

Aus der
Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

**Der Einfluss der α_1 -Untereinheit extraneuraler
GABA_A-Rezeptoren auf die akute pulmonale
Inflammation und das ARDS**

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

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

vorgelegt von:

Roediger, Robin Louis

2026

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professorin Dr. F. Konrad
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Franz

Tag der Disputation: 27.01.2026

Für Oma Jutta, Oma Inge und Onkel Stephan

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Pulmonale Inflammation und ARDS	1
1.1.1 <i>Definition, Ätiologie und Epidemiologie</i>	1
1.1.2 <i>Klinik und Therapie</i>	4
1.2 Pathophysiologie der akuten pulmonalen Inflammation	5
1.2.1 <i>Induktion der Inflammation</i>	6
1.2.2 <i>Zytokine und Chemotaxis</i>	6
1.2.3 <i>Migration neutrophiler Granulozyten</i>	8
1.2.4 <i>Plättchen-Neutrophilen-Komplexe</i>	10
1.2.5 <i>Die Rolle der neutrophilen Granulozyten im Rahmen des ARDS</i>	12
1.3 GABA _A -Rezeptoren und ihre Rolle im Rahmen der Inflammation	13
1.4 Fragestellung	15
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Material	17
2.1.1 <i>Chemikalien und Reagenzien</i>	17
2.1.2 <i>Enzyme</i>	18
2.1.3 <i>FACS-Antikörper</i>	18
2.1.4 <i>Geräte</i>	19
2.1.5 <i>Lösungen</i>	21
2.1.6 <i>Medikamente</i>	22
2.1.7 <i>Primer für die RT-qPCR</i>	22
2.1.8 <i>Proteinbestimmung mittels BCA-Methode</i>	23
2.1.9 <i>Software</i>	23
2.1.10 <i>Verbrauchsmaterialien</i>	24
2.2 Überblick	26
2.3 In vivo Migration polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten: Pulmonale Inflammation im murinen Modell	27
2.3.1 <i>Überblick</i>	27
2.3.2 <i>LPS-Inhalation</i>	28
2.3.3 <i>Pharmakologische Vorbehandlungen</i>	29
2.3.4 <i>Organentnahme</i>	30
2.3.5 <i>Blut, BAL und Lungengewebe</i>	32
2.3.6 <i>Färbung der Proben für die FACS-Analyse</i>	33

2.4	Durchflusszytometrie.....	34
2.4.1	<i>Prinzip</i>	34
2.4.2	<i>Material</i>	36
2.4.3	<i>Durchführung</i>	37
2.4.4	<i>Auswertung</i>	37
2.4.4.1	<i>Mittlere Fluoreszenz-Intensität</i>	40
2.5	Histologie	40
2.5.1	<i>Vorbehandlung und operatives Vorgehen</i>	40
2.5.2	<i>Anfertigung der histologischen Präparate</i>	40
2.5.3	<i>Färbung der histologischen Präparate</i>	41
2.6	Untersuchung der Genexpression mittels PCR.....	42
2.6.1	<i>RNA-Isolation aus murinen Lungen</i>	42
2.6.2	<i>Messung der RNA-Konzentration</i>	43
2.6.3	<i>Umschrieb der RNA in cDNA</i>	43
2.6.4	<i>Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion</i>	44
2.7	ELISA.....	47
2.8	Messung der Myeloperoxidase-Freisetzung.....	49
2.9	Bestimmung der Proteinkonzentration	50
2.10	Statistik.....	50
3	ERGEBNISSE	52
3.1	Zellzahlen.....	52
3.1.1	<i>Leukozytenzahlen</i>	52
3.1.1.1	<i>Vergleich zwischen Wildtyp und Gabra1^{Kl}-Tieren</i>	52
3.1.1.2	<i>Vergleich der Wildtyp-Stimulationsgruppen</i>	53
3.1.2	<i>Zahlen polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten</i>	56
3.1.2.1	<i>Vergleich zwischen Wildtyp- und Gabra1^{Kl}-Tieren</i>	56
3.1.2.2	<i>Vergleich der Wildtyp-Stimulationsgruppen</i>	58
3.1.3	<i>Prozentualer Anteil der Plättchen-Neutrophilen-Komplexe</i>	60
3.1.3.1	<i>Vergleich zwischen Wildtyp- und Gabra1^{Kl}-Tieren</i>	60
3.1.3.2	<i>Vergleich der Wildtyp-Stimulationsgruppen</i>	62
3.1.4	<i>Vergleich der Gabra1^{Kl}-Stimulationsgruppen</i>	62
3.2	Oberflächenproteine.....	65
3.2.1	<i>P-Selektin</i>	65
3.2.2	<i>L-Selektin</i>	66
3.2.3	<i>P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1</i>	67
3.2.4	<i>CD11b</i>	68
3.2.5	<i>Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 1</i>	69
3.3	Zytokine.....	70
3.4	Genexpression	72

3.4.1	Vergleich zwischen Wildtyp- und <i>Gabra1</i> ^{KI} -Tieren	72
3.4.1.1	<i>TNFα</i> , <i>CXCL1</i> und <i>CXCL2</i>	72
3.4.1.2	<i>MAPK1</i> und <i>MAPK3</i>	73
3.5	Myeloperoxidasefreisetzung	74
3.6	Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage	75
3.7	Messung der alveolären Septumdicke	76
4	DISKUSSION	78
4.1	Zellzahlen	78
4.2	Oberflächenproteine und PNC-Bildung	81
4.3	Chemotaxis	85
4.4	Inflammation und pulmonale Schädigung	87
4.5	Limitationen	89
4.6	Ausblick	90
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	LITERATURVERZEICHNIS	X
7	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	XXXI
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	XXXII
9	DANKSAGUNG	XXXIII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten (vereinfacht).....	10
Abbildung 2: Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen.	12
Abbildung 3: Degranulation und NETose neutrophiler Granulozyten.	13
Abbildung 4: Übersicht der verwendeten Methoden.....	27
Abbildung 5: Modell der LPS-Inhalation.	29
Abbildung 6: Pharmakologischen Vorbehandlung.....	30
Abbildung 7: Prinzip der Durchflusszytometrie.....	35
Abbildung 8: Gating-Prinzip der FACS-Analyse.....	39
Abbildung 9: cDNA-Synthese.....	44
Abbildung 10: Temperaturzyklus der RT-qPCR.....	46
Abbildung 11: Funktionsweise des Sandwich-ELISA.....	49
Abbildung 12: Vergleich der Leukozytenzahl zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{KI} -Tieren.....	54
Abbildung 13: Vergleich der Leukozytenzahl zwischen Wildtyp-Tieren nach medikamentöser Stimulation.....	55
Abbildung 14: Vergleich der PMN-Zahl zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{KI} -Tieren.....	57
Abbildung 15: Vergleich der PMN-Zahl zwischen Wildtyp-Tieren nach medikamentöser Stimulation.....	59
Abbildung 16: Vergleich des PNC-Anteils zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{KI} -Tieren.....	61
Abbildung 17: Vergleich des PNC-Anteils zwischen Wildtyp-Tieren nach medikamentöser Stimulation.....	63
Abbildung 18: Vergleich der Zellzahlen zwischen Gabra1 ^{KI} -Tieren nach medikamentöser Stimulation.....	64
Abbildung 19: Vergleich der Expression von P-Selektin zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{KI} -Tieren.....	65
Abbildung 20: Vergleich der Expression von L-Selektin zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{KI} -Tieren.....	66
Abbildung 21: Vergleich der Expression von P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{KI} -Tieren.....	67
Abbildung 22: Vergleich der Expression von CD11b zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{KI} -Tieren.....	68

Abbildung 23: Vergleich der Expression von Lymphozytenfunktions- assoziiertem Antigen 1 zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{Kl} -Tieren.	69
Abbildung 24: Vergleich der Konzentration von TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2 zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{Kl} -Tieren.	71
Abbildung 25: Vergleich der pulmonalen Genexpression von TNF α , CXCL1 und CXCL2 zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{Kl} -Tieren.	73
Abbildung 26: Vergleich der pulmonalen Genexpression von MAPK1 und MAPK3 zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{Kl} -Tieren.	74
Abbildung 27: Vergleich der bronchoaveolären MPO-Aktivität zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{Kl} -Tieren.	75
Abbildung 28: Vergleich der bronchoaveolären Proteinkonzentration zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{Kl} -Tieren.	76
Abbildung 29: Histologische Abbildungen und Vergleich der Alveolarseptendicke zwischen Wildtyp- und Gabra1 ^{-/-} -Tieren. ...	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	ARDS-Diagnosekriterien gemäß der globalen Definition nach Matthay et al. (3).....	3
Tabelle 2:	Zusammensetzung der Narkose.....	31
Tabelle 3:	Zusammensetzung der Enzymlösung für den Verdau des Lungengewebes.	32
Tabelle 4:	Zusammensetzung des Färbepuffers (für 1 Liter).....	33
Tabelle 5:	Zusammensetzung des Erythrozyten-Lysepuffers für Organe (für 1 Liter).	33
Tabelle 6:	Laser des BD Biosciences FACS Canto™ II (133).....	36
Tabelle 7:	Für die FACS-Analyse verwendete Antikörper.	36
Tabelle 8:	Alkoholreihe zur Entparaffinierung der histologischen Präparate.	41
Tabelle 9:	Primer für die RT-qPCR und ihre Schmelztemperatur. (Sequenzen siehe Materialliste)	45
Tabelle 10:	Übersicht der Signifikanzen.....	51

Abkürzungsverzeichnis

%vol	Volumenprozent
λ_{\max}	Ideale Wellenlänge
ABTS	2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADAM-17	<i>engl.: A disintegrin and metalloprotease 17</i>
AK	Antikörper
ALI	<i>Acute Lung Injury</i> (dt.: akute Lungenschädigung)
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
ARDS	<i>engl.: Acute Respiratory Distress Syndrome</i> (dt.: akute respiratorische Insuffizienz)
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BCA	<i>engl.: Bicinchoninic acid</i> (dt.: Bicinchonin-Säure)
BSA	Bovines Serumalbumin
CCL2	CC-Chemokin Ligand 2
CCL7	CC-Chemokin Ligand 7
CD	<i>engl.: Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>engl.: complementary DNA</i> (dt.: Komplementäre DNA)
cm H ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	C-reaktives Protein
Ca ²⁺	zweifach positiv geladene Calciumkationen
Cu ⁺²⁺	ein-/zweifach positiv geladene Kupferkationen
CXCL1	CXC-Motiv Chemokin Ligand 1
CXCL2	CXC-Motiv Chemokin Ligand 2
CXCL8	CXC-Motiv Chemokin Ligand 8
CXCL10	CXC-Motiv Chemokin Ligand 10
CXCR1	CXC-Motiv-Chemokin Rezeptor 1
CXCR2	CXC-Motiv-Chemokin Rezeptor 2
DAMP	<i>engl.: Damage-associated Molecular Pattern</i> (dt.: Schaden-assoziiertes molekulares Muster)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
ELISA	<i>engl.: Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ESL-1	E-Selektin-Ligand 1
FACS	<i>engl.: Fluorescence-activated Cell Sorting/Scanning</i> (dt.: Fluoreszenz-aktivierte(s) Zellsortierung/Scannen)
F _i O ₂	Sauerstoffgehalt des Inspirationsgases
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FMO	<i>engl.: Fluorescence Minus One</i>
FSC	<i>engl.: Forward Scattered Channel</i> (dt.: Vorwärtsstreuung)
FPR-1	Formyl-Peptid-Rezeptor 1
GABA	<i>engl.: Gamma-Aminobutyric Acid</i> (dt.: γ -Aminobuttersäure)
GABA _A R	GABA _A -Rezeptor
GABA _B R	GABA _B -Rezeptor
Gabra1	α 1-Untereinheit des GABA _A -Rezeptors

GP-Ib α	Glykoprotein Ib α
GP-IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HFNO	<i>engl.: high-flow nasal oxygen</i> (dt.: nasale high-flow Sauerstofftherapie)
HIF-1 α	<i>engl.: Hypoxia-inducible factor 1α</i> (dt.: Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α)
HOCl	Hypochlorige Säure
HRP	<i>engl.: Horseradish Peroxidase</i> (dt.: Meerrettichperoxidase)
i.p.	intraperitoneal
ICAM-1	<i>engl.: Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
ICAM-2	<i>engl.: Intercellular Adhesion Molecule 2</i>
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-10	Interleukin 10
IL-12	Interleukin 12
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
JAM-A/B/C	<i>engl.: Junctional Adhesion Molecule A/B/C</i> (dt.: Junktionale Adhäsionsmoleküle A/B/C)
JON/A	Glykoprotein IIb/IIIa, Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$
KG	Körpergewicht
LFA-1	Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharid
Ly6G	Lymphozyten-Antigen 6 Komplex, Locus G
MAC-1	<i>engl.: Macrophage Antigen 1</i> (dt.: Makrophagen Antigen 1)
MAPK1/3	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 1/3
MFI	Mittlere Fluoreszenz-Intensität
MMP	Matrix-Metalloprotease
MPO	Myeloperoxidase
NADPH	Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NaCl	Natriumchlorid
NET	<i>engl.: Neutrophil Extracellular Trap</i>
NFW	Nuklease-freies Wasser
NF κ B	<i>engl.: Nuclear Factor 'Kappa-light-chain-enhancer' of Activated B-cells</i>
NIV	noninvasive Ventilation
PAMP	Pathogen-associated Molecular Pattern (dt.: pathogen-assoziiertes molekulares Muster)
P _a O ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PB	Pacific Blue
PBS-	Phosphat-gepufferter Elektrolytlösung
PBMC	<i>engl.: Peripheral blood mononuclear cell</i>
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin-Cyanin 7

PEEP	<i>engl.: Positive Endexpiratory Pressure</i> (dt.: positiver endexpiratorischer Druck)
PerCP/Cy5.5	Peridinin-Chlorophyll-Protein/Cyanin 5.5
PF-4	Plättchenfaktor 4
PMN	<i>engl.: Polymorphonuclear Neutrophil</i> (dt.: Polymorphkerniger neutrophiler Granulozyt)
PNC	<i>engl.: Platelet-Neutrophil-Complex</i> (dt.: Plättchen-Neutrophilen-Komplex)
PRR	Pattern Recognizing Receptors
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	<i>engl.: rounds per minute</i> ; dt.: Umdrehungen pro Minute
RT-qPCR	Quantitative real-time Polymerasekettenreaktion
S _p O ₂	periphere Sauerstoffsättigung
SSC	<i>engl.: Side Scattered Channel</i> (dt.: Seitwärtsstreuung)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TLR2	Toll-like Rezeptor 2
TLR3	Toll-like Rezeptor 3
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TLR7	Toll-like Rezeptor 7
TMP	Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TRALI	<i>engl.: Transfusion-induced Lung Injury</i> (dt.: transfusionsinduzierte Lungenschädigung)
VILI	<i>engl.: Ventilator-induced Lung Injury</i> (dt.: beatmungsinduzierte Lungenschädigung)
vWF	von-Willebrand-Faktor
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Pulmonale Inflammation und ARDS

1.1.1 Definition, Ätiologie und Epidemiologie

Das *acute respiratory distress syndrome* (dt.: akute respiratorische Insuffizienz; ARDS) bezeichnet die schwerste Form der akuten Lungenschädigung (*engl.: acute lunge injury; ALI*), welche eine überschießende inflammatorische Reaktion in der Lunge darstellt. Das ARDS wurde erstmals 1967 von Ashbaugh et al. beschrieben (1) und ist trotz intensivmedizinischer Therapie in spezialisierten Zentren bis heute eines der Krankheitsbilder mit der höchsten Letalität überhaupt. Diese liegt bei bis zu 46% (2).

Die aktuellen Diagnosekriterien für das Vorliegen eines ARDS entstammen der globalen Definition von Matthay et al. von 2024 (siehe auch *Tabelle 1*) (3). Diese sind das akute Auftreten von Symptomen innerhalb einer Woche mit diffusen, bilateralen Infiltraten in einer Röntgen-Aufnahme des Thorax oder multiple B-Linien und/oder Konsolidierungen in der Lungensonographie, welche nicht vollständig durch Pleuraergüsse, Atelektasen oder Raumforderungen erklärt werden. Darüber hinaus muss eine ausschließlich kardiale Ätiologie oder eine Genese primär aufgrund von Volumenüberladung echokardiographisch ausgeschlossen werden und eine therapierefraktäre Hypoxämie trotz Beatmung mit einem positiv-endexpiratorischen Druck (*engl.: positive endexpiratory pressure; PEEP*) von ≥ 5 cm H₂O oder nasaler High-flow-Sauerstofftherapie (*engl.: high-flow nasal oxygen; HFNO*) mit ≥ 30 L O₂/min vorliegen. Die Hypoxämie wird durch den Horovitz-Index quantifiziert, den Quotienten aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck (P_aO₂) und Sauerstoffgehalt des Inspirationsgases (F_iO₂), alternativ durch den Quotienten aus peripherer Sauerstoffsättigung (SpO₂) und F_iO₂, wenn die SpO₂ $\leq 97\%$ ist. Für einen Lungengesunden mit einem P_aO₂ von annähernd 100 Millimeter Quecksilbersäule (mmHg), welcher Raumluft mit einem Sauerstoffgehalt von 21% einatmet, ergibt sich ein Horovitz-Index von circa 500 mmHg. Gemäß der globalen Definition nach Matthay et al. entspricht bei invasiv beatmeten Patient:innen ein Wert von 201-300 mmHg einem milden ARDS (alternativ:

$235 < \text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$, wenn $\text{SpO}_2 \leq 97\%$), ein Wert von 101-200 mmHg einem moderaten ARDS (alternativ: $148 < \text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 235$, wenn $\text{SpO}_2 < 97\%$) und ein Wert ≤ 100 mmHg einem schweren ARDS (alternativ: $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 148$, wenn $\text{SpO}_2 < 97\%$). Für nicht-invasiv beatmete Patient:innen (noninvasive Ventilation; NIV) mit PEEP ≥ 5 cm H₂O oder solche mit HFNO (≥ 30 L O₂/min) kann anhand derselben Grenzwerte (Horowitz-Index ≤ 300 mmHg oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$, wenn $\text{FiO}_2 \leq 97\%$) die Diagnose eines ARDS gestellt werden. Um einer reduzierten Diagnosestellung des ARDS in Regionen beziehungsweise Situationen mit limitierten medizinischen Ressourcen entgegenzuwirken, wurde im Gegensatz zur Berlin-Definition von Ranieri et al. (4) auch eine modifizierte Definition eingeführt, welche für die Diagnosestellung weder HFNO noch Beatmung mit PEEP ≥ 5 cm H₂O benötigt, sofern $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$ und die $\text{FiO}_2 \leq 97\%$ ist. Hierfür wurde unter anderem auf die Kigali-Modifikation der Berlin-Kriterien nach Riviello et al. zurückgegriffen (5)

Tabelle 1: ARDS-Diagnosekriterien gemäß der globalen Definition nach Matthay et al. (3).

nicht-invasiv beatmetes ARDS	invasiv beatmetes ARDS	modifizierte Definition unter limitierten Ressourcen
Akutes Auftreten innerhalb einer Woche		
Diffuse, bilaterale Infiltrate im Röntgen-Thorax oder multiple B-Linien und/oder Konsolidierungen in der Lungensonographie; nicht vollständig erklärbar durch Pleuraergüsse, Atelektasen oder Raumforderungen		
Ausschließlich/primär kardiale Ätiologie oder Volumenüberladung echokardiographisch ausgeschlossen		
	Mild: Horovitz-Index 201-300 mmHg oder $235 < \text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$ (wenn $\text{SpO}_2 \leq 97\%$)	
Horovitz-Index ≤ 300 mmHg oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$ (wenn $\text{SpO}_2 \leq 97\%$)	Moderat: Horovitz-Index 101-200 mmHg oder $148 < \text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 235$ (wenn $\text{SpO}_2 \leq 97\%$)	$\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 315$ (wenn $\text{SpO}_2 \leq 97\%$). Weder PEEP 5 cm H ₂ O noch HFNO mit ≥ 30 L O ₂ /min notwendig für Diagnosestellung.
	Schwer: Horovitz-Index ≤ 100 mmHg oder $\text{SpO}_2:\text{FiO}_2 \leq 148$ (wenn $\text{SpO}_2 \leq 97\%$)	

Die Ursachen für ein ARDS sind sehr divers und oft sind multiple Faktoren für die Entwicklung eines ARDS verantwortlich. Die weltweit häufigsten Auslöser sind eine Pneumonie oder Sepsis (6), zu den weiteren Ursachen zählen die beatmungsassoziierte Lungenschädigung (*engl.: ventilator-induced lung injury, VILI*) (7), Aspiration von Mageninhalt, Blutung und Schock infolge eines Traumas, schwere akute Pankreatitis, Transfusions-assoziierte Lungenschädigung (*engl.: transfusion-associated lung injury, TRALI*) und Medikamentenreaktionen (8).

Das durchschnittliche Erkrankungsalter von Patient:innen mit ARDS liegt bei 55-65 Jahren (9). Die Inzidenz des ARDS liegt bei circa 7/100.000 Einwohner:innen pro Jahr (10). 10,4% aller intensivmedizinisch betreuten Patient:innen entwickeln

ein ARDS, welches jedoch laut Bellani et al. nach wie vor unterdiagnostiziert ist (2). In einer prospektiven, multizentrischen, 50 Länder umfassenden Studie wurde festgestellt, dass lediglich 60,2% aller Patient:innen mit ARDS auch klinisch als solche identifiziert wurden (2). 30% der Patient:innen entwickelten ein mildes, 47% ein moderates und 23% ein schweres ARDS. Je nach Schweregrad liegt die Letalität bei 35% (mildes ARDS) bis 46% (schweres ARDS) (2). Viele der Überlebenden leiden im Anschluss unter eingeschränkter Lebensqualität. So wurde beispielsweise bei 86% der Proband:innen einer Längsschnittstudie von Pfoh et al. auch fünf Jahre nach ihrer ARDS-Erkrankung noch eine verminderte körperliche Leistungsfähigkeit festgestellt (11).

1.1.2 Klinik und Therapie

Klinisch manifestiert sich das ARDS als rasch progrediente Dyspnoe mit Tachypnoe und Hypoxämie als Symptomen einer zunehmenden Störung des pulmonalen Gasaustauschs (12). Weitere Symptome können pleuritische Thoraxschmerzen, Auswurf oder Fieber sein (12). Die kompensatorische Hyperventilation führt häufig zu einer respiratorischen Alkalose in der Blutgasanalyse als Anzeichen respiratorischer Insuffizienz (13). Diese entwickelt sich im Verlauf zu einer respiratorischen Globalinsuffizienz mit arterieller Hypoxämie und Hyperkapnie. Letztere geht mit einer erhöhten Mortalität einher (14).

Die Erstbeschreibung des ARDS liegt mehr als 50 Jahre zurück, seine Therapie beschränkt sich bis heute dennoch lediglich auf supportive intensivmedizinische Maßnahmen und Prävention. Die Beatmung erfolgt lungenprotektiv mit niedrigen Atemzugvolumina von <6 ml/ kg Körpergewicht (KG) und einem PEEP von ≥ 5 cm H₂O (15). Zur Verbesserung des Ventilations-Perfusions-Verhältnisses werden Patient:innen zeitweise in Bauchlage gelagert (16). Um einen erhöhten hydrostatischen Druck in der Lunge zu vermeiden, wird eine restriktive Volumentherapie durchgeführt (17, 18). Voraussetzung hierfür ist, dass sich der/die Patient:in in einem kreislaufstabilen Zustand befindet. Es wird versucht, Risikopatient:innen frühzeitig zu erkennen, um die Entstehung eines ARDS

möglichst zu vermeiden (19-21). Verschiedene Ansätze zur medikamentösen Therapie wurden und werden evaluiert, unter ihnen Glucocorticoide (22), ACE-Hemmer (23), Statine (24) sowie neuromuskuläre Blocker (25). Für Dexamethason (ein Glucocorticoid) konnte bei Patient:innen mit moderatem bis schwerem ARDS nach frühzeitiger Gabe eine reduzierte Beatmungszeit sowie eine niedrigere Mortalität nachgewiesen werden (26). Als Rescue-Therapie bei klinischer Verschlechterung steht die veno-venöse extrakorporale Membranoxygenierung zur Verfügung, welche allerdings keinen statistisch signifikanten Rückgang der Mortalität bewirkt (27). Eine weitere Option ist die extrakorporale CO₂-Elimination, welche den Einsatz noch geringerer Atemzugvolumina von 3-4 ml/kg KG ermöglicht, ohne zu einer schweren respiratorischen Azidose zu führen (28). Ob diese Kombination aus sogenannter ultra-protektiver Beatmung und extrakorporaler CO₂-Elimination das Outcome verbessert, ist noch Gegenstand der Forschung. Ebenfalls erprobt wird der Einsatz mesenchymaler Stammzellen zur Therapie des ARDS (29). Die Forschung diesbezüglich befindet sich allerdings noch in einem frühen klinischen Stadium (30).

1.2 Pathophysiologie der akuten pulmonalen Inflammation

Die Schädigung des Lungengewebes im Rahmen des ARDS lässt sich histopathologisch in drei Phasen unterteilen: eine exsudative, eine proliferative und eine fibroproliferative Phase (31). In der exsudativen Phase tritt eine diffuse Schädigung der Alveolarwand auf, begleitet von einem Kapillarleck, welches ein proteinreiches alveoläres Ödem zur Folge hat (32). Die proliferative Phase ist gekennzeichnet durch die Bildung hyaliner Membranen und die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten (*engl.: polymorphonuclear neutrophils; PMNs*), Makrophagen und Erythrozyten, was zu einem Verlust der pulmonalen Compliance und infolgedessen zur Entstehung von Atelektasen führt (32). Im Rahmen der fibroproliferativen Phase kommt es zu einer erhöhten Produktion von extrazellulärer Matrix und einem irreversiblen fibrotischen Umbau des Lungengewebes (33).

1.2.1 Induktion der Inflammation

Sowohl intrapulmonale Erreger als auch eine anderweitige Schädigung des Lungengewebes induzieren über die Aktivierung von Signalkaskaden die pulmonale Entzündungsreaktion. Pneumozyten (34), Alveolarmakrophagen und PMNs (35) verfügen über *Pattern Recognizing Receptors (PRRs)*, welche sowohl Bestandteile pathogener Mikroorganismen, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (dt.: Pathogen-assoziierte molekulare Muster; *PAMPs*) als auch Anzeichen für die Schädigung endogener Zellen, sogenannte *damage-associated molecular patterns* (dt.: Schaden-assoziierte molekulare Muster; *DAMPs*), erkennen. Beispiele für PAMPs sind das Lipopolysaccharid (LPS) aus der äußeren Zellwand gramnegativer Bakterien oder Zymosan, ein Zellwandprotein von Hefepilzen (36). Zu den endogenen DAMPs gehören unter anderem Fibrinogen (37) und Heat-Shock Proteine (38, 39). Es gibt verschiedene Gruppen von PRRs, die bekannteste von ihnen ist die der Toll-like Rezeptoren (TLRs), von welchen im Menschen bisher zehn Subtypen identifiziert wurden (40), die auf praktisch allen Körperzellen exprimiert werden (41) und je nach Subtyp verschiedene Strukturen erkennen. LPS wird beispielsweise über TLR4 erkannt (42), dessen pulmonale Expression sich in einem murinen Sepsis-Modell signifikant erhöht (43). Die Bindung der verschiedenen PAMPs und DAMPs an die entsprechenden Rezeptoren führt zur Aktivierung der sie exprimierenden Zellen. Intrazellulär kommt es in der Folge unter anderem zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) sowie von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) (44), welche für die Transkription der Gene proinflammatorischer Zytokine relevant sind.

1.2.2 Zytokine und Chemotaxis

Zytokine sind Proteine, die das Wachstum und die Differenzierung von Zellen regulieren und unter anderem als Mediatoren von Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle spielen (45). Zu den für die Inflammationsreaktion wichtigen Zytokinen gehören exemplarisch der Tumornekrosefaktor α (TNF α) sowie die

Interleukine 1 β (IL-1 β) und 6 (IL-6) (46). TNF α wird beispielsweise von Makrophagen und aktivierten Lymphozyten sezerniert (47). Zu seinen Effekten zählt die Stimulation der Chemotaxis und Proliferation von PMNs sowie deren Adhäsion an Endothelzellen (48). IL-6 wird neben Makrophagen und aktivierten Lymphozyten auch von Endothelzellen ausgeschüttet (49). Es induziert die Differenzierung von B- und T-Lymphozyten. Es konnte gezeigt werden, dass erhöhte Zytokinlevel in der bronchoalveolären Lavage (BAL) und im Plasma bei Patient:innen mit ARDS mit einer ungünstigeren Prognose korrelieren (50, 51).

Kommt es zu einer Dysregulation der Zytokinsekretion spricht man von einem sogenannten „Zytokinsturm“, welcher einen der entscheidenden Mechanismen für die Entwicklung eines ARDS darstellt (52, 53). Dabei steht zunächst ein Anstieg der Zytokine TNF α und IL-1 β sowie Interleukin 8 (IL-8) und CC-Chemokin Ligand 2 (CCL2) im Vordergrund, gefolgt von IL-6 (54). Erst mit Verzögerung wird das anti-inflammatorische Interleukin 10 (IL-10) freigesetzt, eine Kompensationsreaktion des Körpers, um die überschießende Immunreaktion zu dämpfen (54).

Die Extravasation neutrophiler Granulozyten und ihre Migration ins Lungengewebe und in den Alveolarraum ist ein zentraler Prozess für die Entwicklung eines ARDS (55). Es besteht eine positive Korrelation zwischen der Zahl neutrophiler Granulozyten in der BAL und der Mortalität von Patient:innen mit ARDS (55). Die im Blut zirkulierenden PMNs werden aktiviert und zur Migration in Richtung Infektfokus stimuliert. Ein Prozess, der als Chemotaxis bezeichnet wird und für welchen Chemokine (eine Gruppe von Zytokinen) verantwortlich sind (56). Das wichtigste humane Chemokin für die PMN-Migration ist der CXC-Motiv Chemokin Ligand 8 (CXCL8; anderer Name: Interleukin 8, IL-8) mit seinen murinen Pendanten CXC-Motiv Chemokin Ligand 1 und 2 (CXCL1, CXCL2) (57). Die relevantesten Produzenten von IL-8 und CXCL1/2 sind Makrophagen und Monozyten (58). Es existieren zwei Rezeptoren für IL-8 beziehungsweise CXCL1/2: CXCR1 und CXCR2, wobei CXCR1 nur von Menschen exprimiert wird (59). Sowohl bei Patient:innen mit ARDS als auch in murinen Modellen für pulmonale Inflammation sind CXC-Motiv Chemokine erhöht

(60, 61), CXCL8-Spiegel in Plasma und BAL korrelieren zudem mit der Entwicklung (62), dem Schweregrad (63) und der Mortalität (64) eines ARDS.

1.2.3 Migration neutrophiler Granulozyten

Die Inflammation geht mit einer Vasodilatation der Gefäße einher, welche in einer geringeren Strömungsgeschwindigkeit des Blutes resultiert und Leukozyten die effektive Interaktion mit dem Endothel ermöglicht (65). Das intakte pulmonale Endothel hat eine antiinflammatorische und lungenprotektive Funktion, da es die Bildung pulmonaler Ödeme und die Migration von Immunzellen inhibiert (66). Für die transendotheliale Migration muss neben den PMNs auch das Endothel aktiviert werden, wofür ebenfalls Zytokine wie TNF α und IL-6 relevant sind (66). LPS sorgt darüber hinaus für einen Integritätsverlust der Zonula adhaerens, welcher in einer verstärkten leukozytären Transmigration und pulmonalen Ödemen resultiert (67). Endotheliale Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin, das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (*engl.: intercellular adhesion molecule 1; ICAM-1*) oder β_2 -Integrine werden während der akuten pulmonalen Inflammation hochreguliert und erleichtern die Interaktion zwischen Endothelzellen und Leukozyten (68, 69).

Die Extravasation von PMNs wird in mehrere Schritte unterteilt: die Adhäsion am Endothel (*engl.: tethering oder capturing*) wird gefolgt vom Rollen (*engl.: (slow) rolling*) der PMNs am Endothel. Anschließend kommt es zum Arrest und Kriechen (*engl.: crawling*) der PMNs und schließlich zur Transmigration durch das Endothel, auch Diapedese genannt (70) (*Abbildung 1*). Für das *tethering* der PMNs sind Selektine, eine Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen, verantwortlich. E-Selektin (CD62E) wird auf Endothelzellen exprimiert, P-Selektin (CD62P) befindet sich auf Thrombozyten und Endothelzellen, während PMNs auf ihrer Zelloberfläche L-Selektin (CD62L) exprimieren (71). Die wichtigsten Bindungspartner für neutrophile Selektine sind der P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1, auch CD162), der E-Selektin-Ligand 1 (ESL-1) und CD44 (72). PSGL-1 und L-Selektin bilden einen Komplex, welcher über eine intrazelluläre Signalkaskade das Integrin Lymphozytenfunktions-assoziiertes

Antigen 1 (LFA-1) auf der Oberfläche von PMNs aktiviert (73). Die Bindung von LFA-1 an endotheliales ICAM-1 und ICAM-2 vermittelt das *slow rolling* und schließlich den Arrest der PMNs auf dem Endothel (74, 75). Für das intraluminale *crawling* ist das Makrophagen Antigen 1 (*engl.: macrophage antigen 1; MAC-1*, auch bekannt als CD11b/CD18) zuständig, welches an ICAM-1 und -2 bindet (74, 76). Das *crawling* ermöglicht es den PMNs, einen geeigneten Ort für die Extravasation zu finden, in den meisten Fällen ein endothelialer Zellkontakt (70). PMNs können sowohl para- als auch transzellulär nach extravasal migrieren, wobei ersteres der überwiegende und weitaus besser verstandene Migrationspfad ist (70). Für die parazelluläre Transmigration wird der Zell-Zell-Kontakt zwischen den Endothelzellen geöffnet. Dafür spielt unter anderem wiederum die Interaktion von LFA-1 mit ICAM-1 eine Rolle (70). Neben den bereits genannten sind noch eine Reihe weiterer Oberflächenproteine relevant für die Diapedese der PMNs, unter anderem die junctionalen Adhäsionsmoleküle A, B und C, (*engl.: junctional adhesion molecules A/B/C; JAM-A/B/C*) (77).

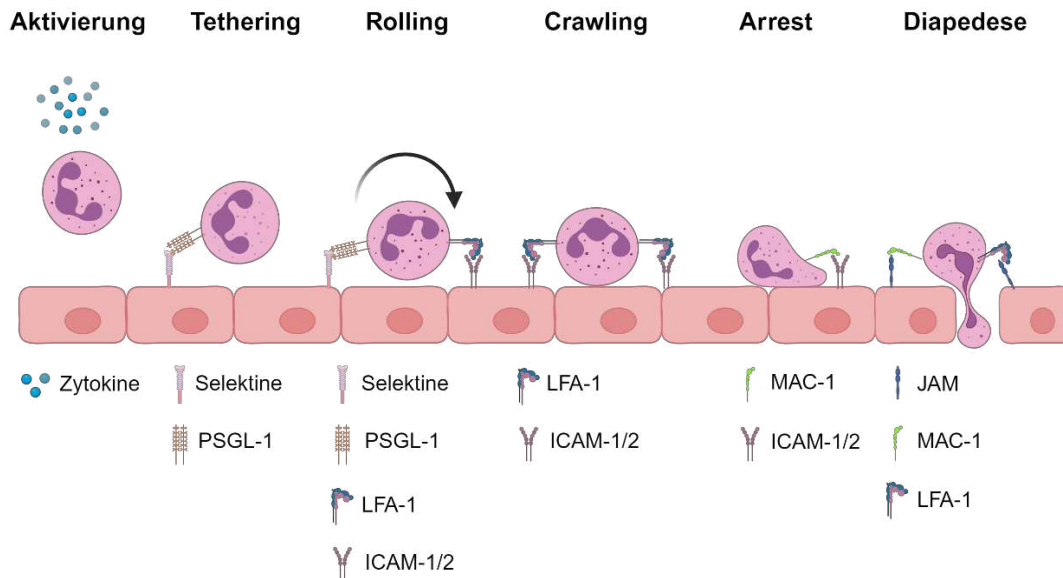


Abbildung 1: Transendotheliale Migration neutrophiler Granulozyten (vereinfacht).

Vereinfachte Darstellung der PMN-Migration. Durch Zytokine werden die PMNs aktiviert. Das Selektin-vermittelte Tethering führt zum Rolling über das Endothel. Die Interaktion der Integrine verstärkt die Bindung der PMNs an das Endothel und sorgt für ihr Crawling sowie ihren Arrest. Die Diapedese ist der letzte Schritt und geschieht unter anderem mithilfe der JAMs.

