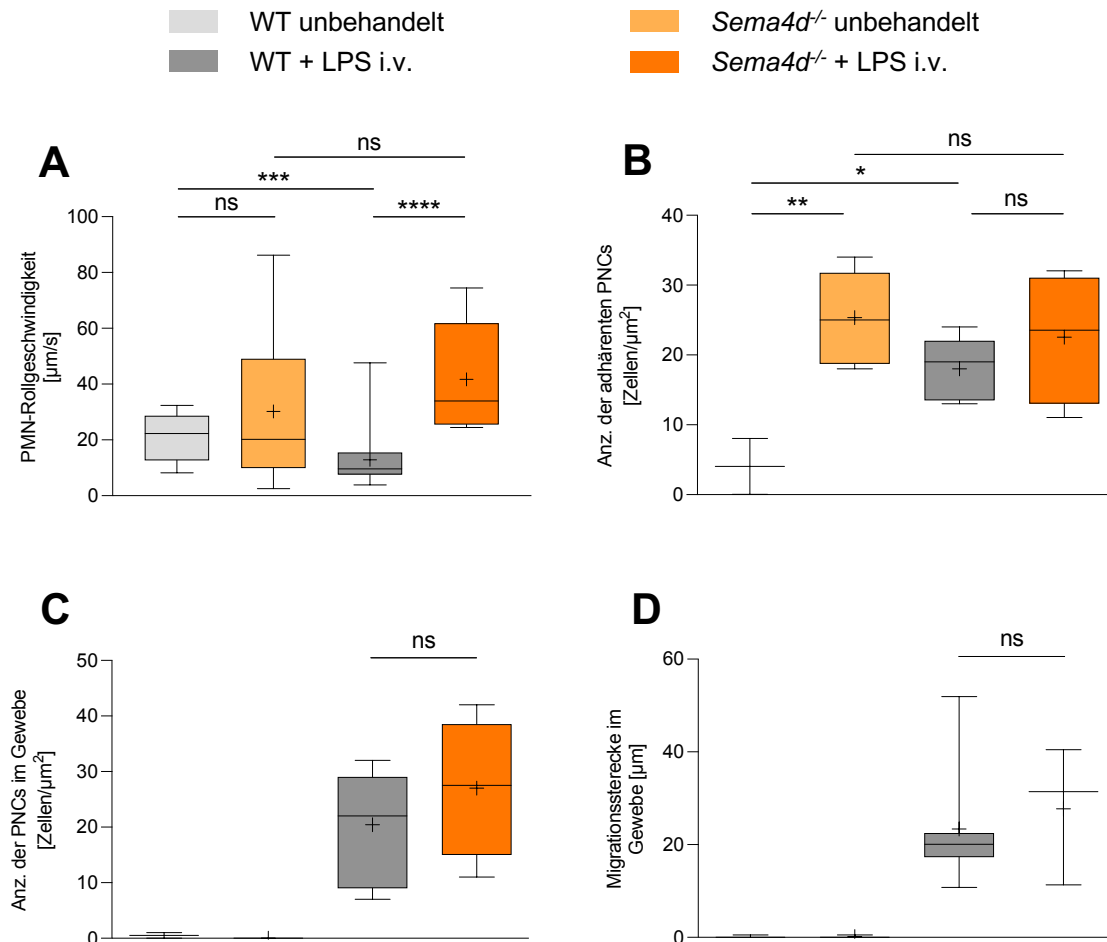


Abbildung 18 Rollgeschwindigkeit und Migrationsverhalten der Granulozyten in der IVM nach i.v. LPS-Applikation

Die Fluoreszenzmarkierung von PMNs und Thrombozyten erfolgte intravenös. Der kapilläre Blutfluss im präparierten Musculus cremaster wurde zunächst ohne Entzündungsreiz aufgenommen. Danach wurde intravenös das LPS appliziert und der kapilläre Blutfluss in Entzündung aufgezeichnet.

A: Rollgeschwindigkeit der PMNs bzw. PNCs (Der Graph ist lediglich mit „PMN-Rollgeschwindigkeit“ beschriftet, einzelne PMNs wurden in der nicht inflammatorischen Kondition aufgezeichnet. Als Reaktion auf den inflammatorischen Reiz des LPS treten in der Folge PNCs auf.), **B:** Anzahl der an der Gefäßwand haftenden PNCs, **C:** Anzahl der aus dem Gefäßsystem ins Gewebe eingewanderten PNCs, **D:** Zurückgelegte Migrationsstrecke im Gewebe gemessen ausgehend von der Gefäßwand. WT und *Sema4d*^{-/-} bestanden aus jeweils drei gesunden Mäusen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Die in Abbildung 18A dargestellte Rollgeschwindigkeit zeigt sich während der Inflammation in den WTs erwartungsgemäß verringert. Unter nicht inflammatorischen Bedingungen weist die Rollgeschwindigkeit der PMNs in *Sema4d*^{-/-} Mäusen eine größere Streuung und einen höheren Mittelwert auf. Die intravenöse LPS-Applikation führte zu keiner signifikanten Veränderung der Rollgeschwindigkeit in den *Sema4d*^{-/-} Mäusen.

Die Zahl der an der Gefäßwand haftenden stationären PNCs zeigte bei den *Sema4d^{-/-}* unter nicht inflammatorischen Konditionen bereits einen signifikant erhöhten Wert. Dies weist auf ein gesteigertes Adhäsionspotential hin. Die WT-Mäuse wiesen unter Inflammation ein signifikant verstärktes Adhäsionsverhalten der PNCs auf. Dieser Anstieg konnte bei den *Sema4d^{-/-}* nicht beobachtet werden (Abbildung 18B).

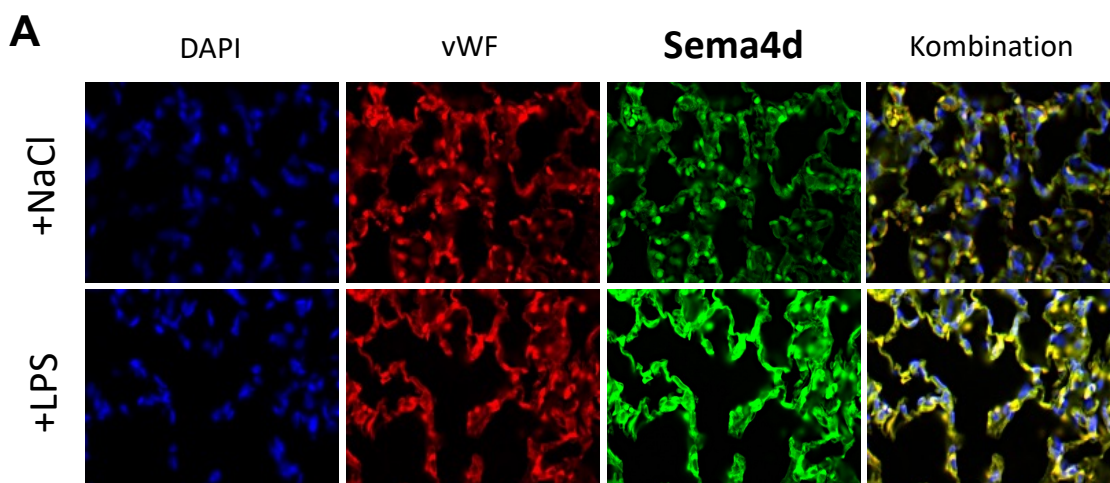
Bezüglich des Migrationsverhaltens von PNCs ergab sich bei einer initial höheren Anzahl adhärenter PNCs 15 Minuten nach der Applikation des LPS kein signifikanter Unterschied zwischen WT und *Sema4d^{-/-}*. Es zeigte sich lediglich eine leicht steigende Tendenz (Abbildung 18C). Die in dieser Zeit zurückgelegte Migrationsstrecke wird in Abbildung 18D dargestellt und weist ein ähnliches Bild auf. Es existiert kein signifikanter Unterschied bezüglich der zurückgelegten Migrationsstrecke der PNCs im Gewebe zwischen WT und *Sema4d^{-/-}*.

3.5 Der Einfluss fehlenden Sema4d's auf die Aktivität von Immunzellen bei Mäusen

Ein Großteil dieses Projektes stützt sich auf das LPS-Inhalations-ALI-Mausmodell. Die Inkubationszeit nach der 45-minütigen Exposition gegenüber dem LPS betrug vier Stunden.

3.5.1 Analyse der histologischen Lungenproben

Die Lungen von Versuchstieren wurden histologisch aufgearbeitet. Mithilfe einer H.E.-Färbung ergab sich ein Überblick über die Gewebeschädigung in den Lungen. Zusätzlich wurden eine immunhistochemische PMN-Färbung und eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt.



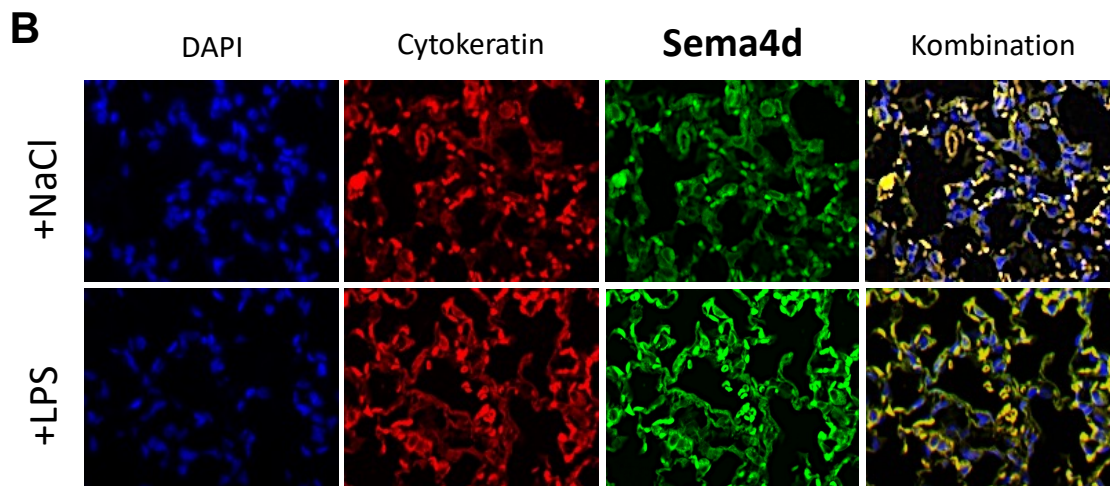


Abbildung 19 Lungen-IF-Färbung von WT-Mäusen nach NaCl- oder LPS-Inhalation

Vier Stunden nach 45-minütiger LPS-bzw. NaCl-Inhalation wurden die Lungen entnommen, Paraffinschnitte erstellt und diese mit einem Standard Immunfluoreszenz Protokoll gefärbt.

A: Sema4d-Expression auf Endothelzellen in der Lunge mit Färbung des vWF als Endothelzellmarker, **B:** Sema4d-Expression auf dem Alveolarepithel mit Cytokeratin-Färbung als Epithelzellmarker

Die IF-Färbung (Darstellung von repräsentativen Schnitten in Abbildung 19) wurde mit Lungenschnitten von WT-Mäusen durchgeführt, um die Veränderung der Sema4d-Expression nach der Induktion einer Lungenentzündung durch LPS darzustellen. Die Lungen wurden hierfür zunächst in Paraffin eingebettet und anschließend dem beschriebenen Standard-Färbeprotokoll unterzogen.

Der von-Willebrand-Faktor (vWF) dient als Marker für Endothelzellen. Die vermehrte Fluoreszenz auf dem grünen Kanal deutet auf eine erhöhte Expression von Sema4d vier Stunden nach LPS-Inhalation hin (Abbildung 19A).

Die Markierung von Epithelzellen erfolgte über die Anfärbung des Cytokeratins. Auch auf dem Alveolarepithel findet sich eine deutlich vermehrte Fluoreszenz von Sema4d (grün) und somit eine gesteigerte Expression von Sema4d nach Entzündung durch LPS-Inhalation (Abbildung 19B).