ICAM-1/2 = Interzelluläres Adhäsionsmoleküle 1/2.

JAM = junctional adhesion molecule.

LFA-1 = Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 1.

MAC-1 = Makrophagen Antigen 1.

PSGL-1 = P-Selektin Glykoprotein Ligand 1.

[eigene Abbildung, Created in BioRender. Konrad, F. (2025) <https://BioRender.com/f81j402>]

1.2.4 Plättchen-Neutrophilen-Komplexe

Für die transendotheliale Migration ebenfalls von großer Bedeutung ist die Interaktion der PMNs mit Thrombozyten. Diese bilden durch die Bindung von thrombozytärem P-Selektin mit PSGL-1 auf PMNs sowie von thrombozytärem PSGL-1 mit L-Selektin auf PMNs sogenannte Plättchen-Neutrophilen-Komplexe (engl.: *platelet-neutrophil-complexes*; PNCs) (Abbildung 2: A) (78-80). Die Interaktion von P-Selektin und PSGL-1 induziert zudem mittels Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen 1 und 3 (MAPK1/3) eine Konformationsänderung der Integrine auf PMNs, welche die transendotheliale Migration begünstigt (81).

Die Selektin-vermittelte Interaktion zwischen Thrombozyten und PMNs induziert weitere Interaktionen durch Integrine (Abbildung 2: B). Die PNC-Bildung sorgt beispielsweise für eine erhöhte Expression vom MAC-1 auf PMNs (80), welches

für die transendotheliale Migration der PMNs relevant ist (siehe Absatz 1.2.3) und mit dem Glykoprotein Iba (GP-Iba) auf Thrombozyten interagiert (82). Ein weiteres thrombozytäres Adhäsionsmolekül ist ICAM-2, welches das LFA-1 der PMNs bindet (83).

Die Thrombozyten fungieren als Bindeglied zwischen PMN und Endothel und unterstützen somit die Extravasation (*Abbildung 2: C*). Dabei bindet unter anderem PSGL-1 der Thrombozyten an endotheliales P-Selektin (84). In thrombozytopenen Mäusen ist die transendotheliale PMN-Migration in die Lunge signifikant reduziert, woraus sich schließen lässt, dass die Interaktion von Thrombozyten und PMNs für die Extravasation letzterer eine wichtige Rolle spielt (85).

Neben der Interaktion mithilfe von Adhäsionsmolekülen beeinflussen Thrombozyten PMNs auch durch die Sekretion von Zytokinen, wie beispielsweise IL-8 oder CCL7 (*Abbildung 2: D*) (86).

PNCs haben im Vergleich zu PMNs eine erhöhte Phagozytose-Kapazität (87). Thrombozyten steigern zudem die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (*engl.: reactive oxygen species*; ROS) durch die PMNs (88) und induzieren die Bildung und Freisetzung sogenannter NETs (*engl.: neutrophil extracellular traps*) (89, 90), wobei wiederum die Interaktion über P-Selektin eine Rolle spielt (91). Umgekehrt kann die Freisetzung von Stoffen wie ROS oder neutrophiler Elastase aus den PMNs auch die Aggregation und Degranulation von Thrombozyten induzieren (86), was für pulmonale Gefäßverschlüsse sorgen und damit eine Gewebeschädigung verursachen kann.

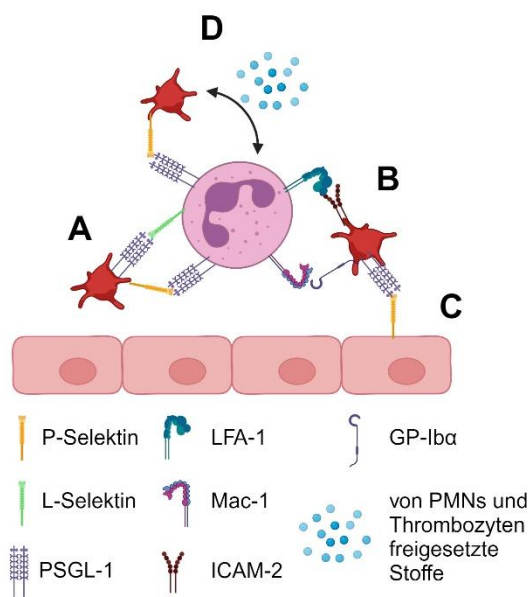


Abbildung 2: Bildung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen.

A: Selektin-vermittelte PNC-Bildung durch Interaktion von P-Selektin mit PSGL-1 sowie PSGL-1 mit L-Selektin.

B: Integrin-vermittelte PNC-Bildung unter Beteiligung von LFA-1, MAC-1, ICAM-2 und GP-Iba.

C: Interaktion der Thrombozyten mit dem Endothel unter anderem mithilfe von PSGL-1 und P-Selektin. Die Thrombozyten fungieren als Bindeglied zwischen PMN und Endothel.

D: Wechselwirkung von PMNs und Thrombozyten mithilfe von sezernierten Stoffen. Zytokine wie IL-8 oder CCL7 aus den Granulae der Thrombozyten stimulieren PMNs, während granulozytäre Sekretionsprodukte wie ROS oder neutrophile Elastase die Plättchenaggregation induzieren.

CCL7 = CC-Motiv Chemokin Ligand 7.
 ICAM-2 = intercellular adhesion molecule 2.
 LFA-1 = lymphocyte function-associated antigen 1.
 PSGL-1 = p-selectin glycoprotein ligand 1.

GP-Iba = Glykoprotein Iba.
 IL-8 = Interleukin 8.
 MAC-1 = macrophage antigen 1.
 ROS = reactive oxygen species.

[eigene Abbildung, Created in BioRender. Konrad, F. (2025) <https://BioRender.com/xfrbw6b>]

1.2.5 Die Rolle der neutrophilen Granulozyten im Rahmen des ARDS

Die Aktivierung der PMNs über Zytokine hat diverse Effekte: Sie moduliert die exprimierten Adhäsionsmoleküle, sorgt für eine Versteifung der Zelle, verzögert die Apoptose, reguliert die Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat-Oxidase (NADPH-Oxidase) hoch und bereitet die Zelle auf eine Degranulation vor (66). Die Versteifung sorgt zudem für eine verstärkte Sequestrierung der PMNs in der Lunge (92, 93).

Während der Degranulation (*Abbildung 3: A*) setzen PMNs diverse Proteine frei, deren Aufgabe es ist, Pathogene abzutöten, die allerdings bei übermäßiger Ausschüttung auch zur Schädigung und zum Umbau des Lungengewebes beitragen (94). Zu diesen Proteinen gehören unter anderem Matrix-Metalloproteasen (MMPs), Neutrophile Elastase und Myeloperoxidase (MPO) (94-96). Sowohl die membranständige NADPH-Oxidase als auch die freigesetzte MPO produzieren ROS (97, 98), welche einerseits eine Rolle bei der Pathogen-

Elimination spielen (99), andererseits aber auch für die Zerstörung des Lungengewebes mitverantwortlich sind (100).

Ein weiterer Mechanismus der PMNs zur Elimination von Pathogenen ist die Freisetzung von NETs, welche aus citrullinierten Histonen, DNA und Proteinen der Granulae bestehen und Erreger extrazellulär fangen und abtöten können (94, 101). Der Prozess der Freisetzung von NETs wird als NETose bezeichnet (*Abbildung 3: B*). Überschießende NETose führt durch die Obstruktion kleiner Atemwege oder durch die Thrombosierung pulmonaler Blutgefäße zur Schädigung des Lungengewebes und korreliert positiv mit dem Schweregrad und der Mortalität des ARDS (102-105).

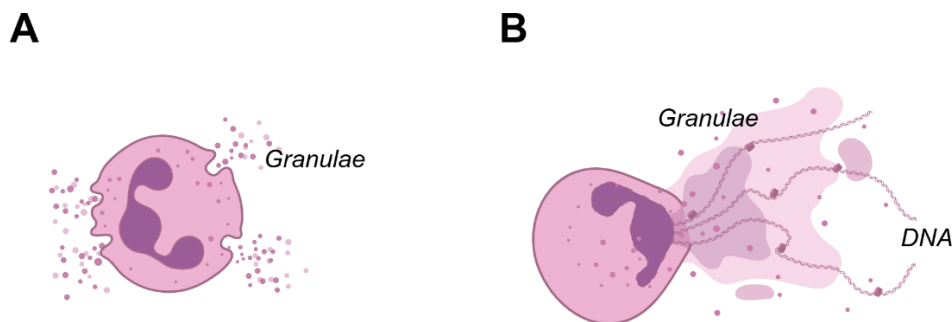


Abbildung 3: Degranulation und NETose neutrophiler Granulozyten.

A: Aktivierter PMN setzt Granulae frei. Diese enthalten diverse Proteine zur Erregerbekämpfung, schädigen allerdings auch das Lungengewebe. **B:** Aktivierter PMN bildet neutrophil extracellular traps (NETs), welche aus DNA, Granulae und Histonen bestehen und zur Elimination von Pathogenen beitragen.

[eigene Abbildung, Created in BioRender. Konrad, F. (2025) <https://BioRender.com/pym1yol>]

1.3 GABA_A-Rezeptoren und ihre Rolle im Rahmen der Inflammation

γ -Aminobuttersäure (engl.: *gamma-Aminobutyric acid*; GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS). Seine Wirkung entfaltet GABA über zwei verschiedene Typen von Rezeptoren, welche als GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren bezeichnet werden. GABA_B-Rezeptoren (GABA_BRs) sind metabotrope, G-proteingekoppelte Rezeptoren, während es sich bei GABA_A-Rezeptoren (GABA_ARs) um ionotrope Chloridkanäle handelt. GABA_ARs sind Heteropentamere, für deren Zusammensetzung 19 verschiedene Untereinheiten zur Verfügung stehen: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , ρ_{1-3} (106). Die

gängigste Konfiguration besteht aus zwei α - und zwei β - sowie einer γ -Untereinheit, andere Konfigurationen sind jedoch möglich (107). Außerhalb des ZNS konnten GABA_AR in diversen anderen Organen detektiert werden, unter anderem auch in der Lunge und auf Immunzellen (108). Die Expression von GABA_ARs mit α_1 -Untereinheit konnte dabei auf Monozyten, Makrophagen, T-Zellen und PMNs nachgewiesen werden (109-112).

Grundsätzlich lässt sich sagen, dass die Effizienz eines GABA_AR und seine Sensitivität für GABAerge Substanzen von den enthaltenen Untereinheiten abhängig ist (113, 114). In der Lunge werden GABA_ARs sowohl in der glatten Muskulatur der Atemwege (115) als auch auf Pneumozyten (116) exprimiert, wobei die pulmonale Expression der folgenden Untereinheiten nachgewiesen wurde: α_{1-6} , β_{1-2} , γ_{1-3} , ϵ , θ , π , ρ_{1-3} (117). Dabei besteht jedoch eine starke Heterogenität in Bezug auf die Quantität der Expression: während beispielsweise die Expression der α_1 - oder die β_2 -Untereinheit während der Entwicklung sukzessive zunimmt, wird die α_5 -Untereinheit während des Fetalstadiums stark, im adulten Stadium jedoch kaum exprimiert. Die α_1 -Untereinheit, welche Thema dieser Arbeit ist, ist die auf den meisten Immunzellen exprimierte α -Untereinheit (118).

Es konnte mehrfach nachgewiesen werden, dass GABA_ARs und GABAerges Signaling Inflammationsprozesse beeinflussen. Für das am GABA_AR wirkende Benzodiazepin Diazepam wurde durch Fernández et al. in einem murinen Modell für experimentelle Autoimmunenzephalitis gezeigt, dass es die Migration von Leukozyten zum Infektfokus inhibiert (119). Eine weitere Arbeit von Sanders et al. an einem murinen Modell für bakterielle Pneumonie kommt zu dem Schluss, dass für diesen Effekt die α_1 -Untereinheit relevant ist (109). Mit LPS stimulierte Peritonealmakrophagen produzierten nach zusätzlicher Stimulation mit GABA signifikant weniger der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12 (120). Während die bisher zitierten Arbeiten in verschiedenen Modellen einen antiinflammatorischen Effekt von GABA_ARs nachweisen konnten, entsteht bei Betrachtung der einzelnen Untereinheiten von GABA_ARs ein differenzierteres Bild. Seifi et al. konnten in einem Modell für stressinduzierte Kolitis eine

proinflammatorische Wirkung der α_3 -Untereinheit nachweisen (121). Ein Knock-Out der α_4 -Untereinheit wiederum zeigte in einem murinen Modell für eosinophiles Asthma proinflammatorische Effekte (122).

GABA_ARs sind als wichtiger inhibitorischer Rezeptor des ZNS Zielstruktur für verschiedene Medikamente im klinischen Gebrauch, neben Benzodiazepinen sind dies auch das intravenöse Anästhetikum Propofol sowie das volatile Anästhetikum Sevofluran. Beide interagieren darüber hinaus allerdings auch mit anderen Rezeptoren (123, 124).

Aufgrund ihrer Anwendung bei kritisch kranken Patient:innen wurde die Auswirkung von Sevofluran und Propofol auf das Inflammationsgeschehen bereits wissenschaftlich untersucht. Sowohl für Sevofluran als auch für Propofol konnte in murinen ALI-Modellen ein inhibitorischer Effekt auf die pulmonale PMN-Migration detektiert werden (125, 126). Es konnte des Weiteren für beide Medikamente im murinen ALI-Modell nachgewiesen werden, dass sie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-6 oder CXCL1/2 hemmen (127, 128). Für Propofol konnte in derselben Publikation zudem gezeigt werden, dass es zu einer gesteigerten pulmonalen GABA_AR-Expression kommt, GABAerges Signaling scheint also für den antiinflammatorischen Effekt eine Rolle zu spielen. Es werden für beide Substanzen jedoch noch weitere Wirkmechanismen diskutiert. Für Sevofluran wurde beispielsweise der Adenosin A_{2B}-Rezeptor als relevante Struktur identifiziert (127) und ein Eingriff in das CXCR2-Signaling als Mediator einer verringerten Integrin-Expression auf der PMN-Oberfläche in vitro nachgewiesen (129), während für Propofol eine GABA_AR-unabhängige Hemmung der ROS-Produktion von PMNs in vitro gezeigt werden konnte (130).

1.4 Fragestellung

Die Schädigung des Lungengewebes im Rahmen des ARDS ist maßgeblich auf eine überschießende Entzündungsreaktion zurückzuführen, weshalb eine antiinflammatorische Medikation, welche dieses unkontrollierte

Inflammationsgeschehen moduliert, ein sinnvoller Therapieansatz wäre. Dazu bedarf es allerdings einer geeigneten Zielstruktur, welche als Mediator dient. Diverse Studien haben gezeigt, dass GABA_ARs sowohl im Lungengewebe als auch auf Immunzellen exprimiert werden und eine immunmodulatorische Wirkung besitzen (109, 115, 116, 118, 121). Wie diese Wirkung aussieht, hängt allerdings maßgeblich von seiner Konfiguration ab, weshalb der Effekt der einzelnen Untereinheiten zu betrachten ist. Die α_1 -Untereinheit ist diejenige Untereinheit, welche auf Immunzellen am häufigsten exprimiert wird (118). Für sie konnte in verschiedenen Modellen bereits ein antiinflammatorischer Effekt nachgewiesen werden (109, 121). Für deren umfangreicheres Verständnis ist jedoch weitere Forschungsarbeit notwendig. Bisher gibt es keine Studien, welche konkret den Einfluss der α_1 -Untereinheit auf die Aktivierung und Migration von PMNs als integralem Bestandteil der ARDS-Pathophysiologie im Rahmen einer pulmonalen Inflammation untersuchen. Dies soll daher Inhalt der vorliegenden Arbeit sein. Daraus resultierend stellt sich für diese Dissertationsschrift folgende Frage:

„Welche Rolle spielt die α_1 -Untereinheit extraneuraler GABA_A-Rezeptoren für die Migration neutrophiler Granulozyten im Rahmen der pulmonalen Inflammation und des ARDS?“

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie	ID	Hersteller	Ort
ABTS	A1888-2G	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	3J002532	AppliChem	Darmstadt, DE
Aqua dest		eigene Herstellung	Tübingen, DE
Bovines Serum Albumin (BSA)	A3294	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Chloroform	C2432	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Disodium-EDTA 0,5 M	E-7889	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Ethanol für Molekularbiologie	A3678	AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
Eukitt Quick-hardening mounting medium	03989	Sigma Aldrich	St. Louis, USA
Formaldehyd (4%)	100496	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Glycerol	G5516	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Isopropanol	I9516	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix	1725124	Bio-Rad	München, DE
Hematoxylin QS Counterstain	H-3404	Vector Laboratories	Burlingame, USA
Natriumacid (NaN ₃)	S8032	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	52455	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Natriumhydrogen-carbonat (NaHCO ₃)	1063290500	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Nuclease Freies Wasser	A7398	AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
PBS Minus	18912014	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Single-Use Cocktail	78442	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
RNase Away	7002	Molecular BioProducts Inc.	San Diego, USA
Salzsäure (HCl)	A3452	AppliChem GmbH	Darmstadt, DE

Tween 20	A4974	AppliChem GmbH	Darmstadt, DE
TRIzol™ Reagent	15596026	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Türk'sche Lösung	93770	Merck KGaA	Darmstadt, DE
Xylol	131769	AppliChem GmbH	Darmstadt, DE

2.1.2 Enzyme

Enzym	ID	Hersteller	Ort
iScript cDNA Synthesis Kit	1708891	Bio-Rad	München, DE
Collagenase from Clostridium histolyticum	C7657	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
DNase from bovine pancreas	DN25	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Hyaluronidase from bovin testes	H3506	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA

2.1.3 FACS-Antikörper

FACS			ID	Hersteller	Ort
Cytometer Setup and Tracking Beads			642412	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA

Antikörper	Fluoreszenz	Klon	ID	Hersteller	Ort
Integrin α IIb β 3 (JON/A)	FITC	Leo.H4	M021-1	Emfret Analytics	Eibelstadt, DE
CD45	PerCP/Cy5.5	RA3-6B2	103130	BioLegend	San Diego, USA
Ly6G	PE-Cy7	1A8	127618	BioLegend	San Diego, USA
CD62L (L-Selektin)	PB	MEL-14	104424	BioLegend	San Diego, USA
CD62P (P-Selektin)	APC	RMP-1	148304	BioLegend	San Diego, USA
CD162 (PSGL-1)	PE	2PH1	555306	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA

CD11b	PB	M1/70	101224	BioLegend	San Diego, USA
CD11a/CD18 (LFA-1)	PE	H155-78	141006	BioLegend	San Diego, USA

2.1.4 Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Aqua dest. Herstellungs-Gerät	Purelab flex 2	Veolia Water Technologies	Paris, FR
Chemilumineszenz Reader	Fusion SL4	Vilber Lourmat	Eberhardzell, DE
Einbettssystem	EG1150H	Leica	Wetzlar, DE
Einschweißgerät	Impuls Sealer	Thyssen Edelstahlwerke	Krefeld, DE
ELISA Washer	hydro flex	Tecan	Männedorf, CH
Histokarussell	TP1020	Leica	Wetzlar, DE
Homogenisator	Precellys 24	Bertin technologies	Montigny-le- Bretonneux, FR
Inhalationskammer		Medizintechnische Werkstatt Uniklinikum	Tübingen, DE
Inkubationsschüttler	Infors HT Ecotron	Infors AG	Einsbach, DE
Inkubator	Heraeus Oven	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Kamera	Axiocam MRc	Zeiss	Oberkochen, DE
Mehrkanalpipette 100 µl	Research plus	Eppendorf	Hamburg, DE
Mehrkanalpipette 300 µl	Research plus	eppendorf	Hamburg, DE
Microplate Reader	Infinite M200 Pro	Tecan	Männedorf, CH
Mikrotom	RM2235	Leica	Wetzlar, DE
Mikroskop	DM IRB	Leica	Wetzlar, DE
Mikrowelle		Bosch	Stuttgart, DE
Multipipette	Multipipette plus	Eppendorf	Hamburg, DE
Nanodrop	NanoDrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE

Paraffinstreckbad	HI1210	Leica	Wetzlar, DE
Paraffinstrecktisch	HI1220	Leica	Wetzlar, DE
Pipetboy	Pipetboy acu	Integra Biosciences	Wallisellen, CH
Pipette 10 µl	Reference	Eppendorf	Hamburg, DE
Pipette 100 µl	Reference	Eppendorf	Hamburg, DE
Pipette 1000 µl	Reference	Eppendorf	Hamburg, DE
Pipette 20 µl	Research plus	Eppendorf	Hamburg, DE
Pipette 200 µl	Research plus	Eppendorf	Hamburg, DE
Sevofluran Vernebler	Dräger Vapor 2000	Drägerwerk AG & Co. KGaA	Lübeck, DE
Thermoblock	Thermomixer 5436	Eppendorf	Hamburg, DE
Thermocycler	T100 Thermal Cycler	Bio-Rad	München, DE
Thermocycler	C1000 Thermal Cycler CFX96 Real-Time System	Bio-Rad	München, DE
Tischmischer	Vortex Genie 2	Scientific Industries	New York, USA
Tischzentrifuge	Mini-Zentrifuge ROTILABO®	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Vernebler	MicroAir U100	OMRON Healthcare	Kyoto, JP
Waage	Mettler PK4800	Mettler	Gießen, DE
Waage	Kern ALS	Kern & Sohn GmbH	Balingen, DE
Wippschüttler	Wippschüttler ST5	CAT	Ballrechten-Dottingen, DE
Wippschüttler	Speci-Mix 92641	Bioblock Scientific	Dubuque, USA
Zentrifuge	Heraeus Fresco 17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0R	Thermo Fisher Scientific	Schwerte, DE

2.1.5 Lösungen

Lösung	ID	Hersteller	Ort
ELISA PBS ⁻		eigene Herstellung	Tübingen, DE
<i>Aqua dest.</i>	<i>1 l</i>		
<i>KCl</i>	<i>0,2 g</i>		
<i>KH₂PO₄</i>	<i>0,2 g</i>		
<i>NaCl</i>	<i>8,0 g</i>		
<i>Na₂HPO₄</i>	<i>1,4 g</i>		
<i>filtrieren</i>			
<i>pH auf 7,2 – 7,4 einstellen</i>			
ELISA Stopp Lösung:		eigene Herstellung	Tübingen, DE
<i>Aqua dest.</i>	<i>68 ml</i>		
<i>H₂SO₄ (18 M)</i>	<i>4 ml</i>		
Erythrozyten-Lysepuffer (Organe)		eigene Herstellung	Tübingen, DE
<i>Aqua dest.</i>	<i>1 l</i>		
<i>NH₄Cl</i>	<i>8,024 g</i>		
<i>NaHCO₃</i>	<i>0,84 g</i>		
<i>Disodium-EDTA</i>	<i>0,372 g</i>		
FACS Lysing Solution (Erythrozytenlyse)	349202	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
FACS Flow	342003	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
FACS Shutdown Solution	334224	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
FACS Clean Solution	340345	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
FACS Rinse Solution	340346	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA

FACS-Färbepuffer:		eigene Herstellung	Tübingen, DE
<i>Aqua dest.</i>	<i>1 l</i>		
<i>PBS Minus</i>	<i>2 Tabletten</i>		
<i>BSA</i>	<i>10 g</i>		
<i>NaN₃</i>	<i>5 ml</i>		
Substrate Reagent Pack (ELISA)	DY999	R&D Systems	Minneapolis, USA

2.1.6 Medikamente

Medikament	Wirkstoff	Dosierung	ID	Hersteller	Ort
Ketamin-hameln	Ketamin-hydrochlorid	50 mg/ml	03760898	Hameln Pharma Plus GmbH	Hameln, DE
Sedaxylan	Xylazin	20 mg/ml	615906	Dechra Pharmaceuticals	Northwich, GB
Heparin	Heparin-Natrium	5000 I.E./ml	059872	Leo Pharma GmbH	Neu-Isenburg, DE
LPS (Lipopolysaccharid)	LPS from Salmonella enteritidis	0,5 mg/ml	L6011	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
NaCl	Natriumchlorid	0,9 %	2350748	B. Braun	Melsungen, DE
Propofol 1%	Propofol	10 mg/ml	N01AX10	Fresenius Kabi	Bad Homburg v. d. Höhe, DE
SEVOrane	Sevofluran	100 % (V/V)	4456	AbbVie Inc.	North Chicago, USA

2.1.7 Primer für die RT-qPCR

Primer	Sequenz	Hersteller	Ort
m18s for	5'-gta acc cgt tga acc cca tt -3'	biomers.net	Ulm, DE
m18s rev	5'-cca tcc aat cgg tag tag cg -3'	biomers.net	Ulm, DE

mCXCL1 for	5'- aaa ccg aag tca tag cca cac -3'	biomers.net	Ulm, DE
mCXCL1 rev	5'- ggg gac acc ttt tag cat ctt -3'	biomers.net	Ulm, DE
mCXCL2/3 for	5'- atc cag agc ttg agt gtg acg -3'	biomers.net	Ulm, DE
mCXCL2/3 rev	5'- gcc ttg cct ttg ttc agt atc -3'	biomers.net	Ulm, DE
mMAPK1 for	5'- aat tgg tca gga caa ggg ctc -3'	biomers.net	Ulm, DE
mMAPK1 rev	5'- gag tgg gta agc tga gac gg -3'	biomers.net	Ulm, DE
mMAPK3 for	5'- agt ctc tgc cct cga aaa cc -3'	biomers.net	Ulm, DE
mMAPK3 rev	5'- act gtg atg cgc ttg ttt gg -3'	biomers.net	Ulm, DE
mTNF α for	5'- cgt cgt agc aaa cca cca ag -3'	biomers.net	Ulm, DE
mTNF α rev	5'- gaa cct ggg agt aga caa gg -3'	biomers.net	Ulm, DE

2.1.8 Proteinbestimmung mittels BCA-Methode

BCA	ID	Hersteller	Ort
Albumin Standard	23209	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	23225	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.1.9 Software

Software	Hersteller	Ort
AxioVision v4.8.2.0.	Zeiss	Oberkochen, DE
BioRender (web based)	BioRender	Toronto, CA
CFX Manager v3.1	Bio-Rad	München, DE
EVOLUTION-CAPT	Vilber Lourmat	Eberhardzell, DE
Excel 2016	Microsoft	Redmond, USA
FACSDiva Software v9	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Flow Jo v7.2.5	FlowJo LCC	Ashland, USA
GraphPad Prism v9	GraphPad Software, Inc.	San Diego, USA
ImageJ v1.54f	Wayne Rasband (NIH)	Bethesda, USA (Sitz der NIH)
Magellan v7.2	Tecan	Männedorf, CH

Nanodrop 2000 v1.6	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
PowerPoint 2016	Microsoft	Redmond, USA
Word 2016	Microsoft	Redmond, USA

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Produkt	ID	Hersteller	Ort
96-Well Platten für die Immunologie (ELISA-Platten)	436110	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Aura™ Atemschutzmaske 9320+	7000088723	3M	Saint Paul, USA
Deckgläser (24 x 60 mm)	01-2460/5	R. Langenbrinck GmbH	Emmendingen, DE
Einbettkassetten ROTILABO®	K113.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
FACS Falcon 5 ml	352052	Corning Inc.	Corning, USA
Falcon 15 ml	188271	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
Falcon 50 ml	10788561	Corning Inc.	Corning, USA
Filterpapier (10 cm)	CA20.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Filterpipettenspitze 10 µl kurz	07-602-8300	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Filterpipettenspitze 10 µl lang	07-612-8300	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Filterpipettenspitze 100 µl	07-642-8300	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Filterpipettenspitze 1000 µl	07-693-8300	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Filterpipettenspitze 20 µl	07-622-8300	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Filterpipettenspitze 200 µl	07-662-8300	nerbe plus GmbH	Winsen, DE
Gazin Mullkompressen	18500	Lohmann & Rauscher GmbH	Rengsdorf, DE
Kanüle Microlance 3 (22G)	300900	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Kanüle Microlance 3 (27G)	302200	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Kanüle Sterican (20G)	4657519	Braun Medical	Melsungen, DE
Nunc™ Kryoröhrchen 1,8 ml	10674511	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

Mehrkanalpipettenspitzen epT.I.P.S. [®] 10 ml	0030000811	Eppendorf	Hamburg, DE
Mehrkanalpipettenspitzen epT.I.P.S. [®] 200 µl	0030000870	Eppendorf	Hamburg, DE
Microtome Blade R35	0207500005	Feather	Osaka, JPN
Microseal 'B' PCR Plate Sealing Film	MSB101	Bio-Rad	München, DE
Multiplate [®] 96-Well PCR Plate	MLL9601	Bio-Rad	München, DE
Nitril Handschuhe	290419	Abena	Aabenraa, Dänemark
Nitril Handschuhe	942202	Paul Hartmann AG	Heidenheim, DE
Objektträger SuperFrost Plus (75 x 25 mm)	03-0060	R. Langenbrinck GmbH	Emmendingen, DE
Parafilm M Verschlussfolie	5170002	Omnilab	Bremen, DE
Paraplast Plus	X881.1	Leica	Wetzlar, DE
Pasteurpipette 3ml	LW4112	Alpha Laboratories Limited	Eastleigh, UK
Pipettenspitze 10 µl	701130600	Sarstedt	Nürnbrecht, DE
Pipettenspitze 1000 µl	701181	Sarstedt	Nürnbrecht, DE
Pipettenspitze 20 µl	701116	Sarstedt	Nürnbrecht, DE
Pipettenspitze 200 µl	70760002	Sarstedt	Nürnbrecht, DE
Reaktionsgefäß 0,2 ml (RNase frei)	XT87.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Reaktionsgefäß 1,5 ml	616201	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE
Reaktionsgefäß ROTILABO [®] (RNase frei) 1,5 ml	EA84.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Spritze 1 ml	300013	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA
Spritze 10 ml Injekt Luer Solo	4606108V	Braun Medical	Melsungen, DE
Spritze 2 ml Injekt Luer Solo	4606027V	Braun Medical	Melsungen, DE
Spritze 5 ml Injekt Luer Solo	4606051V	Braun Medical	Melsungen, DE
Stripette 10 ml	10608261	Corning Inc.	Corning, USA
Stripette 25 ml	10024420	Corning Inc.	Corning, USA
Stripette 5ml	10156420	Corning Inc.	Corning, USA

Verschlussfolie ROTILABO®	EN76.1	Carl Roth GmbH	Karlsruhe, DE
Zellsieb (70 µm Porengröße)	542070	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, DE

2.2 Überblick

Forschungsgegenstand dieser Arbeit war der Einfluss der $\alpha 1$ -Untereinheit extraneuraler GABA_ARs auf die akute Lungenschädigung. Hierfür wurde ein, in der Arbeitsgruppe etabliertes, murines Modell für pulmonale Inflammation verwendet, welches die Inflammation durch Inhalation von vernebeltem LPS induziert (131). Durchflusszytometrisch wurden in Blut, Lungengewebe und BAL Leukozyten, PMNs und die Formierung von PNCs sowie die Expression relevanter Selektine und Integrine auf deren Oberfläche quantifiziert. Die Untersuchung der intrapulmonalen Genexpression von Entzündungsmediatoren erfolgte mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR). Freigesetzte Zytokine in der BAL wurden mithilfe von Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) bestimmt. In der BAL wurden zudem die MPO-Freisetzung als Marker für die Aktivität der PMNs sowie die Proteinextravasation mittels Bicinchoninsäure-Methode (*engl.: Bicinchoninic acid, BCA*) untersucht. Die alveoläre Septumdicke, gemessen in histologischen Präparaten, diente als Indikator für eine Veränderung der Lungenarchitektur (*Abbildung 4*).

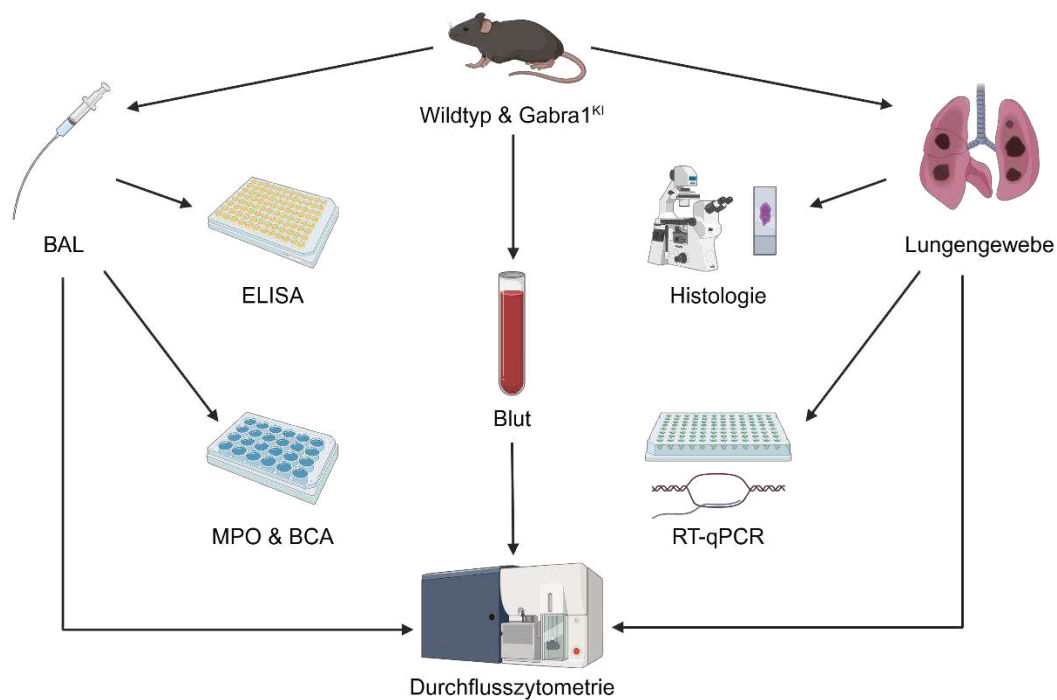


Abbildung 4: Übersicht der verwendeten Methoden.

Blut, BAL (bronchoalveoläre Lavage) und Lungengewebe aus Mäusen wurden für die Durchflusszytometrie verwendet. In der BAL wurden zudem mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Zytokinkonzentrationen bestimmt sowie die Protein-Extravasation mittels Bicinchoninsäure-Methode (BCA) und die Freisetzung von Myeloperoxidase (MPO) aus PMNs als Marker für deren Aktivität gemessen. Aus dem Lungengewebe wurden zusätzlich histologische Präparate angefertigt und mittels quantitativer real-time Polymerasekettenreaktion (RT-qPCR) die Expression relevanter Gene untersucht.

[eigene Abbildung, Created in BioRender. Konrad, F. (2025) <https://BioRender.com/5atfg7i>]

2.3 In vivo Migration polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten: Pulmonale Inflammation im murinen Modell

2.3.1 Überblick

Im Tierversuchsmodell wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse verwendet. Diese waren zum Versuchszeitpunkt zwischen 8 und 12 Wochen alt. Es wurden Wildtyp Mäuse (WT) vom Typ C57BL/6J von Charles River Laboratories und Tiere mit einem Knock-In des Gens für die $\alpha 1$ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors (Gabra1^{KI}) vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Zürich (internationale Bezeichnung: B6.129P2-Gabra1^{tm1.1Uru/Uru}) verwendet. Das Genom der Tiere wurde so modifiziert, dass die Aminosäure Histidin an Position 101 in der $\alpha 1$ -Untereinheit

des GABA_AR durch Arginin ersetzt wurde (132). Diese Mutation ist klinisch stumm und wird erst in Gegenwart eines Benzodiazepins wirksam. Zur Induktion des Knock-Ins wurden 30 Minuten vor Beginn der LPS-Inhalation oder vor der Applikation weiterer Medikamente (siehe Absatz 2.3.3) 15µg/kg KG Midazolam intraperitoneal (i.p.) injiziert. Zur Vergleichbarkeit der Genotypen erhielten die WT-Tiere eine identische Dosis Midazolam.

Die Versuchstiere waren bei 22 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% in Käfigen mit bis zu fünf Individuen untergebracht. Ein zwölfstündiger Tag-Nacht-Rhythmus wurde gewährleistet. Eine Genehmigung der Versuche durch das Regierungspräsidium Tübingen liegt vor, das entsprechende Aktenzeichen lautet: A02/20G.

2.3.2 LPS-Inhalation

Für die LPS-Inhalation wurden je 4 Tiere in eine Inhalationskammer gesetzt, welche auf der einen Seite mit einem Vernebler konnektiert und auf der gegenüberliegenden Seite an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen war. So konnte ein kontinuierlicher Luftstrom in der Kammer gewährleistet werden. Das LPS, gewonnen aus dem Bakterienstamm *Salmonella enteritidis*, war in einer Konzentration von 500 µg/ml in Phosphat-gepufferter Elektrolytlösung (PBS-) gelöst. Mithilfe des Verneblers wurden 7,5 ml der LPS-Lösung verdampft und diese durch die Sogwirkung des Wasserstrahls in die Kammer geleitet, wo der Dampf von den Mäusen inhaliert wurde (*Abbildung 5*). Die Inhalation wurde beendet, sobald die LPS-Lösung komplett verdampft war, in der Regel nach etwa 30 Minuten.

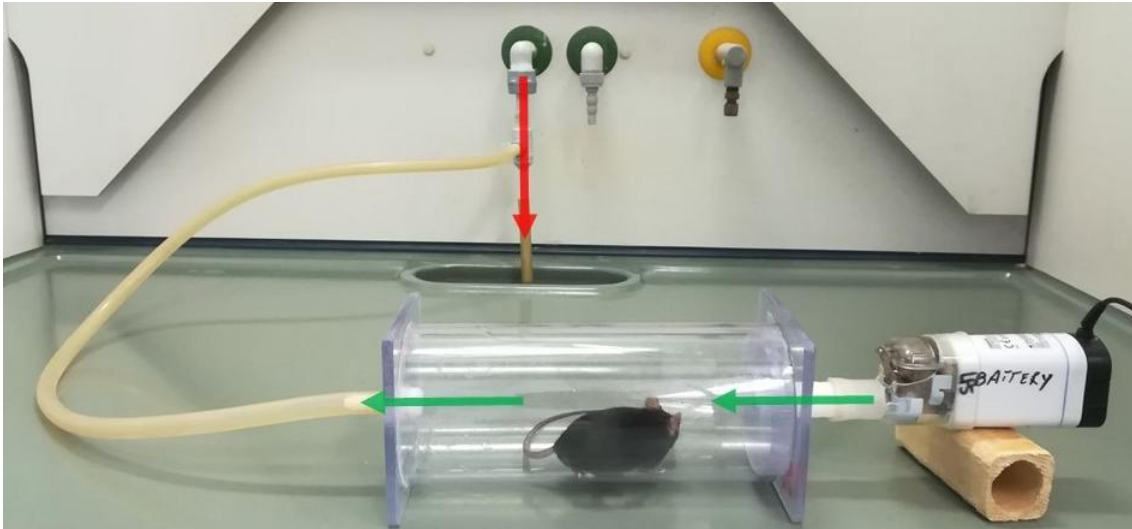


Abbildung 5: Modell der LPS-Inhalation.

Der Vernebler (rechts) ist mit einer Inhalationskammer konnektiert, in welcher sich die Versuchstiere befinden. Auf der anderen Seite generiert eine Wasserstrahlpumpe einen konstanten Sog, durch welchen das vernebelte LPS kontinuierlich durch die Kammer strömt, wo es von den Versuchstieren eingeatmet wird.

Grüne Pfeile = Weg des LPS-Dampfs. Roter Pfeil = Weg des Wassers. LPS = Lipopolysaccharid, gewonnen aus *Salmonella enteritidis*.

[eigene Abbildung, erstellt mit PowerPoint, Photographie durch Roediger, R.]

2.3.3 Pharmakologische Vorbehandlungen

30 Minuten nach der Induktion des Knock-Ins mithilfe von Midazolam (siehe Absatz 2.3.1) folgte entweder die LPS-Inhalation (Absatz 2.3.2) oder die Applikation eines weiteren Medikaments. Einer Kohorte wurde inhalativ Sevofluran verabreicht. In einem Versuchsaufbau analog zur Stimulation mit LPS (Absatz 2.3.2) inhalierten die Tiere für 30 Minuten 2 %vol. Sevofluran. 30 Minuten später erfolgte die LPS-Inhalation. Einer weiteren Kohorte wurden 50 µg/kg Propofol i.p. injiziert. Darauf folgte eine Inkubationszeit von 60 Minuten bis zur LPS-Inhalation. Kontrolltiere erhielten anstelle der LPS-Inhalation eine Inhalation mit einer 0,9%-Natriumchlorid-Lösung (NaCl) (Abbildung 6).

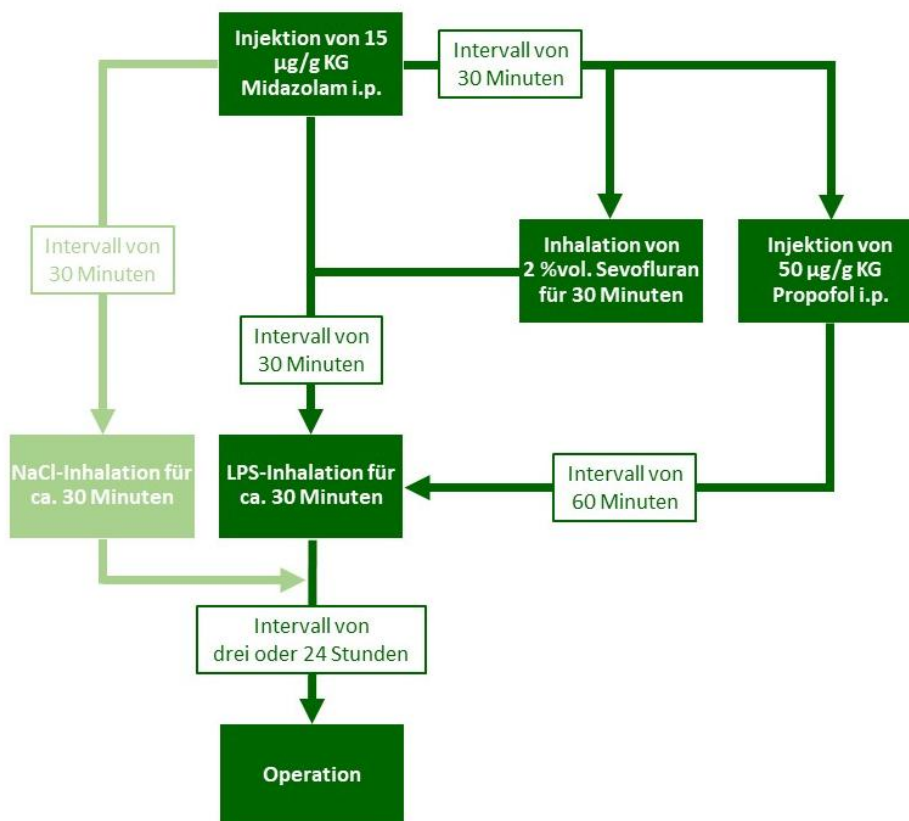


Abbildung 6: Pharmakologischen Vorbehandlung.

Jedem Versuchstier wurden 15 µg/g KG Midazolam i.p. injiziert. Nach einem Inkubationsintervall von 30 Minuten schloss sich entweder die LPS-Inhalation an oder es wurde ein weiteres Medikament appliziert. Sevofluran: 30 Minuten Inhalation mit 2 %vol., Propofol: 50 µg/g KG i.p. Nach der Sevofluraninhalation folgte eine Inkubationszeit von 30 Minuten, nach der Propofolinjektion betrug die Inkubationszeit 60 Minuten. Anschließend fand die LPS-Inhalation statt. Drei, bzw. 24 Stunden nach Beginn der LPS-Inhalation folgte die Organentnahme. Die Kontrollgruppe inhalierte 30 Minuten nach der Midazolam-Injektion 0,9%ige NaCl-Lösung (hellgrüner Pfeil).

i.p. = intraperitoneal. KG = Körpergewicht. LPS = Lipopolysaccharid. NaCl = Natriumchlorid.

[eigene Abbildung, erstellt mit PowerPoint]

2.3.4 Organentnahme

Die Entnahme der Organe erfolgte je nach Verwendungszweck der Proben drei oder 24 Stunden nach Beginn der LPS-Inhalation. Präoperativ bekamen die Mäuse eine gewichtsadaptierte subletale Narkosedosis der folgenden Lösung i.p. injiziert (Tabelle 2):

Tabelle 2: Zusammensetzung der Narkose.

Medikament	Wirkstoff	Dosierung	ID; Hersteller; Ort	Menge
Ketamin-hameln	Ketamin-hydrochlorid	50 mg/ml	03760898; Hameln Pharma Plus GmbH; Hameln, DE	1,2 ml
Sedaxylan	Xylazin	20 mg/ml	1906602; Dechra Pharmaceuticals; Northwich, GB	0,4 ml
NaCl	Natriumchlorid	0,9 %	02737756; Braun; Melsungen, DE	8,4 ml
Gesamt				10 ml

Nachdem mittels Zwischenzehenreflextest eine suffiziente Narkosetiefe festgestellt worden war, wurde die Maus in Rückenlage positioniert und die Extremitäten sowie der Kopf fixiert. Das Fell wurde mit Glycerol benetzt, um eine Kontamination der Proben mit Haaren zu vermeiden. Beginnend von submandibulär wurde die Haut bis zur Beckenregion eröffnet. Anschließend wurde das Peritoneum und darauffolgend das Diaphragma stumpf eröffnet, was zum Kollaps beider Lungenflügel führte. Nun wurde der Thorax beidseits lateral der Musculi pectorales eröffnet, und das Thoraxschild nach oben fixiert, sodass der Thoraxsitus zugänglich war. Mit einer Heparin-benetzten Spritze wurden aus dem rechten Ventrikel mindestens 500 µl Blut entnommen, in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt und sofort in einem Wasserbad mit 37 °C gelagert. Infrahepatisch wurden die großen Bauchgefäße durchtrennt, im Anschluss der rechte Ventrikel erneut punktiert und der Lungenkreislauf mit 2,5 ml PBS⁻ gespült, um die in den Lungengefäßen zirkulierenden Leukozyten herauszuwaschen. Die Trachea wurde freipräpariert und mit einer Kanüle punktiert, welche als Tubus diente und mit einem Nähgarnknoten in der Trachea fixiert wurde. Es erfolgte eine BAL mit PBS⁻, bei der 2 ml Lavage gewonnen wurden, welche in einem FACS-Röhrchen (*fluorescence-activated cell sorting/scanning* (dt.: Fluoreszenz-aktivierte(s) Zellsortierung/Scannen)) auf Eis gelagert wurde. Abschließend wurde das Herz-Lungen-Paket am Lungenhilus abpräpariert. Der rechte Ober- und Unterlappen wurden in ein Kryotube überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Es folgte eine Asservierung bei -80 °C, sodass die Proben zu

einem späteren Zeitpunkt für RT-qPCRs verwendet werden konnten. Der rechte Mittellappen sowie der linke Lungenflügel wurden mechanisch zerkleinert und mit einer Enzymlösung (*Tabelle 3*) in ein 50 ml Falcon gegeben. Der enzymatische Verdau des Gewebes erfolgte über einen Zeitraum von 30 Minuten in einem Inkubationsschüttler bei 37 °C und 70 rpm.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Enzymlösung für den Verdau des Lungengewebes.

Enzym	ID; Hersteller; Ort	Menge/Maus
Collagenase XI from <i>Clostridium histolyticum</i>	C7657; Sigma-Aldrich; St. Louis, USA	2,5 µl
DNAse from bovine pancreas	DN25; Sigma-Aldrich; St. Louis, USA	2,5 µl
Hyaluronidase from bovine testes	H3506; Sigma-Aldrich; St. Louis, USA	2,5 µl
PBS ⁻	Gibco; Carlsbad, USA	2,425 ml
Gesamt		2,5 ml

2.3.5 Blut, BAL und Lungengewebe

Die Leukozytenzahl der Blutproben wurde lichtmikroskopisch bestimmt. Die Auszählung erfolgte in 1:10 Verdünnung mit Türk'scher Lösung in einer Neubauerzählkammer. Für jede FACS-Probe wurden 25 µl entnommen und anschließend das verbliebene Blut bei 13.000 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert, um daraus Plasma zu asservieren.

Die BAL wurde bei 1.300 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und jeweils 1 ml des Überstands für Proteinassays und ELISA aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Das Zellpellet wurde bei unstimulierten Proben mit 330 µl und bei stimulierten Proben mit 500 µl Färbepuffer (*Tabelle 4*) resuspendiert und wie bei den Blutproben ebenfalls die Leukozytenzahl bestimmt. Anschließend wurde die Probe soweit verdünnt oder konzentriert, dass die relative Zellzahl bei 200.000/100µl lag.

Nachdem das Lungengewebe für 30 Minuten inkubiert hatte, wurde es mit dem Konus einer Spritze durch ein Zellsieb mit 70 µm großen Poren gedrückt und mit circa 20 ml PBS⁻ nachgespült. Die entstandene Zellsuspension wurde bei 1.300

rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde zur Lyse der Erythrozyten mit 2,5 ml Lysepuffer (*Tabelle 5*) resuspendiert und für 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Lyse mit 17,5 ml Färbepuffer gestoppt und die Suspension erneut bei 1.300 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet mit 1-2 ml Färbepuffer resuspendiert. Nun wurde ebenfalls die Leukozytenzahl bestimmt und durch Verdünnung oder Konzentration eine relative Zellzahl von 200.000/100 µl erreicht.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Färbepuffers (für 1 Liter).

Substanz	ID	Hersteller	Ort	Menge
Aqua dest		eigene Herstellung	Tübingen, DE	1 Liter
PBS-	18912014	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA	2 Tabletten
Bovines Serumalbumin	A3294	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA	10 g
NaN ₃	08591	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA	5 ml

Tabelle 5: Zusammensetzung des Erythrozyten-Lysepuffers für Organe (für 1 Liter).

Substanz	ID	Hersteller	Ort	Menge
Aqua dest		eigene Herstellung	Tübingen, DE	1 Liter
NH ₄ Cl	3J002532	AppliChem	Darmstadt, DE	8,024 g
NaHCO ₃	K10720529	Merck KGaA	Darmstadt, DE	0,84 g
Disodium EDTA	ED4S	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA	0,372 g

2.3.6 Färbung der Proben für die FACS-Analyse

Die Zellen aus Blut, Lunge und BAL wurden mittels Durchflusszytometrie (*Absatz 2.4*) analysiert. Für die Identifikation unterschiedlicher Zellpopulationen und die Quantifizierung der Oberflächenexpression von Proteinen werden in der Durchflusszytometrie monoklonale, fluoreszenzkonjugierte Antikörper verwendet. Die verwendeten Antikörper wurden in zwei Antikörper-Mixes aufgeteilt. Es wurde von jedem Kompartiment (Blut, Lunge, BAL) je eine FACS-

Probe für beide Antikörper-Mixe vorbereitet. Zusätzlich wurden ungefärbte Proben (*engl.: unstained*) und Proben, bei denen je ein Antikörper aus dem Mix nicht verwendet wurde, (*engl.: fluorescence minus one; FMO*) hergestellt. Diese wurden bei der Auswertung benötigt, um korrekte Gates zu setzen, wobei die *FMO*-Proben als explizite Negativkontrolle des jeweiligen Antikörpers dienen, da sie im Gegensatz zu den *unstained*-Proben die Einflüsse der anderen Antikörper auf den zu untersuchenden berücksichtigen. In jedes FACS-Röhrchen wurden 50 µl des entsprechenden Antikörper-Mixes pipettiert, für die *unstained*-Proben wurden 50 µl Färbepuffer verwendet. Hinzu kamen jeweils 100 µl der BAL- oder Lungen-Zellsuspension oder 25 µl Vollblut. Die BAL- und Lungen-Proben wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert und anschließend je 2 ml Färbepuffer hinzugegeben. Die Blutproben wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Dann wurde jeweils 1 ml Erythrozytenlyse hinzupipettiert und für weitere 10 Minuten inkubiert. Nun wurde 1 ml Färbepuffer hinzugegeben. Alle Proben wurden bei 1.300 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal mit 2 ml Färbepuffer wiederholt und im Anschluss wurden die Zellen mit 400 µl 2%igem Formaldehyd fixiert. Bis zur Analyse wurden die Proben lichtgeschützt bei 4 °C gelagert. Die Analyse erfolgte stets innerhalb von 24 Stunden.

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie macht sich die Größe, Granularität und Beschaffenheit der Zelloberfläche zunutze und wird mit einem FACS-Gerät durchgeführt. Die Probenflüssigkeit wird durch eine Mikrokanalküvette zu einer Düse geleitet, wobei sie von einem Hüllstrom umgeben ist, welcher die Probe fokussiert. Durch die Düse entstehen kleine Tröpfchen mit einzelnen Zellen, welche dann an einem Laser vorbeigeleitet werden. Dabei werden zwei Signale gemessen: Die Intensität des in kleinen Winkeln gestreuten Lichts (Vorwärtsstreuung, *engl.: forward scattered channel; FSC*) sowie die Intensität des in großen Winkeln

gestreuten Lichts (Seitwärtsstreuung, engl.: *side scattered channel*; SSC). Das FSC ist ein Maß für das Volumen einer Zelle, das SSC für ihre Granularität (Abbildung 7: A). Werden diese beiden Werte in einem Dot-Plot-Diagramm gegeneinander aufgetragen, kann man bereits einzelne Zellpopulationen – Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten – identifizieren und voneinander abgrenzen (Abbildung 7: B).

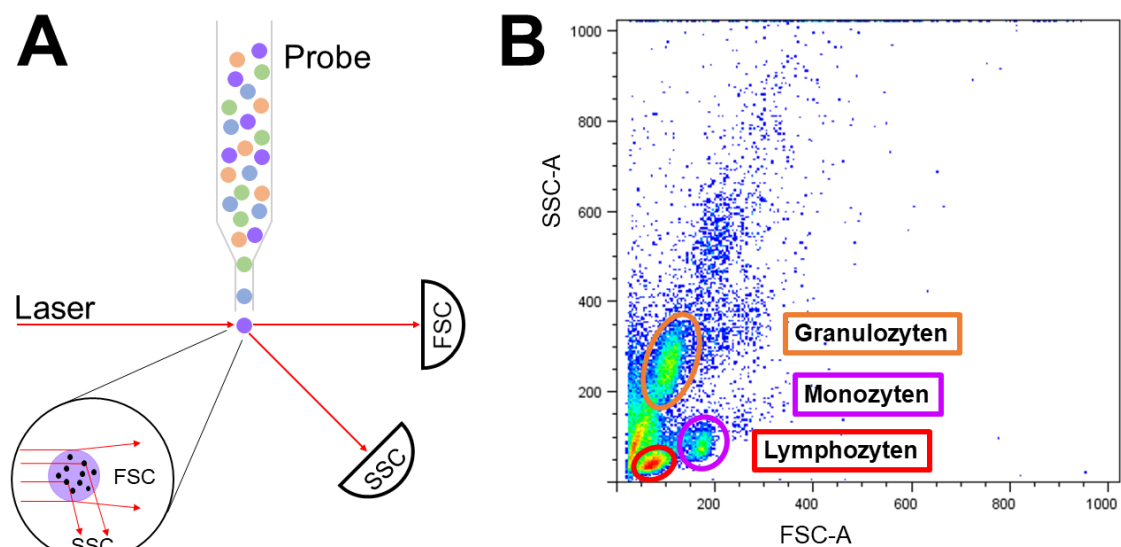


Abbildung 7: Prinzip der Durchflusszytometrie.

A: Die Vorwärtsstreuung (engl.: *forward scattered channel*; FSC) wird durch das Zellvolumen determiniert, die Seitwärtsstreuung (engl.: *side scattered channel*; SSC) durch die Zellgranularität. **B:** Im FSC-SSC-Dot-Plot einer Blutprobe sind Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten grob identifizierbar.

[eigene Abbildung, erstellt mit FlowJo und PowerPoint]

Zur Differenzierung von Subpopulationen bestimmter Zellarten, wurden mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierte monoklonale Antikörper verwendet (Tabelle 7). Diese binden spezifisch an ein Oberflächenprotein der Zelle und ihr konjugierter Fluoreszenzfarbstoff emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge. Auf diese Art und Weise können einzelne Zellpopulationen gezielt markiert werden.

2.4.2 Material

Für die Durchflusszytometrie wurde das FACS CANTO™ II (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) verwendet, welches mit 3 Lasern ausgestattet ist:

Tabelle 6: Laser des BD Biosciences FACS Canto™ II (133).

Laser	Wellenlänge	Leistung
<i>Violet</i>	405 nm	30 mW solid state
<i>Blue</i>	488 nm	20 mW solid state
<i>Red</i>	633 nm	17 mW HeNe

Die Aufnahme der FACS-Messdaten erfolgte mit der Software BD FACSDiva (Version 9 von BD Biosciences, Franklin Lakes, USA). Für die anschließende Analyse der Daten (siehe Absatz 2.4.4) wurde die Software FlowJo (Version 7.2.5 von FlowJo LCC, Ashland, USA) verwendet.

Es wurden folgende konjugierte monoklonale Antikörper zur Fluoreszenzmarkierung der Zellen verwendet:

Tabelle 7: Für die FACS-Analyse verwendete Antikörper.

APC = Allophycocyanin.

FITC = Fluorescein-Isothiocyanat.

PB = Pacific Blue.

PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cyanin 7.

CD = Cluster of Differentiation.

Ly6G = Lymphozyten-Antigen 6 Komplex, Lokus G.

PE = Phycoerythrin.

PerCP/Cy5.5 = Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex/Cyanin 5.5.

Antikörper	Fluoreszenz	Klon	Menge/Probe
Integrin α IIb β 3 (JON/A)	FITC	Leo.H4	2,5 μ l
CD45	PerCP/Cy5.5	RA3-6B2	1,0 μ l
Ly6G	PE-Cy7	1A8	1,0 μ l
CD62L (L-Selektin)	PB	MEL-14	1,0 μ l
CD62P (P-Selektin)	APC	RMP-1	1,0 μ l
CD162 (PSGL-1)	PE	2PH1	1,0 μ l
CD11b	PB	M1/70	1,0 μ l
CD11a/CD18 (LFA-1)	PE	H155-78	1,0 μ l

JON/A (andere Namen: GP-IIb/IIIa, Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$) wurde für die Identifikation von aktivierten Thrombozyten verwendet. CD45 ist ein allgemeiner Leukozytenmarker, Ly6G (Lymphozyten-Antigen 6 Komplex, Lokus G) diente der Identifikation von neutrophilen Granulozyten. Die weiteren Antikörper binden an für die Transmigration relevante Oberflächenproteine und für sie wurde die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI; *engl.: mean fluorescence intensity*) ermittelt, um die Oberflächenexpression der entsprechenden Proteine zu quantifizieren (*Absatz 2.4.4.1*).

2.4.3 Durchführung

Zur Baseline-Kalibrierung der Laser des Durchflusszytometers war es vor Beginn jeder Messung notwendig, ein „Cytometer Setup and Tracking“ durchzuführen. Hierfür wurden Cytometer Setup Tracking Beads (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) genutzt. Es wurden 10.000 Events bei einer Medium-Flussrate gemessen.

2.4.4 Auswertung

Werden mehrere Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, ist nicht auszuschließen, dass es zu Überschneidungen zwischen deren Emissionsspektren kommt. Dem wird mithilfe einer Kompensation entgegengewirkt. Im Rahmen der Kompensation wird von der Fluoreszenz-Emission jedes Fluorochroms ein festgelegter relativer Betrag subtrahiert. Zur Ermittlung dieses relativen Betrags wurden zu Beginn Einzelfärbungen (*engl.: single stainings*) für jeden Farbstoff und jedes Kompartiment (BAL, Lunge und Blut) durchgeführt, anhand derer eindeutig positive und negative Bereiche definiert werden konnten. Wenn Zellen nur mit einem Farbstoff in Kontakt gekommen sind, muss es sich bei einer Emission zwangsweise um diesen Farbstoff handeln (positiver Bereich). Gibt es keine Emission, befindet man sich folglich im negativen Bereich. Aus diesen positiven und negativen Werten wurde eine Matrix generiert, welche auf jede zu analysierende Probe angewendet wurde.

Um einzelne Zellpopulationen zu identifizieren, wurde das Prinzip des *Gating* genutzt. Dies bedeutet, dass mithilfe der verwendeten Oberflächenmarker eine Zellpopulation in immer differenziertere Subpopulationen unterteilt wurde. Zur Veranschaulichung des Prozederes dient die Analyse einer Blutprobe. Zunächst wurde im FSC-SSC Dot-Plot-Diagramm ein Gate für Leukozyten gesetzt (*Abbildung 8: A*). In der Leukozyten-Population wurden die mit Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex/Cyanin 5.5 (PerCP/Cy5.5) markierten, CD45-positiven Zellen bestimmt (*Abbildung 8: B*). Von den CD45-positiven Zellen wurde anschließend der Anteil der Phycoerythrin-Cyanin 7 (PE-Cy7) markierten, Ly6G-positiven Zellen determiniert, bei denen es sich um PMNs handelt (*Abbildung 8: C*). In einem letzten Schritt wurde der Anteil der PNCs berechnet. Diese sind sowohl Ly6G+ (PMNs), als auch JON/A+ (Thrombozyten), während die PMNs ausschließlich Ly6G+ sind (*Abbildung 8: D*). Der JON/A-Antikörper war mit Fluorescein Isothiocyanat (FITC) konjugiert.

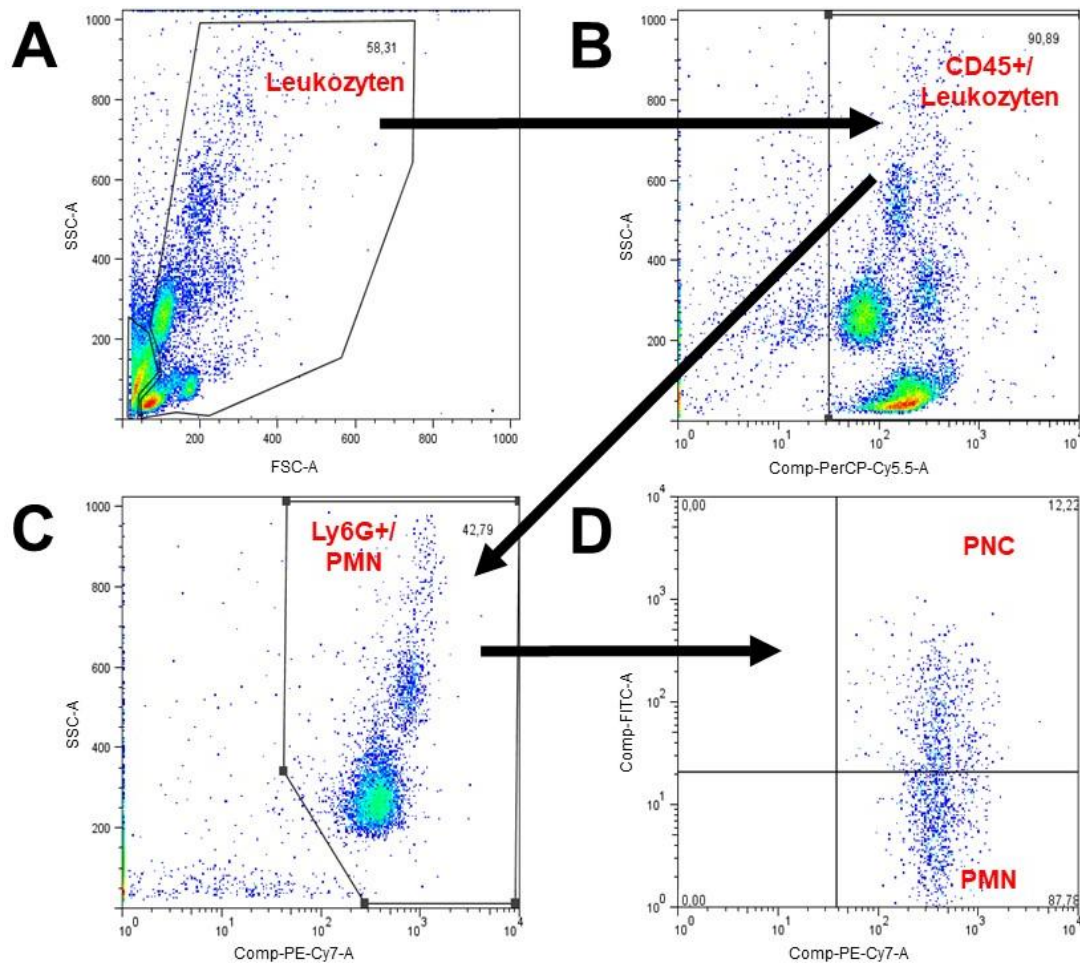


Abbildung 8: Gating-Prinzip der FACS-Analyse.

A: Leukozytengate im FSC-SSC-Diagramm. **B:** Gating der CD45-positiven Zellen (Leukozyten) im PerCP/Cy5.5-SSC-Diagramm. **C:** Gating der Ly6G-positiven Zellen (polymorphkernige neutrophile Granulozyten; PMNs) im PE-Cy7-SSC-Diagramm. **D:** Differenzierung zwischen JON/A-positiven Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs) und JON/A-negativen PMNs im PE-Cy7-FITC-Diagramm.

FITC = Fluorescein Isothiocyanat. FSC = forward scattered channel (dt.: Vorwärtsstreuung).

PE-Cy7 = Phycoerythrin-Cyanin 7. PerCP/Cy5.5 = Peridinin-Chlorophyll-Protein Komplex/Cyanin 5.5.

SSC = side scattered channel (dt.: Seitwärtsstreuung).

[eigene Abbildung, erstellt mit FlowJo und PowerPoint]

In den Gates wurde der prozentuelle Anteil der ausgewählten Subpopulation an der Gesamtzellpopulation angegeben. Aus diesen Prozentzahlen und der zuvor mithilfe der Neubauer-Zählkammer ermittelten Gesamtzellzahl ließen sich absolute Zahlen für die einzelnen Subpopulationen ermitteln.

2.4.4.1 Mittlere Fluoreszenz-Intensität

Für die drei definierten Zellpopulationen (Leukozyten, PMNs und PNCs) wurde die Expression von L-Selektin, P-Selektin, PSGL-1, CD11b und LFA-1 bestimmt. Dafür wurden in FlowJo die MFIs dieser Zelloberflächenmarker ermittelt, wobei der geometrische Mittelwert verwendet wurde. Auf diese Art und Weise konnte festgestellt werden, ob es signifikante Unterschiede in der Expression besagter Marker zwischen den Genotypen gibt.

2.5 Histologie

2.5.1 Vorbehandlung und operatives Vorgehen

Zur Gewinnung der Gewebeproben für die Erstellung histologischer Präparate wurde in Bezug auf die Vorbehandlungen identisch vorgegangen wie bei den Tieren für die Durchflusszytometrie (siehe Absatz 2.3.3). Es wurden allerdings lediglich Tiere mit einem Stimulationsintervall von 24 Stunden verwendet. Das Operationsverfahren war bis zur Tracheotomie ebenfalls identisch mit dem in Absatz 2.3.4 beschriebenen. Über die Tracheotomiekanüle wurde die Lunge mit 4%igem Formaldehyd gefüllt und 15 Minuten fixiert. Anschließend wurde die Lunge entnommen, rechter und linker Lungenflügel in getrennte Einbettkassetten überführt und für sechs Stunden in 4%igem Formaldehyd aufbewahrt.

2.5.2 Anfertigung der histologischen Präparate

Nach erfolgter Fixierung in Formaldehyd wurden die Präparate entwässert, bevor sie in Paraffin eingebettet werden konnten, da Paraffin nicht wasserlöslich ist. Hierzu wurden sie mithilfe des Einbettkarussells TP1020 der Firma Leica einer aufsteigenden Ethanolreihe (50% bis 100%) zugeführt. Im vorletzten Schritt wurde das Ethanol durch Xylol ersetzt und abschließend die Präparate in flüssiges Paraffin getaucht.

Mithilfe des Einbettsystems EG1150H von Leica wurden die Organe in Paraffinblöcke eingebettet und anschließend mit einem Mikrotom (RM2235,

Leica, Wetzlar, DE) 3 µm dicke Schnitte angefertigt, auf einen Objektträger aufgebracht und über Nacht auf einem Paraffinstrecktisch getrocknet.

2.5.3 Färbung der histologischen Präparate

Vor der Färbung mussten die Präparate zunächst entparaffiniert werden. Hierzu wurden sie in die folgende Alkohol-Reihe überführt:

Tabelle 8: Alkoholreihe zur Entparaffinierung der histologischen Präparate.

Alkohol	Dauer
3x Xylol	3x 7 Minuten
2x Ethanol 100%	2x 5 Minuten
2x Ethanol 96%	2x 5 Minuten
2x Ethanol 70%	2x 5 Minuten

Anschließend wurden die Proben für zehn Minuten in Aqua dest. gespült und die Zellstrukturen mit Hämatoxylin gefärbt. Die Inkubationszeit betrug dabei fünf Sekunden und anschließend wurde das Hämatoxylin für fünf Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Alkoholreihe (siehe *Tabelle 8*) wurde rückwärts angewendet, um die Präparate zu dehydrieren und abschließend wurden diese mit Eukitt und einem Deckglas abgedeckt.

Die Aufnahmen der Präparate wurden mithilfe des Lichtmikroskops DM IRB von Leica (Wetzlar, DE) und der Kamera AxioCam MRc von Zeiss (Oberkochen, DE) angefertigt. Zur Steuerung der Kamera diente die Software Axiovision (Version 4.8.2.0, Zeiss, Oberkochen, DE). Für die Vermessung der Alveolarsepten wurde die Software ImageJ (Version 1.54f, Wayne Rasband (NIH), Bethesda, USA) verwendet.

2.6 Untersuchung der Genexpression mittels PCR

2.6.1 RNA-Isolation aus murinen Lungen

Um die intrapulmonale Genexpression mittels RT-qPCR zu quantifizieren, wurde RNA aus dem murinen Lungengewebe isoliert. Zur Vermeidung einer Verunreinigung der RNA und zum Schutz vor gesundheitsschädlichen Dämpfen wurden sämtliche Arbeitsschritte unter einem Abzug durchgeführt. Die RNA-Isolation mittels TRIzol™ erfolgte gemäß Herstellerangaben.

Die bei -80°C gelagerten Lungenflügel wurden auf Raumtemperatur gebracht und der rechte Oberlappen in ein Precellys-Tube mit 1ml TRIzol™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und Keramik-Beads gegeben. Der Unterlappen wurde umgehend wieder bei -80°C eingefroren. TRIzol™ enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat, beides Substanzen, welche der Denaturierung von Proteinen dienen. Nun wurden die Proben bei 5000 rpm für 1-2x20 Sekunden homogenisiert und anschließend bei Raumtemperatur 5 Minuten stehen gelassen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und die Proben gevortext, bis sie homogen milchig imponierten. Das Homogenat wurde 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12.000 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert, wobei es sich in drei Phasen trennte. Die obere der drei Phasen enthielt die durch Phenol und Chloroform gelöste RNA, die Interphase DNA und die untere Phase organische Reste aus Proteinen und DNA. Die obere Phase wurde in ein neues RNase-freies 1,5 ml Eppendorf-Cup überführt, 500 µl Isopropanol hinzugegeben, um die RNA herauszufällen, kräftig geschüttelt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 10 Minuten bei 12.000 g und 4°C war ein RNA-Pellet am Boden des Eppendorf-Cups sichtbar. Der Isopropanol-Überstand wurde abpipettiert und 1 ml 75%iges Ethanol hinzugegeben. Mittels vortexen wurde das Pellet gelöst und erneut für 10 Minuten bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Ethanol-Überstand wurde wiederum abpipettiert und der Waschschrift wiederholt. Anschließend wurden die geöffneten Eppendorf-Cups für 10 Minuten unter den Abzug gelegt, um das Ethanol vollständig verdampfen zu lassen. Daraufhin wurde das Pellet in 40 µl

Nuklease-freiem Wasser (NFW) resuspendiert (bei sehr kleinen Mengen RNA in 20 µl). Im letzten Schritt wurden die Proben kurz anzentrifugiert und anschließend 10 Minuten bei 58°C auf einem Thermoblock (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, DE) erwärmt, um die Löslichkeit der RNA zu verbessern. Sofern die RNA nicht unmittelbar verwendet wurde, wurde sie bei -80°C aufbewahrt.

2.6.2 Messung der RNA-Konzentration

Die RNA-Proben wurden aufgetaut und auf Eis gelagert. Mithilfe des Nanodrop 2000 Spektrophotometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) wurde die RNA-Konzentration gemessen. Diese sollte in einem Bereich von 400-800 ng/µl liegen, um im Anschluss einen exakten Umschrieb in cDNA zu gewährleisten. Bei zu hohen Konzentrationen wurde die Probe mit Nuklease-freiem Wasser (NFW) auf eine passende Konzentration verdünnt. Für ein möglichst exaktes Ergebnis wurden je Probe zwei Messungen vorgenommen und deren Mittelwert verwendet. Als Indikator für die Reinheit der Proben diente der 260/280-Quotient, welcher sich aus der Absorption bei Wellenlängen von 260 nm (typisch für RNA) und 280 nm (typisch für Proteine) berechnet. Bei reinen Proben liegt dieser Quotient bei 2,0. Nach jeder Messung wurde die Sonde des Spektrophotometers gereinigt.