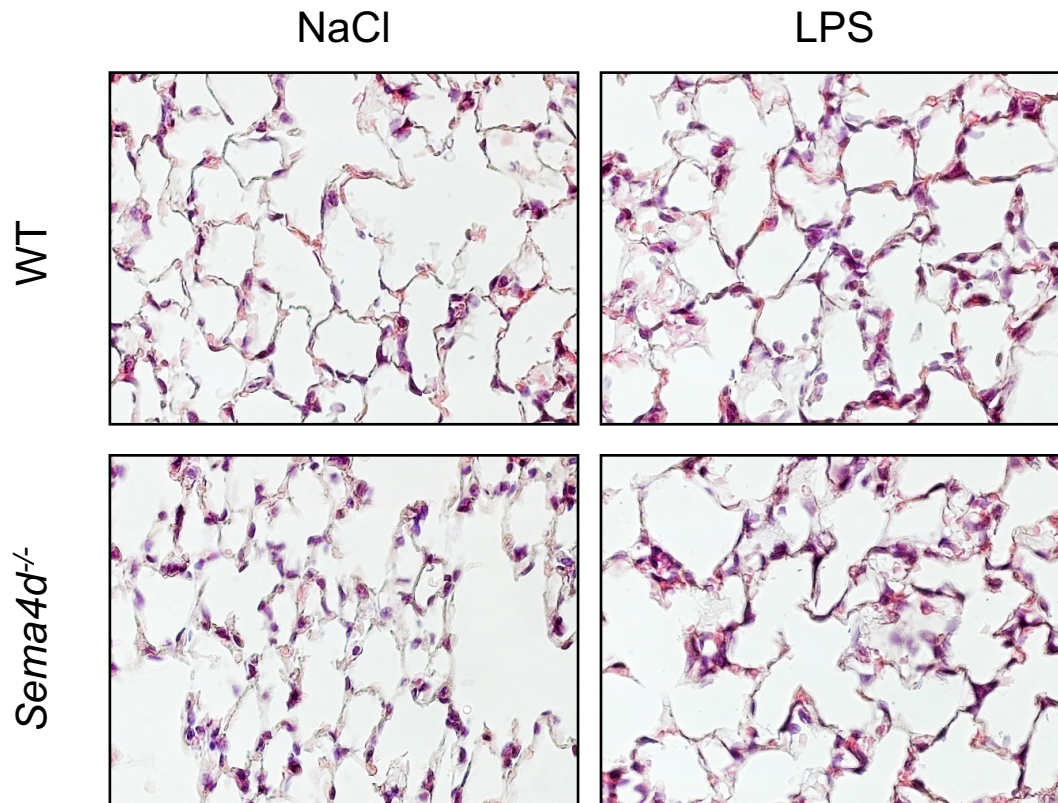


Abbildung 20 Hämatoxylin-Eosin Färbung von Lungenschnitten der Versuchstiere nach NaCl- oder LPS-Inhalation und vier Stunden Inkubation (repräsentative Bilder)

H.E.-Färbung von Lungenschnitten von WT und *Sema4d^{-/-}* Mäusen. Es wurde ein Standard H.E. Färbeprotokoll benutzt. Vergrößerung 400x

Durch die H.E.-Färbung erhält man eine gute Übersicht und kann auf diese Weise einen möglichen entstandenen Gewebeschaden beurteilen. In den Lungen der WT-Mäuse ist nach der LPS-Inhalation eine erhöhte Zahl eingewanderter Zellen erkennbar. Außerdem weisen die Alveolarwände eine starke ödematöse Schwellung als Folge der Entzündungsreaktion auf (Abbildung 20).

Die Lungen der *Sema4d^{-/-}* weisen bereits ohne einen gesetzten Entzündungsreiz eine erhöhte Anzahl von Zellen im Gewebe auf. Außerdem ist die ödematöse Alveolarwandschwellung in den *Sema4d^{-/-}* verglichen mit den Lungen der WT-Mäuse nach der Inhalation von NaCl ausgeprägter. Die mit LPS behandelten *Sema4d^{-/-}* zeigten, verglichen mit den WT-Mäusen, eine geringere ödematöse Schwellung des Lungengewebes. Auch im Vergleich zu den *Sema4d^{-/-}* nach NaCl-Inhalation stellte sich in den Lungen der mit LPS behandelten *Sema4d^{-/-}* eine geringere Gewebeschwellung dar. Die Zahl der ins Gewebe eingewanderten

Zellen wie in den *Sema4d^{-/-}* ebenfalls eine geringere Tendenz auf (Abbildung 20).

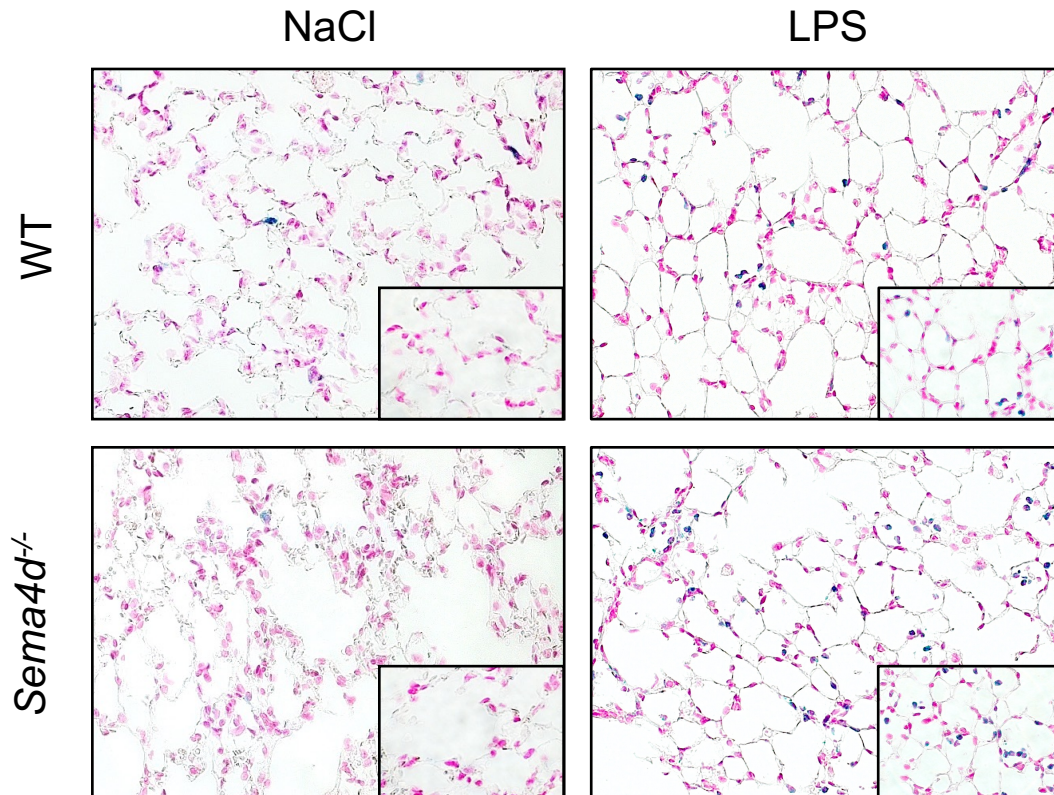


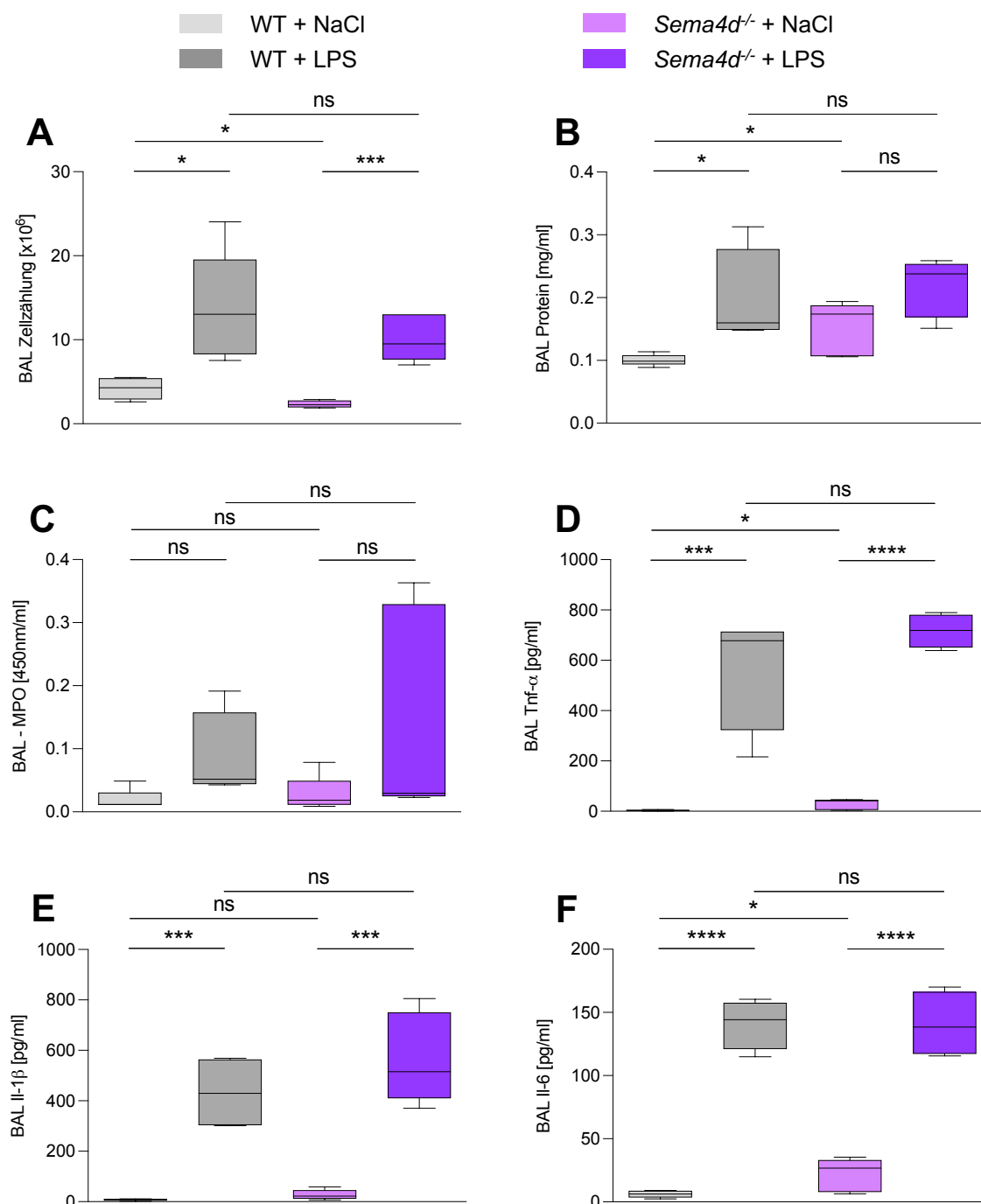
Abbildung 21 Immunhistochemische PMN-Färbung von Lungenschnitten der Versuchstiere nach NaCl- oder LPS-Inhalation mit anschließender vierstündiger Inkubationszeit. Vergrößerung 400x (große Bilder) und 630x (kleine Bilder)

Die immunhistochemische PMN-Färbung wurde ebenfalls mit Schnitten von Lungen durchgeführt, die vier Stunden nach der LPS- oder NaCl-Inhalation entnommen wurden.

Die PMN-Färbung diente der Untersuchung der Migration von PNCs durch die Alveolarwand, getriggert durch den inflammatorischen Stimulus. In der Übersicht zeigen sich teilweise Unterschiede bei der Anzahl der ins Gewebe migrierten Zellen. Insgesamt wird in Abbildung 21 eine ähnliche Tendenz wie in der im Folgenden behandelten BAL deutlich (Abbildung 22)

3.5.2 In der bronchoalveolären Lavage besteht nach der LPS-Inhalation kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und *Sema4d*^{-/-}-Mäusen

Die BAL dient in der Humanmedizin als diagnostisches Hilfsmittel bei pulmonalen Erkrankungen. Zur Bestimmung von Zellzahl und Zytokinen wurde bei den Versuchstieren eine BAL durchgeführt. Außerdem wurden die Gesamtproteinmenge und der relative Myeloperoxidaseanteil mittels Extinktionsmessung bestimmt.



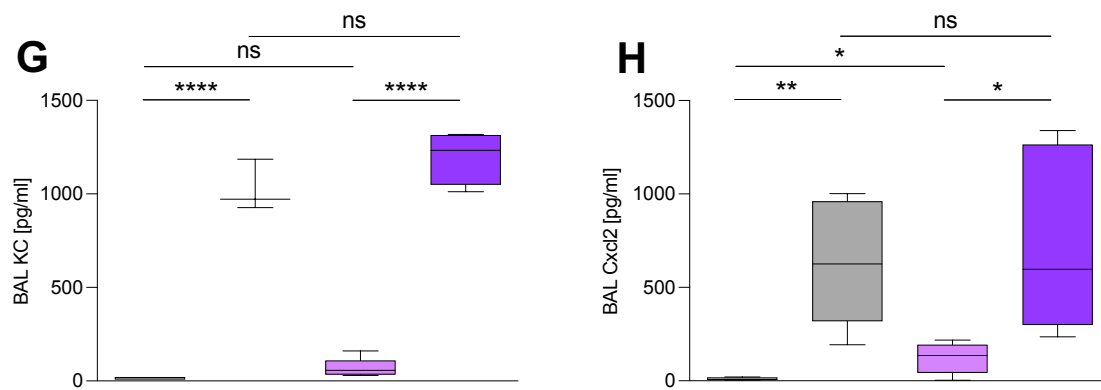


Abbildung 22 Ergebnisse der bronchoalveolären Lavage bei Mäusen nach NaCl- oder LPS-Inhalation

Aus der BAL von WT und *Sema4d^{-/-}* Mäusen mit und ohne LPS-induzierte Entzündungsreaktion erfolgte eine Zellzahlbestimmung, die Bestimmung von Gesamtproteinmenge, MPO und die Quantifizierung proinflammatorischer Zytokine mit Standard ELISA-Kits.

A: Zellzahl BAL, **B:** Gesamtproteinmenge, **C:** Myeloperoxidase, **D:** *Tnf- α* (ELISA), **E:** *Il-1 β* (ELISA), **F:** *Il-6* (ELISA), **G:** KC (ELISA), **H:** *Cxcl2* (ELISA)

Beide Mausgruppen bestanden aus jeweils drei gesunden Mäusen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

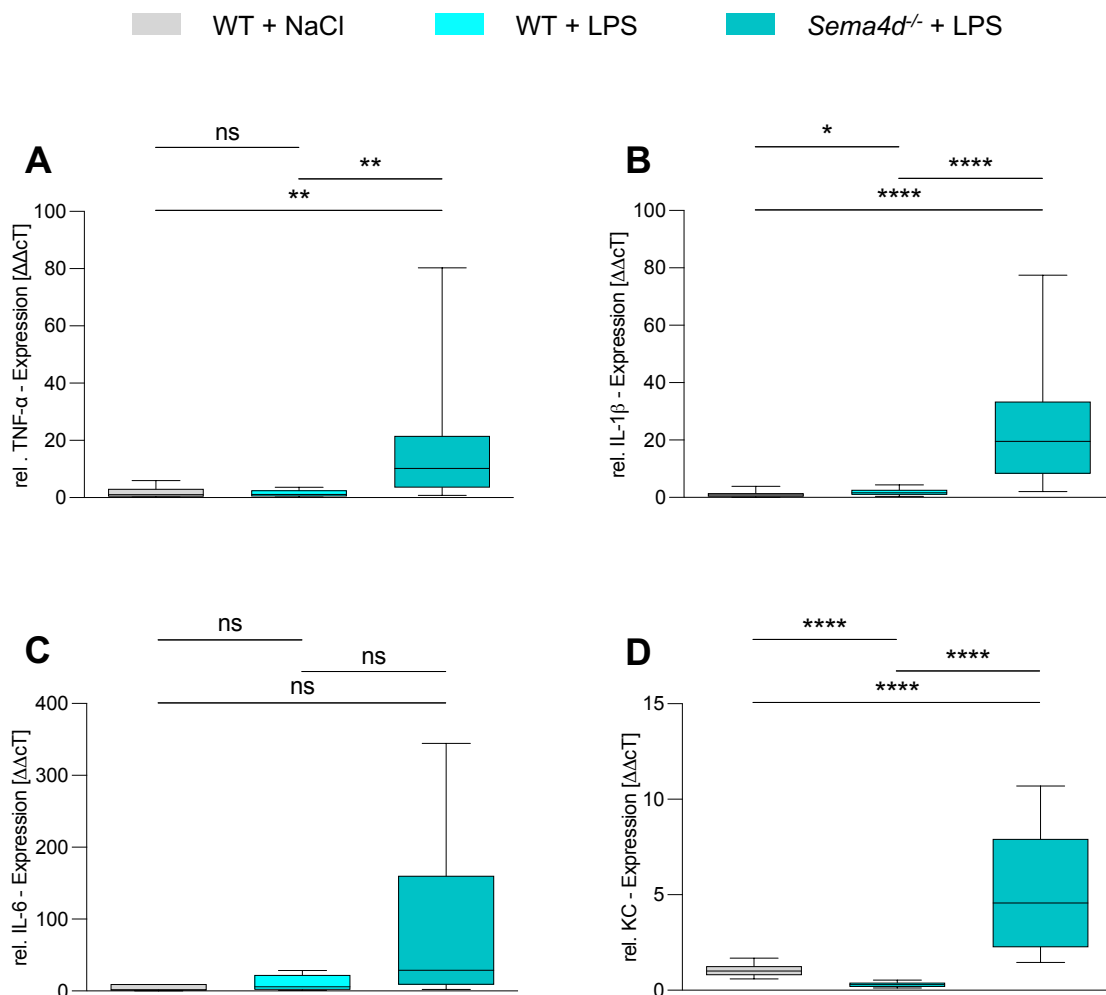
Ohne Entzündungsreiz zeigt sich in den Lungen der *Sema4d^{-/-}* verglichen mit den WTs eine niedrigere Zellzahl in der BAL. Nach der LPS-Inhalation besteht bezüglich der Zellzahlen keine statistische Signifikanz, jedoch weisen diese eine erkennbare Tendenz zu einer im Vergleich zu den WTs geringeren Zellzahl in den *Sema4d^{-/-}* auf (Abbildung 22A).

Das Gesamtprotein ist ohne Inflammation in den *Sema4d^{-/-}* geringfügig erhöht. In den mit LPS behandelten Gruppen besteht eine nicht signifikant erhöhte Menge an Gesamtprotein in den *Sema4d^{-/-}*. Die Myeloperoxidase liegt in den Gruppen mit Lungenentzündung in den WT-Mäusen tendenziell höher als in den *Sema4d^{-/-}* (Abbildung 22B-C).

Aus der BAL wurden außerdem die proinflammatorischen Zytokine *Tnf- α* , *Il-1 β* , *Il-6*, KC und *Cxcl2* bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte jeweils mit einem Standard ELISA-Kit. Für sämtliche Zytokine zeigte sich ohne Inflammation ein geringfügiger, aber nicht signifikanter Unterschied. Nach LPS-Inhalation wiesen alle proinflammatorischen Zytokine in beiden Mausgruppen einen deutlichen Anstieg auf. Im inflammatorischen Milieu zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT und *Sema4d^{-/-}* (Abbildung 22D-H).

3.6 Entzündung durch LPS-Inhalation führt in den Lungen von *Sema4d*^{-/-} zu einer erhöhten mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine

Wesentliches Merkmal einer Entzündungsreaktion des Körpers ist die vermehrte Produktion von Entzündungsmediatoren. $\text{Tnf-}\alpha$ und Il-6 zählen zu den ersten Zytokinen, die ansteigen und die Produktion von Akute-Phase Proteinen auslösen. Die Lungen der Mäuse wurden nach LPS-Inhalation und anschließender vierstündiger Inkubationszeit entnommen und die Expression der proinflammatorischen Zytokine und des *Sema4d*-Rezeptors *Plexinb1* mittels RT-qPCR bestimmt.



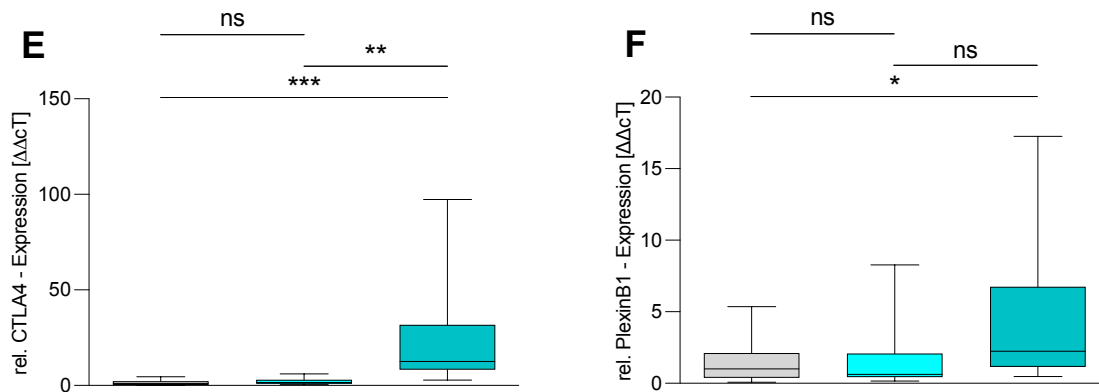


Abbildung 23 Bestimmung von proinflammatorischen Zytokinen mittels RT-qPCR

Die Lungen der Mäuse wurden homogenisiert, die RNA wurde extrahiert und in cDNA umgeschrieben und anschließend mittels RT-qPCR quantifiziert. Die relative Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Plexinb1 mit der $\Delta\Delta CT$ -Methode bestimmt.

A: Relative Expression von Tnf- α , **B:** Relative Expression von Il-1 β , **C:** Relative Expression von Il-6, **D:** Relative Expression von KC, **E:** Relative Expression von Ctla4, **F:** Relative Expression von Plexinb1
Beide Mausgruppen bestanden aus jeweils drei gesunden Mäusen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

In der relativen Expression von Il-6 zeigte sich in den LPS behandelten Gruppen WT und Sema4d^{-/-} kein signifikanter Unterschied (Abbildung 23C). Die übrigen Zytokine Tnf- α (Abbildung 23A), Il-1 β (Abbildung 23B), KC (Abbildung 23D) und Ctla4 (Abbildung 23E) wiesen unter inflammatorischen Bedingungen in den Sema4d^{-/-} Mäusen verglichen mit den WTs eine deutlich vermehrte Genexpression auf.

Auch Plexinb1 erwies sich unter inflammatorischen Bedingungen in den Sema4d^{-/-}-Mäusen gegenüber den WT-Mäusen, die ausschließlich mit NaCl behandelt worden waren, genetisch als signifikant vermehrt exprimiert.

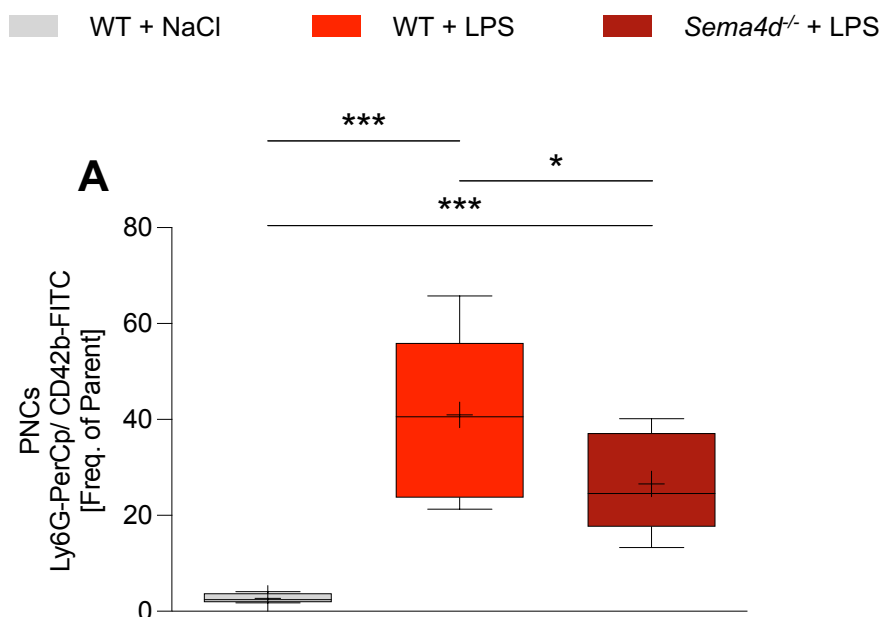
3.7 Sema4d beeinflusst bei Mäusen die zelluläre Expression von Zelladhäsionsmolekülen

Während einer inflammatorischen Reaktion weisen PMNs eine gesteigerte Aktivität auf. Diese äußert sich unter anderem in einer vermehrten Bildung von PNCs sowie deren Migration aus dem Gefäßsystem ins Gewebe. Das Rollen und Anhaften sowie die Transmigration der PNCs wird beispielsweise durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelt, die im Zuge der Interaktion von PNCs und Gewebe vermehrt gebildet werden.

3.7.1 *Sema4d*^{-/-}-Mäuse zeigen nach LPS-Inhalation eine geringere Anzahl von PNCs im Blut und eine geringere Expression von Adhäsionsmolekülen

Die durchflusszytometrische Analyse des Blutes von Mäusen nach LPS-Inhalation erlaubt anhand der gemessenen Stärke der Fluoreszenz Rückschlüsse auf eine veränderte Expression der jeweiligen Zielmoleküle.

Nach Inkubation des Vollblutes mit einem Detektions-Antikörper-Gemisch wurden die Erythrozyten lysiert, die übrigen Zellen fixiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die PNCs wurden mit der in Abbildung 5 dargestellten Gating-Strategie identifiziert und die Fluoreszenz in der so selektierten Zellpopulation gemessen.