2.6.3 Umschrieb der RNA in cDNA

Für die RT-qPCR wird DNA benötigt. Die durch den Umschrieb entstehende DNA wird als komplementäre DNA bezeichnet (*engl.: complementary DNA; cDNA*). Für die Transkription in cDNA wurde anhand der RNA-Konzentration errechnet, welches Volumen einer Probe exakt 1µg RNA enthält und dieses in ein RNase-freies 0,2 ml Eppendorf-Cup pipettiert. Nun wurden jeweils 5 µl des iScript™ Synthese Mix (iScript™ cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad, München, DE), hinzugegeben und mit NFW auf ein Volumen von exakt 20 µl aufgefüllt. Der Synthese Mix setzte sich aus 1 µl Reverse Transkriptase und 4 µl Reaction Mix zusammen.

Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase nutzt die vorhandene RNA als Vorlage (engl.: *template*) für den Leitstrang der cDNA. Sie verfügt zudem über Ribonuklease-Aktivität, baut die RNA also nach erfolgter Transkription ab. Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert anschließend den Folgestrang, sodass doppelsträngige cDNA entsteht.



Abbildung 9: cDNA-Synthese.

Nach erfolgreicher Isolation aus der murinen Lunge wird RNA von einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase als *template* für den Leitstrang der cDNA genutzt, ein RNA-cDNA-Hybrid entsteht. Die RNA-abhängige DNA-Polymerase verfügt zudem über Ribonuklease-Aktivität und baut den RNA-Strang ab, sodass zwischenzeitlich Einzelstrang-cDNA existiert (engl.: *single strand cDNA*, ss cDNA). Eine DNA-abhängige DNA-Polymerase synthetisiert anschließend den Folgestrang, es entsteht doppelsträngige cDNA (ds cDNA).

[eigene Abbildung, erstellt mit PowerPoint]

Für den Umschrieb wurde ein Thermocycler (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, München, DE) verwendet. Bei 25 °C erfolgte für 5 Minuten das Priming, anschließend fand für 20 Minuten bei 46 °C die reverse Transkription statt. Durch Erhitzen auf 95 °C für eine Minute wurde die reverse Transkriptase inaktiviert und die Proben danach auf 4 °C heruntergekühlt. Im Anschluss wurden zu jeder Probe 140 µl NFW hinzugegeben, sodass das Volumen nun 160 µl betrug. Die cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.6.4 Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: *polymerase chain reaction*; PCR) dient der Amplifikation von Nukleinsäuren. Sie benötigt neben Primern und

Desoxyribonucleotidtriphosphaten die thermostabile DNA-Polymerase des thermophilen, grampositiven Bakteriums *Thermus aquaticus* (Taq-Polymerase). Die Amplifikation setzt sich aus drei aufeinanderfolgenden Schritten zusammen, welche einen Zyklus ergeben. Dieser wird 40-mal wiederholt, wobei die Menge an Nucleinsäure exponentiell wächst, da es mit jedem Zyklus zu einer Verdoppelung kommt. Im ersten Schritt wird die Nucleinsäure bei 95 °C denaturiert, sodass sie einzelsträngig vorliegt. Abhängig vom jeweiligen Primer (*Tabelle 9*) kommt es im Anschluss bei 60-67 °C zur Anlagerung des Primers an den DNA-Einzelstrang, der sogenannten Hybridisierung (engl.: *annealing*). Die Taq-Polymerase synthetisiert bei 72 °C, beginnend am 5'-Ende des Einzelstrangs, den komplementären Strang, sodass wieder doppelsträngige DNA (dsDNA) vorliegt. Dieser Schritt wird als Polymerisation bezeichnet (*Abbildung 10*). Durch die gezielte Auswahl von Primern konnte die Expression der entsprechenden Gene untersucht werden. Es wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 9: Primer für die RT-qPCR und ihre Schmelztemperatur. (Sequenzen siehe Materialliste)

Primer	Schmelztemperatur
CXCL1	65°C
CXCL2/3	63,8°C
MAPK1	61 °C
MAPK3	66°C
TNF α	65,5 °C

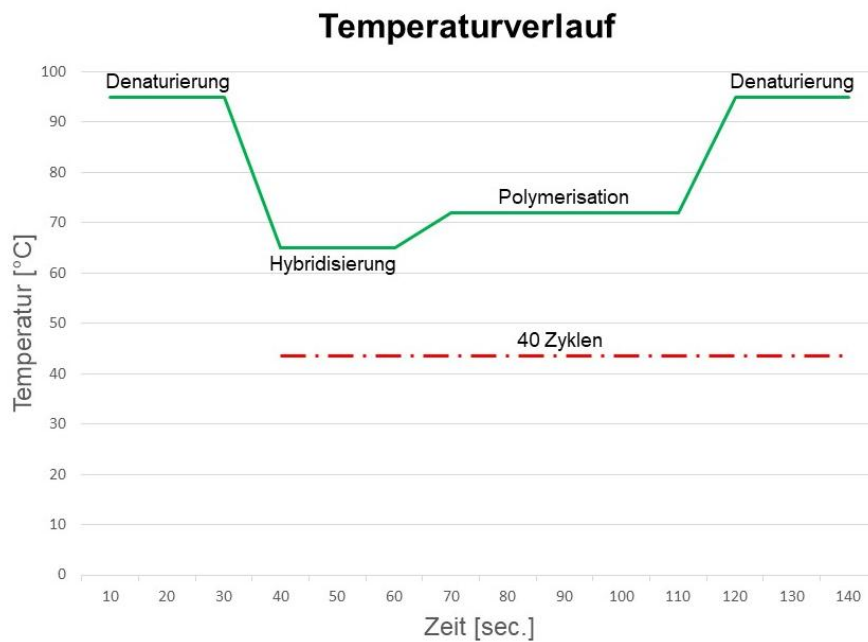


Abbildung 10: Temperaturzyklus der RT-qPCR.

Bei 95 °C kommt es zur Denaturierung der der DNA, sodass diese einzelsträngig vorliegt. Je nach Primer erfolgt bei 60-67 °C die Hybridisierung von Primer und DNA-Strang, bei 72 °C synthetisiert die Taq-Polymerase den komplementären DNA-Strang. Dieser Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation wird insgesamt 40-mal wiederholt. Nach jedem Zyklus erfolgt die Messung der Fluoreszenz-Intensität, welche proportional zur Menge der synthetisierten DNA ist.

[eigene Abbildung, erstellt mit PowerPoint]

Um die Genexpression nicht nur detektieren, sondern auch quantifizieren zu können, wurde eine RT-qPCR durchgeführt. Dafür wurde der iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, München, DE) verwendet. Dieser enthält zusätzlich zu den für die PCR notwendigen Zutaten einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher eine hohe Bindungsaffinität zu dsDNA aufweist. Ungebunden fluoresziert er nur sehr wenig, bei Bindung an dsDNA ändert sich jedoch seine Struktur und der DNA-Farbstoff-Komplex absorbiert blaues (ideale Wellenlänge $\lambda_{\max} = 497$ nm) und emittiert grünes Licht ($\lambda_{\max} = 520$ nm) (134). Anhand der Fluoreszenz-Intensität kann nun das Maß der Genexpression quantifiziert werden.

Für die Durchführung der RT-qPCR wurden in jedes Well der PCR-Platten 4 μ l der cDNA-Probe pipettiert und 5 μ l NFW, 10 μ l SYBR Green und 1 μ l des Primer Mix hinzugegeben. Bei den Negativkontrollen wurde die Probe durch NFW ersetzt. Für die Erstellung eines Standards wurde eine Verdünnungsreihe mit den

Verdünnungen 1:2, 1:4 und 1:8 einer cDNA-Probe (WT 3h LPS) verwendet. Als Referenzwert diente ein Primer für ribosomale 18s RNA.

Für die Amplifikationszyklen und Fluoreszenzmessung wurde ein Thermocycler genutzt (C1000 Thermal Cycler CFX96 Real-Time System, Bio-Rad, München, DE). Die Auswertung erfolgte mittels der Software CFX Manager (Version 3.1, Bio-Rad, München, DE). Zur Normalisierung der Messwerte wurde die $\Delta\Delta C_q$ -Methode verwendet, wobei die Werte der ribosomalen 18s-RNA als Referenz dienten, da diese effektunabhängig ist. Die entsprechende Berechnung wurde durch die CFX Manager Software durchgeführt.

2.7 ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde verwendet, um Zytokine in der BAL nachzuweisen. Der ELISA nutzt Enzym-gekoppelte Antikörper, welche an das zu detektierende Antigen binden. Das Enzym katalysiert eine Farbreaktion, wobei eine lineare positive Korrelation zwischen der Antigenkonzentration und der Reaktionsgeschwindigkeit der Farbreaktion besteht.

Es wurden ELISA Kits für TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2 verwendet (R&D Systems, Minneapolis, USA). Konkret wurde ein sogenannter Sandwich-ELISA durchgeführt (siehe *Abbildung 11*). Er benötigt zunächst einen Capture-Antikörper, mit welchem die Reaktionsgefäße beschichtet werden und welcher das Zielantigen bindet. Der Capture-Antikörper wurde entsprechend den Herstellerangaben in ELISA-PBS⁻ gelöst und 100 μ l in jedes Well pipettiert. Die Platte wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert, damit der Antikörper mit seiner F_c-Domäne an der Oberfläche des Wells binden konnte. Dieser Vorgang wird als *Coating* (dt.: Beschichtung) bezeichnet. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit 300 μ l ELISA-Waschpuffer (ELISA-PBS⁻ mit 0,05% Tween) pro Well gewaschen. Nun wurden unspezifische Proteinbindungsstellen geblockt, indem 200 μ l Reagent Diluent (1%iges BSA) in jedes Well pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen wurden

jeweils 100 µl der Standardreihe oder einer Probe in die Wells pipettiert, wobei jeweils Doppelwerte angefertigt wurden. Es folgte eine Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach einem Waschschrift wurden je Well 100 µl des gemäß Herstellerangaben in Reagent Diluent gelösten, Biotin-konjugierten Detection-Antikörpers hinzugegeben und erneut für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem erneut gewaschen worden war, wurden pro Well 100 µl Streptavidin-konjugierte Meerrettich-Peroxidase (*engl.: horseradish peroxidase, HRP*) hinzupipettiert. Streptavidin hat eine hohe Affinität für das Biotin des Detection-Antikörpers und vermittelte die indirekte Bindung der HRP an das jeweilige Antigen. Die HRP katalysierte die Farbreaktion. Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten im Dunklen und erneutem Waschen wurden pro Well 100 µl einer Lösung aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin (TMB) hinzugegeben (enthalten im Substrate Reagent Pack von R&D Systems) und für 20 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Die HRP reduziert H₂O₂ zu Wasser (H₂O), wobei das TMB als Reduktionsmittel dient und sich durch die Oxidation hellblau färbt. Die Redox-Reaktion wurde durch die Zugabe von 50 µl ELISA Stopp-Lösung (Schwefelsäure) gestoppt, wodurch sich die Proben gelb färbten. Unmittelbar im Anschluss wurde mithilfe des TECAN Microplate Readers (Infinite M200 Pro, Tecan, Männerdorf, CH) die Farbintensität bei 450 und 540 nm gemessen. Anhand des Standards wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt.

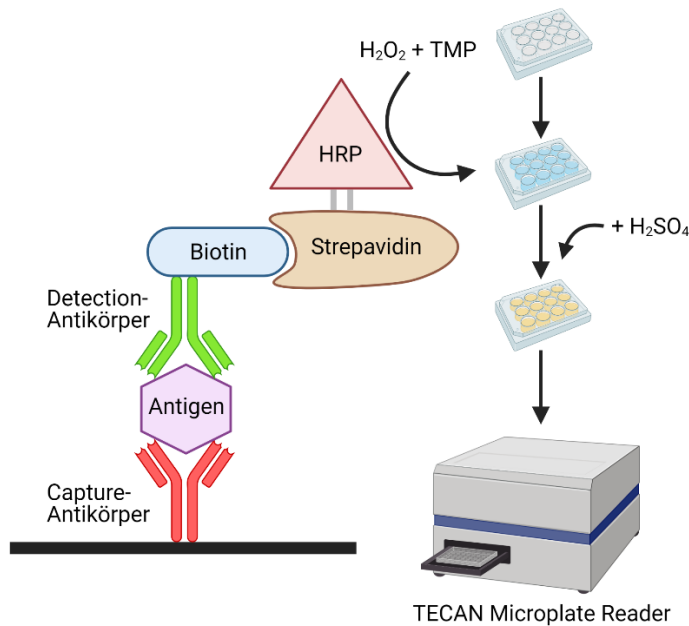


Abbildung 11:
Funktionsweise des Sandwich-ELISA.

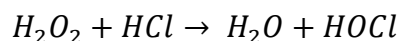
Das Reaktionsgefäß wird mit dem Capture-Antikörper beschichtet (Coating). Das Antigen bindet an den Capture-Antikörper. Der Biotin-konjugierte Detection-Antikörper bindet das Antigen. Streptavidin bindet an Biotin und die HRP reduziert H_2O_2 zu H_2O . Dabei wird Tetramethylbenzidin (TMB) oxidiert und verfärbt sich blau. Die Redox-Reaktion wird mit Schwefelsäure (H_2SO_4) gestoppt, was gleichzeitig zu einer Gelbfärbung der Proben führt. Die Farbintensität wird unmittelbar mit dem TECAN Microplate Reader gemessen.

HRP = horseradish peroxidase (dt.: Meerrettich-Peroxidase).

[eigene Abbildung, erstellt mit Biorender.com]

2.8 Messung der Myeloperoxidase-Freisetzung

Die Myeloperoxidase (MPO) ist ein Enzym, welches in azurophilen Granula neutrophiler Granulozyten vorkommt (135). Sie katalysiert die Bildung von hypochloriger Säure (HOCl) und Wasser aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Salzsäure (HCl) (136):



Um die Menge der freigesetzten MPO nachzuweisen, wurde 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS) genutzt, welches ein Substrat der MPO ist. Bei der enzymatischen Umsetzung von ABTS durch die MPO entsteht das grünlich-türkise ABTS-Kation.

In jedes Well wurden 50 μ l Probe, 50 μ l Citratpuffer und 100 μ l ABTS-Lösung pipettiert und die Platte bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Intensität der Farbreaktion mithilfe des TECAN Microplate Readers (Infinite M200 Pro, Tecan, Männerdorf, CH) bei einer Wellenlänge von 405 nm photometrisch bestimmt.

2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in der BAL wurde die BCA-Methode (*engl.: bicinchoninic acid*; dt.: Bicinchoninsäure) verwendet. Hierfür wurde das Pierce Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) genutzt. Die Methode beruht darauf, dass Cu^{2+} -Kationen in alkalischem Medium von Proteinen zu Cu^{+} -Kationen reduziert werden. Diese Cu^{+} -Kationen bilden mit der Bicinchoninsäure einen Komplex, der sich violett verfärbt und photometrisch bei einer Wellenlänge von 562 nm nachgewiesen werden kann. 25 μl des Überstands der BAL wurden mit 200 μl BCA-Lösung für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der dem Kit beiliegende Albumin Standard (2mg/ml) wurde als Referenz für die Quantifizierung der Proteinkonzentration verwendet. Für die photometrische Messung der Farbreaktion wurde der TECAN Microplate Reader (Infinite M200 Pro, Tecan, Männerdorf, CH) genutzt.

2.10 Statistik

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit GraphPad Prism (Version 9, GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Mithilfe der ROUT-Methode (eine robuste Regression gefolgt von einer Ermittlung statistischer Ausreißer; *engl.: robust Regression followed by outlier identification*) wurden statistische Ausreißer ermittelt, wobei der Koeffizient Q (die Falsch-Entdeckungs-Rate, *engl.: false discovery rate; FDR*) auf 5% festgelegt wurde. Mittels Shapiro-Wilk Test und Kolmogorov-Smirnov Test wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Für den Vergleich zweier normalverteilter Gruppen wurde der Student's *t*-Test für unabhängige Stichproben (*engl.: unpaired t-test*) angewendet, für nicht normalverteilte Daten der Mann-Whitney-U-Test. Wurden mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde bei normalverteilten Werten eine unifaktorielle Varianzanalyse (*engl.: one-way analysis of variance; one-way ANOVA*) genutzt, bei nicht normalverteilten Daten der Kruskal-Wallis-Test. Für die Mehrgruppenvergleiche im zeitlichen Verlauf wurde eine two-way ANOVA mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Mithilfe der Software wurden zudem die p-Werte bestimmt, das zugrundeliegende Signifikanzniveau war $\alpha = 5\%$. Die Daten wurde

mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Signifikanzen wurden durch Asteriske gekennzeichnet, die folgende Tabelle diene zur Einordnung der Signifikanzen:

Tabelle 10: Übersicht der Signifikanzen.

Symbol	p-Wert
*	$p \leq 0,05$
**	$p \leq 0,01$
***	$p \leq 0,001$
****	$p \leq 0,0001$

3 Ergebnisse

Die Rohdaten der im Folgenden dargestellten Ergebnisse fanden teilweise Eingang in eine bereits veröffentlichte Publikation (137). In der Legende der entsprechenden Abbildungen wurden diese jeweils mit § markiert.

3.1 Zellzahlen

Die inhalative Stimulation mit LPS induziert bei den Versuchstieren eine pulmonale Inflammationsreaktion. Die ins Lungengewebe migrierenden Leukozyten und unter diesen besonders die PMNs sind maßgeblich für die pulmonale Gewebeschädigung im Rahmen des ALI und ARDS verantwortlich. Aus diesem Grund wird im Folgenden die Anzahl der CD45⁺-Leukozyten, der PMNs und der prozentuale Anteil der PNCs in Blut, Lungengewebe und BAL dargestellt.

3.1.1 Leukozytenzahlen

3.1.1.1 Vergleich zwischen Wildtyp und *Gabra1^{Kl}*-Tieren

Nach drei Stunden konnte im Blut kein signifikanter Unterschied der Leukozytenzahl zwischen Wildtyp- und *Gabra1^{Kl}*-Tieren nachgewiesen werden (*Abbildung 12: A1*). Nach 24 Stunden war die Leukozytenzahl im Blut der *Gabra1^{Kl}*-Tiere signifikant niedriger (*Abbildung 12: A2*). Im zeitlichen Verlauf (*Abbildung 12: A3*) zeigte sich, dass nach drei Stunden bei beiden Mauslinien die Leukozytenzahl im Blut simultan abfiel. Während sie bei den Wildtyp-Tieren jedoch nach 24 Stunden wieder das Niveau der unstimulierten Tiere erreicht hatte, kam es bei den *Gabra1^{Kl}*-Tieren zu einem weiteren Abfall. Im Lungengewebe konnte nach drei Stunden eine signifikante höhere Leukozytenzahl bei den *Gabra1^{Kl}*-Tieren nachgewiesen werden (*Abbildung 12: B1*), wobei sich der Anstieg nach 24 Stunden noch deutlicher darstellte (*Abbildung 12: B2*). Grundsätzlich zeigte sich in beiden Mauslinien im zeitlichen Verlauf ein signifikanter und kontinuierlicher Anstieg der Leukozytenzahl im pulmonalen Gewebe (*Abbildung 12: B3*). In der BAL konnte nach drei Stunden bei den *Gabra1^{Kl}*-Tieren eine signifikant erhöhte Leukozytenzahl nachgewiesen werden (*Abbildung 12: C1*). Dieser Unterschied war nach 24 Stunden nicht mehr

nachzuweisen (*Abbildung 12: C2*). Die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs zeigt, dass die Stimulation mit LPS in beiden Mauslinien eine signifikante Zunahme der Leukozyten in der BAL bedingt (*Abbildung 12: C3*).

3.1.1.2 Vergleich der Wildtyp-Stimulationsgruppen

Der Einfluss der extraneuronalen GABA_AR- α 1-Untereinheit auf die pulmonale Inflammation wurde nicht nur durch ein genetisches Knock-In sondern zudem durch Applikation der am GABA_AR wirkenden Medikamente Sevofluran und Propofol untersucht. Weder nach drei noch nach 24 Stunden konnte ein signifikanter Effekt von Sevofluran oder Propofol auf die Anzahl CD45⁺-positiver Leukozyten im Blut festgestellt werden (*Abbildung 13: A1 und B1*). In der Lunge mit Propofol stimulierter Tiere war nach 24 Stunden die Zahl CD45⁺-positiver Zellen signifikant verringert (*Abbildung 13: B2*), in der BAL zeigte sich nach 24 Stunden eine signifikant erniedrigte Zahl CD45⁺-positiver Zellen nach Sevofluran- und Propofol-Applikation (*Abbildung 13: B3*).

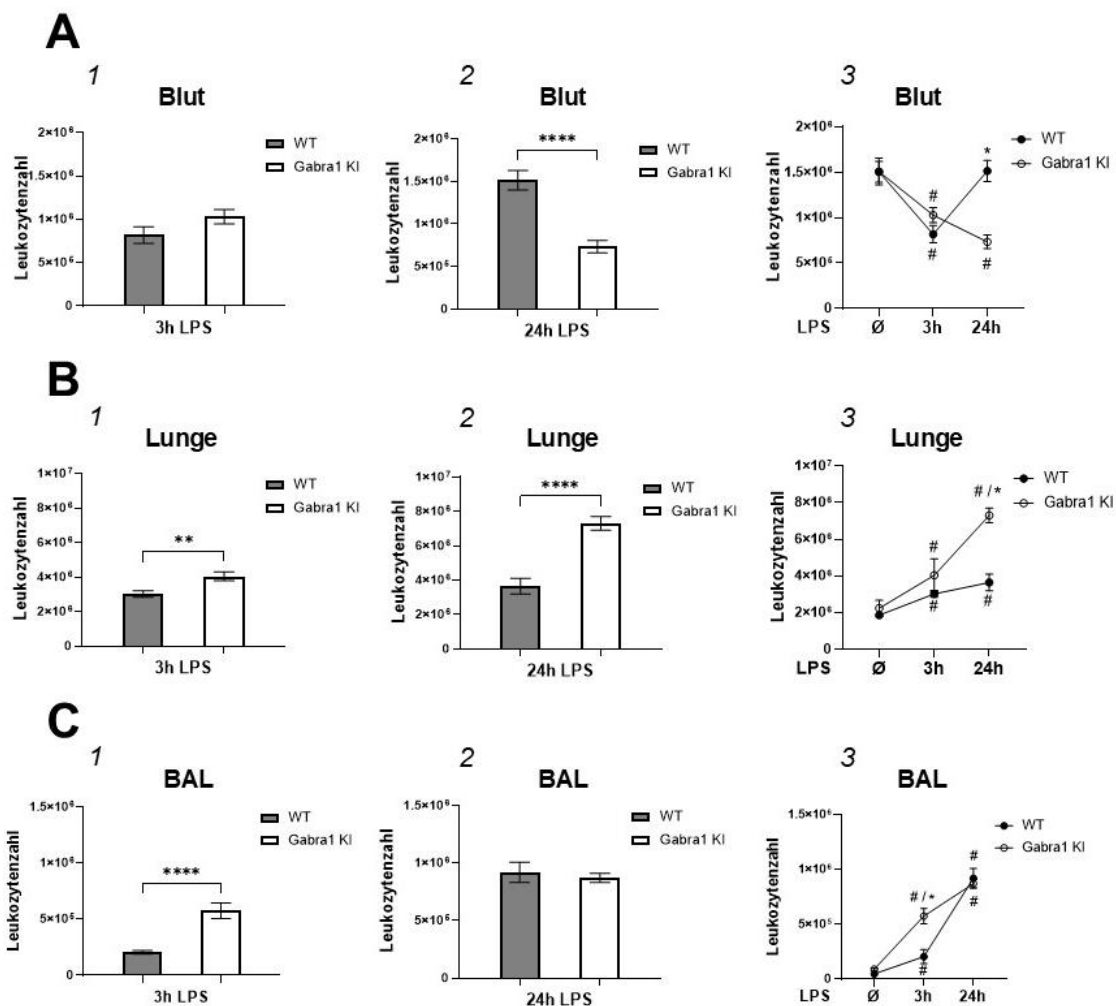


Abbildung 12: Vergleich der Leukozytenzahl zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozytenzahl in Blut (A), Lungengewebe (B) und BAL (C) nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und Gabra1^{KI}-Tieren. Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (1, 2) sowie im Punktdiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (3). Statistischer Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben bei normalverteilten und mittels Mann-Whitney-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur (## $p < 0,05$: # stimuliert vs. nicht-stimuliert, * WT vs. Gabra1^{KI}).

A1: Blut 3h LPS; $n=15/11$ (WT/Gabra^{KI}).

A2: Blut 24h LPS; $p < 0,0001$; $n=16/16$.

A3: Blut zeitlicher Verlauf; $n=8/8$, $15/11$, $16/16$ (WT/Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS).

B1: Lunge 3h LPS; $p=0,0034$; $n=16/12$.

B2: Lunge 24h LPS; $p < 0,0001$ $n=15/16$.

B3: Lunge zeitlicher Verlauf; $n=8/8$, $16/12$, $15/16$ (WT/Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS).

C1: BAL 3h LPS; $p < 0,0001$; $n=16/12$.

C2: BAL 24h LPS; $n=15/15$.

C3: BAL zeitlicher Verlauf; $n=8/7$, $16/12$, $15/15$ (WT/Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS).

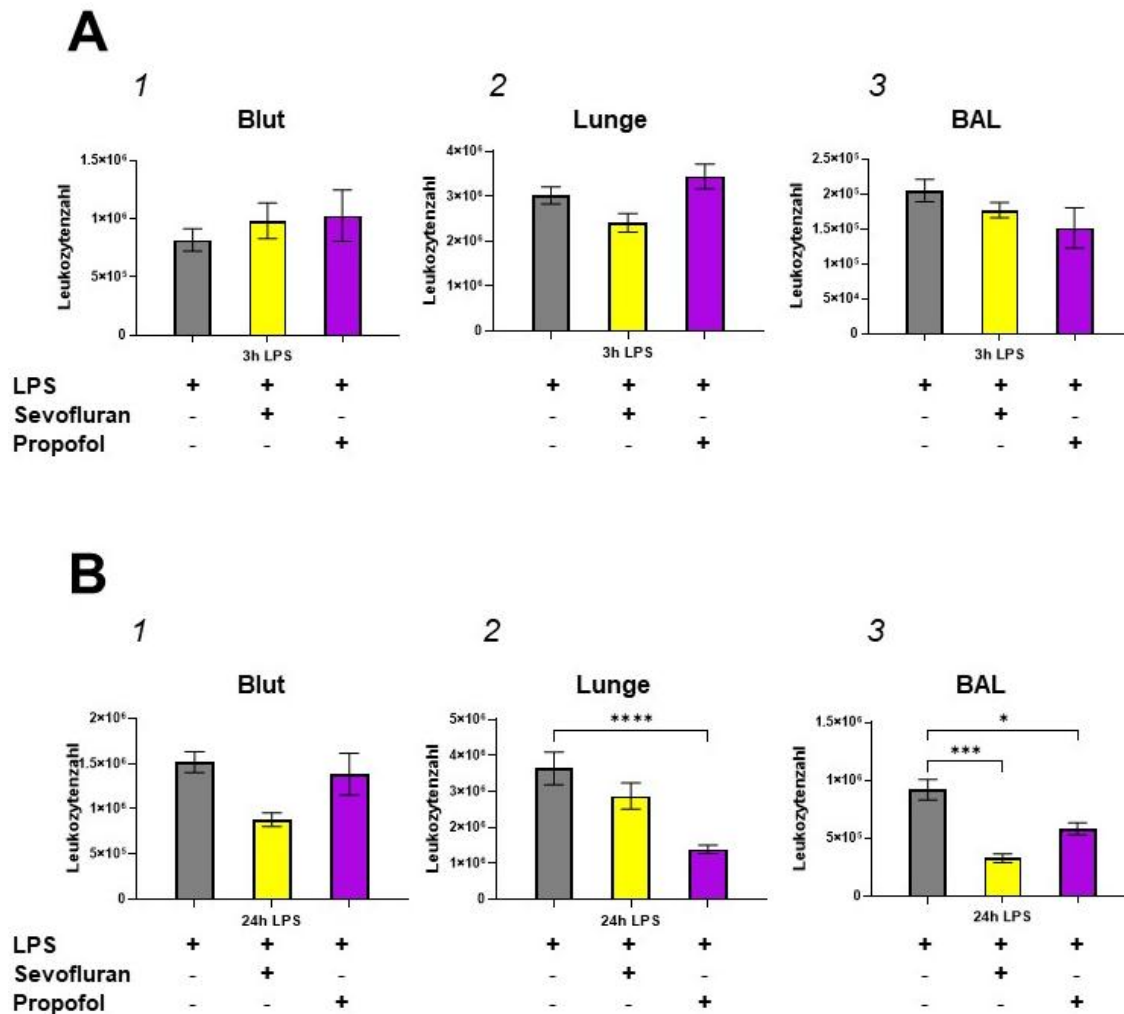


Abbildung 13: Vergleich der Leukozytenzahl zwischen Wildtyptieren nach medikamentöser Stimulation.

Bestimmung der Leukozytenzahl in der Durchflusszytometrie drei (A) beziehungsweise 24 Stunden (B) nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) vergleichend zwischen Wildtyptieren folgender Stimulationsgruppen: LPS, LPS + Sevofluran, LPS + Propofol. Vergleich der Leukozytenzahl in Blut (1), Lungengewebe (2) und BAL (3). Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA bei normalverteilten und mittels Kruskal-Wallis-Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

A1: Blut 3h LPS; $n=15/8/8$ (LPS/LPS + Sevofluran/LPS + Propofol).

A2: Lunge 3h LPS; $n=16/8/8$.

A3: BAL 3h LPS; $n=16/8/8$.

B1: Blut 24h LPS; $n=16/8/10$.

B2: Lunge 24h LPS; $p < 0,0001$ (LPS vs. LPS + Propofol); $n=15/8/8$.

B3: BAL 24h LPS; $p = 0,0003$ (LPS vs. LPS + Sevofluran), $p = 0,0427$ (LPS vs. LPS + Propofol); $n=15/8/10$.

3.1.2 Zahlen polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten

3.1.2.1 Vergleich zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren

Unter allen Leukozyten-Subpopulationen spielen PMNs eine besonders relevante Rolle für die pulmonale Inflammation und Parenchymschädigung im Rahmen des ARDS (vergleiche Absatz 1.2.5). Aus diesem Grund wurden sie explizit untersucht. Nach drei Stunden konnte kein signifikanter Unterschied der PMN-Zahl im Blut der Versuchstiere detektiert werden (*Abbildung 14: A1*), nach 24 Stunden zeigten sich im Blut der Gabra1^{KI}-Tiere signifikant weniger PMNs (*Abbildung 14: A2*). Im zeitlichen Verlauf stieg die PMN-Zahl im Blut beider Gruppen nach drei Stunden an gefolgt von einem Abfall nach 24 Stunden, der bei den Gabra1^{KI}-Tieren stärker ausgeprägt war (*Abbildung 14: A3*). Im Lungengewebe war die PMN-Zahl bei den Gabra1^{KI}-Tieren sowohl nach drei als auch nach 24 Stunden signifikant erhöht (*Abbildung 14: B1 und B2*). In beiden Mauslinien führte die Stimulation mit LPS zu einem signifikanten Anstieg der pulmonalen PMN-Zahl. Es zeigt sich zudem, dass bei den Wildtyp-Tieren der Anstieg zwischen dem Drei-Stunden- und dem 24-Stunden-Intervall wieder zurückgeht, während es bei den Gabra1^{KI}-Tieren zu einem weiteren Anstieg kommt (*Abbildung 14: B3*). Im Drei-Stunden-Intervall konnte für die Gabra1^{KI}-Tiere eine signifikante Erhöhung der PMN-Zahl in der BAL nachgewiesen werden (*Abbildung 14: C1*), ein Effekt, der nach 24 Stunden nicht mehr nachweisbar war (*Abbildung 14: C2*). Die Betrachtung des zeitlichen Verlaufs zeigt, dass die Stimulation mit LPS in beiden Mauslinien in einer signifikanter Zunahme der PMNs in der BAL resultiert (*Abbildung 14: C3*).

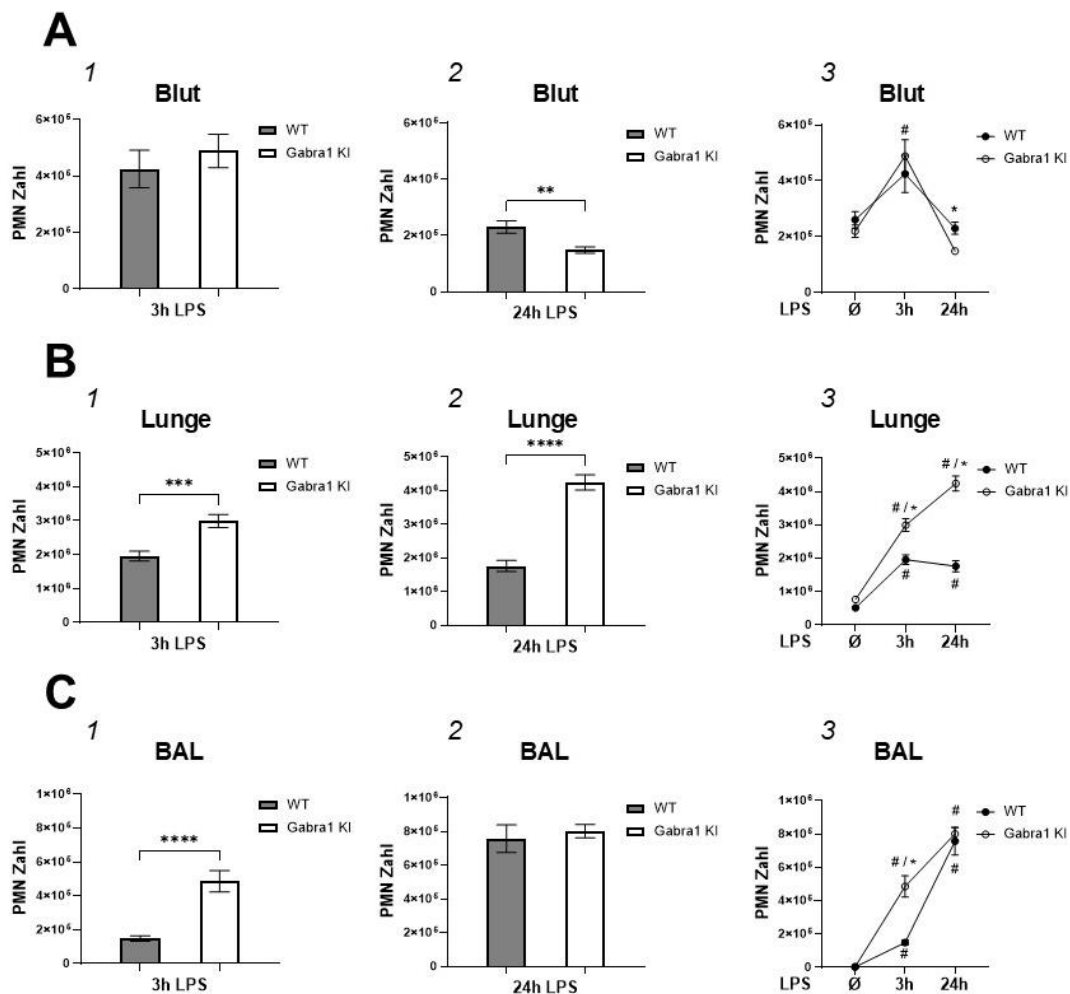


Abbildung 14: Vergleich der PMN-Zahl zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren.

Durchflusszytometrische Bestimmung der PMN-Zahl in Blut (A), Lungengewebe (B) und BAL (C) nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und Gabra1^{KI}-Tieren. Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (1, 2) sowie im Punktdiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (3). Statistischer Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben bei normalverteilten und mittels Whitney-Mann-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur (# $p < 0,05$: # stimuliert vs. nicht-stimuliert, * WT vs. Gabra1^{KI}). §: Daten teilweise publiziert (137).

A1: Blut 3h LPS; $n=15/12$ (WT/Gabra1^{KI}).

A2: Blut 24h LPS; $p=0,0377$; $n=16/14$.

A3: Blut zeitlicher Verlauf; $n=8/8, 15/12, 16/14$ (WT/Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS).

B1: Lunge 3h LPS; $p=0,0002$; $n=16/12$.

B2: Lunge 24h LPS; $p < 0,0001$; $n=15/16$. §

B3: Lunge zeitlicher Verlauf; $n=8/8, 16/12, 15/16$ (WT/Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS). §

C1: BAL 3h LPS; $p < 0,0001$; $n=16/12$.