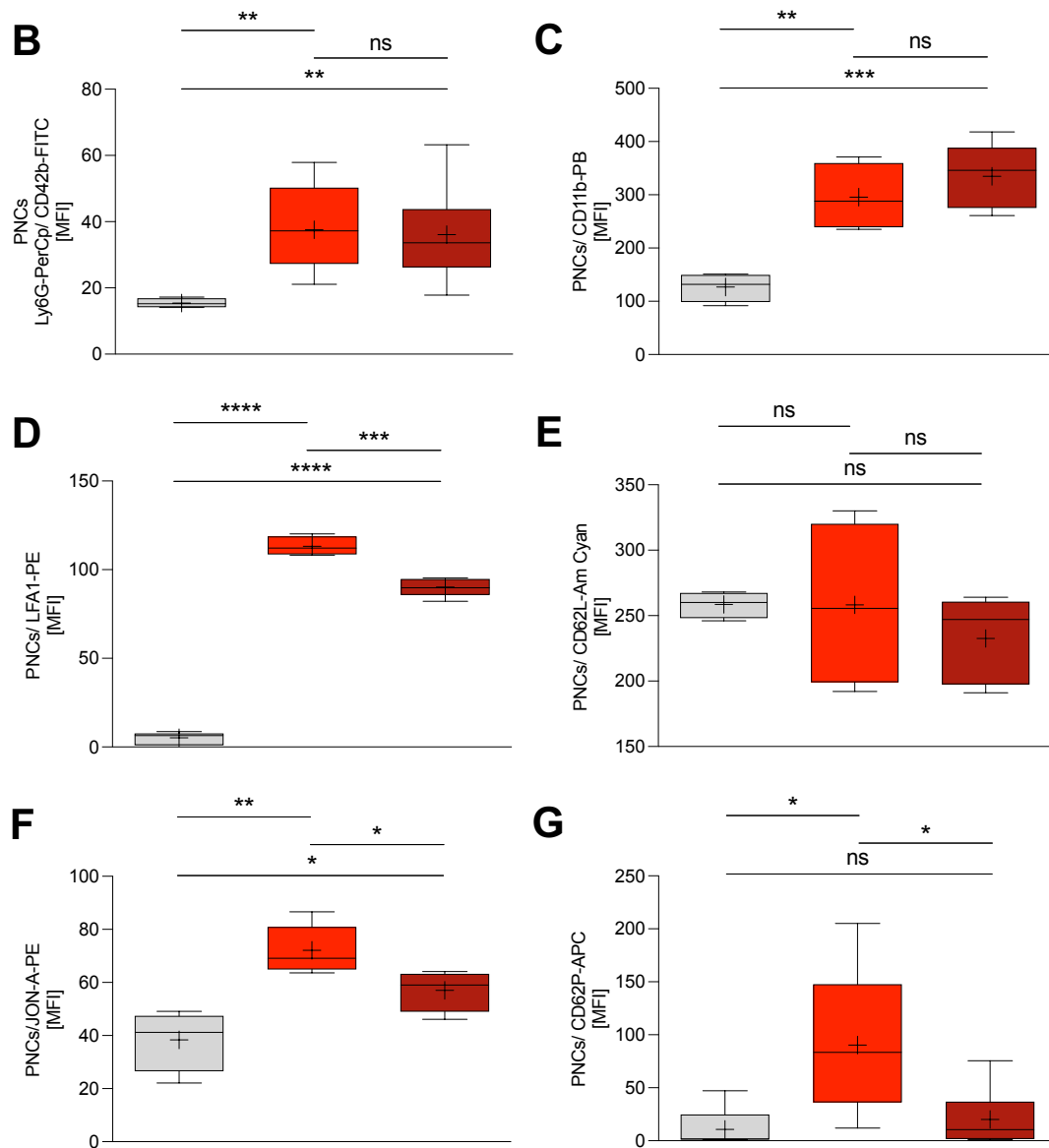


Abbildung 24 Durchflusszytometrie von murinem Vollblut nach LPS-Inhalation

Das Blut der Mäuse wurde nach LPS-Inhalation und Inkubationszeit entnommen, für 15 Minuten mit dem Detektions-Antikörper-Gemisch inkubiert und anschließend mit BD CellFix fixiert.

A: Anzahl der PNCs im Blut, **B:** CD42b (MFI), **C:** CD11b (MFI), **D:** LFA-1 (FMI), **E:** L-Selektin (MFI), **F:** JON/A (MFI), **G:** P-Selektin (MFI)

Beide Mausgruppen bestanden aus jeweils drei Mäusen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

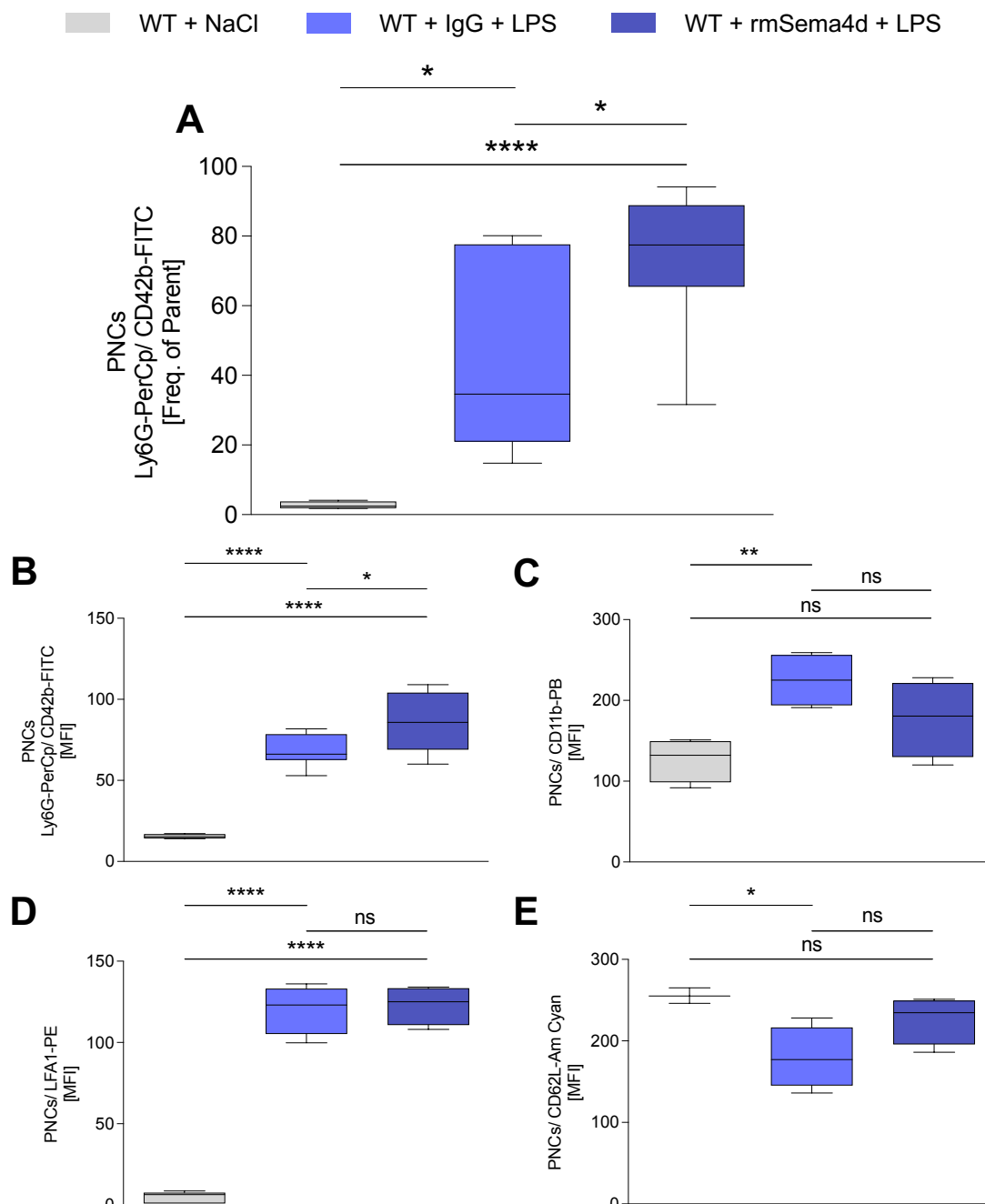
Die *Sema4d*^{-/-} wiesen vier Stunden nach Ende der LPS-Inhalation eine Tendenz zur verminderten Bildung von PNCs auf (Abbildung 24A). Der weniger starke Anstieg von CD42b auf den PNCs der *Sema4d*^{-/-} deutet ebenfalls auf eine geringere Interaktion von Thrombozyten und PMNs hin (Abbildung 24B). Die Ergebnisse der leukozytären Adhäsionsmoleküle zeigen sich heterogen. Der genetische Knockout übt hier keinen Einfluss auf CD11b aus (Abbildung 24C).

Sowohl WT- als auch *Sema4d^{-/-}* weisen einen ähnlichen Anstieg dieses Integrins auf. L-Selektin zeigt in keiner der Gruppen eine signifikante Veränderung (Abbildung 24E). Jedoch ist in Abbildung 24D zu erkennen, dass die PNCs der *Sema4d^{-/-}* verglichen mit den WT-Mäusen nach LPS-Inhalation eine deutlich geringere Menge an LFA-1 exprimieren.

Außerdem weisen die PNCs der *Sema4d^{-/-}* signifikant geringere Mengen an JON/A und P-Selektin auf (Abbildung 24F und G).

3.7.2 Die Behandlung von WT-Mäusen mit rmSema4d führt zu einer erhöhten Zahl an PNCs

Als nächstes wurden WT-Mäuse mit rmSema4d behandelt. Den Tieren wurde wie in Abbildung 4 schematisch dargestellt mit einer Inkubationszeit von 15 Minuten rmSema4d verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt murines IgG. Der Ablauf der LPS-Inhalation sowie das Protokoll für die Markierung der Zellen sind analog zu den übrigen Durchflusszytometrie-Versuchen mit einer Inkubationszeit von vier Stunden.



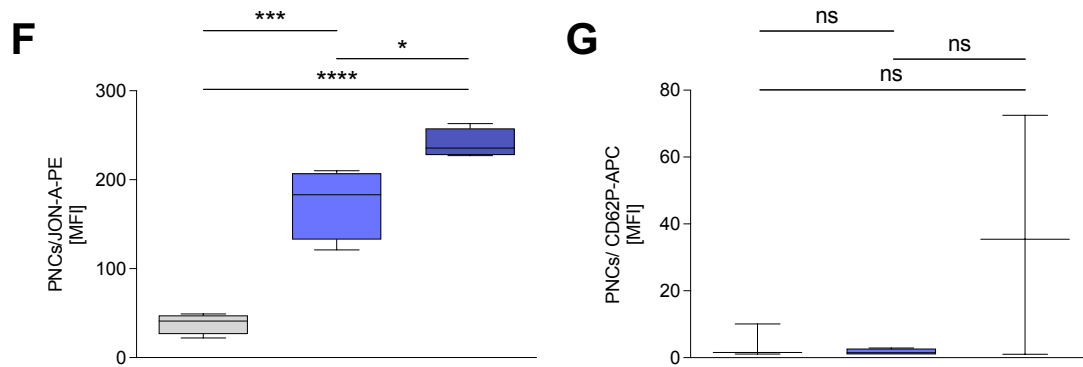


Abbildung 25 Durchflusszytometrie von murinem Vollblut nach intravenöser Applikation von rmSema4d in WT-Mäusen

Den WT-Mäusen wurde 15 Minuten vor der Inhalation entweder murines IgG oder rmSema4d i.v. verabreicht. Die LPS-Inhalation und die Blutentnahme erfolgten analog zur unter 2.5 beschriebenen Methode.

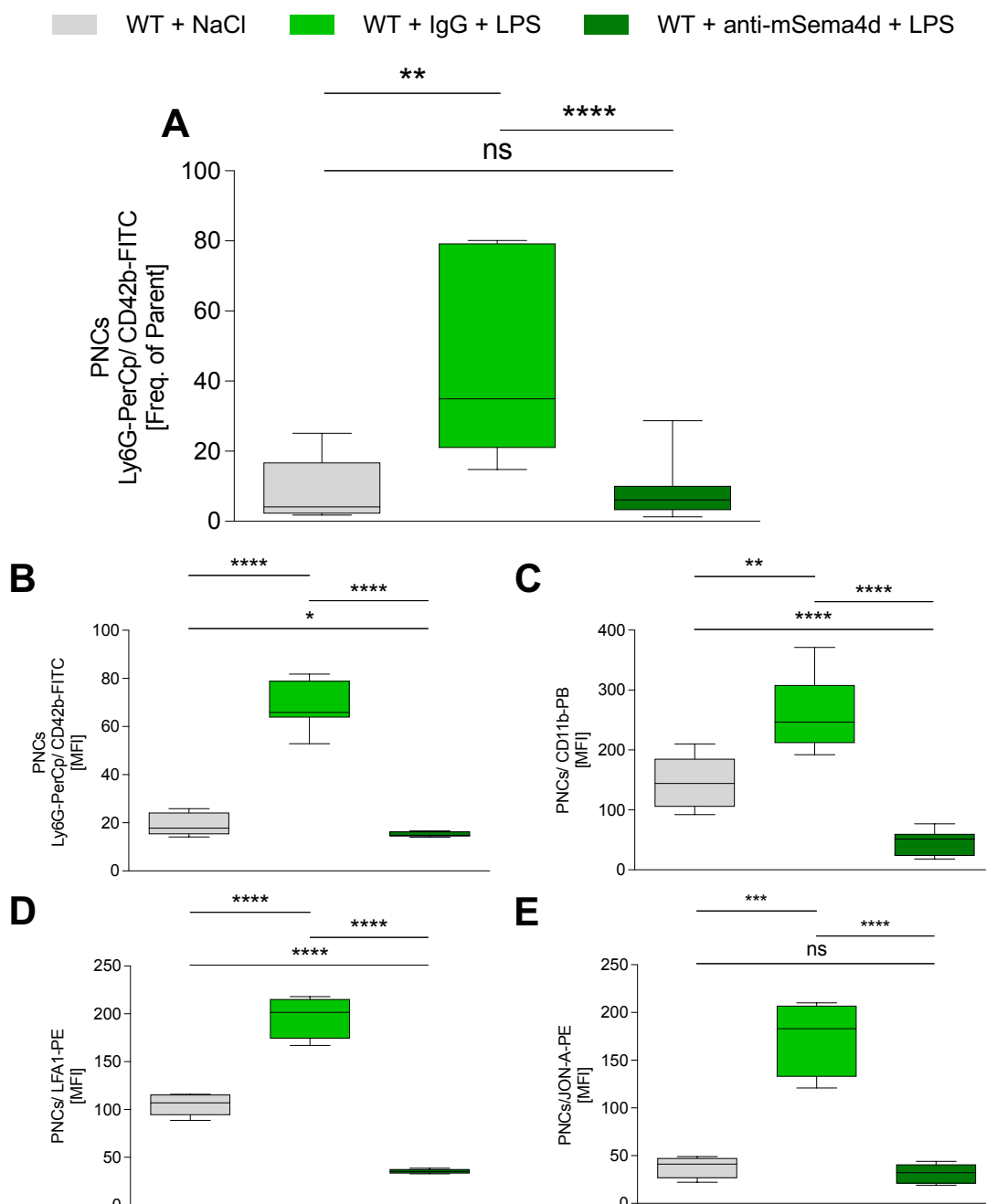
A: Anzahl der PNCs im Blut, **B:** CD42b (MFI), **C:** CD11b (MFI), **D:** LFA-1 (MFI), **E:** L-Selektin (MFI), **F:** JON/A (MFI), **G:** P-Selektin (MFI)