C2: BAL 24h LPS; $n=15/15$. §

C3: BAL zeitlicher Verlauf; $n=8/6, 16/12, 15/16$ (WT/Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS). §

3.1.2.2 Vergleich der Wildtyp-Stimulationsgruppen

Sowohl nach drei als auch nach 24 Stunden konnte im Blut kein signifikanter Unterschied der PMN-Zahl nachgewiesen werden (*Abbildung 15: A1 und B1*). Während nach drei Stunden die Prämedikation keinen signifikanten Einfluss auf die PMN-Zahl im Lungengewebe zeigte (*Abbildung 15: A2*), war diese nach 24 Stunden bei den Propofol-behandelten Tieren signifikant reduziert (*Abbildung 15: B2*). Im Drei-Stunden-Intervall waren keine signifikanten Unterschiede in der BAL nachweisbar (*Abbildung 15: A3*), nach 24 Stunden zeigte sich eine signifikant geringere PMN-Zahl in der BAL der Sevofluran-Tiere (*Abbildung 15: B3*).

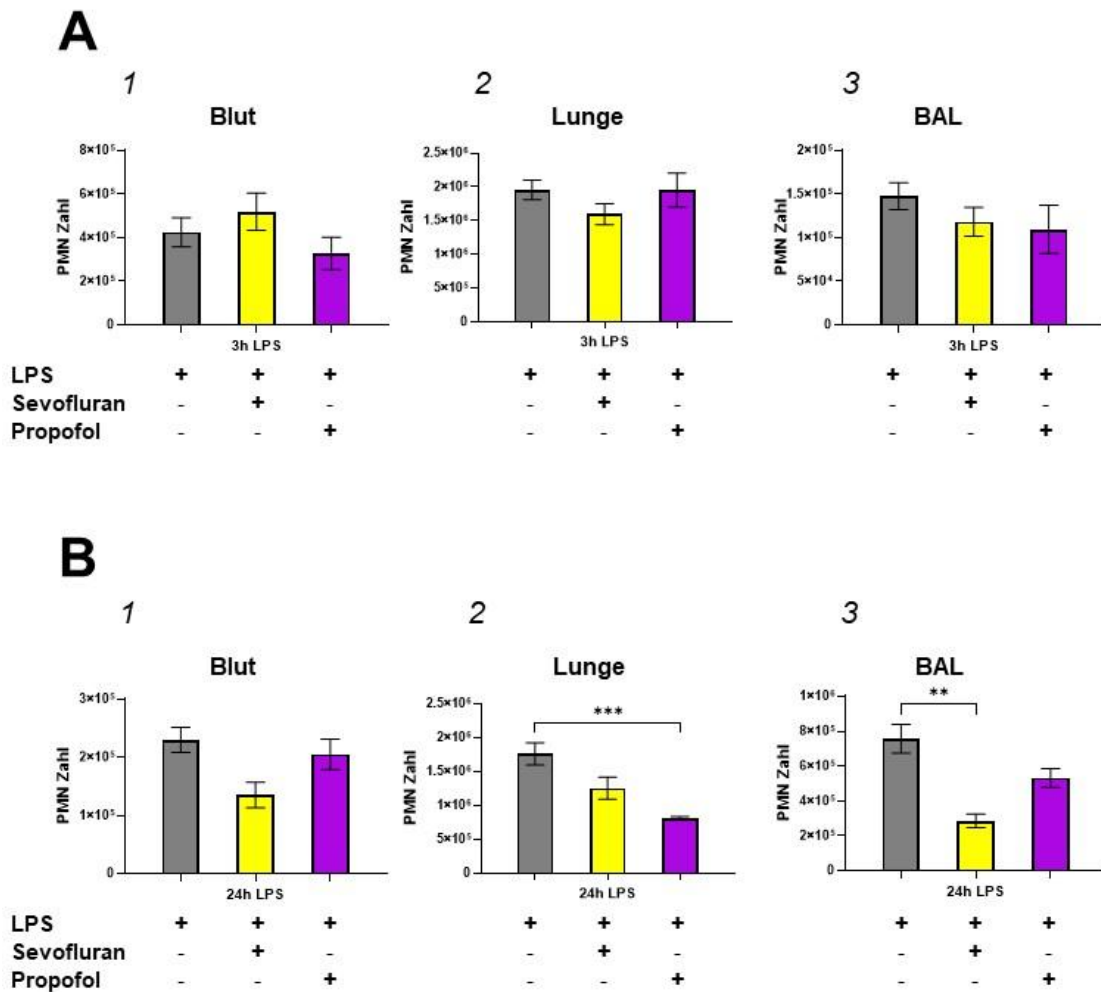


Abbildung 15: Vergleich der PMN-Zahl zwischen Wildtyptieren nach medikamentöser Stimulation.

Bestimmung der PMN-Zahl in der Durchflusszytometrie drei (A) beziehungsweise 24 Stunden (B) nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) vergleichend zwischen Wildtyptieren folgender Stimulationsgruppen: LPS, LPS + Sevofluran, LPS + Propofol. Vergleich der PMN-Zahl in Blut (1), Lungengewebe (2) und BAL (3). Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA bei normalverteilten und mittels Kruskal-Wallis-Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). §: Daten teilweise publiziert (137).

A1: Blut 3h LPS; $n=16/8/7$ (LPS/LPS + Sevofluran/LPS + Propofol).

A2: Lunge 3h LPS; $n=16/8/8$.

A3: BAL 3h LPS; $n=16/8/8$.

B1: Blut 24h LPS; $n=16/8/8$.

B2: Lunge 24h LPS; $p=0,0004$ (LPS vs. LPS + Propofol); $n=15/8/7$. §

B3: BAL 24h LPS; $p=0,0053$ (LPS vs. LPS + Sevofluran); $n=15/8/10$. §

3.1.3 Prozentualer Anteil der Plättchen-Neutrophilen-Komplexe

3.1.3.1 Vergleich zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren

Wie in Absatz 1.2.4 dargelegt, spielen PNCs eine wichtige Rolle für die transendotheliale Migration der PMNs. Aus diesem Grund wurden sie im Folgenden untersucht. Im Drei-Stunden-Intervall ließ sich kein Unterschied des PNC-Anteils an der PMN-Zahl in den Blutproben der Versuchstiere feststellen (*Abbildung 16: A1*). Nach 24 Stunden war der PNC-Anteil im Blut der Wildtyp-Tiere signifikant niedriger als jener im Blut der Gabra1^{KI}-Tiere (*Abbildung 16: A2*). Im zeitlichen Verlauf wird deutlich, dass der PNC-Anteil im Blut der Wildtyp-Tiere nach 24 Stunden signifikant sinkt, während dieser Effekt bei den Gabra1^{KI}-Tieren nicht zu beobachten war (*Abbildung 16: A3*). Nach drei Stunden zeigte sich im Lungengewebe kein signifikanter Unterschied (*Abbildung 16: B1*), nach 24 Stunden konnte für den PNC-Anteil in der Lunge der Gabra1^{KI}-Tiere eine signifikante Senkung nachgewiesen werden (*Abbildung 16: B2*). Es konnte zudem detektiert werden, dass die unstimulierte Wildtyp-Mauslinie einen signifikant niedrigeren PNC-Anteil im Lungengewebe aufweist als die entsprechenden Gabra1^{KI}-Tiere und es bei ihnen nach LPS-Inhalation im zeitlichen Verlauf zu einem Anstieg kommt, während bei den Gabra1^{KI}-Tieren der PNC-Anteil im Verlauf sinkt (*Abbildung 16: B3*). Während sich nach drei Stunden in der BAL kein signifikanter Unterschied feststellen ließ (*Abbildung 16: C1*), war der PNC-Anteil bei den Gabra1^{KI}-Tieren nach 24 Stunden signifikant niedriger (*Abbildung 16: C2*). Zwischen dem Drei- und dem 24-Stunden-Intervall bleibt der PNC-Anteil in der BAL der Wildtyp-Mauslinie nahezu unverändert, während er bei den Gabra1^{KI}-Tieren sinkt (*Abbildung 16: C3*). Es wird zudem deutlich, dass der PNC-Anteil bei beiden Mauslinien ohne Stimulation mit LPS erheblich höher ist (*Abbildung 16: C3*).

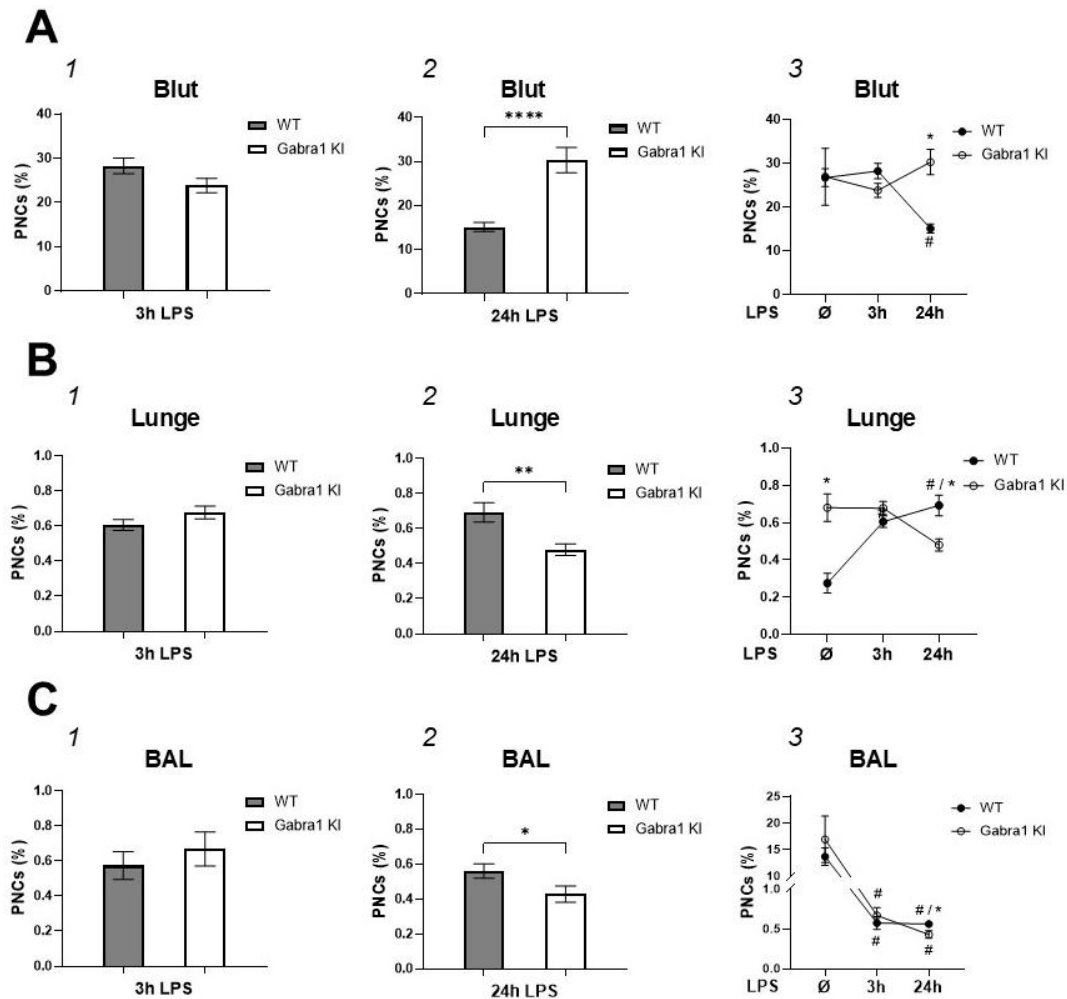


Abbildung 16: Vergleich des PNC-Anteils zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren.

Durchflusszytometrische Bestimmung des PNC-Anteils in Blut (A), Lungengewebe (B) und BAL (C) nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und Gabra1^{KI}-Tieren. Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (1, 2) sowie im Punktdiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (3). Statistischer Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben bei normalverteilten und mittels Whitney-Mann-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur (#/* $p < 0,05$: # stimuliert vs. nicht-stimuliert, * WT vs. Gabra1^{KI}).

A1: Blut 3h LPS; $n=16/12$ (WT/ Gabra1^{KI}).

A2: Blut 24h LPS; $p < 0,0001$; $n=16/16$.

A3: Blut zeitlicher Verlauf; $n=8/8, 16/12, 16/16$ (WT/ Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS).

B1: Lunge 3h LPS; $n=16/12$.

B2: Lunge 24h LPS; $p=0,0019$; $n=16/16$.

B3: Lunge zeitlicher Verlauf; $n=8/7, 16/12, 16/16$ (WT/ Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS).

C1: BAL 3h LPS; $n=16/12$.

C2: BAL 24h LPS; $p=0,0483$; $n=14/16$.

C3: BAL zeitlicher Verlauf; $n=8/8, 16/12, 14/16$ (WT/ Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS).

3.1.3.2 Vergleich der Wildtyp-Stimulationsgruppen

Während nach drei Stunden kein signifikanter Unterschied des PNC-Anteils im Blut festgestellt werden konnte (*Abbildung 17: A1*), zeigte sich nach 24 Stunden eine signifikante Erhöhung des PNC-Anteils im Blut der Sevofluran-Tiere (*Abbildung 17: B1*). Im Lungengewebe konnte nach drei Stunden bei den Propofol-Tieren ein signifikant niedriger PNC-Anteil nachgewiesen werden (*Abbildung 17: A2*), im 24-Stunden-Intervall war der PNC-Anteil sowohl nach Sevofluran-Inhalation als auch nach Injektion von Propofol signifikant erniedrigt (*Abbildung 17: B2*). In der BAL konnte nach drei Stunden kein signifikanter Unterschied detektiert werden (*Abbildung 17: A3*), nach 24 Stunden war der PNC-Anteil bei den Sevofluran-Tieren signifikant niedriger als bei den Tieren ohne medikamentöse Vorbehandlung (*Abbildung 17: B3*).

3.1.4 Vergleich der Gabra1^{KI}-Stimulationsgruppen

Aufgrund von Reproduktionsproblemen der Gabra1^{KI}-Tiere wurden die Medikamentengruppen mit Sevofluran und Propofol bei diesen lediglich für das 24-Stunden-, nicht jedoch für das Drei-Stunden-Intervall untersucht, da sich bei den WT-Tieren nach 24 Stunden signifikantere Effekte der applizierten Medikamente auf die untersuchten Zellpopulationen gezeigt hatten als nach drei Stunden.

In keinem der drei Kompartimente konnte ein signifikanter Effekt der Stimulation mit Sevofluran oder Propofol auf eine der untersuchten Zellpopulationen nachgewiesen werden (*Abbildung 18*).

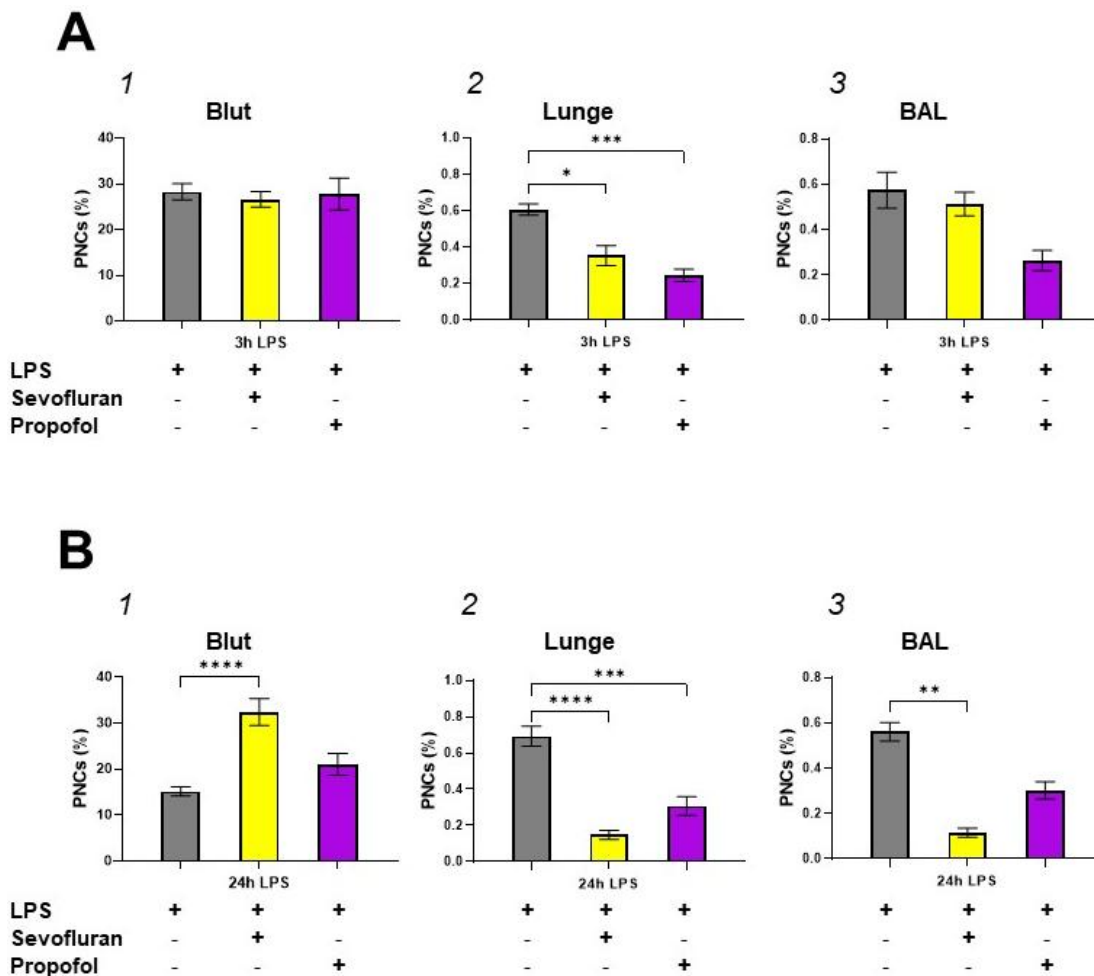


Abbildung 17: Vergleich des PNC-Anteils zwischen Wildtyptieren nach medikamentöser Stimulation.

Bestimmung des PNC-Anteils in der Durchflusszytometrie drei (A) beziehungsweise 24 Stunden (B) nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) vergleichend zwischen Wildtyptieren folgender Stimulationsgruppen: LPS, LPS + Sevofluran, LPS + Propofol. Vergleich des PNC-Anteils in Blut (1), Lungengewebe (2) und BAL (3). Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA bei normalverteilten und mittels Kruskal-Wallis-Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

A1: Blut 3h LPS; $n=16/8/8$ (LPS/LPS + Sevofluran/LPS + Propofol).

A2: Lunge 3h LPS; $p=0,0159$ (LPS vs. LPS + Sevofluran), $p=0,0027$ (LPS vs. LPS + Propofol); $n=16/8/8$.

A3: BAL 3h LPS; $n=16/7/7$.

B1: Blut 24h LPS; $p < 0,0001$ (LPS vs. LPS + Sevofluran); $n=16/8/10$.

B2: Lunge 24h LPS; $p < 0,0001$ (LPS vs. LPS + Sevofluran), $p=0,0002$ (LPS vs. LPS + Propofol); $n=15/8/10$.

B3: BAL 24h LPS; $p=0,0012$ (LPS vs. LPS + Sevofluran); $n=14/6/10$.

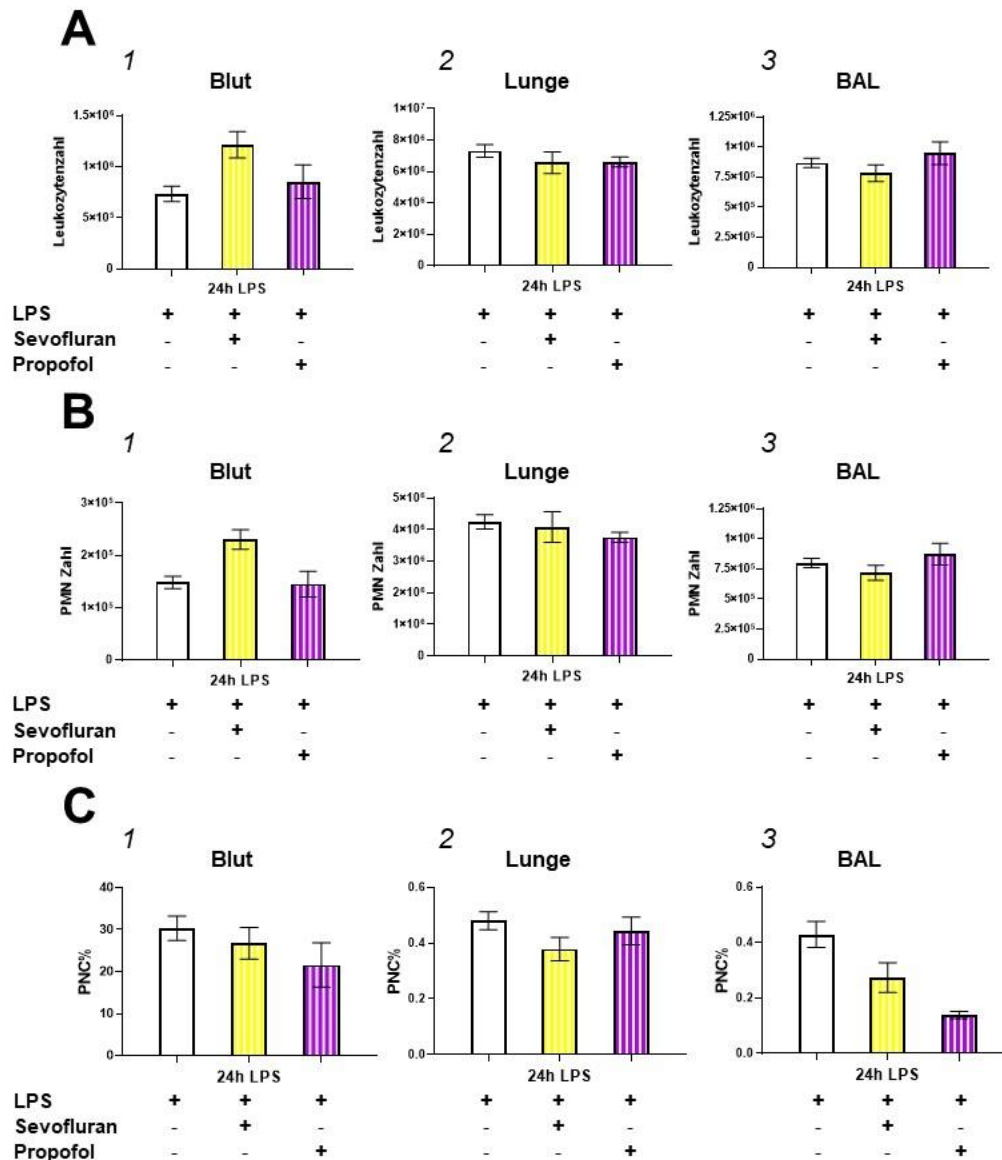


Abbildung 18: Vergleich der Zellzahlen zwischen *Gabra1^{Kl}*-Tieren nach medikamentöser Stimulation.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Leukozytenzahl (A), PMN-Zahl (B) und des PNC-Anteils (C) nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) vergleichend zwischen *Gabra1^{Kl}*-Tieren folgender Stimulationsgruppen: LPS, LPS + Sevofluran, LPS + Propofol. Vergleich der Zellzahlen in Blut (1), Lungengewebe (2) und BAL (3). Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA bei normalverteilten und mittels Kruskal-Wallis-Test bei nicht-normalverteilten Werten.

A1: Leukozytenzahl Blut 24h LPS; n=16/8/8 (LPS/LPS + Sevofluran/LPS + Propofol).

A2: Leukozytenzahl Lunge 24h LPS; n=16/8/8.

A3: Leukozytenzahl BAL 24h LPS; n=15/8/8.

B1: PMN-Zahl Blut 24h LPS; n=14/7/8.

C1: PNC-Anteil Blut 24h LPS; n=16/8/8.

B2: PMN-Zahl Lunge 24h LPS; n=16/8/8.

C2: PNC-Anteil Lunge 24h LPS; n=16/8/8.

B3: PMN-Zahl BAL 24h LPS; n=15/8/8.

C3: PNC-Anteil BAL 24h LPS; n=16/8/6.

3.2 Oberflächenproteine

Für die transendotheliale Migration und die PNC-Bildung benötigen die PMNs und Thrombozyten verschiedene Oberflächenproteine (vergleiche Absatz 1.2.3 und Absatz 1.2.4), welche durchflusszytometrisch untersucht wurden. Dabei wurde die Expression auf PNCs nach drei und die Expression auf PMNs nach 24 Stunden betrachtet, da PNCs im Verlauf zerfallen (138), weshalb ihre Betrachtung zu einem früheren Zeitpunkt sinnvoll ist, während die Anzahl der migrierten PMNs typischerweise bis 24 Stunden post LPS-Stimulation steigt (139).

3.2.1 P-Selektin

Da P-Selektin auf PMNs nicht exprimiert wird, wurden lediglich PNCs untersucht. Drei Stunden nach LPS-Inhalation konnte bei den *Gabra1*^{KI}-Tieren sowohl im Blut (Abbildung 19: A) als auch in der Lunge (Abbildung 19: B) eine signifikant erhöhte Expression von P-Selektin auf PNCs im Vergleich zur Wildtyp-Population nachgewiesen werden. In der BAL zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 19: C).

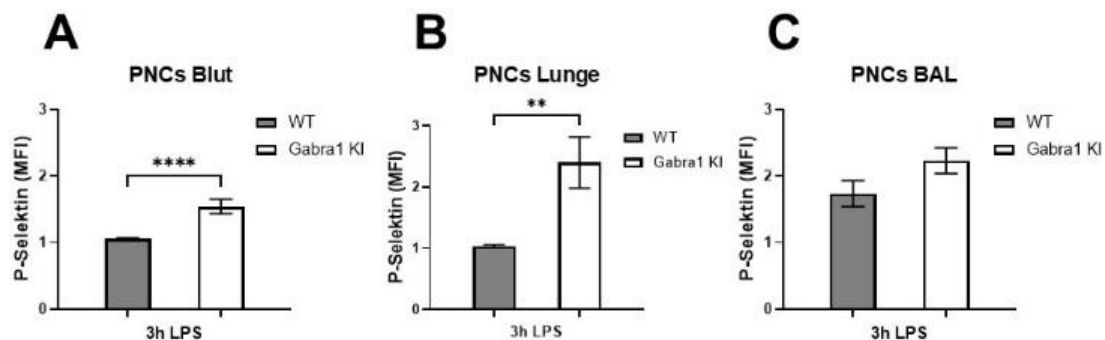


Abbildung 19: Vergleich der Expression von P-Selektin zwischen Wildtyp- und *Gabra1*^{KI}-Tieren.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von P-Selektin auf Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs) in Blut (A), Lungengewebe (B) und BAL (C) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und *Gabra1*^{KI}-Tieren nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben bei normalverteilten und mittels Whitney-Mann-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$).

A: Blut 3h LPS; $p < 0,0001$; $n = 16/12$ (WT/ *Gabra1*^{KI}). B: Lunge 3h LPS; $p = 0,0011$; $n = 16/12$.

C: BAL 3h LPS; $n = 14/7$.

3.2.2 L-Selektin

Die Expression von L-Selektin auf PNCs war drei Stunden nach LPS-Inhalation auf den PNCs im Blut der Gabra1^{KI}-Tiere signifikant gesteigert (Abbildung 20: A1), in der BAL signifikant geringer (Abbildung 20: A3). Im Lungengewebe zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abbildung 20: A2). Auf PMNs zeigte sich im 24-Stunden-Intervall im Lungengewebe der Gabra1^{KI}-Tiere eine signifikant gesteigerte L-Selektin-Expression (Abbildung 20: B2), in der BAL der Gabra1^{KI}-Tiere war die Expression signifikant erniedrigt (Abbildung 20: B3), während im Blut kein signifikanter Unterschied detektiert werden konnte (Abbildung 20: B1).

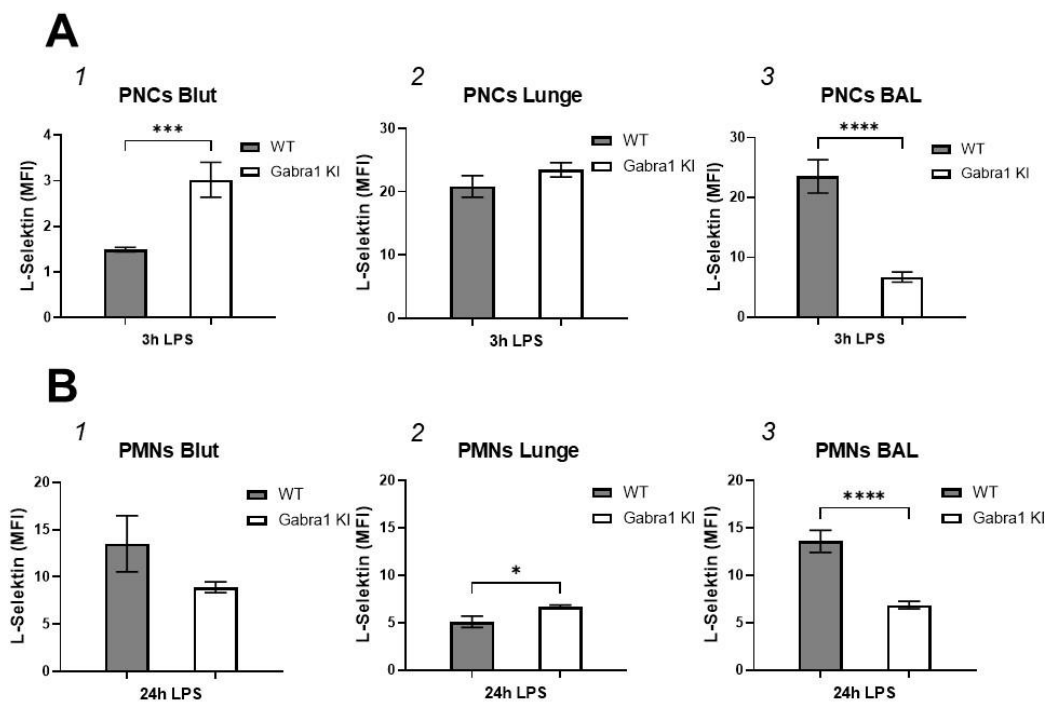


Abbildung 20: Vergleich der Expression von L-Selektin zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von L-Selektin auf Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs) (A) drei Stunden und auf polymorphkernigen Granulozyten (PMNs) (B) 24 Stunden nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) in Blut (1), Lungengewebe (2) und BAL (3) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und Gabra1^{KI}-Tieren gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben bei normalverteilten und mittels Whitney-Mann-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). §: Daten teilweise publiziert (137).

A1: Blut 3h LPS; $p = 0,0001$; $n = 16/12$ (WT/ Gabra1^{KI}).

B1: Blut 24h LPS; $n = 15/16$. §

A2: Lunge 3h LPS; $n = 15/12$.

B2: Lunge 24h LPS; $p = 0,017$; $n = 16/16$. §

A3: BAL 3h LPS; $p < 0,0001$; $n = 16/12$.

B3: BAL 24h LPS; $p < 0,0001$; $n = 15/16$. §

3.2.3 P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1

Drei Stunden nach LPS-Inhalation konnte im Blut der *Gabra1^{KI}*-Tiere ein signifikanter Anstieg der Expression von PSGL-1 auf PNCs nachgewiesen werden (*Abbildung 21: A1*). Dieser Unterschied zeigte sich im Lungengewebe nicht (*Abbildung 21: A2*). In der BAL war im Drei-Stunden-Intervall die Expression von PSGL-1 auf PNCs bei den *Gabra1^{KI}*-Tieren signifikant niedriger als bei der Wildtyp-Kohorte (*Abbildung 21: A3*). Auf PMNs der *Gabra1^{KI}*-Tiere wurde PSGL-1 24 Stunden nach LPS-Inhalation sowohl im Blut als auch in Lungengewebe und BAL signifikant weniger stark exprimiert (*Abbildung 21: B1-B3*).

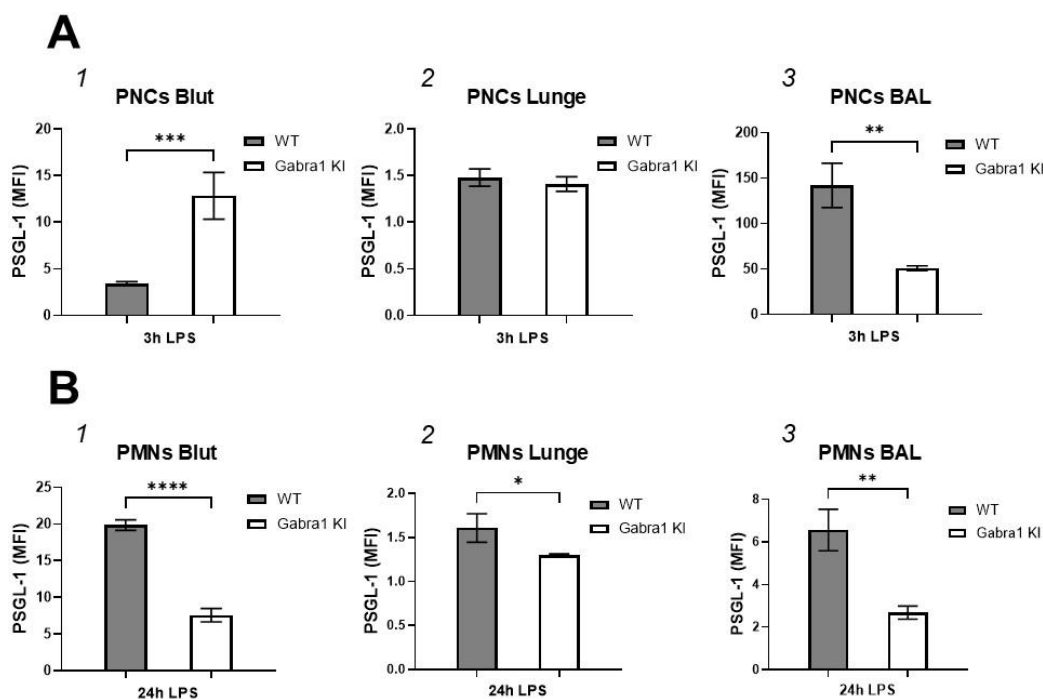


Abbildung 21: Vergleich der Expression von P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 zwischen Wildtyp- und *Gabra1^{KI}*-Tieren.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) auf Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs) (A) drei Stunden und auf polymorphkernigen Granulozyten (PMNs) (B) 24 Stunden nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) in Blut (1), Lungengewebe (2) und BAL (3) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und *Gabra1^{KI}*-Tieren gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben bei normalverteilten und mittels Whitney-Mann-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). §: Daten teilweise publiziert (137).

A1: Blut 3h LPS, $p = 0,0005$, $n = 14/12$ (WT/ *Gabra1^{KI}*).

B1: Blut 24h LPS, $p < 0,0001$, $n = 16/12$.

A2: Lunge 3h LPS, $n = 14/12$.

B2: Lunge 24h LPS, $p = 0,0126$, $n = 8/16$. §

A3: BAL 3h LPS, $p = 0,0033$, $n = 14/11$.

B3: BAL 24h LPS, $p = 0,0048$, $n = 15/16$. §

3.2.4 CD11b

Auf PNCs im Blut der *Gabra1^{KI}*-Tiere wurde drei Stunden nach LPS-Inhalation eine signifikant gesteigerte CD11b-Expression nachgewiesen (Abbildung 22: A1), wobei sich in Lungengewebe und BAL kein signifikanter Unterschied zeigte (Abbildung 22: A2 und A3). Im 24-Stunden-Intervall war die Expression von CD11b auf PMNs der *Gabra1^{KI}*-Tiere in Blut, Lungengewebe und BAL signifikant erhöht (Abbildung 22: B1-B3).

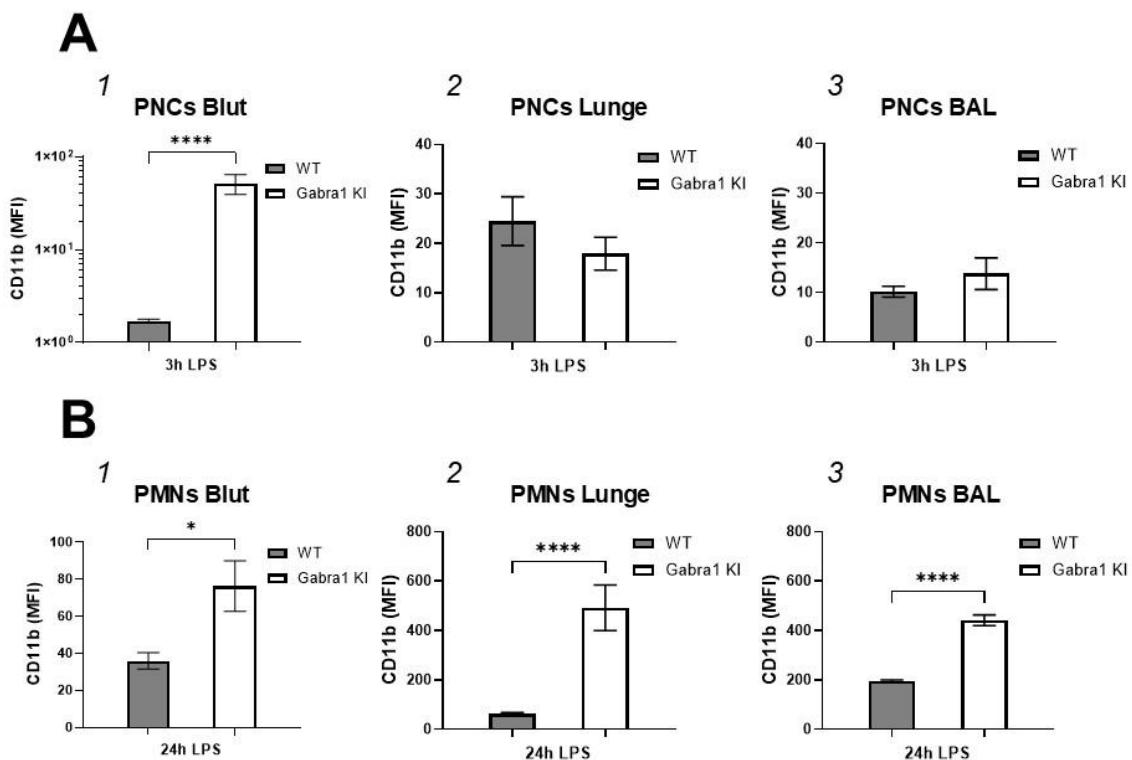


Abbildung 22: Vergleich der Expression von CD11b zwischen Wildtyp- und *Gabra1^{KI}*-Tieren.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von CD11b auf Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs) (A) drei Stunden und auf polymorphkernigen Granulozyten (PMNs) (B) 24 Stunden nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) in Blut (1), Lungengewebe (2) und BAL (3) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und *Gabra1^{KI}*-Tieren gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Stichproben bei normalverteilten und mittels Whitney-Mann-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$).

A1: Blut 3h LPS, $p < 0,0001$, $n = 12/12$ (WT/ *Gabra1^{KI}*).

B1: Blut 3h LPS, $p = 0,0121$, $n = 16/16$.

A2: Lunge 3h LPS, $n = 15/12$.

B2: Lunge 3h LPS, $p < 0,0001$, $n = 8/16$.

A3: BAL 3h LPS, $n = 16/10$.

B3: BAL 3h LPS, $p < 0,0001$, $n = 15/16$.

3.2.5 Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen 1

Drei Stunden nach LPS-Inhalation wurde LFA-1 auf den PNCs der Gabra1^{KI}-Tiere in Blut, Lungengewebe und BAL signifikant stärker exprimiert (Abbildung 23: A1-A3). 24 Stunden nach LPS-Inhalation zeigte sich auf den PMNs der Gabra1^{KI}-Tiere in der BAL eine signifikant geringere Expression von LFA-1 (Abbildung 23: B1 und B2). In Blut und Lungengewebe war kein signifikanter Unterschied nachweisbar (Abbildung 23: B1 und B2).

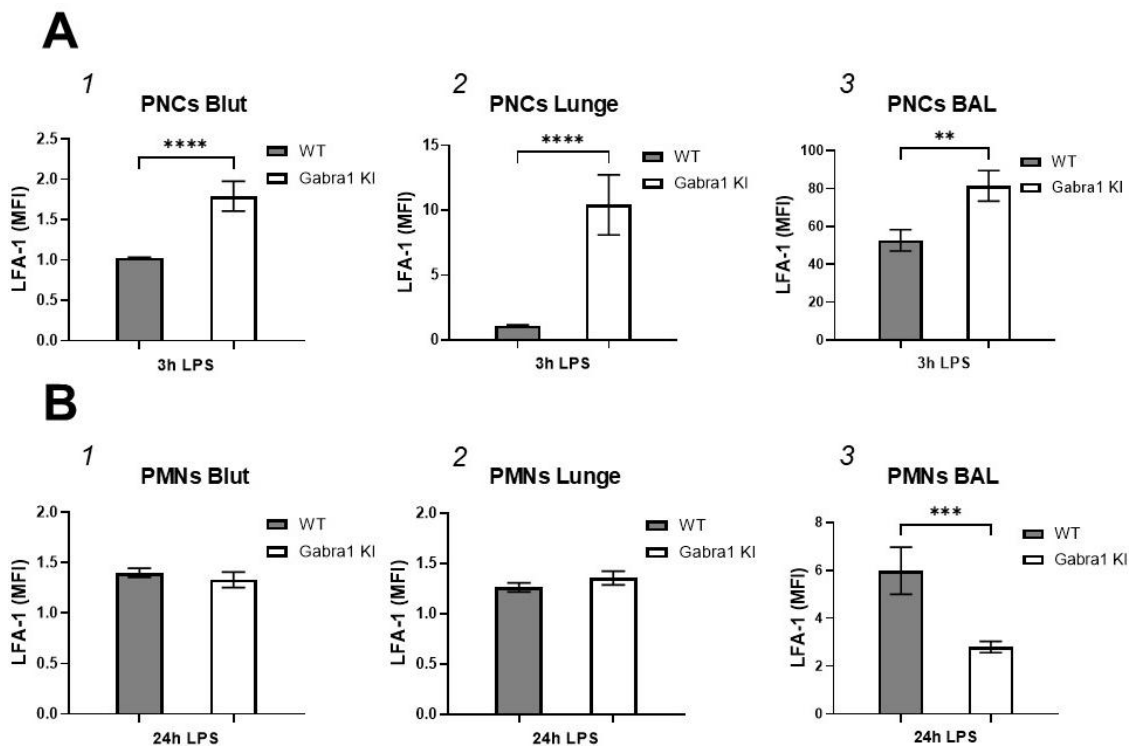


Abbildung 23: Vergleich der Expression von Lymphozytenfunktions-assoziiertem Antigen 1 zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren.

Durchflusszytometrische Bestimmung der Expression von Lymphozytenfunktions-assoziiertem Antigen 1 (LFA-1) auf Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs) (A) drei Stunden und auf polymorphkernigen Granulozyten (PMNs) (B) 24 Stunden nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) in Blut (1), Lungengewebe (2) und BAL (3) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und Gabra1^{KI}-Tieren gemessen durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). Darstellung der Ergebnisse im Punktdiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels t-Test für unabhängige Stichproben bei normalverteilten und mittels Whitney-Mann-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). §: Daten teilweise publiziert (137).

A1: Blut 3h LPS, $p < 0,0001$, $n = 15/12$ (WT/ Gabra1^{KI}).

B1: Blut 3h LPS, $n = 8/16$.

A2: Lunge 3h LPS, $p < 0,0001$, $n = 16/12$.

B2: Lunge 3h LPS, $n = 8/16$. §

A3: BAL 3h LPS, $p = 0,0072$, $n = 13/12$.

B3: BAL 3h LPS, $p < 0,0008$, $n = 8/10$. §

3.3 Zytokine

Für das Fortschreiten der Entzündungsreaktion und die Chemotaxis der PMNs sind diverse Entzündungsmediatoren von Relevanz (vergleiche *Absatz 1.2.2*). Mittels ELISA wurde die Konzentration der Zytokine TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2 in der BAL drei Stunden nach LPS-Inhalation untersucht.

Bei den Gabra1^{Kl}-Tieren konnte gegenüber den WT-Tieren eine signifikant erhöhte Konzentration von TNF α (*Abbildung 24: A*), IL-6 (*Abbildung 24: B*), CXCL1 (*Abbildung 24: C*) und CXCL2 (*Abbildung 24: D*) in der BAL nachgewiesen werden. Grundsätzlich zeigte sich für alle Populationen und alle Zytokine eine signifikant gesteigerte Sekretion nach Stimulation mit LPS im Vergleich zu unstimulierten Tieren (*Abbildung 24: A-D*). Weder nach Applikation von Sevofluran noch von Propofol konnte bei Wildtyptieren ein signifikanter Effekt auf die bronchoalveoläre Sekretion der untersuchten Zytokine festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

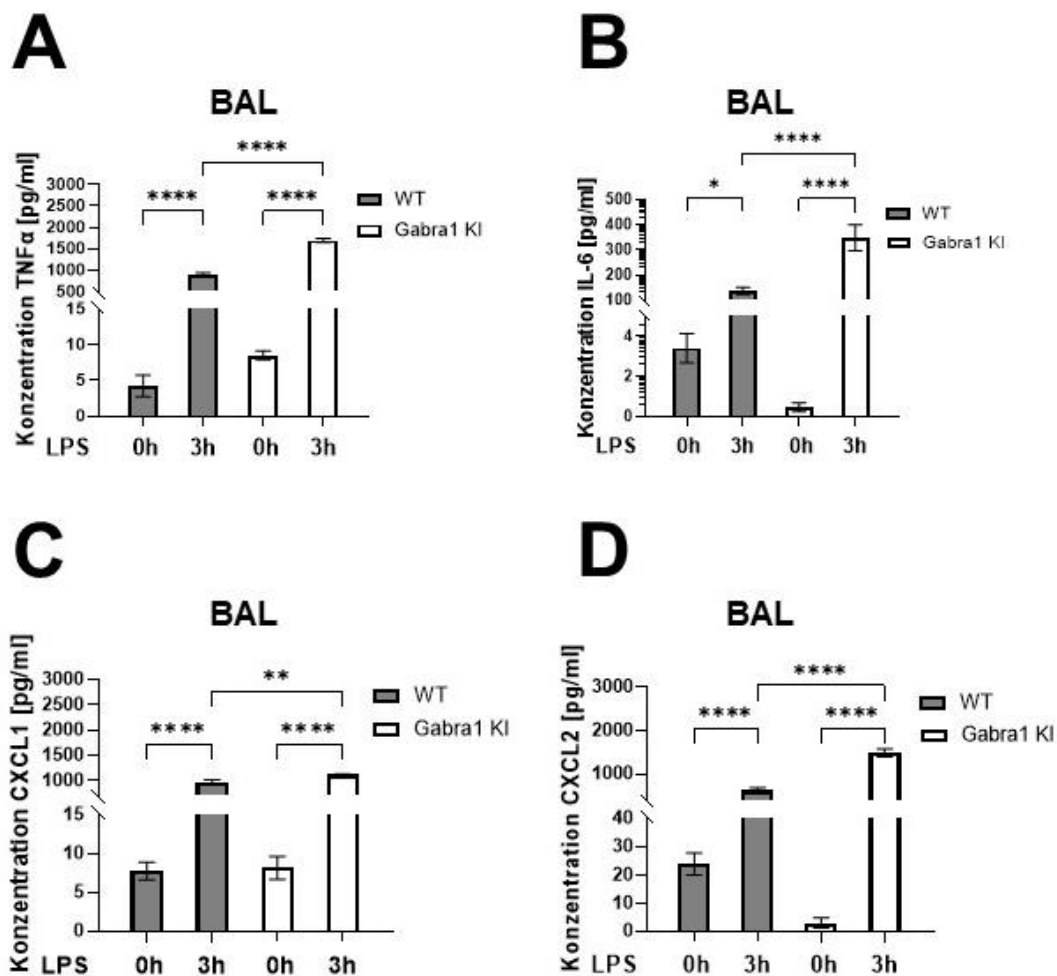


Abbildung 24: Vergleich der Konzentration von TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2 zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren.

Bestimmung der Konzentration von TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2 in der BAL nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und Gabra1^{KI}-Tieren mittels ELISA. Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA bei normalverteilten und mittels Kruskal-Wallis-Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$). §: Daten teilweise publiziert (137).

A: TNF α -Konzentration; $p < 0,0001$ (WT \emptyset LPS vs. WT 3h LPS), $p < 0,0001$ (WT 3h LPS vs. Gabra1^{KI} 3h LPS), $p < 0,0001$ (Gabra1^{KI} \emptyset LPS vs. Gabra1^{KI} 3h LPS); $n = 6/16/8/11$ (WT \emptyset LPS/WT 3h LPS/Gabra1^{KI} \emptyset LPS/Gabra1^{KI} 3h LPS). §

B: IL-6-Konzentration; $p = 0,0344$ (WT \emptyset LPS vs. WT 3h LPS), $p < 0,0001$ (WT 3h LPS vs. Gabra1^{KI} 3h LPS), $p < 0,0001$ (Gabra1^{KI} \emptyset LPS vs. Gabra1^{KI} 3h LPS); $n = 6/16/7/12$. §

C: CXCL1-Konzentration; $p < 0,0001$ (WT \emptyset LPS vs. WT 3h LPS), $p = 0,0027$ (WT 3h LPS vs. Gabra1^{KI} 3h LPS), $p < 0,0001$ (Gabra1^{KI} \emptyset LPS vs. Gabra1^{KI} 3h LPS); $n = 5/8/6/7$. §

D: CXCL2-Konzentration; $p < 0,0001$ (WT \emptyset LPS vs. WT 3h LPS), $p = 0,0027$ (WT 3h LPS vs. Gabra1^{KI} 3h LPS), $p < 0,0001$ (Gabra1^{KI} \emptyset LPS vs. Gabra1^{KI} 3h LPS); $n = 6/8/3/7$. §

3.4 Genexpression

Es hat sich gezeigt, dass der funktionelle Knock-In der α_1 -Untereinheit des GABA_AR sowohl auf zellulärer als auch auf Zytokinebene signifikante Unterschiede bedingt (vergleiche Absätze 3.1 und 3.3). Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob sich diese Unterschiede auch bereits auf Genexpressionsebene manifestieren.

3.4.1 Vergleich zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren

3.4.1.1 TNF α , CXCL1 und CXCL2

Analog zur erhöhten TNF α -Konzentration in der BAL (vergleiche *Abbildung 24: A*) konnte auch eine signifikant gesteigerte Expression des TNF α -Gens nachgewiesen werden (*Abbildung 25: A*). Die CXCL1-Expression war in der Lunge der Gabra1^{KI}-Tiere signifikant erhöht (*Abbildung 25: B*), was die erhöhte Konzentration in der BAL (vergleiche *Abbildung 24: C*) widerspiegelt. Für die Genexpression von CXCL2 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren (*Abbildung 25: B*). Es wurden wiederholt PCRs für IL-6 pipettiert, jedoch konnte zu keinem Zeitpunkt eine Verdünnungsreihe als Standard etabliert werden, weshalb das Experiment abgebrochen wurde, um hinreichend Probenmaterial für die übrigen PCR-Versuche zur Verfügung zu haben.

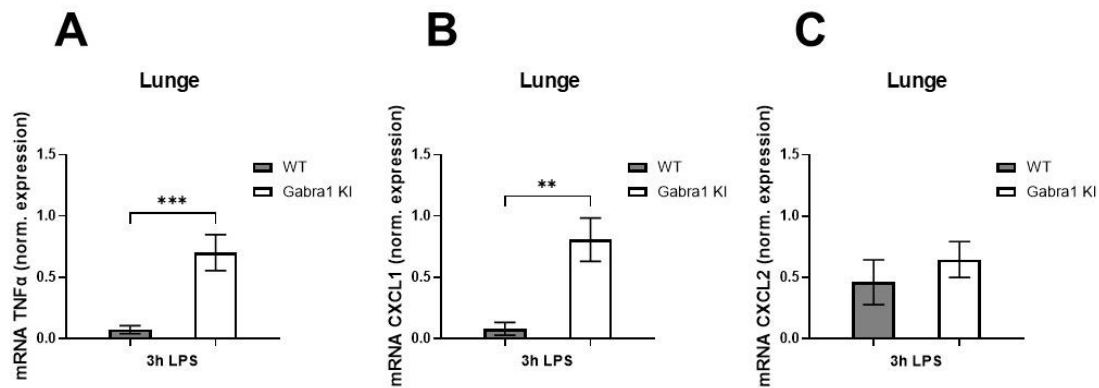


Abbildung 25: Vergleich der pulmonalen Genexpression von TNF α , CXCL1 und CXCL2 zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren.

Bestimmung der Genexpression von TNF α , CXCL1 und CXCL2 im Lungengewebe nach Stimulation mit LPS mittels RT-qPCR vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und Gabra1^{KI}-Tieren. Darstellung der normalisierten Expression mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels t-Test für unabhängige Gruppen bei normalverteilten und mittels Mann-Whitney-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (** $p < 0,01$).

A: normalisierte Genexpression TNF α ; $p = 0,0007$; $n = 6/8$ (WT/ Gabra1^{KI}).

B: normalisierte Genexpression CXCL1; $p = 0,0012$; $n = 6/8$.

C: normalisierte Genexpression CXCL2; $n = 7/8$.

3.4.1.2 MAPK1 und MAPK3

MAPKs spielen bei intrazellulären Vorgängen im Rahmen der Inflammationsreaktion sowie der transendothelialen Migration von PMNs eine Rolle (vergleiche Absätze 1.2.1 und 1.2.4), weshalb die intrapulmonale Expression von MAPK1 und MAPK3 untersucht wurde. Während sich bei der Expression von MAPK1 kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren zeigte (Abbildung 26: A), konnte für MAPK3 bei den Gabra1^{KI}-Tieren eine signifikant erhöhte Expression nachgewiesen werden (Abbildung 26: B).

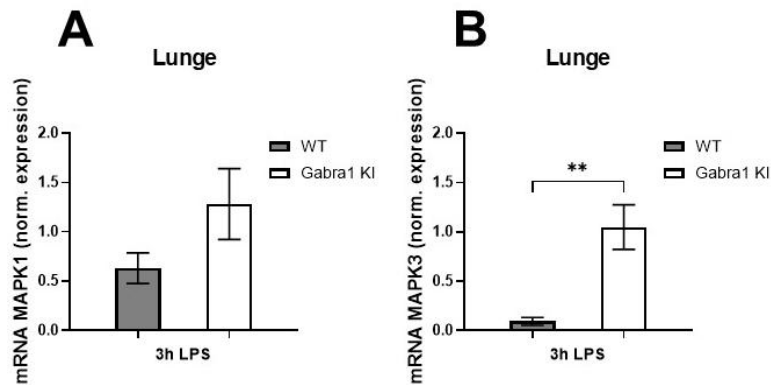


Abbildung 26: Vergleich der pulmonalen Genexpression von MAPK1 und MAPK3 zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren.

Bestimmung der Genexpression von MAPK1 und MAPK3 im Lungengewebe nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) mittels RT-qPCR vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und Gabra1^{KI}-Tieren. Darstellung der normalisierten Expression mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels t-Test für unabhängige Gruppen bei normalverteilten und mittels Mann-Whitney-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (**p<0,01).

A: normalisierte Genexpression MAPK1; n=8/8 (WT/ Gabra1^{KI}).

B: normalisierte Genexpression MAPK3; p=0,0013; n=6/8.

3.5 Myeloperoxidasefreisetzung

PMNs entfalten ihre antibakterielle, aber auch gewebeschädigende Wirkung unter anderem durch die Produktion von ROS (siehe Absatz 1.2.5). Ein wichtiges Enzym hierfür ist die MPO (siehe Absatz 2.8). Diese wurde in der BAL photometrisch bei einer Wellenlänge von 405 nm bestimmt.

Nach drei Stunden zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren (Abbildung 27: A). Nach 24 Stunden konnte eine signifikant erhöhte MPO-Freisetzung bei den Gabra1^{KI}-Tieren nachgewiesen werden (Abbildung 27: B). Im zeitlichen Verlauf zeigt sich, dass es drei Stunden nach Stimulation mit LPS in beiden Gruppen lediglich zu einem geringen Anstieg der MPO-Freisetzung kommt, während diese im 24-Stunden-Intervall in beiden Mauslinien signifikant ansteigt (Abbildung 27: C).

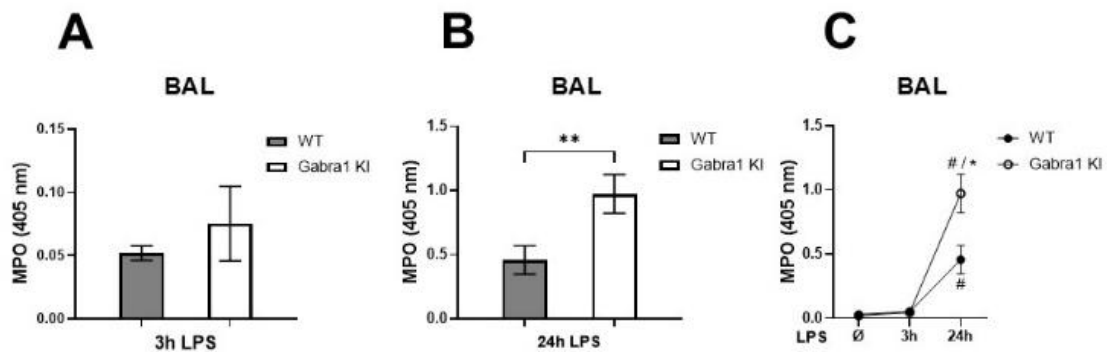


Abbildung 27: Vergleich der bronchoaveolären MPO-Freisetzung zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren.

Bestimmung der MPO-Freisetzung in der BAL nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und Gabra1^{KI}-Tieren. Photometrische Messung mit einer Wellenlänge von 405 nm. Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (A, B) sowie im Punktdiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (C). Statistischer Vergleich mittels t-Test für unabhängige Gruppen bei normalverteilten und mittels Mann-Whitney-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (* $p < 0,05$). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur (** $p < 0,05$; # stimuliert vs. nicht-stimuliert, * WT vs. Gabra1^{KI}).

A: 3h LPS; $n=15/11$ (WT/ Gabra1^{KI}).

B: 24h LPS; $p=0,017$; $n=15/13$.

C: zeitlicher Verlauf; $n=8/7, 15/11, 15/13$ (WT/ Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS).

3.6 Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage

Die Messung der Proteinkonzentration in der BAL stellt eine Methode dar, das Ausmaß des inflammationsbedingten pulmonalen Kapillarlecks (siehe Absatz 1.2) zu untersuchen. Hierfür wurde ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA) verwendet.

Drei Stunden nach LPS-Inhalation konnte eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration in der BAL der Gabra1^{KI}-Tieren festgestellt werden (Abbildung 28: A), nach 24 Stunden bestand kein signifikanter Unterschied (Abbildung 28: B). Im zeitlichen Verlauf zeigt sich, dass die Stimulation mit LPS in beiden Mauslinien für einen kontinuierlichen Anstieg der alveolären Proteinkonzentration sorgt, welcher jedoch bei den Gabra1^{KI}-Tieren initial schneller vonstattengeht (Abbildung 28: C).

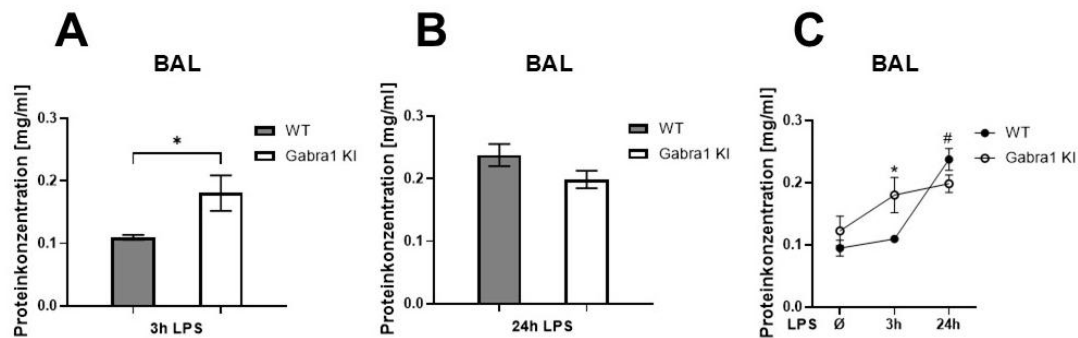


Abbildung 28: Vergleich der bronchoaveolären Proteinkonzentration zwischen Wildtyp- und Gabra1^{KI}-Tieren.

Bestimmung der Proteinkonzentration in der BAL nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) mittels Bicinchinonsäure-Assay (BCA) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und Gabra1^{KI}-Tieren. Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (A, B) sowie im Punktdiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts (C). Statistischer Vergleich mittels *t*-Test für unabhängige Gruppen bei normalverteilten und mittels Mann-Whitney-U-Test bei nicht-normalverteilten Werten (**p*<0,05). Mehrgruppenvergleich im zeitlichen Verlauf berechnet mit two-way ANOVA und Bonferroni-Korrektur (#**p*<0,05: # stimuliert vs. nicht-stimuliert, * WT vs. Gabra1^{KI}). §: Daten teilweise publiziert (137).

A: 3h LPS; *p*=0,0133; *n*=14/12 (WT/ Gabra1^{KI}). § B: 24h LPS; *n*=15/15.

C: zeitlicher Verlauf; *n*=8/8, 14/12, 15/15 (WT/ Gabra1^{KI}: Ø LPS, 3h LPS, 24h LPS).

3.7 Messung der alveolären Septumdicke

Im Rahmen der pulmonalen Inflamationsreaktion kommt es zum Kapillarleck und infolgedessen zum Austritt eines proteinreichen Exsudats (siehe Absatz 1.2), was eine ödematöse Zunahme der Alveolarseptendicke zur Folge hat. Die Messung der alveolären Septumdicke stellt deshalb neben der Messung der Proteinkonzentration in der BAL (siehe 3.6) eine weitere Methode dar, das Ausmaß der pulmonalen Schädigung aufgrund der Inflammation zu beurteilen. Es wurde der Zeitpunkt 24 Stunden nach Stimulation mit LPS betrachtet.

Abbildung 29 zeigt beispielhaft ein histologisches Präparat eines Wildtypieres ohne Stimulation mit LPS in 20facher Vergrößerung (Abbildung 29: A) sowie repräsentative Ausschnitte der histologischen Präparate von Wildtypieren ohne und 24 Stunden nach Stimulation mit LPS (Abbildung 29: B und C) und Gabra1^{KI}-Tieren 24 Stunden nach LPS-Inhalation (Abbildung 29: D). Die Alveolarseptendicke nimmt durch Stimulation mit LPS sowohl bei Wildtyp- als auch bei Gabra1^{KI}-Tieren signifikant zu (Abbildung 29: E). Darüber hinaus konnte

nachgewiesen werden, dass die alveoläre Septumdicke bei $Gabra1^{KI}$ -Tieren 24 Stunden nach LPS-Inhalation signifikant größer ist als bei Wildtyp-Tieren (Abbildung 29: E).

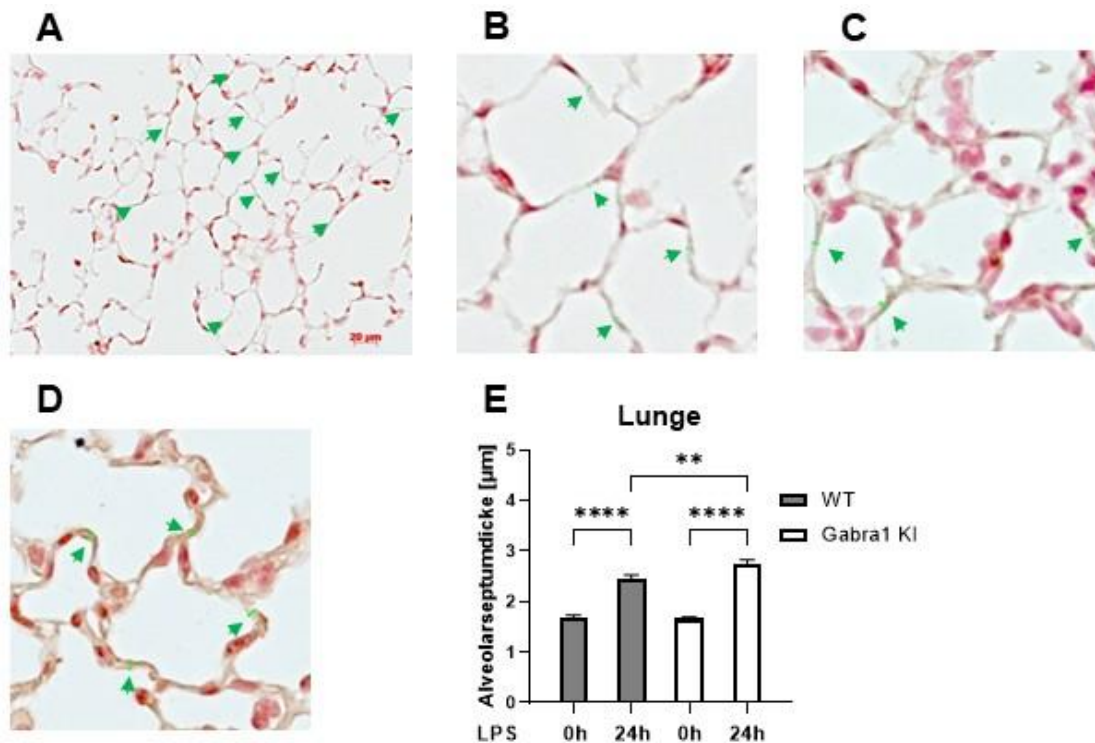


Abbildung 29: Histologische Abbildungen und Vergleich der Alveolarseptendicke zwischen Wildtyp- und $Gabra1^{KI}$ -Tieren.

A: Histologische Abbildung eines Wildtyp-Lungenpräparats ohne Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) in 20x Vergrößerung, mit vermessenen Alveolarsepten (mit Pfeilen markiert).

B: repräsentativer Ausschnitt eines Wildtyp-Lungenpräparats ohne Stimulation mit LPS mit vermessenen Alveolarsepten (mit Pfeilen markiert).

C: repräsentativer Ausschnitt eines Wildtyp-Lungenpräparats 24 Stunden nach Stimulation mit LPS mit vermessenen Alveolarsepten (mit Pfeilen markiert).

D: repräsentativer Ausschnitt eines $Gabra1^{KI}$ -Lungenpräparats 24 Stunden nach Stimulation mit LPS mit vermessenen Alveolarsepten (mit Pfeilen markiert).

E: Vergleich der alveolären Septumdicke nach Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) vergleichend zwischen Wildtyp- (WT) und $Gabra1^{KI}$ -Tieren. Darstellung der Ergebnisse im Balkendiagramm mit Mittelwert und Standardfehler des Mittelwerts. Statistischer Vergleich mittels one-way ANOVA bei normalverteilten und mittels Kruskal-Wallis-Test bei nicht-normalverteilten Werten (**p < 0,01, ****p < 0,0001). §: Daten teilweise publiziert (137).

p < 0,0001 (WT Ø LPS vs. 24h LPS), p = 0,0026 (WT 24h LPS vs. $Gabra1^{KI}$ 24h LPS),

p < 0,0001 ($Gabra1^{KI}$ Ø LPS vs. 24h LPS);

n = 50/50/46/50 (WT Ø LPS/ WT 24h LPS/ $Gabra1^{KI}$ Ø LPS/ $Gabra1^{KI}$ 24h LPS).

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat erstmals umfangreich den Einfluss der α_1 -Untereinheit von GABA_A-Rezeptoren auf die akute Lungenschädigung und das ARDS untersucht. Bei dem verwendeten Modell der LPS-induzierten pulmonalen Inflammation handelt es sich um ein etabliertes Modell (127, 131). Es wurden mehrere Ebenen der Entzündungsreaktion betrachtet: die Migration von Immunzellen und ihre Verteilung innerhalb der verschiedenen Kompartimente sowie ihre exprimierten Oberflächenproteine, die Genexpression von für den Entzündungsprozess relevanten Molekülen in der Lunge, Zytokinkonzentrationen in der BAL, die Aktivität von PMNs sowie das Ausmaß des Kapillarlecks.

Die klinische Relevanz des ARDS ist unbestritten (siehe *Absatz 1.1*). Es konnte zudem bereits gezeigt werden, dass GABA und spezifisch GABA_ARs eine relevante Rolle für die Inflammationsprozesse spielen (siehe *Absatz 1.3*). Dabei wurde jedoch deutlich, dass unterschiedliche Untereinheiten verschiedene Effekte aufweisen. Während für die α_4 - und α_5 -Untereinheiten antiinflammatorische Effekte nachgewiesen werden konnten (115, 122, 140), zeigte die α_3 -Untereinheit in einem stressinduzierten Inflammationsmodell des murinen Kolons proinflammatorische Eigenschaften (121). Im selben Modell zeigte die α_1 -Untereinheit wiederum eine antiinflammatorische Wirkung. Eine dezidierte Betrachtung der einzelnen Untereinheiten ist folglich unumgänglich, um gegebenenfalls zukünftig eine zielgerichtete Therapie etablieren zu können.

4.1 Zellzahlen

Im Blut der Gabra1^{Kl}-Tiere konnte 24 Stunden nach LPS-Stimulation im Vergleich zu den Wildtyptieren eine signifikant erniedrigte Leukozyten- und PMN-Zahl nachgewiesen werden (vergleiche *Absätze 3.1.1.1* und *3.1.2.1*). Im Rahmen einer Infektion steigt grundsätzlich die Zahl der Leukozyten und im Rahmen einer bakteriellen Infektion speziell die Zahl der PMNs im Blut (141). Es ist jedoch bekannt, dass es im Rahmen systemischer Infektionen auch zu einer Leukopenie

kommen kann (142). Die reduzierte Leukozyten- und PMN-Zahl im Blut der Gabra1^{Kl}-Tieren kann folglich ein Hinweis auf eine systemische Entzündungsreaktion sein.

Sowohl drei als auch 24 Stunden nach LPS-Inhalation wurde im Lungengewebe der Gabra1^{Kl}-Tiere eine signifikant gesteigert Leukozyten- und PMN-Zahl im Vergleich zu den WT-Tieren detektiert (vergleiche *Absätze 3.1.1.1* und *3.1.2.1*). Sanders et al. konnten in einem murinen Pneumonie-Modell nachweisen, dass Diazepam die Aktivität von Alveolarmakrophagen inhibiert, was unter anderem in einer reduzierten Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IL-6 resultierte (109). Diese sind für die Chemotaxis von Leukozyten und im Speziellen von PMNs relevant (vergleiche *Absatz 1.2.2*), eine niedrigere Konzentration geht mit einer Reduktion der transendothelialen Migration einher. Da andere GABA_AR-Agonisten ohne Affinität für die α_1 -Untereinheit diesen Effekt nicht aufwiesen, ist davon auszugehen, dass die α_1 -Untereinheit hierfür eine kritische Rolle spielt. Fernández et al. konnten zudem in einem murinen Modell für experimentelle Autoimmun-Enzephalitis zeigen, dass die Applikation von Diazepam in einer signifikanten Inhibition der Infiltration von Leukozyten in das ZNS resultiert (119). Angesichts der bereits zitierten Arbeit von Sanders et al, liegt auch hier eine Beteiligung der α_1 -Untereinheit nahe. Kim et al. haben in einem murinen Modell für Lungentuberkulose nachgewiesen, dass die Behandlung der Tiere mit GABA mit einer signifikanter Reduktion der Infiltration des Lungengewebes durch PMNs einhergeht (143). Der GABA_AR-Agonist Topiramat inhibiert in einem murinen Herzinfarkt-Modell die Migration von Makrophagen in das Infarktareal und induziert verstärkt die Entwicklung der Makrophagen hin zum antiinflammatorischen M2-Phänotyp, wie Wang et al. nachgewiesen haben, was unter anderem eine reduzierte Zytokinproduktion zur Folge hat (112). In unterschiedlichen experimentellen Inflamationsmodellen wurde bereits der Einfluss von GABA_ARs auf das Migrationsverhalten von Leukozyten nachgewiesen, die vorliegende Arbeit zeigt diesen Effekt nun auch für die pulmonale Inflammation und kann in Einklang mit der Arbeit von Sanders et al. die α_1 -Untereinheit des GABA_AR als hierfür relevante Struktur identifizieren.