Beide Mausgruppen bestanden aus jeweils drei Mäusen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Die Behandlung von WT-Mäusen mit rmSema4d führte zu einer tendenziell erhöhten Bildung von PNCs (Abbildung 25A). CD42b zeigte in den Mäusen, denen rmSema4d appliziert worden war, nach der LPS-Inhalation ebenfalls einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abbildung 25B). Für JON/A ließ sich ein ähnlicher Effekt beobachten (Abbildung 25F). Die Adhäsionsmoleküle wiesen eine erkennbare, jedoch nicht signifikante Tendenz zur höheren Expression auf den PNCs der mit rmSema4d behandelten Mäuse auf (Abbildung 25C-E).

3.7.3 Die Blockade von Sema4d in WT-Mäusen führt zu einer signifikant geringeren Menge von Zelladhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von PNCs

Zur Blockade von Sema4d wurde WT-Mäusen vor der LPS-Inhalation ein blockierender anti-mSema4d Antikörper intravenös verabreicht. Das Blut der Mäuse wurde vier Stunden nach Ende der LPS-Inhalation entnommen. Die Markierung der Zellen und die anschließende FACS-Analyse erfolgte analog zu den übrigen Durchflusszytometrie-Versuchen.



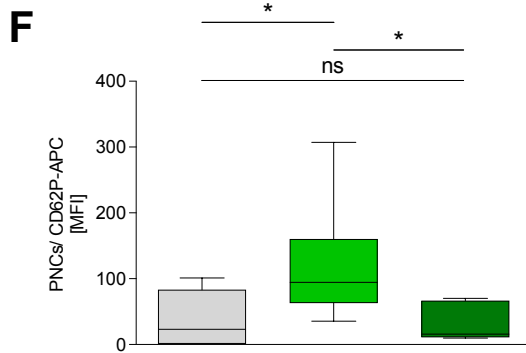


Abbildung 26 Durchflusszytometrie von murinem Vollblut nach SEMA4D-Blockade mit einem anti-mSema4d Antikörper

Den WT-Mäusen wurde 15 Minuten vor der Inhalation entweder murines IgG als Negativkontrolle oder ein Sema4d Antikörper verabreicht. Die LPS-Inhalation und die Blutentnahme erfolgten analog zur unter 2.5 beschriebenen Methode.

A: Anzahl der PNCs im Blut, **B:** CD42b (MFI), **C:** CD11b (MFI), **D:** LFA-1 (MFI), **E:** JON/A (MFI), **F:** P-Selektin (MFI)

Beide Mausgruppen bestanden aus jeweils drei Mäusen, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Die durchflusszytometrische Analyse der PNCs von WT-Mäusen, die zuvor mit dem blockierenden anti-mSema4d Antikörper behandelt wurden, zeigte nach vier Stunden unter Inflammation deutliche Unterschiede zu den PNCs der Kontrollgruppe. Die Anzahl an PNCs erwies sich als deutlich vermindert (Abbildung 26A). Außerdem waren CD42b und P-Selektin auf den PNCs der mit blockierendem anti-mSema4d Antikörper behandelten Mäuse in deutlich geringerem Maße exprimiert (Abbildung 26B, Abbildung 26F). Für die Zelladhäsionsmoleküle CD11b und LFA-1 konnten ebenfalls signifikant geringere Fluoreszenzwerte gegenüber der Kontrollgruppe gemessen werden (Abbildung 26C-D). Die Thrombozyten auf den PNCs der Mäuse mit blockiertem Sema4d wiesen außerdem eine signifikant geringere Expression von JON/A auf (Abbildung 26E). Dies gibt einerseits Hinweis auf eine durch die Blockade von Sema4d mittels spezifischen Antikörpers bedingte verminderte PNC-Bildung und andererseits auch auf eine so herbeigeführte Reduktion der PNC-Aktivität per se.

4 Diskussion

In jüngerer Vergangenheit wurden in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universität Tübingen bereits Studien durchgeführt, in denen der Einfluss von NGPs und speziell von Semaphorinen während einer ALI untersucht wurde. Diese befassten sich bislang vorwiegend mit SEMA7A und dessen Rezeptor PLEXINC1.

Für eine ALI, die durch invasive Beatmung ausgelöst wird, wurde ein hemmender Effekt auf die Migration von PMNs in den Alveolarraum von Mäusen durch Verhinderung der Plexinc1-Aktivierung nachgewiesen [72].

Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2016 unterstützt außerdem die Annahme, dass SEMA7A auch nach der Inhalation von LPS proinflammatorische Eigenschaften besitzt. Die Ergebnisse dieser Studie besagen, dass SEMA7A zum einen mit einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in Verbindung steht und zum anderen, dass die Abspaltung von SEMA7A von der Zelloberfläche ebenso Einfluss auf die Migration von PMNs hat. Eine Blockade von SEMA7A führte zu einem signifikant erniedrigten Schweregrad der durch LPS-Inhalation erzeugten Entzündungsreaktion [66].

Auf Grundlage dieser und weiterer Projekte erfolgte die Planung der Experimente zur Untersuchung des Einflusses von SEMA4D auf den Verlauf einer ALI.

Die Arbeit aus dem Jahr 2007 von Zhu et al. ist eine der Untersuchungen, die zu dem Ergebnis kommen, dass SEMA4D bei der Aktivierung einer Zelle abgespalten wird. Es wurde ein vaskuläres Schädigungsmodell verwendet. Die Aktivierung von Thrombozyten erfolgt durch Kontakt mit Kollagenfasern. Die Forschungsgruppe kam außerdem zu dem Ergebnis, dass SEMA4D, sobald es von der Zelloberfläche abgespalten wird, aktivierungsfördernde Eigenschaften besitzt. Außerdem wird aus dieser Studie ersichtlich, dass das Abspalten von SEMA4D ein Prozess ist, der sich über einen gewissen Zeitraum aufbaut [73].

Um eine für die LPS-Inhalation adäquate Inkubationszeit zu bestimmen, wurde zunächst der zeitliche Verlauf der Konzentration von SEMA4D im Blutplasma und den zellulären Blutbestandteilen untersucht. Hierbei ergab sich, dass sich die

höchste Konzentration von SEMA4D auf der Oberfläche der zellulären Blutbestandteile nach zwei Stunden zeigte. Die höchste Konzentration von freiem SEMA4D (sSEMA4D) im Blutplasma konnte hingegen nach vier Stunden gemessen werden. Auf Grundlage der Annahme, dass zu dem Zeitpunkt, an welchem die höchste Konzentration an sSEMA4D vorliegt, auch der Anteil der aktivierten Zellen und somit die Ausprägung der akuten Immunreaktion das höchste Ausmaß besitzt, wurde eine Inkubationszeit von vier Stunden festgelegt.

Da sich dieses Projekt primär mit der Interaktion von PMNs mit dem Gefäßendothel während einer ALI beschäftigt, wurden sowohl Zellkulturen mit humanen Endothelzellen als auch Zellkulturen mit Lungenepithelzellen *in vitro* für vier Stunden proinflammatorisch stimuliert. Beide Zelltypen wurden mit den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-6 behandelt. Dass sich SEMA4D auf Bronchialepithel befindet, ist bereits bekannt [74].

In der Immunfluoreszenzmikroskopie ergab sich für beide Zytokine eine vermehrte Fluoreszenz von FITC, das zur Markierung von Sema4d verwendet wurde. Somit tritt während einer akuten Entzündung sowohl auf dem Lungenepithel als auch auf dem Endothel nach vier Stunden Inkubationszeit eine vermehrte Expression von Sema4d auf.

Diese Ergebnisse sind im Vergleich zu einer Studie von Luque et al. aus dem Jahr 2015 gegensätzlich [63]. Diese besagt, dass nach einer Aktivierung von Endothelzellen deren Expression von SEMA4D auf der Oberfläche sinkt. Im Unterschied zu dem Projekt für diese Dissertation wurde im Projekt von Luque et al. eine Inkubationszeit von sechs Stunden gewählt. Es besteht die Möglichkeit, dass im zeitlichen Verlauf der Abspaltung von SEMA4D ein Unterschied zwischen Endothel und Blutzellen besteht. In Abbildung 11A ist zu erkennen, dass die Plasmakonzentration von sSEMA4D nach sechs Stunden bereits wieder eine fallende Tendenz aufweist, während Abbildung 11B darauf schließen lässt, dass zu diesem Zeitpunkt die Abspaltung von SEMA4D von der Zelloberfläche der Blutzellen bereits abgeschlossen ist. Entsprechend des Verlaufes des Graphen aus Abbildung 11A lässt dies den Schluss zu, dass das Abspalten von

SEMA4D von den Endothelzellen nach und nach über einen längeren Zeitraum geschieht.

Mit den HMEC-1 Zellen wurden außerdem RT-qPCR-Versuche zur Bestimmung der genetischen Expression von SEMA4D und PlexinB1 durchgeführt. PlexinB1 besitzt unter den bekannten SEMA4D-Rezeptoren die höchste Bindeaffinität [53]. Eine signifikante Änderung der mRNA-Expression von PlexinB1 durch proinflammatorische Stimulation des Endothels findet sich nicht. Dies legt nahe, dass sich PlexinB1 vorwiegend auf anderen Zelltypen befindet. Die Expression von SEMA4D zeigte bei proinflammatorischer Stimulation einen deutlichen Unterschied zur Negativkontrolle. Die HMEC-1-Zellen, die mit TNF- α stimuliert wurden, wiesen eine signifikant höhere genetische Expression von SEMA4D auf, während die Stimulation mit IL-6 keinen signifikanten Effekt erzielte (Abbildung 10).

Deb Roy et al. zeigen in einer Publikation aus 2017 den repulsiven Effekt der SEMA4D-PlexinB1 Achse für diverse Arten von Zellen des Körpers, der dem in der neuronalen Entwicklung ähnelt. Sie untersuchten die Funktion von PlexinB1 auf Interaktionen von Osteoklasten und Osteoblasten. Die PlexinB1-Aktivierung beeinflusst das Zytoskelett und kann dementsprechend auch die Zellbewegung modifizieren. Deb Roy et al. führten die Aktivierung von PlexinB1 mittels eines eigens entwickelten chimären Proteins durch, welches durch Licht aktiviert wird. Die Aktivierung von PlexinB1 auf Osteoblasten führte dazu, dass diese Zellen nicht nur ihre Migrationsbewegung in Richtung der Osteoklasten stoppten, sondern auch dazu, dass die Osteoblasten eine entgegengesetzte Bewegungsrichtung aufwiesen. Die Autoren schlossen aufgrund dieser und weiterer Daten aus dieser Publikation auf eine CIL (contact inhibition of locomotion) [75].

Auf Grundlage der Ergebnisse dieser Publikation stellte sich die Frage, welchen Effekt SEMA4D bei direkter Exposition auf PMNs ausübt. Deshalb wurde mit den PMNs gesunder Spender ein Chemotaxis-Versuch durchgeführt. Anhand der Migrationsstrecken der PMNs, die in Abbildung 12 dargestellt werden, wird ersichtlich, dass die repulsive Wirkung von SEMA4D durch diesen Versuch

bestätigt werden konnte. Zur Verdeutlichung und Objektivierung dieser Ergebnisse wurden mithilfe des ibidi Chemotaxis and Migration Tool's außerdem die Statistiken aus Abbildung 13 erhoben. Diese zeigen einerseits, dass die PMNs sich von der Kammer, in der sich rekombinantes SEMA4D befindet, wegbewegen und andererseits, dass diese Zellbewegung nicht zufällig geschieht. γ FMI und Richtungskonstanz aus. In Abbildung 13D und E ist anhand des Vergleiches zur fMLP-Positivkontrolle eine eindeutige Richtungstendenz erkennbar.

Der zweite Teil des Chemotaxis Versuches bezieht sich auf die Beteiligung der SEMA4D-Rezeptoren PlexinB1 und PlexinB2 an der Entstehung der Ergebnisse aus dem ersten Teil. Eine messbare Reaktion der isolierten Zellen auf rhSEMA4D lässt darauf schließen, dass sich die betreffenden Rezeptoren folglich auch auf diesen Zellen befinden müssen. Die Zellmigrationspfade aus Abbildung 14A zeigen, dass das Blockieren unterschiedlicher Rezeptoren für SEMA4D auf PMNs verschiedene Auswirkungen besitzt. Die Blockade von PlexinB1 schränkt, wie anhand der gemessenen Migrationsstrecke und der so errechneten Migrationsgeschwindigkeit aus Abbildung 14C und Abbildung 14D zu erkennen ist, die Beweglichkeit der Zellen nicht ein. Jedoch ergibt sich anhand des γ FMI und der Richtungskonstanz, dass es sich um eine vollkommen ungerichtete Bewegung handelt (Abbildung 14 F und G). Aus denselben Abbildungen wird ersichtlich, dass die Blockade von PlexinB2 sowohl ebenso eine weniger gerichtete Bewegung als auch eine generell geringere zurückgelegte Migrationsstrecke und somit eine Verringerung der Zellmigration auslöst (Abbildung 14). Die Blockade beider Rezeptoren führt zu einem Mischbild beider Effekte. Ein möglicher Schluss aus diesen Versuchen wäre somit in Übereinstimmung mit Deb Roy et al. eine Beteiligung von PlexinB1 an der Migrationsrichtung der Zellen sowie eine Beteiligung von PlexinB2 an der generellen Beweglichkeit der Zellen. Außerdem wurde die Expression von PlexinB1 auf PMNs bisher nicht beschrieben, was einen neuen möglichen Ansatzpunkt für zukünftige Forschungsprojekte darstellt.

Luque et al. bewiesen in einer Studie von 2015, dass SEMA4D und die Plexine B1 und B2 einen direkten Effekt auf die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen besitzen. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen für Monozyten bei blockierten Plexinen eine verminderte Zelladhäsion und bei blockiertem SEMA4D eine Tendenz zu einer vermehrten Adhäsion, die allerdings keine statistische Signifikanz aufweist [63].

Der Durchtritt von PMNs durch die Endothelbarriere setzt eine Aktivierung verschiedener Zelladhäsionsmoleküle voraus. Dementsprechend betreffen einige Experimente dieses Projekts genau diesen Themenkomplex. Als ex vivo Modell wurden unter anderem Versuche mit Flusskammern durchgeführt. Mittels Beschichtung mit E-Selektin, oder E-Selektin + ICAM-1 wurden unterschiedliche Bedingungen der zellulären Adhäsion simuliert. Zur Beurteilung einer verstärkten oder verminderten Zelladhäsion wurde die Rollgeschwindigkeit der PMNs an der Kapillarwand gemessen. Die Kontrollgruppe zeigte bei zusätzlicher Beschichtung mit ICAM-1 erwartungsgemäß einen deutlichen Abfall der Rollgeschwindigkeit. Bei blockiertem SEMA4D wies die Rollgeschwindigkeit der Zellen keinen signifikanten Unterschied bei zusätzlicher Beschichtung mit ICAM-1 auf (Abbildung 16). Des Weiteren wird aus selbiger Abbildung deutlich, dass die PMNs unter Blockade von SEMA4D per se eine signifikant niedrigere Rollgeschwindigkeit aufwiesen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Chemotaxis-Versuches spricht dies dafür, dass die Wirkung von SEMA4D auf PMNs eine repulsive Komponente besitzt. Dies steht teilweise im Gegensatz zu den Ergebnissen von Luque et al.

Insgesamt legt dies, zusammen mit den Ergebnissen des Chemotaxis-Versuches nahe, dass nicht nur die Präsenz einzelner Moleküle Einfluss auf die Reaktion bestimmter Zellen auf Versuche mit der SEMA4D-PlexinB1/2-Achse besitzt, sondern auch die physiologischen oder pathologischen Bedingungen, unter denen der jeweilige Versuch durchgeführt wird, die Ergebnisse verändern. Sowohl der Flusskammer-Versuch als auch der Chemotaxis-Versuch wurden mit Blut bzw. Zellen durchgeführt, die zu keinem Zeitpunkt einem proinflammatorischen Stimulus im Sinne einer TLR-Aktivierung oder einer Exposition mit proinflammatorischen Zytokinen ausgesetzt waren. Somit

untersuchen diese Versuche die Reaktion von PMNs auf Manipulationen an der SEMA4D-PlexinB1/2-Achse unter physiologischen Bedingungen. Insgesamt lässt sich daraus schließen, dass SEMA4D, das sich auf der Oberfläche von Zellen befindet, unter physiologischen, nicht inflammatorischen Bedingungen einen repulsiven Effekt auf PMNs ausübt. Ein möglicher Ansatzpunkt für zukünftige Projekte wäre in diesem Fall die Durchführung der gleichen Versuche unter proinflammatorischer Stimulation, beispielsweise mit fMLP oder TNF- α .

Die Intravitalmikroskopie stellt eine Brücke zwischen dem in vitro / ex vivo Abschnitt und dem in vivo Abschnitt des Projektes dar. Das Analyseprinzip gleicht dem der Flusskammer-Versuche, jedoch in vivo und sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch unter proinflammatorischer Stimulation mit LPS. Es wurde die Rollgeschwindigkeit von PMNs gemessen und außerdem spezifisches Augenmerk auf die Adhäsion und das Migrationsverhalten von PNCs gelegt. Die gemessene Rollgeschwindigkeit der PMNs und die Anzahl der an der Gefäßwand adhärenen PNCs unterstützen ebenfalls die Annahme, dass SEMA4D unter nicht inflammatorischen Bedingungen einen repulsiven Effekt aufweist. In Abbildung 18A und Abbildung 18B ergibt sich zunächst, dass sich die Rollgeschwindigkeit in vivo nicht signifikant unterscheidet. Die Anzahl der an einem festen Punkt der Gefäßwand adhärenen PNCs ist jedoch in *Sema4d*^{-/-}-Mäusen signifikant erhöht. Dies spricht für ein generell höheres Maß an PNC-Adhäsion unter physiologischen Bedingungen und somit für eine fehlende repulsive Komponente in den *Sema4d*^{-/-}-Mäusen. In Zusammenschau mit den durch intravenöse Applikation des LPS erbrachten Ergebnissen ist eine mögliche Schlussfolgerung, dass unterschieden werden muss, ob die Funktion von SEMA4D unter inflammatorischen oder unter physiologischen Konditionen untersucht wird. Wie sich bei den WT-Mäusen zeigt, sinkt die Rollgeschwindigkeit der PMNs als Reaktion auf einen proinflammatorischen Reiz. Bei den *Sema4d*^{-/-} fehlt dieser Geschwindigkeits-abfall. Zwischen der physiologischen und der pathologischen Kondition existiert kein signifikanter Unterschied (Abbildung 18A). Die Zahl der an der Gefäßwand adhärenen PNCs verhält sich kongruent zu diesen Messungen. In Abbildung 18B wird deutlich, dass es unter Inflammation zu einem Anstieg der an der Gefäßwand adhärenen PNCs

kommen müsste. Dies tritt bei den *Sema4d*^{-/-} nicht auf, es existiert kein signifikanter Unterschied nach der Applikation des LPS. Abbildung 18C und Abbildung 18D zeigen die Anzahl der ins Gewebe emigrierten PNCs sowie deren Migrationsstrecke. Beides lässt keinen signifikanten Unterschied zwischen WT und *Sema4d*^{-/-} erkennen. Dies spricht entweder dafür, dass die Beweglichkeit der PNCs an sich durch ein Fehlen von SEMA4D nicht eingeschränkt wird oder für eine zu geringe Stichprobenzahl. Um diese Graphen valide beurteilen zu können, sollte eine höhere Anzahl an Proben untersucht werden.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch eine Studie von Nishide et al. aus 2017. Die Forschungsgruppe beschäftigte sich mit der Rolle von SEMA4D während einer ANCA-assoziierten Vaskulitis, einem Krankheitsbild, das ebenso wie das ARDS durch eine überschießende Aktivierung von PMNs charakterisiert ist. In dieser Studie wurde das Hauptaugenmerk auf die Interaktion von SEMA4D und PlexinB2 gelegt. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass SEMA4D, das membrangebunden auf PMNs vorliegt, über seine intrazelluläre Domäne als Rezeptor für PlexinB2 fungiert. Die Interaktion dieser Proteine führt bei Stimulation mit LPS zu einer verminderten NET-Formation sowie über eine verminderte Rac-Aktivierung zu einer geringeren Ausschüttung von ROS. Die durch fMLP herbeigeführte Abspaltung von SEMA4D bewirkte eine Abschwächung dieser anti-inflammatorischen Charakteristik. PMNs mit fehlendem SEMA4D zeigten sich nicht repulsiv beeinflusst. Gleichzeitig stellte die Forschungsgruppe fest, dass die Konzentration an freiem sSEMA4D im Blut mit der Höhe des BVAS, einem disease activity score für die ANCA-assoziierte Autoimmunvaskulitis, korreliert und dass sich die Menge an SEMA4D auf PMNs bei einer bestehenden Entzündung durch Abspaltung verringert. Nishide et al. kamen zu dem Ergebnis, dass sSEMA4D zu einer erhöhten Permeabilität der Endothelzellschicht und zu einer erhöhten Produktion von IL-8 durch die Endothelzellen führt. Aus dieser Publikation geht ebenfalls hervor, dass sSEMA4D bei bakteriellen Infektionen ebenfalls signifikant erhöht ist [64].

Die LPS-Inhalation repräsentiert den größten Teil der in vivo Experimente dieses Projektes. Die Mäuse befanden sich für 45 Minuten in einer Kammer mit LPS-

Aerosolen oder zerstäubter NaCl-Lösung mit vier Stunden Inkubationszeit und anschließender Probenentnahme.

Analog zu den histologischen Untersuchungen der Zellkulturen wurde auch mit den Paraffinschnitten der Lungen der Versuchstiere eine Immunfluoreszenzfärbung und zusätzlich eine Immunhistochemische sowie eine H.E.-Färbung durchgeführt. Abbildung 19 zeigt, dass in Übereinstimmung mit den *in vitro* Ergebnissen Sema4d auch auf dem Lungenepithel und den Endothelzellen der Lungengefäße vier Stunden nach der Inhalation des LPS vermehrt exprimiert wird. Betrachtet man die in Abbildung 20 gezeigten Bilder von H.E.-gefärbten Präparaten, so wird deutlich, dass ähnlich zu den Ergebnissen aus der Intravitalmikroskopie die *Sema4d*^{-/-} zwar eine höhere Grundbelastung des Gewebes aufweisen, jedoch im Gegensatz zu den WTs nach vier Stunden kein vermehrter Gewebeschaden auftritt. Die immunhistochemische Färbung der Lungenschnitte zeigt ein ähnliches Bild. Diese dient zur Detektion von in den Alveolarraum eingewanderten PNCs. Die Lungen der *Sema4d*^{-/-} wiesen vier Stunden nach der LPS-Inhalation eine geringere Anzahl an eingewanderten PMNs auf (Abbildung 21).

Die BAL aus den Lungen der Versuchstiere erbrachte insgesamt kein eindeutiges Ergebnis. Gleichwohl zeigten die Zellkonzentration in der BAL sowie die Messung des Gesamtproteinanteils eine Tendenz, die mit den übrigen Ergebnissen übereinstimmt (Abbildung 22A und B). Beide Werte wiesen bei den *Sema4d*^{-/-} im Vergleich zu den WTs nach der LPS-Inhalation eine erniedrigte Tendenz auf. Anhand der MPO-Messung wurde deutlich, dass die Versuchstiere eine hohe interindividuelle Variabilität aufweisen (Abbildung 22C). Eine höhere Gruppengröße könnte hier ein eindeutigeres Ergebnis liefern.

Abbildung 22D-H zeigt die Konzentration proinflammatorischer Zytokine in der BAL. Nach LPS-Inhalation ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen WTs und *Sema4d*^{-/-}. Es besteht die Möglichkeit eines Zusammenhanges zu den Zellzahlwerten aus Abbildung 22A, die, wie bereits erwähnt, ebenfalls keinen signifikanten Unterschied zeigten. Hierbei ist hervorzuheben, dass die Zellzahlbestimmung mittels Neubauer Zählkammer und

Toluidinblau keinesfalls spezifisch neutrophile Granulozyten zählt, sondern beispielsweise auch Monozyten, die eine tragende Rolle bei der Produktion proinflammatorischer Zytokine spielen. Dementsprechend könnte eine höhere Anzahl an Stichproben pro Gruppe oder ein anderes Zählverfahren auch hier Klarheit verschaffen.

Bezüglich des Zusammenhanges zwischen SEMA4D und der Produktion proinflammatorischer Zytokine erbrachten verschiedene Studien unterschiedlicher Forschungsgruppen unterschiedliche Ergebnisse. Evans et al. konnten in einer Tumorstudie aus 2015 feststellen, dass die Blockade von SEMA4D zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine führt [76], während Lei et al. in einer Studie zu einer LPS-induzierten Osteoarthritis zu dem Ergebnis kommen, dass die Inhibition von SEMA4D zu einer verringerten Produktion proinflammatorischer Zytokine führt [77]. Yoshida et al. erhielten ähnliche Ergebnisse bei der Untersuchung der Rolle von SEMA4D bei Rheumatoider Arthritis [57].