Drei Stunden nach Stimulation mit LPS war eine signifikant erhöhte Leukozyten- und PMN-Zahl in der BAL der Gabra1^{KL}-Tiere nachweisbar, nach 24 Stunden wurde kein signifikanter Effekt mehr festgestellt (vergleiche *Absätze 3.1.1.1* und *3.1.2.1*). Im Rahmen der Literaturrecherche konnten keine Quellen identifiziert werden, die explizit den Einfluss von GABA_ARs oder GABA_Aergem Signaling auf die Leukozyten- beziehungsweise PMN-Zahl in der BAL untersuchen. Der Effekt auf deren Migration im Rahmen einer Inflammation wurde im vorangegangenen Abschnitt bereits diskutiert. Da die Zeitspanne zwischen beiden gewählten Messpunkten relativ groß ist, wäre es grundsätzlich sinnvoll, noch weitere Zeitpunkte zu untersuchen, um die Entwicklung der Inflammation besser beurteilen zu können. Andere Publikationen, die an murinen Modellen die akute Lungenschädigung untersucht haben, haben allerdings häufig ebenfalls lediglich frühe Messzeitpunkte innerhalb der ersten sechs Stunden nach Stimulation (125, 128, 144) und beziehungsweise oder das 24-Stunden-Intervall betrachtet (127, 131), sodass die Frage gestellt werden kann, inwieweit durch zusätzliche Messpunkte weiterer Erkenntnisgewinn zu erwarten wäre. Reutershan et al. konnten wiederum zeigen, dass die transepitheliale Migration von PMNs in der Lunge im murinen LPS-ALI-Modell erst nach 24 Stunden ihren Höhepunkt erreicht, weshalb eine Betrachtung des gesamten Zeitraums sinnvoll erscheint (145).

Sowohl für Sevofluran (125) als auch für Propofol (126) konnte bereits nachgewiesen werden, dass sie die Migration von Leukozyten und konkret von PMNs in murinen ALI-Modellen hemmen. Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (vergleiche *Absätze 3.1.1.2* und *0*). Da die inhibitorische Wirkung von Sevofluran und Propofol auf die Migration bei den Gabra1^{KL}-Tieren nicht nachweisbar war (vergleiche *Absatz 3.1.4*), kann angenommen werden, dass GABA_ARs und konkret deren α_1 -Untereinheit eine Rolle spielen. Die Bindungsstelle für volatile Anästhetika wie Sevofluran am GABA_AR beinhaltet eine α -Untereinheit (146) und auch für Propofol konnte nachgewiesen werden, dass es zwischen einer α - und einer β -Untereinheit an den GABA_AR bindet (147). Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass die α_1 -Untereinheit die am häufigsten auf Immunzellen exprimierte α -Untereinheit ist

(118), erscheint die Annahme, dass sie für die inhibitorische Wirkung von Sevofluran und Propofol auf die transendotheliale Migration relevant ist, mit Blick auf die Ergebnisse dieser Arbeit durchaus plausibel. Es sei an dieser Stelle lediglich angemerkt, dass beide Medikamente nicht selektiv für GABA_ARs sind (vergleiche *Absatz 1.3*) und für beide auch bereits andere Wirkmechanismen zur Beeinflussung einer Inflammationsreaktion nachgewiesen wurden. Für Propofol wurde beispielsweise eine kompetitive Hemmung des Formyl-Peptid-Rezeptors 1 (FPR-1) detektiert, was in einer reduzierten ROS-Produktion und NETose von PMNs resultierte (130), für die Inhibierung der PMN-Migration durch Sevofluran spielt wiederum auch der Adenosin A_{2B}-Rezeptor eine Rolle (127).

4.2 Oberflächenproteine und PNC-Bildung

Viele der auf PMNs exprimierten Oberflächenproteine sind sowohl für die Migration in entzündliches Gewebe als auch für die PNC-Bildung relevant, wobei beides häufig miteinander zusammenhängt (vergleiche *Absätze 1.2.3* und *1.2.4*).

Der PNC-Anteil war im Blut der Gabra1^{Kl}-Tiere 24 Stunden nach Stimulation mit LPS signifikant erhöht, im Lungengewebe und der BAL jedoch signifikant verringert (vergleiche *Absatz 3.1.3.1*). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass eine Bakteriämie mit erhöhten PNC-Zahlen im Blut einhergeht und auch bei septischen Patient:innen die PNC-Zahl im Blut erhöht ist (148, 149). Ebenso konnte der positive Einfluss der Plättchen-Neutrophilen-Interaktion auf die Migration der PMNs im murinen Modell für LPS-induzierte Lungenschädigung nachgewiesen werden (150). Grommes et al. applizierten LPS inhalativ und konnten im Vier-Stunden-Intervall zeigen, dass eine Plättchendepletion die Migration von PMNs in die Lunge und den Alveolarraum signifikant inhibiert. Folglich kann der erhöhte PNC-Anteil im Blut als relevanter Faktor für die gesteigerte PMN-Migration ins Lungengewebe der Gabra1^{Kl}-Tiere (vergleiche *Absatz 3.1.2.1*) angesehen werden. Während die PNC-Bildung laut Lam et al. für die transendotheliale Migration von Bedeutung ist (151), spielt sie für die transepitheliale Migration in den Alveolarraum laut Adams et al. keine relevante

Rolle (152). Wenn Thrombozyten für die transepitheliale Migration weniger relevant sind, kann vermutet werden, dass es nach der transendothelialen Migration zu einer Auflösung der PNCs kommt. Da der Gabra1-Knock-In einen signifikant positiven Einfluss auf die transendotheliale Migration zu haben scheint, liegt hier eine mögliche Erklärung für den signifikant niedrigeren intrapulmonalen PNC-Anteil (vergleiche *Absatz 3.1.3.1*) bei gleichzeitig signifikant erhöhter intrapulmonaler PMN-Zahl (vergleiche *Absatz 3.1.2.1*). Hierzu konnte jedoch keine vergleichbare Literatur identifiziert werden.

Die Expression von P-Selektin war auf den PNCs der Gabra1^{KI}-Tiere in Blut und Lungengewebe drei Stunden nach LPS-Inhalation signifikant höher als auf jenen der WT-Tiere (vergleiche *Absatz 3.2.1*). Huang et al. und Wacker et al. konnten zeigen, dass Sevofluran die Expression von P-Selektin auf Thrombozyten und daraus resultierend auch die PNC-Bildung in vivo inhibiert (153, 154). In den Experimenten von Fan et al. wiederum erhöhte Sevofluran die Expression von P-Selektin auf Thrombozyten von Patient:innen mit laparoskopischer Cholezystektomie (155). Ob diese Effekte GABA_AR-vermittelt waren, geht aus den jeweiligen Arbeiten nicht hervor. Es konnte keine Literatur identifiziert werden, die dezidiert einen Zusammenhang zwischen GABA_AR-abhängigem Signaling und der Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche von Thrombozyten untersucht hat, die vorliegende Arbeit kann folglich mutmaßlich erstmals diesen Zusammenhang zeigen.

Drei Stunden nach LPS-Inhalation wurde L-Selektin auf den PNCs im Blut der Gabra1^{KI}-Tiere signifikant stärker exprimiert als bei den WT-Tieren, nach 24 Stunden zeigte sich im Vergleich zu den WT-Tieren wiederum eine signifikant gesteigerte L-Selektin-Expression auf den PMNs der Gabra1^{KI}-Tiere (vergleiche *Absatz 3.2.2*). Gabapentin ist ein Antikonvulsivum, das die cerebrale GABA-Konzentration signifikant erhöht (156). Newton et al. konnten in einem murinen Modell für Diabetes mellitus und diabetische Polyneuropathie nachweisen, dass Gabapentin die spinale L-Selektin-Expression und konsekutiv die Migration von PMNs ins Rückenmark inhibiert (157). Es ist folglich möglich, dass die reduzierte L-Selektin-Expression auf die erhöhte GABA-Konzentration zurückzuführen ist

und dass dieser Effekt GABA_AR-vermittelt ist. Dies würde mit den hier zu diskutierenden Ergebnissen übereinstimmen, ist der Arbeit von Newton et al. jedoch nicht zu entnehmen. Von Lubick et al. wurde auf der anderen Seite gezeigt, dass der GABA_AR-Antagonist Securinin die Expression von L-Selektin auf Makrophagen *in vitro* inhibiert (158). Securinin blockiert kompetitiv die Bindungsstelle von GABA am GABA_AR, welche zwischen einer α - und einer β -Untereinheit liegt (147). Da die α_1 -Untereinheit auf Makrophagen stark exprimiert wird (109), kann ihre Relevanz für den Einfluss von Securinin auf die L-Selektin-Expression zumindest in Betracht gezogen werden. Ein vergleichbarer Effekt zeigte sich in der BAL der Gabra1^{KI}-Tiere, wo L-Selektin sowohl auf den PNCs (nach drei Stunden) als auch auf den PMNs (nach 24 Stunden) signifikant weniger stark exprimiert wurde als auf jenen der WT-Tiere (vergleiche Absatz 3.2.2). Ein Erklärungsansatz für die geringere Expression von L-Selektin in der BAL der Gabra1^{KI}-Tiere ist folgender: L-Selektin auf PMNs wird nach deren Aktivierung von der Zelloberfläche abgespalten (*engl.: shedding*) (159), wofür maßgeblich, jedoch nicht ausschließlich die MMP ADAM-17 (*engl.: A disintegrin and metalloprotease 17*) verantwortlich ist (160). Wang et al. haben nachgewiesen, dass auf PMNs im Sputum von Patient:innen, die mit dem respiratorischen Synzytial-Virus infiziert sind, signifikant weniger L-Selektin exprimiert wird (161), es konnte also eine negative Korrelation zwischen der PMN-Aktivierung durch einen inflammatorischen Stimulus und der L-Selektin-Expression auf der Zelloberfläche der PMNs festgestellt werden. Ein dem zugrundeliegender Mechanismus wurde von Rahman et al identifiziert (162): die Aktivierung durch TNF α induziert auf PMNs die Co-Clusterung von L-Selektin und dem Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül 1 (*engl.: platelet endothelial cell adhesion molecule 1; PECAM-1*), was zu einem verstärkten L-Selektin-Shedding führt und die transendotheliale Migration beschleunigt. Die signifikant erhöhte Konzentration in der BAL und Expression im Lungengewebe von TNF α bei den Gabra1^{KI}-Tieren im Vergleich zu den WT-Tieren (vergleiche Absätze 3.3 und 3.4.1.1) kann folglich eine Ursache für das verstärkte Shedding von L-Selektin sein.

PSGL-1 wird drei Stunden nach LPS-Inhalation auf den PNCs im Blut der Gabra1^{KI}-Tiere signifikant stärker exprimiert als auf jenen der WT-Tiere. In der BAL ist die Expression von PSGL-1 auf den PNCs der Gabra1^{KI}-Tiere nach drei Stunden signifikant verringert. Im 24-Stunden-Intervall konnte für alle drei Kompartimente eine signifikant niedrigere PSGL-1-Expression auf den PMNs der Gabra1^{KI}-Tiere im Vergleich zu den WT-Tieren detektiert werden (vergleiche *Absatz 3.2.3*). Almulki et al. konnten nachweisen, dass die Expression von PSGL-1 auf PMNs im Blut im Rahmen der akuten, LPS-induzierten Uveitis hochreguliert wird (163), wie es auch auf den intravasalen PNCs im Drei-Stunden-Intervall detektiert wurde. Adams et al. haben in ihrer Übersichtsarbeit keine Bedeutung von PSGL-1 für die transepitheliale Migration in den Alveolarraum festgestellt (152), dessen geringere Expression in Lungengewebe und BAL der Gabra1^{KI}-Tiere ist folglich nicht als Hinweis auf eine eingeschränkte Migrationsfähigkeit der Zellen zu interpretieren. Gardiner et al. konnten zeigen, dass neutrophile Elastase und Cathepsin G, welche von aktivierten PMNs sezerniert werden (vergleiche *Absatz 1.2.5*), PSGL-1 von der Oberfläche der PMNs abspalten (164). Die erhöhte PMN-Aktivität der Gabra1^{KI}-Tiere (vergleiche *Absatz 3.5*) könnte folglich für die geringere Expression von PSGL-1 verantwortlich sein. Da PSGL-1 für die Interaktion von PMNs und Thrombozyten im Rahmen der PNC-Bildung relevant ist (vergleiche *Absatz 1.2.4*), stellt die verminderte PSGL-1 Expression auf PMNs in Lungengewebe und BAL eine mögliche Ursache für den niedrigeren intrapulmonalen und alveolären PNC-Anteil bei den Gabra1^{KI}-Tieren dar (vergleiche *Absatz 3.1.3.1*).

CD11b, ein Bestandteil des Integrins MAC-1 auf PMNs, wurde im Blut der Gabra1^{KI}-Tiere sowohl drei Stunden nach LPS-Inhalation auf PNCs als auch 24 Stunden nach LPS-Inhalation auf PMNs signifikant stärker exprimiert als auf jenen der WT-Tiere. Zudem war die Expression auch auf PMNs in Lungengewebe und BAL der Gabra1^{KI}-Tiere 24 Stunden nach Stimulation mit LPS signifikant erhöht (vergleiche *Absatz 3.2.4*). Lubick et al. haben gezeigt, dass der GABA_AR-Antagonist Securinin in vitro die Expression von CD11b auf Makrophagen erhöht (158). Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass der GABA_AR für die Expression von CD11b auf

Immunzellen relevant ist und dass eine Blockade des Rezeptors beziehungsweise eine funktionelle Ausschaltung seiner α_1 -Untereinheit mit einer verstärkten Expression von CD11b einhergeht, welches für die transendotheliale Migration von Bedeutung ist.

Drei Stunden nach LPS-Inhalation war die Expression von LFA-1 auf den PNCs der *Gabra1^{KI}*-Tiere im Vergleich zu jenen der WT-Tiere in allen drei Kompartimenten signifikant erhöht, während sie nach 24 Stunden auf den PMNs in der BAL der *Gabra1^{KI}*-Tiere signifikant niedriger war (vergleiche *Absatz 3.2.5*). Harmon et al. konnten zeigen, dass Clomethiazol, ein GABA_AR-Modulator, welcher die Wirkung von GABA am GABA_AR potenziert und diesen in hohen Dosen selbst aktiviert (165), in vitro die Expression von CD18, einem Bestandteil von LFA-1, auf PMNs inhibiert (166). Die Aktivierung von GABA_ARs scheint demzufolge eine inhibitorische Wirkung auf die Expression von LFA-1 zu haben, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit zumindest für PNCs deckt, bei welchen der Knock-In der α_1 -Untereinheit in einer gesteigerten LFA-1-Expression resultierte. Die geringere Expression von LFA-1 nach 24 Stunden auf PMNs in der BAL der *Gabra1^{KI}*-Tiere kann hierdurch nicht erklärt werden. Stadtmann et al. haben jedoch nachgewiesen, dass LFA-1 durch eine Interaktion von L-Selektin und PSGL-1 auf der PMN-Oberfläche mithilfe verschiedener Kinasen aktiviert wird (73). Sowohl L-Selektin als auch PSGL-1 wurde nach 24 Stunden auf den PMNs in der BAL vermindert exprimiert (vergleiche *Absätze 3.2.2* und *3.2.3*), was auch eine verminderte LFA-1-Aktivität erklären könnte. Aktivität ist zwar nicht mit Expression gleichzusetzen, hier zeigt sich jedoch ein möglicher Erklärungsansatz dafür, wie und warum sich der GABAerge Einfluss auf die Expression von Oberflächenmolekülen über die untersuchten Kompartimente hinweg unterscheidet.

4.3 Chemotaxis

Drei Stunden nach Stimulation mit LPS war die Konzentration der Zytokine TNF α , IL-6, CXCL1 und CXCL2 in der BAL der *Gabra1^{KI}*-Tiere in Relation zu den WT-

Tieren ebenso signifikant erhöht wie die Genexpression von TNF α und CXCL1 in ihrem Lungengewebe (vergleiche Absätze 3.3 und 3.4.1.1). Es konnte in verschiedenen Modellen gezeigt werden, dass die Aktivierung von GABA_ARs die Sekretion proinflammatorischer Zytokine hemmt. Die Konzentration von TNF α , IL-12 und Interferon γ im Kolongewebe in einem murinen Kolitis-Modell (167) wurde durch die Aktivierung des GABA_AR mit GABA ebenso inhibiert wie die Sekretion von TNF α und IL-6 aus humanen Astrozyten nach Stimulation mit LPS (168). Der GABA_AR-Agonist MIDD0301 verringerte in einem murinen Modell für Asthma bronchiale die intrapulmonale Konzentration unter anderem von TNF α (169). Wang et al. haben nachgewiesen, dass in einem murinen Myokardinfarkt-Modell der GABA_AR-Agonist Topiramamat die Entwicklung von Makrophagen zum antiinflammatorischen M2-Typ fördert und die Sekretion von TNF α und IL-6 sowie die Aktivität der MMP-9 inhibiert (112). Sanders et al. konnten in einem murinen Modell für Streptokokken-Pneumonie zeigen, dass Diazepam die Sekretion von TNF α , IL-6 und CCL2 aus Makrophagen hemmt (109). Die antiinflammatorischen Effekte konnte durch GABA_AR-Agonisten ohne Affinität für die α_1 -Untereinheit nicht repliziert werden, sodass diese hierfür ausschlaggebend zu sein scheint. Auch Jiang et al. konnten in einem murinen Myokardinfarkt-Modell die inhibitorische Wirkung von Diazepam auf die Zytokinsekretion aus Makrophagen nachweisen, ohne jedoch auf eine Untereinheiten-spezifische Wirkung zu testen (170). Diese Publikationen unterstreichen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wonach die Aktivierung von GABA_ARs einen inhibitorischen Effekt auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine hat. Sanders et al. konnten im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen nachweisen, dass die α_1 -Untereinheit des GABA_AR hierfür eine relevante Rolle spielt (109). Malaguarnera et al. haben allerdings nachgewiesen, dass die Blockade des GABA_AR durch den GABA_AR-Antagonisten Bicucullin in hyperammonämischen Ratten die Konzentrationen von TNF α und IL-6 im Blut senkt und die des antiinflammatorischen IL-10 erhöht, was den Ergebnissen dieser Arbeit grundsätzlich widerspricht (171). Es handelt sich bei dem von Malaguarnera verwendeten Modell jedoch um eines für chronische Inflammation (Versuchsdauer vier Wochen) und um einen endogenen Inflammationsinduktor (Hyperammonämie), sodass lediglich eine eingeschränkte

Vergleichbarkeit mit den vorliegenden Daten möglich ist beziehungsweise hier eine mögliche Erklärung für die divergierenden Ergebnisse liegt. In der nicht hyperammonämen Kontrollgruppe resultierte die Bicucullin-Applikation wiederum in einer signifikant gesteigerten plasmatischen IL-6-Konzentration bei gleichzeitig geringerer IL-10-Konzentration, was eher die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt. Es wird folglich deutlich, dass das Zusammenspiel von GABA_AR und Immunsystem ausgesprochen komplex zu sein scheint und noch weitere Forschung für ein umfangreicheres Verständnis notwendig ist.

4.4 Inflammation und pulmonale Schädigung

Die MPO ist ein wichtiges Enzym für die Produktion von ROS durch PMNs und spielt nicht nur bei der Elimination von Pathogenen, sondern auch bei der Schädigung des Lungengewebes im Rahmen der akuten pulmonalen Inflammation eine Rolle (vergleiche *Absatz 1.2.5*). In einem murinen Modell mit genetischem Knock-Out der MPO zeigte sich eine geringere Schädigung der Lungenarchitektur und eine geringere Proteinkonzentration in der BAL bei den MPO^{-/-}-Tieren (98). Aus diesem Grund wurde die MPO-Freisetzung in der BAL bestimmt. Nach 24 Stunden zeigte sich eine signifikant erhöhte MPO-Freisetzung bei den Gabra1^{KI}-Tieren (vergleiche *Absatz 3.5*). Zhu et al. haben nachgewiesen, dass die Applikation von GABA die ROS-Produktion in Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen nach inflammatorischer Stimulation mit H₂O₂ signifikant hemmt (172). Dies steht grundsätzlich im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen, jedoch geht aus der Arbeit von Zhu et al. nicht hervor, ob der Effekt GABA_AR-vermittelt ist. In einem murinen two-hit ALI-Modell konnte nachgewiesen werden, dass Propofol, dessen Wirkung am GABA_AR bekannt ist (siehe *Absatz 1.3*), hemmend auf die MPO-Aktivität wirkt (128). Für den inhibitorischen Einfluss von Propofol auf die ROS-Produktion durch PMNs wurde eine verringerte Aktivierung der NfκB- und MAPK1/3-Signalwege als möglicher Mechanismus identifiziert (173, 174). Es wurde jedoch auch eine GABA_AR-unabhängige Wirkung durch kompetitive Hemmung des FPR-1 beschrieben (130, 175) und der inhibitorische Effekt von Propofol auf die ROS-

Produktion der PMNs konnte ebenfalls durch eine Lipidemulsion, welche vergleichbar mit der Trägersubstanz von Propofol in der klinischen Anwendung ist, erzielt werden (176). Der hemmende Einfluss von Propofol auf die MPO-beziehungsweise ROS-Produktion ist folglich zumindest nicht ausschließlich GABA_AR-vermittelt. Im Rahmen der Literaturrecherche konnte keine Quelle identifiziert werden, welche den inhibitorischen Effekt der α_1 -Untereinheit des GABA_AR auf die ROS-Produktion bestätigt, der im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurde. Es konnte jedoch von Kim et al. in einem murinen Pneumonie-Modell eine verringerte ROS-Produktion durch Makrophagen nach Knock-Out der α_4 -Untereinheit festgestellt werden (177), ein Knock-Out der α_3 -Untereinheit resultierte in einem murinen Colitis-Modell in einer geringeren MPO-Aktivität im Kolon (121). Dies verdeutlicht die Heterogenität der GABA_ARs und ihren ebenso vielfältigen Einfluss auf immunologische Prozesse.

Wie bereits erwähnt ist der MAPK1/3-Pathway ein wichtiger proinflammatorischer Signalweg, welcher beispielsweise durch die Bindung von LPS an den TLR4 aktiviert wird (178) und unter anderem für die Produktion und Sekretion von TNF α , IL-6 und IL-8 von Bedeutung ist (179-181). Bei den Gabra1^{KI}-Tieren zeigte sich eine signifikant erhöhte Expression von MAPK3, die Expression von MAPK1 war deutlich, jedoch nicht statistisch signifikant erhöht (vergleiche Absatz 3.4.1.2). Bhat et al. konnten zeigen, dass die GABA_AR-Agonisten Topiramate und Vigabatrin die Phosphorylierung und damit Aktivierung von MAPK1/3 in LPS-stimulierten Makrophagen inhibieren (182). Lee et al. haben detektiert, dass GABA via Aktivierung des GABA_AR in LPS-stimulierten Astrozyten und Mikrogliazellen den ebenfalls downstream des TLR4 gelegenen Nf κ B-Signalweg hemmt, was in einer geringeren Sekretion von TNF α und IL-6 resultiert (168). Ein inhibitorischer Effekt des GABA_AR auf proinflammatorische intrazelluläre Signalwege konnte in den zitierten Publikationen in vitro nachgewiesen werden, die vorliegende Arbeit liefert nun einen Hinweis dafür, dass dieser Effekt auch in vivo zu finden sein kann und dass zudem das Vorhandensein der α_1 -Untereinheit hierfür eine Rolle spielt. Hier wären im Verlauf weitere Experimente indiziert, beispielsweise eine Untersuchung intrazellulärer Proteine mittels Western Blots.

Als Indikatoren für ein Kapillarleck und daraus resultierendes Lungenödem wurden die Proteinkonzentration in der BAL sowie die alveoläre Septumdicke untersucht. Drei Stunden nach LPS-Inhalation konnte eine signifikant erhöhte Proteinkonzentration in der BAL der Gabra1^{KI}-Tiere nachgewiesen werden (vergleiche *Absatz 3.6*). Ye et al. konnten in einem murinen, LPS-basierten ALI-Modell zeigen, dass die intravenöse Applikation von GABA in einer signifikant niedrigeren bronchoalveolären Proteinkonzentration resultiert (183), wobei laut den Autor:innen der Effekt stärker GABA_BR- als GABA_AR-vermittelt sei. Die vorliegende Arbeit kann keine Aussagen bezüglich der Rolle von GABA_BRs treffen, bestätigt allerdings den von Ye et al. detektierten Einfluss des GABA_AR auf die bronchoalveoläre Proteinkonzentration.

24 Stunden nach Stimulation mit LPS wurde bei den Gabra1^{KI}-Tieren eine signifikante größere Zunahme der Alveolarseptendicke detektiert als bei den WT-Tieren (vergleiche *Absatz 3.7*). Chintagari und Liu konnten in einem murinen VILI-Modell zeigen, dass intratracheal appliziertes GABA durch seine Wirkung am GABA_AR die Zunahme der Septumdicke und Bildung eines pulmonalen Ödems inhibiert (184). Der Effekt beruhte dabei maßgeblich auf einer verbesserten Clearance der intraalveolären Flüssigkeit. Es wurde durch Huang et al. nachgewiesen, dass Propofol in einem murinen two-hit ALI-Modell die histopathologische Lungenschädigung im Sinne eines pulmonalen Ödems und einer Zunahme der Alveolarseptendicke inhibiert (128). Parallel kam es zu einer verstärkten intrapulmonalen Expression des GABA_ARs, was nahelegt, dass dieser für die antiinflammatorische Wirkung des Propofols eine Rolle spielte. Die Ergebnisse von Chintagari und Liu sowie Huang et al. unterstreichen die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen und zeigen einen lungenprotektiven Effekt des GABA_AR, für welchen die α_1 -Untereinheit eine Rolle spielt.

4.5 Limitationen

Wie bereits in *Absatz 4.1* dargelegt wurde, wäre es gegebenenfalls sinnvoll, das inflammatorische Geschehen nicht nur nach drei und nach 24 Stunden zu betrachten, sondern auch den Zeitraum dazwischen zu untersuchen. Es wurde

versucht, männliche und weibliche Tiere in ausgewogenem Verhältnis zu verwenden, da es bei den Gabra1^{KI}-Tieren jedoch, wie bereits in *Absatz 3.1.4* beschrieben, zeitweise zu Reproduktionsproblemen kam, konnte dieses Verhältnis nicht zu allen Zeiten gewährleistet werden. Bhandage et al. haben nachgewiesen, dass das Geschlecht Einfluss auf die Expression des GABA_AR auf PBMCs hat (185) und da nicht ausgeschlossen werden kann, dass dies auch für andere Zellpopulation gilt, sollte es angemerkt werden.

Eine weitere Limitation betrifft das Alter der Versuchstiere. Diese waren zum Versuchszeitpunkt 8 bis 12 Wochen alt (vergleiche *Absatz 2.2*), was gemäß der Arbeit von Dutta und Sengupta einem menschlichen Alter von etwa 6-9 Jahren entspricht (186). ARDS-Patient:innen sind durchschnittlich jedoch 55-65 Jahre alt (9), was einem Mäusealter von etwa 17 bis 20 Monaten entspräche (186). Grundlagenforschung ist dennoch unverändert lohnend, da oftmals Erkenntnisse gewonnen werden, die sich in einem anderen Gebiet oder in Bezug auf ein anderes Krankheitsbild als das ursprünglich Untersuchte als wertvoll erweisen. Es erscheint folglich vor dem Hintergrund der bereits gewonnenen Erkenntnisse sinnvoll, die Experimente zur α_1 -Untereinheit fortzuführen. Ein möglicher Fokus wäre hierbei die Untersuchung intrazellulärer Signalkaskaden, welche ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Abläufe ermöglichen würde.

4.6 Ausblick

Die klinische Relevanz des ARDS wird mit Blick auf die epidemiologische Datenlage deutlich (vergleiche *Absatz 1.1.1*). Selbst unter intensivmedizinischer Therapie ist die Sterblichkeit unverändert hoch, weshalb weitere Forschung notwendig ist, da nach wie vor viele Fragen unbeantwortet und Zusammenhänge nicht vollständig verstanden sind.

Die vorliegende Arbeit hat den Einfluss der α_1 -Untereinheit des GABA_AR auf die akute Lungenschädigung und das ARDS im murinen Modell untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Gabra1-Knock-In mit einer verstärkten Migration von PMNs in die Lunge einhergeht. Dies wird maßgeblich durch eine

verstärkte Zytokinsekretion und eine veränderte Expression von Oberflächenproteinen auf PMNs und PNCs bedingt. Die gesteigerte Infiltration des Lungengewebes durch Leukozyten resultierte in einer erhöhten Entzündungsaktivität und verstärkter pulmonaler Schädigung. Es konnte folglich insgesamt ein antiinflammatorischer Effekt der α_1 -Untereinheit des GABA_AR im Rahmen von ALI und ARDS nachgewiesen werden. Auch für Sevofluran und Propofol konnte eine hemmende Wirkung auf die transendotheliale Migration von PMNs detektiert werden.

Um aus diesen Erkenntnissen zukünftig möglicherweise Implikationen für die klinische Arbeit abzuleiten, ist jedoch weitere Grundlagenforschung nötig. Wie in *Absatz 4.5* dargestellt wäre es wichtig, den verhältnismäßig langen Zeitraum zwischen drei und 24 Stunden durch weitere Messzeitpunkte zu ergänzen und darüber hinaus auch den weiteren Verlauf der Inflammation bis hin zu ihrer Resolution zu untersuchen. Des Weiteren wäre eine Betrachtung intrazellulärer Vorgänge und Signalkaskaden zielführend, um den Mechanismus der antiinflammatorischen Wirkung der α_1 -Untereinheit des GABA_AR tatsächlich zu verstehen. Auch könnte man beispielsweise untersuchen, inwieweit diese Wirkung auch Thrombozyten als Teil der PNCs und relevanten Bestandteil der transendothelialen Migration von PMNs betrifft.

Bei einer möglichen zukünftigen Medikamentenentwicklung müssten mehrere Dinge beachtet werden. Zum einen müsste eine spezifische Wirkung an der und eine hohe Affinität für die α_1 -Untereinheit des GABA_AR sichergestellt werden, da, wie bereits beschrieben, die einzelnen Untereinheiten unterschiedliche Auswirkungen auf die Inflammation haben (vergleiche *Absätze 1.3* und *4*). Zum anderen müsste bedacht werden, dass GABA der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des ZNS ist und eine GABAerge Therapie im Regelfall mit einer zentralnervösen Wirkung einhergeht. Da eine Sedierung bei ARDS-Patient:innen unter Umständen notwendig ist und diese teilweise mit GABAergen Substanzen durchgeführt wird (187), müssen Interaktionen zwischen den verschiedenen Medikamenten und eine gegebenenfalls beeinflusste Wirkung sorgfältig untersucht werden. Falk-Petersen et al. ist es gelungen, GABA_AR-Antagonisten

herzustellen, welche die Blut-Hirn-Schranke nicht durchdringen und dementsprechend keine zentralnervöse Wirkung entfalten (188). Neumann et al. verwendeten in einer Arbeit einen GABA_AR-Agonisten, der selektiv für die δ -Untereinheit ist und die Blut-Hirn-Schranke nicht suffizient überwinden kann (189). Ein dezidiertes Targeting peripherer GABA_ARs und selbst spezifischer Untereinheiten ist folglich grundsätzlich möglich.

5 Zusammenfassung

Hintergrund: Beim ARDS handelt es sich um ein intensivmedizinisches Krankheitsbild mit diverser Ätiologie und trotz langjähriger Forschung unverändert hoher Letalität. Die Inflammation induziert eine Zytokin-getriggerte Migration von PMNs in die Lunge, vermittelt durch Selektine und Integrine auf der Zelloberfläche der PMNs und unterstützt durch die Formierung von Plättchen-Neutrophilen-Komplexen (PNCs). Vorarbeiten konnten die Relevanz von GABA_A-Rezeptoren und GABA_Aergem Signaling für den Inflammationsprozess nachweisen. In dieser Arbeit wurde in einem murinen Model der LPS-induzierten akuten Lungenschädigung der Einfluss der α_1 -Untereinheit extraneuronaler GABA_ARs auf die pulmonale Inflammation sowie die immunmodulatorische Wirkung von Sevofluran und Propofol und deren Abhängigkeit von besagter α_1 -Untereinheit untersucht.

Methoden: Es wurden Wildtyp-Tiere und solche mit einem Knock-In der α_1 -Untereinheit des GABA_AR (Gabra1^{KI}) verwendet. Alle Tiere erhielten im Vorfeld Midazolam, welches bei den Gabra1^{KI}-Tieren die Inaktivierung der α_1 -Untereinheit induzierte. Einzelne Populationen wurden zudem mit Sevofluran oder Propofol vorbehandelt. Blut, Lungengewebe und bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurden durchflusszytometrisch in Bezug auf PMN-Migration und PNC-Bildung untersucht, wobei zusätzlich relevante Oberflächenproteine betrachtet wurden. Mittels ELISA wurden Zytokinkonzentrationen in der BAL bestimmt. Die Genexpression bestimmter Gene im Lungengewebe wurde mithilfe der RT-qPCR untersucht. Die photometrische Bestimmung der granulozytären MPO-Freisetzung und der Proteinkonzentration in der BAL mittels Bicinchoninsäure-Methode (BCA) sowie die Messung der alveolären Septumdicke in histologischen Präparaten dienten als Indikatoren für das Ausmaß von Inflammation und Schädigung des Lungengewebes.

Ergebnisse: Bei den Gabra1^{KI}-Tieren zeigte sich eine gesteigerte Migration von PMNs ins Lungengewebe, welche mit einem veränderten Expressionsmuster der Selektine und Integrine einherging. Parallel wurde eine erhöhte Konzentration proinflammatorischer Zytokine in der BAL der Gabra1^{KI}-Tiere und eine verstärkte

Genexpression im mitogen-aktivierte Proteinkinase 1/3 (MAPK1/3) Signalweg nachgewiesen. Zudem zeigte sich eine erhöhte PMN-Aktivität und eine ausgeprägtere Schädigung des Lungengewebes bei den Gabra1^{Kl}-Tieren. Die Prämedikation mit Sevofluran und Propofol resultierte bei den WT-Tieren jeweils in einer signifikant inhibierten Migration von PMNs ins Lungengewebe. Dieser Effekt war bei den Gabra1^{Kl}-Tieren nicht nachweisbar, scheint also auf die α_1 -Untereinheit des GABA_AR zurückzuführen sein.

Diskussion: Der Knock-In der α_1 -Untereinheit des GABA_AR sorgt bei Mäusen für eine gesteigerte pulmonale Inflamationsreaktion nach inhalativer Stimulation mit LPS und hebt den antiinflammatorischen Effekt von Sevofluran und Propofol auf. Diese Erkenntnis kann gegebenenfalls zukünftig ein Ansatzpunkt für eine pharmakologische Therapie des ARDS darstellen, dabei muss jedoch der unterschiedliche Einfluss verschiedener GABA_AR-Untereinheiten auf den Inflamationsprozess ebenso beachtet werden wie eine mögliche zentralnervöse Wirkung GABAerger Substanzen.

6 Literaturverzeichnis

1. Ashbaugh, D.G., Bigelow, D.B., Petty, T.L., Levine, B.E. *Acute respiratory distress in adults*. Lancet. 1967; 2(7511): S. 319-23.
2. Bellani, G., Laffey, J.G., Pham, T., Fan, E., Brochard, L., Esteban, A., Gattinoni, L., van Haren, F., Larsson, A., McAuley, D.F., Ranieri, M., Rubenfeld, G., Thompson, B.T., Wrigge, H., Slutsky, A.S., Pesenti, A., Investigators, f.t.L.S., Group, t.E.T. *Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries*. JAMA. 2016; 315(8): S. 788-800.
3. Matthay, M.A., Arabi, Y., Arroliga, A.C., Bernard, G., Bersten, A.D., Brochard, L.J., Calfee, C.S., Combes, A., Daniel, B.M., Ferguson, N.D., Gong, M.N., Gotts, J.E., Herridge, M.S., Laffey, J.G., Liu, K.D., Machado, F.R., Martin, T.R., McAuley, D.F., Mercat, A., Moss, M., Mularski, R.A., Pesenti, A., Qiu, H., Ramakrishnan, N., Ranieri, V.M., Riviello, E.D., Rubin, E., Slutsky, A.S., Thompson, B.T., Twagirumugabe, T., Ware, L.B., Wick, K.D. *A New Global Definition of Acute Respiratory Distress Syndrome*. Am J Respir Crit Care Med. 2024; 209(1): S. 37-47.
4. Ferguson, N.D., Fan, E., Camporota, L., Antonelli, M., Anzueto, A., Beale, R., Brochard, L., Brower, R., Esteban, A., Gattinoni, L., Rhodes, A., Slutsky, A.S., Vincent, J.L., Rubenfeld, G.D., Thompson, B.T., Ranieri, V.M. *The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material*. Intensive Care Med. 2012; 38(10): S. 1573-82.
5. Riviello, E.D., Kiviri, W., Twagirumugabe, T., Mueller, A., Banner-Goodspeed, V.M., Officer, L., Novack, V., Mutumwinka, M., Talmor, D.S., Fowler, R.A. *Hospital Incidence and Outcomes of the Acute Respiratory Distress Syndrome Using the Kigali Modification of the Berlin Definition*. Am J Respir Crit Care Med. 2016; 193(1): S. 52-9.
6. Matthay, M.A., Ware, L.B., Zimmerman, G.A. *The acute respiratory distress syndrome*. J Clin Invest. 2012; 122(8): S. 2731-40.
7. Carrasco Loza, R., Villamizar Rodríguez, G., Medel Fernández, N. *Ventilator-Induced Lung Injury (VILI) in Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS): Volutrauma and Molecular Effects*. Open Respir Med J. 2015; 9: S. 112-9.
8. Matthay, M.A., Zemans, R.L. *The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment*. Annu Rev Pathol. 2011; 6: S. 147-63.