Die Produktion proinflammatorischer Zytokine wurde in diesem Projekt mittels RT-qPCR bestimmt. Außerdem wurde auch die Expression des für Plexinb1 kodierenden Gens untersucht. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse dieser Versuche. Insgesamt ergibt sich das Bild einer gesteigerten Zytokinproduktion in den Lungen der *Sema4d^{-/-}*. Im Falle von Il-6 und Plexinb1 existieren zwar keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 23C u. F), jedoch ist verglichen mit den übrigen Graphen aus Abbildung 23 eine ähnlich steigende Tendenz bei den *Sema4d^{-/-}* erkennbar. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der beiden vorher genannten Publikationen von Evans et al. [76] und Lei et al. [77] führt dies zu zwei möglichen Schlussfolgerungen. Einerseits könnte während einer ALI der genetische Knockout von Sema4d in der Lunge eine gesteigerte Produktion proinflammatorischer Zytokine bedingen. Angesichts der ebenfalls signifikant erhöhten Produktion von Ctla4 erscheint jedoch eine andere Schlussfolgerung wahrscheinlicher. Die erhöhte relative Expression der für proinflammatorische Zytokine kodierenden Gene stellt möglicherweise einen Versuch der Kompensation des Organismus auf eine entsprechend der übrigen Daten dieses

Projektes verringerte zelluläre Reaktion in den *Sema4d*^{-/-} dar. Ctl4 gilt als Mediator, der zur Vermeidung einer überschießenden Immunreaktion beiträgt. Eine erhöhte Produktion von Ctl4 könnte für eine verstärkte Regulation der Immunantwort sprechen. Hinzu kommt, dass sich die Inkubationszeit von vier Stunden in diesem Projekt von der aus dem Projekt von Lei et al. [77] erheblich unterscheidet, die zwölf Stunden beträgt. Die versuchte Kompensation durch erhöhte Zytokinproduktion in den Lungen der *Sema4d*^{-/-}-Mäuse könnte somit nur vorübergehend stattfinden und bei längerer Inkubationszeit nicht mehr auftreten.

Zur direkten Untersuchung der Reaktion von PMNs im in vivo Modell wurde mithilfe der Durchflusszytometrie die Bildung von PNCs sowie die Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf deren Oberfläche bestimmt. Eine vermehrte Expression von Zelladhäsionsmolekülen spricht für eine gesteigerte zelluläre Reaktion. Luque et al. zeigten bereits, dass die SEMA4D-Plexin-Achse eine Rolle bei der Zelladhäsion spielt, jedoch findet sich in deren Studie keine spezifische Analyse einzelner Zelladhäsionsmoleküle [63].

Die Versuche wurden mit murinem Vollblut durchgeführt. Eine genauere Beschreibung der Zelladhäsionsmoleküle findet sich in Punkt 1.2. Abbildung 24 zeigt den Vergleich der Ergebnisse von WT- und *Sema4d*^{-/-}-Mäusen nach LPS-Inhalation ohne Applikation weiterer Substanzen. Es wird deutlich, dass das Fehlen von SEMA4D zu einer signifikant verringerten Bildung von PNCs führt (Abbildung 24A). Dies äußert sich ebenfalls durch die geringere Menge an CD42b und JON/A (Abbildung 24B u. F). Erniedrigtes LFA-1 und CD62P (D u. G) sprechen für eine geringere Zelladhäsion seitens der PNCs. CD11b zeigt sich wenig beeinflusst (Abbildung 24C). Abbildung 25 veranschaulicht die Ergebnisse der intravenösen Applikation von Sema4d in WT-Mäusen. Die Inkubationszeit nach LPS-Inhalation betrug ebenso vier Stunden. RmSema4d besitzt einen statistisch signifikanten Effekt in Bezug auf die stattfindende Entzündungsreaktion. Es findet sich eine gesteigerte Bildung von PNCs in den mit rmSema4d behandelten WT-Mäusen (Abbildung 25A), die allerdings keine signifikante Steigerung der Adhäsionsmoleküle aufweisen (Abbildung 25C-E u.

G). Inwiefern dies Auswirkungen auf die Migration der PNCs ins Gewebe besitzt stellt einen möglichen Ansatzpunkt für einen weiteren Versuch dar.

Die Graphen in Abbildung 26 enthalten Informationen über die Auswirkungen einer Blockade von SEMA4D mit einem spezifischen Antikörper. Durch eine Behandlung mit blockierendem anti-mSema4d Antikörper wurde die Bildung von PNCs signifikant verringert (Abbildung 26A). Da CD11b und LFA-1 ebenfalls verringert waren, spricht dies für eine geringere adhäsive Aktivität der PNCs (Abbildung 26C u. D).

Im Gesamtüberblick legen die Ergebnisse der drei Durchflusszytometrie-Versuche eine adhäsionsfördernde Rolle von SEMA4D unter inflammatorischen Bedingungen nahe.

Zusammenfassend bestehen durchaus Ähnlichkeiten zu den Ergebnissen von Nishide et al. [64] erzielten Ergebnissen aufweisen. Hier wird gezeigt, dass SEMA4D weder ein rein aktivatorisches noch ein rein inhibitorisches Protein ist. Folglich spielt für die Erforschung dieser Proteine vornehmlich der physiologische oder pathologische Kontext eine wichtige Rolle. Unter physiologischen Bedingungen ist SEMA4D an die Membranen diverser Zellen gebunden. Bezüglich der PMNs besitzt SEMA4D die Fähigkeit, der vermehrten Adhäsion der Zellen an die Gefäßwand entgegenzuwirken. Die direkte Exposition von PMNs mit SEMA4D zeigt außerdem, dass die Interaktion mit PlexinB1 ähnlich der Wirkung auf Osteoblasten und Osteoklasten [75] einen direkt repulsiven Effekt besitzt. Im Rahmen einer Entzündungsreaktion erfolgt zunächst eine vermehrte Expression von SEMA4D an der Membran zahlreicher Zelltypen und anschließend die enzymatische Abspaltung des Proteins. Im inflammatorischen Kontext freigesetztes, im Blut gelöstes sSEMA4D hat proinflammatorische Wirkeigenschaften. Freies sSEMA4D ist sowohl an der Bildung von PNCs beteiligt als auch über die Beeinflussung der Expression von Zelladhäsionsmolekülen auf der Zellmembran, an deren Migration ins Gewebe. Ein Fehlen oder eine funktionelle Inhibition von SEMA4D führt außerdem zu einer verringerten PNC-Aktivität. Somit besteht die Möglichkeit, dass ein spezifischer Antikörper gegen SEMA4D und eine konsekutive Blockade dieses Moleküls das

Potential besitzen, einem überschießenden Übertritt von PMNs in den Alveolarraum entgegenzuwirken.

5 Zusammenfassung

Das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) ist eine in der Intensivmedizin häufig auftretende Pathologie, die durch eine hohe Mortalitätsrate gekennzeichnet ist. Es handelt sich primär um eine überschießende Reaktion des Immunsystems auf ein spezifisches Ereignis verschiedener Genese. Sowohl eine erhöhte Permeabilität der Blut-Luft-Schranke als auch die überschießende Migration von neutrophilen Granulozyten spielen bei der Entstehung des ARDS eine wichtige Rolle. Es ist bereits bekannt, dass Neuronale guidance Proteine (NGPs) neben ihrer Funktion in der Entwicklung des Nervensystems auch im Immunsystem zahlreiche Funktionen haben. In Bezug auf SEMA4D wurden ebenso bereits zahlreiche Studien durchgeführt, die diesen Gesichtspunkt untersuchen. Jedoch ist die Rolle von SEMA4D bei einer akuten Entzündungsreaktion der Lunge noch unerforscht. Bisher existieren außerdem nur wenige Studien, die neutrophile Granulozyten miteinschließen.

In dieser Studie wurden als *in vivo* Modelle die Intravitalmikroskopie des präparierten M. cremaster männlicher Mäuse und das LPS-Inhalationsmodell verwendet. Des Weiteren wurden *ex vivo* Versuche mit humanem Vollblut und isolierten neutrophilen Granulozyten sowie *in vitro* Versuche mit humanen Zelllinien durchgeführt.

Im physiologischen Zustand zeigten sich für SEMA4D Eigenschaften, die einer Interaktion von neutrophilen Granulozyten mit dem Gefäßendothel entgegenwirken. Dies zeigte sich sowohl anhand der *ex vivo* Versuche als auch in Zusammenhang mit den Ergebnissen der Intravitalmikroskopie. Betrachtet man den inflammatorischen Kontext, ergab sich ein gegensätzliches Bild. Hier besitzt SEMA4D Eigenschaften, die, entsprechend den Ergebnissen der *in vivo* Modelle, die Neutrophilenmigration fördern. Eine vor Beginn der LPS-Inhalation durchgeführte Behandlung der Versuchstiere mit einem anti-mSema4d Antikörper setzte die inflammatorische Aktivität der neutrophilen Granulozyten merklich herab.

Die Ergebnisse dieses Projektes zeigen eine gegensätzliche Funktion von SEMA4D, die primär davon abhängt, ob ein Organismus sich im physiologischen Zustand befindet oder eine Inflammation vorliegt.

Die Behandlung mit anti-SEMA4D Antikörpern könnte außerdem ein möglicher Ansatz zukünftiger Projekte in Bezug auf die therapeutische Wirkung einer solchen Behandlung im Hinblick auf ein ARDS darstellen.

6 Referenzen

1. Medzhitov, R., *Inflammation 2010: new adventures of an old flame*. Cell, 2010. **140**(6): p. 771-6.
2. Scott, A., et al., *What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus?* Br J Sports Med, 2004. **38**(3): p. 248-9.
3. Turk, J.L., *Inflammation: John Hunter's "A treatise on the blood, inflammation and gun-shot wounds"*. Int J Exp Pathol, 1994. **75**(6): p. 385-95.
4. Nakamura, K. and T. Shichita, *Cellular and molecular mechanisms of sterile inflammation in ischaemic stroke*. J Biochem, 2019. **165**(6): p. 459-464.
5. Kuprash, D.V. and S.A. Nedospasov, *Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation*. Biochemistry (Mosc), 2016. **81**(11): p. 1237-1239.
6. Patel, S., *Danger-Associated Molecular Patterns (DAMPs): the Derivatives and Triggers of Inflammation*. Curr Allergy Asthma Rep, 2018. **18**(11): p. 63.
7. Karin, M. and H. Clevers, *Reparative inflammation takes charge of tissue regeneration*. Nature, 2016. **529**(7586): p. 307-15.
8. Kono, H. and K.L. Rock, *How dying cells alert the immune system to danger*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(4): p. 279-89.
9. Feghali, C.A. and T.M. Wright, *Cytokines in acute and chronic inflammation*. Front Biosci, 1997. **2**: p. d12-26.
10. Sugimoto, M.A., et al., *Resolution of Inflammation: What Controls Its Onset?* Front Immunol, 2016. **7**: p. 160.
11. Fonceca, A.M., et al., *Accumulation mode particles and LPS exposure induce TLR-4 dependent and independent inflammatory responses in the lung*. Respir Res, 2018. **19**(1): p. 15.
12. Lucas, K. and M. Maes, *Role of the Toll Like receptor (TLR) radical cycle in chronic inflammation: possible treatments targeting the TLR4 pathway*. Mol Neurobiol, 2013. **48**(1): p. 190-204.
13. Idriss, H.T. and J.H. Naismith, *TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)*. Microsc Res Tech, 2000. **50**(3): p. 184-95.
14. Mitsuiki, N., C. Schwab, and B. Grimbacher, *What did we learn from CTLA-4 insufficiency on the human immune system?* Immunol Rev, 2019. **287**(1): p. 33-49.
15. Peters, M.J., et al., *Circulating platelet-neutrophil complexes represent a subpopulation of activated neutrophils primed for adhesion, phagocytosis and intracellular killing*. Br J Haematol, 1999. **106**(2): p. 391-9.
16. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
17. Zarbock, A. and K. Ley, *Mechanisms and Consequences of Neutrophil Interaction with the Endothelium*. 2008.
18. Force*, T.A.D.T., *Acute Respiratory Distress Syndrome: The Berlin Definition*. JAMA, 2012. **307**(23): p. 2526-2533.

19. Wagner, K., et al., *Blunt Chest Trauma in Mice after Cigarette Smoke-Exposure: Effects of Mechanical Ventilation with 100% O₂*. PLoS One, 2015. **10**(7): p. e0132810.
20. Ware, L.B. and M.A. Matthay, *The acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med, 2000. **342**(18): p. 1334-49.
21. Ware, L.B., *Pathophysiology of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. Semin Respir Crit Care Med, 2006. **27**(4): p. 337-49.
22. Al-Saiedy, M., et al., *Surfactant Dysfunction in ARDS and Bronchiolitis is Repaired with Cyclodextrins*. Mil Med, 2018. **183**(suppl_1): p. 207-215.
23. Tomashefski, J.F., Jr., *Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome*. Clin Chest Med, 2000. **21**(3): p. 435-66.
24. Fichtner, F., et al., *S3-Leitlinie „Invasive Beatmung und Einsatz extrakorporaler Verfahren bei akuter respiratorischer Insuffizienz“*. DIVI, 2017. **4**: p. 154-163.
25. Huppert, L.A., M.A. Matthay, and L.B. Ware, *Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome*. Semin Respir Crit Care Med, 2019. **40**(1): p. 31-39.
26. Mirakaj, V. and P. Rosenberger, *Immunomodulatory Functions of Neuronal Guidance Proteins*. Trends Immunol, 2017. **38**(6): p. 444-456.
27. Bougeret, C., et al., *Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation*. J Immunol, 1992. **148**(2): p. 318-23.
28. Mirakaj, V., et al., *Netrin-1 dampens pulmonary inflammation during acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(8): p. 815-24.
29. Ko, C.L., et al., *Netrin-1 Dampens Hypobaric Hypoxia-Induced Lung Injury in Mice*. High Alt Med Biol, 2019. **20**(3): p. 293-302.
30. Taylor, L., et al., *Netrin-1 Reduces Monocyte and Macrophage Chemotaxis towards the Complement Component C5a*. PLoS One, 2016. **11**(8): p. e0160685.
31. Yu, S., et al., *Blockade of RGMb inhibits allergen-induced airways disease*. J Allergy Clin Immunol, 2019. **144**(1): p. 94-108.e11.
32. Schlegel, M., et al., *Inhibition of neogenin dampens hepatic ischemia-reperfusion injury*. Crit Care Med, 2014. **42**(9): p. e610-9.
33. Mirakaj, V., et al., *The guidance receptor neogenin promotes pulmonary inflammation during lung injury*. Faseb j, 2012. **26**(4): p. 1549-58.
34. Alto, L.T. and J.R. Terman, *Semaphorins and their Signaling Mechanisms*. Methods Mol Biol, 2017. **1493**: p. 1-25.
35. Kuklina, E.M., *Receptor Functions of Semaphorin 4D*. Biochemistry (Mosc), 2019. **84**(9): p. 1021-1027.
36. Janssen, B.J., et al., *Structural basis of semaphorin-plexin signalling*. Nature, 2010. **467**(7319): p. 1118-22.
37. Hota, P.K. and M. Buck, *Plexin structures are coming: opportunities for multilevel investigations of semaphorin guidance receptors, their cell signaling mechanisms, and functions*. Cell Mol Life Sci, 2012. **69**(22): p. 3765-805.
38. Jackson, R.E. and B.J. Eickholt, *Semaphorin signalling*. Curr Biol, 2009. **19**(13): p. R504-7.

39. König, K., et al., *Inhibition of Plexin C1 Protects Against Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury*. Crit Care Med, 2016. **44**(8): p. e625-32.
40. Köhler, D., et al., *Red blood cell-derived semaphorin 7A promotes thrombo-inflammation in myocardial ischemia-reperfusion injury through platelet GPIIb*. Nat Commun, 2020. **11**(1): p. 1315.
41. Zhang, M., et al., *Endothelial Semaphorin 7A promotes inflammation in seawater aspiration-induced acute lung injury*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(11): p. 19650-61.
42. Zhang, M., et al., *Endothelial semaphorin 7A promotes seawater aspiration-induced acute lung injury through plexin C1 and β 1 integrin*. Mol Med Rep, 2017. **16**(4): p. 4215-4221.
43. Mizui, M., A. Kumanogoh, and H. Kikutani, *Immune semaphorins: novel features of neural guidance molecules*. J Clin Immunol, 2009. **29**(1): p. 1-11.
44. Vadasz, Z., et al., *Increased soluble CD72 in systemic lupus erythematosus is in association with disease activity and lupus nephritis*. Clin Immunol, 2016. **164**: p. 114-8.
45. Kuklina, E.M., et al., *Semaphorin Sema4D in the immune system in multiple sclerosis*. Bull Exp Biol Med, 2014. **157**(2): p. 234-7.
46. Correa-Rocha, R., et al., *CD72/CD100 and PD-1/PD-L1 markers are increased on T and B cells in HIV-1+ viremic individuals, and CD72/CD100 axis is correlated with T-cell exhaustion*. PLoS One, 2018. **13**(8): p. e0203419.
47. Galuppo, M.K., et al., *CD100/Sema4D Increases Macrophage Infection by Leishmania (Leishmania) amazonensis in a CD72 Dependent Manner*. Front Microbiol, 2018. **9**: p. 1177.
48. Kumanogoh, A., et al., *Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1175-81.
49. Duran-Struuck, R., et al., *A novel role for the semaphorin Sema4D in the induction of allo-responses*. Biol Blood Marrow Transplant, 2007. **13**(11): p. 1294-1303.
50. Hiraguchi, Y., et al., *Semaphorin 4D is expressed constitutively by human eosinophils*. Allergol Int, 2015. **64 Suppl**: p. S77-9.
51. Cao, J., et al., *Plexin-B1 and semaphorin 4D cooperate to promote cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration and invasion*. J Dermatol Sci, 2015. **79**(2): p. 127-36.
52. Barberis, D., et al., *Plexin signaling hampers integrin-based adhesion, leading to Rho-kinase independent cell rounding, and inhibiting lamellipodia extension and cell motility*. Faseb j, 2004. **18**(3): p. 592-4.
53. Ch'ng, E.S. and A. Kumanogoh, *Roles of Sema4D and Plexin-B1 in tumor progression*. Mol Cancer, 2010. **9**: p. 251.
54. Smith, E.S., et al., *SEMA4D compromises blood-brain barrier, activates microglia, and inhibits remyelination in neurodegenerative disease*. Neurobiol Dis, 2015. **73**: p. 254-68.
55. Driessens, M.H., et al., *Plexin-B semaphorin receptors interact directly with active Rac and regulate the actin cytoskeleton by activating Rho*. Curr Biol, 2001. **11**(5): p. 339-44.

56. Mou, P., et al., *Identification of a calmodulin-binding domain in Sema4D that regulates its exodomain shedding in platelets*. Blood, 2013. **121**(20): p. 4221-30.
57. Yoshida, Y., et al., *Semaphorin 4D Contributes to Rheumatoid Arthritis by Inducing Inflammatory Cytokine Production: Pathogenic and Therapeutic Implications*. Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(6): p. 1481-90.
58. Liu, B., et al., *Elevated plasma soluble Sema4D/CD100 levels are associated with disease severity in patients of hemorrhagic fever with renal syndrome*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73958.
59. Vadasz, Z., et al., *Low levels of the immunoregulator Semaphorin 4D (CD100) in sera of HIV patients*. Clin Immunol, 2018. **191**: p. 88-93.
60. Delaire, S., et al., *Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4348-54.
61. Okuno, T., et al., *Roles of Sema4D-plexin-B1 interactions in the central nervous system for pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1499-506.
62. Basile, J.R., T. Afkhami, and J.S. Gutkind, *Semaphorin 4D/plexin-B1 induces endothelial cell migration through the activation of PYK2, Src, and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(16): p. 6889-98.
63. Luque, M.C., et al., *CD100 and plexins B2 and B1 mediate monocyte-endothelial cell adhesion and might take part in atherogenesis*. Mol Immunol, 2015. **67**(2 Pt B): p. 559-67.
64. Nishide, M., et al., *Semaphorin 4D inhibits neutrophil activation and is involved in the pathogenesis of neutrophil-mediated autoimmune vasculitis*. Ann Rheum Dis, 2017. **76**(8): p. 1440-1448.
65. Luque, M.C., et al., *Phage display identification of CD100 in human atherosclerotic plaque macrophages and foam cells*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e75772.
66. Roth, J.M., et al., *Semaphorin 7A Aggravates Pulmonary Inflammation during Lung Injury*. PLoS One, 2016. **11**(1): p. e0146930.
67. Ades, E.W., et al., *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. J Invest Dermatol, 1992. **99**(6): p. 683-90.
68. Wu, J., et al., *Characterization of air-liquid interface culture of A549 alveolar epithelial cells*. Braz J Med Biol Res, 2017. **51**(2): p. e6950.
69. Aratani, Y., *Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function*. Arch Biochem Biophys, 2018. **640**: p. 47-52.
70. Delaire, S., et al., *CD100 is a leukocyte semaphorin*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(11): p. 1265-76.
71. Nourshargh, S. and R. Alon, *Leukocyte migration into inflamed tissues*. Immunity, 2014. **41**(5): p. 694-707.
72. Granja, T., et al., *Crucial role of Plexin C1 for pulmonary inflammation and survival during lung injury*. Mucosal Immunol, 2014. **7**(4): p. 879-91.
73. Zhu, L., et al., *Regulated surface expression and shedding support a dual role for semaphorin 4D in platelet responses to vascular injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1621-6.

74. Potiron, V.A., J. Roche, and H.A. Drabkin, *Semaphorins and their receptors in lung cancer*. Cancer Lett, 2009. **273**(1): p. 1-14.
75. Deb Roy, A., et al., *Optogenetic activation of Plexin-B1 reveals contact repulsion between osteoclasts and osteoblasts*. Nat Commun, 2017. **8**: p. 15831.
76. Evans, E.E., et al., *Antibody Blockade of Semaphorin 4D Promotes Immune Infiltration into Tumor and Enhances Response to Other Immunomodulatory Therapies*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(6): p. 689-701.
77. Lei, J., et al., *Sema4D Aggravated LPS-Induced Injury via Activation of the MAPK Signaling Pathway in ATDC5 Chondrocytes*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 8691534.

7 Anhang

7.1 Danksagung

Sehr großer Dank gebührt an erster Stelle dem ärztlichen Direktor der Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Tübingen, Herrn Prof. Dr. med. Rosenberger, der mir diese Doktorarbeit sowie einen umfassenden Einblick in die Arbeit an wissenschaftlichen Projekten ermöglichte.

Dank der wöchentlichen Teammeetings, Ihrer herausragenden fachlichen Kompetenz, Ihrer Fähigkeit ein Team zu leiten und Menschen mitzureißen und auch dank dem engen Mailkontakt nach Abschluss meines Studiums habe ich mich bei Ihnen immer sehr gut aufgehoben gefühlt. Herr Professor, vielen Dank für die jahrelange permanente Unterstützung bei meiner Arbeit.

Außerdem bedanke ich mich besonders bei meinen Betreuern Dr. rer. med. Tiago Folgosa Granja und Dr. rer. nat. David Köhler, die mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mir die Sicherheit gaben, die nötig war, um auch neben meinem Studium weiter an dem Projekt zu arbeiten und diese Dissertation zu verfassen.

Weiterer Dank gilt dem gesamten Laborteam, insbesondere:

- Dr. Claudia Eggstein, Michaela Hoch-Gutbrod, Alice Mager, Ariane Streißenberger, Irene Vollmer, Tatjana Schreiber und Jutta Gamper-Tsigaras für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Versuche
- Christof Zanke für die Unterstützung in IT-Fragen

Ich möchte speziell, auch wenn dies nur indirekt in Bezug zu dieser Doktorarbeit steht, bei Dr. Ingo Pötsch danken. Ingo, Du hast mir nicht nur viel über Medizin und deren Verständnis und Praxis beigebracht, sondern auch einen Teil meiner Persönlichkeit in mir hervorgebracht, der, bis ich Dich traf noch deutlich unterrepräsentiert war. Du hast mir gezeigt, dass man mit einem gesunden Maß an Souveränität und ohne Verbissenheit meistens besser dran ist. Wenn auch diese Einstellung nicht vollständig vor Stress in herausfordernden Lebensphasen

bewahrt, so hilft sie dennoch enorm, dem geistig und körperlich standzuhalten, auch wenn es mal drunter und drüber geht.

Nicht zuletzt geht großer Dank an meine Familie für die moralische und finanzielle Unterstützung während des gesamten Studiums.

Ihr habt mir den Rücken freigehalten, damit ich mich auf das Wesentliche konzentrieren konnte. Die Dankbarkeit dafür und was mir all dies bedeutet ist nicht in Worte zu fassen, deshalb fasse ich mich kurz und lasse ich das so stehen.

7.2 Erklärung zum Eigenanteil

Ich, Maximilian Blaha, geb. 25.01.1993 in Burghausen, bestätige hiermit, dass ich der alleinige Autor dieser Dissertationsschrift bin. Die Planung dieses Projektes, die Analyse der Daten sowie das Verfassen dieser Dissertation erfolgte in Zusammenarbeit und unter Supervision von Herrn Prof. Peter Rosenberger, Dr. Tiago Granja und Dr. David Köhler. Ferner wurden die Tierversuche in Zusammenarbeit und unter Aufsicht von Dr. Tiago Granja und Dr. David Köhler durchgeführt. Die histologischen Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Michaela Hoch-Gutbrod durchgeführt. Die zum Zeitpunkt meines Eintrittes in die Arbeitsgruppe bereits vorhandenen Daten aus den humanen Zellkulturen sowie die IF-gefärbten Bilder der humanen Zelllinien stellten den Anfangspunkt für meine Arbeit dar und wurden mir von Dr. David Köhler zur Verfügung gestellt.

Maximilian Blaha