9. Brown, R., McKelvey, M.C., Ryan, S., Creane, S., Linden, D., Kidney, J.C., McAuley, D.F., Taggart, C.C., Weldon, S. *The Impact of Aging in Acute Respiratory Distress Syndrome: A Clinical and Mechanistic Overview*. Front Med (Lausanne). 2020; 7: S. 589553.
10. Villar, J., Blanco, J., Kacmarek, R.M. *Current incidence and outcome of the acute respiratory distress syndrome*. Current Opinion in Critical Care. 2016; 22(1): S. 1-6.
11. Pfoh, E.R., Wozniak, A.W., Colantuoni, E., Dinglas, V.D., Mendez-Tellez, P.A., Shanholtz, C., Ciesla, N.D., Pronovost, P.J., Needham, D.M. *Physical declines occurring after hospital discharge in ARDS survivors: a 5-year longitudinal study*. Intensive Care Medicine. 2016; 42(10): S. 1557-66.
12. Saguil, A., Fargo, M.V. *Acute Respiratory Distress Syndrome: Diagnosis and Management*. Am Fam Physician. 2020; 101(12): S. 730-8.
13. Mortelliti, M.P., Manning, H.L. *Acute respiratory distress syndrome*. Am Fam Physician. 2002; 65(9): S. 1823-30.
14. Nin, N., Muriel, A., Peñuelas, O., Brochard, L., Lorente, J.A., Ferguson, N.D., Raymondos, K., Ríos, F., Violi, D.A., Thille, A.W., González, M., Villagomez, A.J., Hurtado, J., Davies, A.R., Du, B., Maggiore, S.M., Soto, L., D'Empaire, G., Matamis, D., Abroug, F., Moreno, R.P., Soares, M.A., Arabi, Y., Sandi, F., Jibaja, M., Amin, P., Koh, Y., Kuiper, M.A., Bülow, H.H., Zeggwagh, A.A., Anzueto, A., Sznajder, J.I., Esteban, A. *Severe hypercapnia and outcome of mechanically ventilated patients with moderate or severe acute respiratory distress syndrome*. Intensive Care Med. 2017; 43(2): S. 200-8.
15. Brower, R.G., Matthay, M.A., Morris, A., Schoenfeld, D., Thompson, B.T., Wheeler, A. *Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med. 2000; 342(18): S. 1301-8.
16. Guérin, C., Reignier, J., Richard, J.C., Beuret, P., Gacouin, A., Boulain, T., Mercier, E., Badet, M., Mercat, A., Baudin, O., Clavel, M., Chatellier, D., Jaber, S., Rosselli, S., Mancebo, J., Sirodot, M., Hilbert, G., Bengler, C., Richecoeur, J., Gainnier, M., Bayle, F., Bourdin, G., Leray, V., Girard, R., Baboi, L., Ayzac, L. *Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med. 2013; 368(23): S. 2159-68.

17. Wiedemann, H.P., Wheeler, A.P., Bernard, G.R., Thompson, B.T., Hayden, D., deBoisblanc, B., Connors, A.F., Jr., Hite, R.D., Harabin, A.L. *Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury*. N Engl J Med. 2006; 354(24): S. 2564-75.
18. Grissom, C.K., Hirshberg, E.L., Dickerson, J.B., Brown, S.M., Lanspa, M.J., Liu, K.D., Schoenfeld, D., Tidswell, M., Hite, R.D., Rock, P., Miller, R.R., 3rd, Morris, A.H. *Fluid management with a simplified conservative protocol for the acute respiratory distress syndrome**. Crit Care Med. 2015; 43(2): S. 288-95.
19. Gajic, O., Dabbagh, O., Park, P.K., Adesanya, A., Chang, S.Y., Hou, P., Anderson, H., 3rd, Hoth, J.J., Mikkelsen, M.E., Gentile, N.T., Gong, M.N., Talmor, D., Bajwa, E., Watkins, T.R., Festic, E., Yilmaz, M., Iscimen, R., Kaufman, D.A., Esper, A.M., Sadikot, R., Douglas, I., Sevransky, J., Malinchoc, M. *Early identification of patients at risk of acute lung injury: evaluation of lung injury prediction score in a multicenter cohort study*. Am J Respir Crit Care Med. 2011; 183(4): S. 462-70.
20. Festic, E., Kor, D.J., Gajic, O. *Prevention of acute respiratory distress syndrome*. Current Opinion in Critical Care. 2015; 21(1): S. 82-90.
21. Yadav, H., Thompson, B.T., Gajic, O. *Fifty Years of Research in ARDS. Is Acute Respiratory Distress Syndrome a Preventable Disease?* Am J Respir Crit Care Med. 2017; 195(6): S. 725-36.
22. Carr, G., Cartin-Ceba, R., Hinds, R.F., Bansal, V., Banner-Goodspeed, V., Talmor, D.S., Rajagopalan, G., Frank, R.D., Gajic, O., Matthay, M., Levitt, J.E. *Lung Injury Prevention Study with Budesonide and Beta Agonist, Formoterol (LIPS-B): A Multicenter Randomized Clinical Trial*. S. A7851-A.
23. Marshall, R.P., Gohlke, P., Chambers, R.C., Howell, D.C., Bottoms, S.E., Unger, T., McAnulty, R.J., Laurent, G.J. *Angiotensin II and the fibroproliferative response to acute lung injury*. American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology. 2004; 286(1): S. L156-L64.
24. Shyamsundar, M., McAuley, D.F., Shields, M.O., MacSweeney, R., Duffy, M.J., Johnston, J.R., McGuigan, J., Backman, J.T., Calfee, C.S., Matthay, M.M., Griffiths, M.J., McDowell, C., Elborn, S.J., O'Kane, C.M. *Effect of Simvastatin on Physiological and Biological Outcomes in Patients Undergoing Esophagectomy: A Randomized Placebo-Controlled Trial*. Annals of Surgery. 2014; 259(1): S. 26-31.

25. Papazian, L., Forel, J.M., Gacouin, A., Penot-Ragon, C., Perrin, G., Loundou, A., Jaber, S., Arnal, J.M., Perez, D., Seghboyan, J.M., Constantin, J.M., Courant, P., Lefrant, J.Y., Guérin, C., Prat, G., Morange, S., Roch, A. *Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome*. N Engl J Med. 2010; 363(12): S. 1107-16.
26. Villar, J., Ferrando, C., Martínez, D., Ambrós, A., Muñoz, T., Soler, J.A., Aguilar, G., Alba, F., González-Higueras, E., Conesa, L.A., Martín-Rodríguez, C., Díaz-Domínguez, F.J., Serna-Grande, P., Rivas, R., Ferreres, J., Belda, J., Capilla, L., Tallet, A., Añón, J.M., Fernández, R.L., González-Martín, J.M. *Dexamethasone treatment for the acute respiratory distress syndrome: a multicentre, randomised controlled trial*. Lancet Respir Med. 2020; 8(3): S. 267-76.
27. Combes, A., Hajage, D., Capellier, G., Demoule, A., Lavoué, S., Guervilly, C., Da Silva, D., Zafrani, L., Tirot, P., Veber, B., Maury, E., Levy, B., Cohen, Y., Richard, C., Kalfon, P., Bouadma, L., Mehdaoui, H., Beduneau, G., Lebreton, G., Brochard, L., Ferguson, N.D., Fan, E., Slutsky, A.S., Brodie, D., Mercat, A. *Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Acute Respiratory Distress Syndrome*. New England Journal of Medicine. 2018; 378(21): S. 1965-75.
28. Fanelli, V., Ranieri, M.V., Mancebo, J., Moerer, O., Quintel, M., Morley, S., Moran, I., Parrilla, F., Costamagna, A., Gaudiosi, M., Combes, A. *Feasibility and safety of low-flow extracorporeal carbon dioxide removal to facilitate ultra-protective ventilation in patients with moderate acute respiratory distress syndrome*. Crit Care. 2016; 20: S. 36.
29. Maron-Gutierrez, T., Laffey, J.G., Pelosi, P., Rocco, P.R. *Cell-based therapies for the acute respiratory distress syndrome*. Curr Opin Crit Care. 2014; 20(1): S. 122-31.
30. Qin, H., Zhao, A. *Mesenchymal stem cell therapy for acute respiratory distress syndrome: from basic to clinics*. Protein Cell. 2020; 11(10): S. 707-22.
31. Thille, A.W., Esteban, A., Fernández-Segoviano, P., Rodríguez, J.M., Aramburu, J.A., Vargas-Errázuriz, P., Martín-Pellicer, A., Lorente, J.A., Frutos-Vivar, F. *Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies*. Lancet Respir Med. 2013; 1(5): S. 395-401.

32. Matthay, M.A., Zemans, R.L., Zimmerman, G.A., Arabi, Y.M., Beitler, J.R., Mercat, A., Herridge, M., Randolph, A.G., Calfee, C.S. *Acute respiratory distress syndrome*. *Nat Rev Dis Primers*. 2019; 5(1): S. 18.
33. Sharp, C., Millar, A.B., Medford, A.R. *Advances in understanding of the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome*. *Respiration*. 2015; 89(5): S. 420-34.
34. MacRedmond, R., Greene, C., Taggart, C.C., McElvaney, N., O'Neill, S. *Respiratory epithelial cells require Toll-like receptor 4 for induction of Human β -defensin 2 by Lipopolysaccharide*. *Respiratory Research*. 2005; 6(1): S. 116.
35. Kumar, H., Kawai, T., Akira, S. *Pathogen recognition by the innate immune system*. *Int Rev Immunol*. 2011; 30(1): S. 16-34.
36. Roeder, A., Kirschning, C.J., Rupec, R.A., Schaller, M., Weindl, G., Korting, H.C. *Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity*. *Med Mycol*. 2004; 42(6): S. 485-98.
37. Smiley, S.T., King, J.A., Hancock, W.W. *Fibrinogen Stimulates Macrophage Chemokine Secretion Through Toll-Like Receptor 4*. *The Journal of Immunology*. 2001; 167(5): S. 2887-94.
38. Ohashi, K., Burkart, V., Flohé, S., Kolb, H. *Cutting Edge: Heat Shock Protein 60 Is a Putative Endogenous Ligand of the Toll-Like Receptor-4 Complex*. *The Journal of Immunology*. 2000; 164(2): S. 558-61.
39. Vabulas, R.M., Ahmad-Nejad, P., Ghose, S., Kirschning, C.J., Issels, R.D., Wagner, H. *HSP70 as Endogenous Stimulus of the Toll/Interleukin-1 Receptor Signal Pathway**. *Journal of Biological Chemistry*. 2002; 277(17): S. 15107-12.
40. Kawai, T., Akira, S. *The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors*. *Nat Immunol*. 2010; 11(5): S. 373-84.
41. El-Zayat, S.R., Sibaii, H., Mannaa, F.A. *Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview*. *Bulletin of the National Research Centre*. 2019; 43(1): S. 187.

42. Miyake, K. *Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4*. Trends in Microbiology. 2004; 12(4): S. 186-92.
43. Bakopoulos, A., Kapelouzou, A., Tsilimigras, D.I., Katsimpoulas, M., Schizas, D., Aravanis, C., Balafas, E., Mavroidis, M., Pavlakis, K., Machairas, A., Liakakos, T. *Expression of Toll-like receptors (TLRs) in the lungs of an experimental sepsis mouse model*. PLoS One. 2017; 12(11): S. e0188050.
44. Deguine, J., Barton, G.M. *MyD88: a central player in innate immune signaling*. F1000Prime Rep. 2014; 6: S. 97.
45. Liu, C., Chu, D., Kalantar-Zadeh, K., George, J., Young, H.A., Liu, G. *Cytokines: From Clinical Significance to Quantification*. Adv Sci (Weinh). 2021; 8(15): S. e2004433.
46. Beck-Schimmer, B., Schwendener, R., Pasch, T., Reyes, L., Booy, C., Schimmer, R.C. *Alveolar macrophages regulate neutrophil recruitment in endotoxin-induced lung injury*. Respiratory Research. 2005; 6(1): S. 61.
47. Huang, X., Xiu, H., Zhang, S., Zhang, G. *The Role of Macrophages in the Pathogenesis of ALI/ARDS*. Mediators of Inflammation. 2018; 2018: S. 1264913.
48. Gressner, A.M., Gressner, O.A. *TNF- α* . In: Gressner AM, Arndt T, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. S. 2320-.
49. Gressner, A.M., Gressner, O.A. *Interleukin-6*. In: Gressner AM, Arndt T, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. S. 1265-6.
50. Meduri, G.U., Kohler, G., Headley, S., Tolley, E., Stentz, F., Postlethwaite, A. *Inflammatory cytokines in the BAL of patients with ARDS. Persistent elevation over time predicts poor outcome*. Chest. 1995; 108(5): S. 1303-14.
51. Meduri, G.U., Headley, S., Kohler, G., Stentz, F., Tolley, E., Umberger, R., Leeper, K. *Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time*. Chest. 1995; 107(4): S. 1062-73.
52. Ye, Q., Wang, B., Mao, J. *The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19*. J Infect. 2020; 80(6): S. 607-13.

53. Chousterman, B.G., Swirski, F.K., Weber, G.F. *Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis*. Semin Immunopathol. 2017; 39(5): S. 517-28.
54. Tisoncik, J.R., Korth, M.J., Simmons, C.P., Farrar, J., Martin, T.R., Katze, M.G. *Into the Eye of the Cytokine Storm*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2012; 76(1): S. 16-32.
55. Steinberg, K.P., Milberg, J.A., Martin, T.R., Maunder, R.J., Cockrill, B.A., Hudson, L.D. *Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med. 1994; 150(1): S. 113-22.
56. Bhatia, M., Zemans, R.L., Jeyaseelan, S. *Role of chemokines in the pathogenesis of acute lung injury*. Am J Respir Cell Mol Biol. 2012; 46(5): S. 566-72.
57. Zemans, R.L., Matthay, M.A. *What drives neutrophils to the alveoli in ARDS?* Thorax. 2017; 72(1): S. 1-3.
58. Remick, D.G. *Interleukin-8*. Critical Care Medicine. 2005; 33(12): S. S466-S7.
59. Matsushima, K., Yang, D., Oppenheim, J.J. *Interleukin-8: An evolving chemokine*. Cytokine. 2022; 153: S. 155828.
60. Goodman, R.B., Strieter, R.M., Martin, D.P., Steinberg, K.P., Milberg, J.A., Maunder, R.J., Kunkel, S.L., Walz, A., Hudson, L.D., Martin, T.R. *Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome*. Am J Respir Crit Care Med. 1996; 154(3 Pt 1): S. 602-11.
61. Frevert, C.W., Farone, A., Danaee, H., Paulauskis, J.D., Kobzik, L. *Functional characterization of rat chemokine macrophage inflammatory protein-2*. Inflammation. 1995; 19(1): S. 133-42.
62. Donnelly, S.C., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Walz, A., Robertson, C.R., Carter, D.C., Grant, I.S., Pollok, A.J., Haslett, C. *Interleukin-8 and development of adult respiratory distress syndrome in at-risk patient groups*. Lancet. 1993; 341(8846): S. 643-7.

63. Groeneveld, A.B., Raijmakers, P.G., Hack, C.E., Thijs, L.G. *Interleukin 8-related neutrophil elastase and the severity of the adult respiratory distress syndrome*. Cytokine. 1995; 7(7): S. 746-52.
64. Miller, E.J., Cohen, A.B., Nagao, S., Griffith, D., Maunder, R.J., Martin, T.R., Weiner-Kronish, J.P., Sticherling, M., Christophers, E., Matthay, M.A. *Elevated levels of NAP-1/interleukin-8 are present in the airspaces of patients with the adult respiratory distress syndrome and are associated with increased mortality*. Am Rev Respir Dis. 1992; 146(2): S. 427-32.
65. Sherwood, E.R., Toliver-Kinsky, T. *Mechanisms of the inflammatory response*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol. 2004; 18(3): S. 385-405.
66. Vassallo, A., Wood, A.J., Subburayalu, J., Summers, C., Chilvers, E.R. *The counter-intuitive role of the neutrophil in the acute respiratory distress syndrome*. British Medical Bulletin. 2019; 131(1): S. 43-55.
67. Broermann, A., Winderlich, M., Block, H., Frye, M., Rossaint, J., Zarbock, A., Cagna, G., Linnepe, R., Schulte, D., Nottebaum, A.F., Vestweber, D. *Dissociation of VE-PTP from VE-cadherin is required for leukocyte extravasation and for VEGF-induced vascular permeability in vivo*. J Exp Med. 2011; 208(12): S. 2393-401.
68. Müller, A.M., Cronen, C., Müller, K.M., Kirkpatrick, C.J. *Heterogeneous expression of cell adhesion molecules by endothelial cells in ARDS*. J Pathol. 2002; 198(2): S. 270-5.
69. Rimmelé, T., Payen, D., Cantaluppi, V., Marshall, J., Gomez, H., Gomez, A., Murray, P., Kellum, J.A. *Immune cell phenotype and function in sepsis*. Shock. 2016; 45(3): S. 282-91.
70. Vestweber, D. *How leukocytes cross the vascular endothelium*. Nature Reviews Immunology. 2015; 15(11): S. 692-704.
71. McEver, R.P. *Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall*. Cardiovasc Res. 2015; 107(3): S. 331-9.
72. Zarbock, A., Ley, K., McEver, R.P., Hidalgo, A. *Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow*. Blood. 2011; 118(26): S. 6743-51.

73. Stadtmann, A., Germena, G., Block, H., Boras, M., Rossaint, J., Sundd, P., Lefort, C., Fisher, C.I., Buscher, K., Gelschefarth, B., Urzainqui, A., Gerke, V., Ley, K., Zarbock, A. *The PSGL-1-L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow.* J Exp Med. 2013; 210(11): S. 2171-80.
74. Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C.M., Kubes, P. *Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade.* J Exp Med. 2006; 203(12): S. 2569-75.
75. Li, N., Yang, H., Wang, M., Lü, S., Zhang, Y., Long, M. *Ligand-specific binding forces of LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion and crawling.* Mol Biol Cell. 2018; 29(4): S. 408-18.
76. Halai, K., Whiteford, J., Ma, B., Nourshargh, S., Woodfin, A. *ICAM-2 facilitates luminal interactions between neutrophils and endothelial cells in vivo.* J Cell Sci. 2014; 127(Pt 3): S. 620-9.
77. Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S. *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated.* Nat Rev Immunol. 2007; 7(9): S. 678-89.
78. Hamburger, S.A., McEver, R.P. *GMP-140 Mediates Adhesion of Stimulated Platelets to Neutrophils.* Blood. 1990; 75(3): S. 550-4.
79. Frenette, P.S., Denis, C.V., Weiss, L., Jurk, K., Subbarao, S., Kehrel, B., Hartwig, J.H., Vestweber, D., Wagner, D.D. *P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (Psgl-1) Is Expressed on Platelets and Can Mediate Platelet-Endothelial Interactions in Vivo.* Journal of Experimental Medicine. 2000; 191(8): S. 1413-22.
80. Page, C., Pitchford, S. *Neutrophil and platelet complexes and their relevance to neutrophil recruitment and activation.* Int Immunopharmacol. 2013; 17(4): S. 1176-84.
81. Zuchtriegel, G., Uhl, B., Pühr-Westerheide, D., Pörnbacher, M., Lauber, K., Krombach, F., Reichel, C.A. *Platelets Guide Leukocytes to Their Sites of Extravasation.* PLoS Biol. 2016; 14(5): S. e1002459.
82. Simon, D.I., Chen, Z., Xu, H., Li, C.Q., Dong, J., McIntire, L.V., Ballantyne, C.M., Zhang, L., Furman, M.I., Berndt, M.C., López, J.A. *Platelet*

- glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18)*. J Exp Med. 2000; 192(2): S. 193-204.
83. Diacovo, T.G., deFougerolles, A.R., Bainton, D.F., Springer, T.A. *A functional integrin ligand on the surface of platelets: intercellular adhesion molecule-2*. J Clin Invest. 1994; 94(3): S. 1243-51.
84. Frenette, P.S., Johnson, R.C., Hynes, R.O., Wagner, D.D. *Platelets roll on stimulated endothelium in vivo: an interaction mediated by endothelial P-selectin*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92(16): S. 7450-4.
85. Kornerup, K.N., Salmon, G.P., Pitchford, S.C., Liu, W.L., Page, C.P. *Circulating platelet-neutrophil complexes are important for subsequent neutrophil activation and migration*. J Appl Physiol (1985). 2010; 109(3): S. 758-67.
86. Ghasemzadeh, M., Hosseini, E. *Platelet-leukocyte crosstalk: Linking proinflammatory responses to procoagulant state*. Thrombosis Research. 2013; 131(3): S. 191-7.
87. Lisman, T. *Platelet-neutrophil interactions as drivers of inflammatory and thrombotic disease*. Cell Tissue Res. 2018; 371(3): S. 567-76.
88. Zalavary, S., Grenegård, M., Stendahl, O., Bengtsson, T. *Platelets enhance Fc(gamma) receptor-mediated phagocytosis and respiratory burst in neutrophils: the role of purinergic modulation and actin polymerization*. Journal of leukocyte biology. 1996; 60(1): S. 58-68.
89. Caudrillier, A., Kessenbrock, K., Gilliss, B.M., Nguyen, J.X., Marques, M.B., Monestier, M., Toy, P., Werb, Z., Looney, M.R. *Platelets induce neutrophil extracellular traps in transfusion-related acute lung injury*. J Clin Invest. 2012; 122(7): S. 2661-71.
90. Clark, S.R., Ma, A.C., Tavener, S.A., McDonald, B., Goodarzi, Z., Kelly, M.M., Patel, K.D., Chakrabarti, S., McAvoy, E., Sinclair, G.D., Keys, E.M., Allen-Vercoe, E., Devinney, R., Doig, C.J., Green, F.H., Kubes, P. *Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood*. Nat Med. 2007; 13(4): S. 463-9.
91. Etulain, J., Martinod, K., Wong, S.L., Cifuni, S.M., Schattner, M., Wagner, D.D. *P-selectin promotes neutrophil extracellular trap formation in mice*. Blood. 2015; 126(2): S. 242-6.

92. Downey, G.P., Worthen, G.S., Henson, P.M., Hyde, D.M. *Neutrophil sequestration and migration in localized pulmonary inflammation. Capillary localization and migration across the interalveolar septum.* Am Rev Respir Dis. 1993; 147(1): S. 168-76.
93. Yoshida, K., Kondo, R., Wang, Q., Doerschuk, C.M. *Neutrophil cytoskeletal rearrangements during capillary sequestration in bacterial pneumonia in rats.* Am J Respir Crit Care Med. 2006; 174(6): S. 689-98.
94. Yang, S.-C., Tsai, Y.-F., Pan, Y.-L., Hwang, T.-L. *Understanding the role of neutrophils in acute respiratory distress syndrome.* Biomedical Journal. 2020: S.
95. Moraes, T.J., Zurawska, J.H., Downey, G.P. *Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury.* Current Opinion in Hematology. 2006; 13(1): S. 21-7.
96. Albaiceta, G.M., Fueyo, A., editors. *Matrix Metalloproteinases in Acute Lung Injury 2007*; New York, NY: Springer New York.
97. Shatwell, K.P., Segal, A.W. *NADPH oxidase.* Int J Biochem Cell Biol. 1996; 28(11): S. 1191-5.
98. Sugamata, R., Dobashi, H., Nagao, T., Yamamoto, K.-i., Nakajima, N., Sato, Y., Aratani, Y., Oshima, M., Sata, T., Kobayashi, K., Kawachi, S., Nakayama, T., Suzuki, K. *Contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection.* Microbiology and Immunology. 2012; 56(3): S. 171-82.
99. Bedouhène, S., Dang, P.M.-C., Hurtado-Nedelec, M., El-Benna, J. *Neutrophil Degranulation of Azurophil and Specific Granules.* In: Quinn MT, DeLeo FR, editors. New York, NY: Springer US; 2020. S. 215-22.
100. Usatyuk, P.V., Natarajan, V. *Regulation of reactive oxygen species-induced endothelial cell-cell and cell-matrix contacts by focal adhesion kinase and adherens junction proteins.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2005; 289(6): S. L999-1010.
101. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D.S., Weinrauch, Y., Zychlinsky, A. *Neutrophil extracellular traps kill bacteria.* Science. 2004; 303(5663): S. 1532-5.

102. Cortjens, B., de Boer, O.J., de Jong, R., Antonis, A.F., Sabogal Piñeros, Y.S., Lutter, R., van Woensel, J.B., Bem, R.A. *Neutrophil extracellular traps cause airway obstruction during respiratory syncytial virus disease*. *The Journal of Pathology*. 2016; 238(3): S. 401-11.
103. Papayannopoulos, V. *Neutrophil extracellular traps in immunity and disease*. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18(2): S. 134-47.
104. Ashar, H.K., Mueller, N.C., Rudd, J.M., Snider, T.A., Achanta, M., Prasanthi, M., Pulavendran, S., Thomas, P.G., Ramachandran, A., Malayer, J.R., Ritchey, J.W., Rajasekhar, R., Chow, V.T.K., Esmon, C.T., Teluguakula, N. *The Role of Extracellular Histones in Influenza Virus Pathogenesis*. *The American Journal of Pathology*. 2018; 188(1): S. 135-48.
105. Lefrançois, E., Mallavia, B., Zhuo, H., Calfee, C.S., Looney, M.R. *Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury*. *JCI Insight*. 2018; 3(3): S.
106. Sarto-Jackson, I., Sieghart, W. *Assembly of GABAA receptors (Review)*. *Molecular Membrane Biology*. 2008; 25(4): S. 302-10.
107. Olsen, R.W., Sieghart, W. *International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update*. *Pharmacol Rev*. 2008; 60(3): S. 243-60.
108. Erdö, S.L., Wolff, J.R. *γ -Aminobutyric Acid Outside the Mammalian Brain*. *Journal of Neurochemistry*. 1990; 54(2): S. 363-72.
109. Sanders, R.D., Godlee, A., Fujimori, T., Goulding, J., Xin, G., Salek-Ardakani, S., Snelgrove, R.J., Ma, D., Maze, M., Hussell, T. *Benzodiazepine augmented γ -amino-butyric acid signaling increases mortality from pneumonia in mice*. *Crit Care Med*. 2013; 41(7): S. 1627-36.
110. Tian, J., Chau, C., Hales, T.G., Kaufman, D.L. *GABAA receptors mediate inhibition of T cell responses*. *Journal of Neuroimmunology*. 1999; 96(1): S. 21-8.

111. Nigam, R., El-Nour, H., Amatya, B., Nordlind, K. *GABA and GABA(A) receptor expression on immune cells in psoriasis: a pathophysiological role*. Arch Dermatol Res. 2010; 302(7): S. 507-15.
112. Wang, Z., Huang, S., Sheng, Y., Peng, X., Liu, H., Jin, N., Cai, J., Shu, Y., Li, T., Li, P., Fan, C., Hu, X., Zhang, W., Long, R., You, Y., Huang, C., Song, Y., Xiang, C., Wang, J., Yang, Y., Liu, K. *Topiramate modulates post-infarction inflammation primarily by targeting monocytes or macrophages*. Cardiovasc Res. 2017; 113(5): S. 475-87.
113. Olsen, R.W., Sieghart, W. *GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology*. Neuropharmacology. 2009; 56(1): S. 141-8.
114. Lindquist, C.E., Birnir, B. *Graded response to GABA by native extrasynaptic GABA receptors*. J Neurochem. 2006; 97(5): S. 1349-56.
115. Gallos, G., Yocum, G.T., Siviski, M.E., Yim, P.D., Fu, X.W., Poe, M.M., Cook, J.M., Harrison, N., Perez-Zoghbi, J., Emala, C.W., Sr. *Selective targeting of the $\alpha 5$ -subunit of GABAA receptors relaxes airway smooth muscle and inhibits cellular calcium handling*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2015; 308(9): S. L931-42.
116. Xiang, Y.-Y., Wang, S., Liu, M., Hirota, J.A., Li, J., Ju, W., Fan, Y., Kelly, M.M., Ye, B., Orser, B., O'Byrne, P.M., Inman, M.D., Yang, X., Lu, W.-Y. *A GABAergic system in airway epithelium is essential for mucus overproduction in asthma*. Nature Medicine. 2007; 13(7): S. 862-7.
117. Jin, N., Guo, Y., Sun, P., Bell, A., Chintagari, N.R., Bhaskaran, M., Rains, K., Baviskar, P., Chen, Z., Weng, T., Liu, L. *Ionotropic GABA receptor expression in the lung during development*. Gene Expr Patterns. 2008; 8(6): S. 397-403.
118. Wu, C., Qin, X., Du, H., Li, N., Ren, W., Peng, Y. *The immunological function of GABAergic system*. Front Biosci (Landmark Ed). 2017; 22: S. 1162-72.
119. Fernández Hurst, N., Zanetti, S.R., Báez, N.S., Bibolini, M.J., Bouzat, C., Roth, G.A. *Diazepam treatment reduces inflammatory cells and mediators in the central nervous system of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis*. Journal of Neuroimmunology. 2017; 313: S. 145-51.

120. Reyes-García, M.G., Hernández-Hernández, F., Hernández-Téllez, B., García-Tamayo, F. *GABA (A) receptor subunits RNA expression in mice peritoneal macrophages modulate their IL-6/IL-12 production*. Journal of Neuroimmunology. 2007; 188(1): S. 64-8.
121. Seifi, M., Rodaway, S., Rudolph, U., Swinny, J.D. *GABAA Receptor Subtypes Regulate Stress-Induced Colon Inflammation in Mice*. Gastroenterology. 2018; 155(3): S. 852-64 e3.
122. Yocum, G.T., Turner, D.L., Danielsson, J., Barajas, M.B., Zhang, Y., Xu, D., Harrison, N.L., Homanics, G.E., Farber, D.L., Emala, C.W. *GABAA receptor alpha4-subunit knockout enhances lung inflammation and airway reactivity in a murine asthma model*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2017; 313(2): S. L406-L15.
123. Trapani, G., Altomare, C., Liso, G., Sanna, E., Biggio, G. *Propofol in anesthesia. Mechanism of action, structure-activity relationships, and drug delivery*. Curr Med Chem. 2000; 7(2): S. 249-71.
124. Campagna, J.A., Miller, K.W., Forman, S.A. *Mechanisms of actions of inhaled anesthetics*. N Engl J Med. 2003; 348(21): S. 2110-24.
125. Kalimeris, K., Zerva, A., Matsota, P., Nomikos, T., Fragopoulou, E., Politi, A.N., Karamitopoulou, E., Kostopanagiotou, G. *Pretreatment with sevoflurane attenuates direct lung injury*. Minerva Anesthesiol. 2014; 80(6): S. 635-44.
126. Taniguchi, T., Yamamoto, K., Ohmoto, N., Ohta, K., Kobayashi, T. *Effects of propofol on hemodynamic and inflammatory responses to endotoxemia in rats*. Crit Care Med. 2000; 28(4): S. 1101-6.
127. Ngamsri, K.C., Fuhr, A., Schindler, K., Simelitis, M., Hagen, M., Zhang, Y., Gamper-Tsigaras, J., Konrad, F.M. *Sevoflurane Dampens Acute Pulmonary Inflammation via the Adenosine Receptor A2B and Heme Oxygenase-1*. Cells. 2022; 11(7): S.
128. Huang, T., Zhang, Y., Wang, C., Gao, J. *Propofol reduces acute lung injury by up-regulating gamma-aminobutyric acid type a receptors*. Exp Mol Pathol. 2019; 110: S. 104295.
129. Müller-Edenborn, B., Frick, R., Piegeler, T., Schläpfer, M., Roth-Z'graggen, B., Schlicker, A., Beck-Schimmer, B. *Volatile anaesthetics*

- reduce neutrophil inflammatory response by interfering with CXCR2 signalling.* Br J Anaesth. 2015; 114(1): S. 143-9.
130. Yang, S.C., Chung, P.J., Ho, C.M., Kuo, C.Y., Hung, M.F., Huang, Y.T., Chang, W.Y., Chang, Y.W., Chan, K.H., Hwang, T.L. *Propofol inhibits superoxide production, elastase release, and chemotaxis in formyl peptide-activated human neutrophils by blocking formyl peptide receptor 1.* J Immunol. 2013; 190(12): S. 6511-9.
131. Konrad, F.M., Wohlert, J., Gamper-Tsigaras, J., Ngamsri, K.C., Reutershan, J. *How Adhesion Molecule Patterns Change While Neutrophils Traffic through the Lung during Inflammation.* Mediators Inflamm. 2019; 2019: S. 1208086.
132. Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brünig, I., Benson, J.A., Fritschy, J.-M., Martin, J.R., Bluethmann, H., Möhler, H. *Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acidA receptor subtypes.* Nature. 1999; 401(6755): S. 796-800.
133. BD Biosciences. *BD FACS Canto™ II Cell Analyzer.* Abgerufen am: 04.01.2021. Abgerufen von: <https://www.bdbiosciences.com/en-us/instruments/research-instruments/research-cell-analyzers/facscanto-ii>.
134. Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M.J., Solera, J. *Real-time PCR detection chemistry.* Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry. 2015; 439: S. 231-50.
135. Kinkade, J.M., Jr., Pember, S.O., Barnes, K.C., Shapira, R., Spitznagel, J.K., Martin, L.E. *Differential distribution of distinct forms of myeloperoxidase in different azurophilic granule subpopulations from human neutrophils.* Biochem Biophys Res Commun. 1983; 114(1): S. 296-303.
136. Winterbourn, C.C., Hampton, M.B., Livesey, J.H., Kettle, A.J. *Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing.* J Biol Chem. 2006; 281(52): S. 39860-9.
137. Fuhr, A., Roediger, R., Simelitis, M., Gamper-Tsigaras, J., Templin, M., Kormann, M., Antkowiak, B., Rudolph, U., Köhler, D., Rosenberger, P., Ngamsri, K.C., Konrad, F.M. *Regulation of neutrophil migration in acute pulmonary inflammation by extraneuronal α 1 gamma-aminobutyric acid(A) receptors.* Cell Death Dis. 2025; 16(1): S. 313.

138. Zucoloto, A.Z., Jenne, C.N. *Platelet-Neutrophil Interplay: Insights Into Neutrophil Extracellular Trap (NET)-Driven Coagulation in Infection*. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 2019; 6: S.
139. Corteling, R., Wyss, D., Trifilieff, A. *In vivo models of lung neutrophil activation. Comparison of mice and hamsters*. *BMC Pharmacology*. 2002; 2(1): S. 1.
140. Forkuo, G.S., Nieman, A.N., Yuan, N.Y., Kodali, R., Yu, O.B., Zahn, N.M., Jahan, R., Li, G., Stephen, M.R., Guthrie, M.L., Poe, M.M., Hartzler, B.D., Harris, T.W., Yocum, G.T., Emala, C.W., Steeber, D.A., Stafford, D.C., Cook, J.M., Arnold, L.A. *Alleviation of Multiple Asthmatic Pathologic Features with Orally Available and Subtype Selective GABA(A) Receptor Modulators*. *Mol Pharm*. 2017; 14(6): S. 2088-98.
141. Chmielewski, P.P., Strzelec, B. *Elevated leukocyte count as a harbinger of systemic inflammation, disease progression, and poor prognosis: a review*. *Folia Morphol (Warsz)*. 2018; 77(2): S. 171-8.
142. Belok, S.H., Bosch, N.A., Klings, E.S., Walkey, A.J. *Evaluation of leukopenia during sepsis as a marker of sepsis-defining organ dysfunction*. *PLoS One*. 2021; 16(6): S. e0252206.
143. Kim, J.K., Kim, Y.S., Lee, H.-M., Jin, H.S., Neupane, C., Kim, S., Lee, S.-H., Min, J.-J., Sasai, M., Jeong, J.-H., Choe, S.-K., Kim, J.-M., Yamamoto, M., Choy, H.E., Park, J.B., Jo, E.-K. *GABAergic signaling linked to autophagy enhances host protection against intracellular bacterial infections*. *Nature Communications*. 2018; 9(1): S. 4184.
144. Voigtsberger, S., Lachmann, R.A., Leutert, A.C., Schläpfer, M., Booy, C., Reyes, L., Urner, M., Schild, J., Schimmer, R.C., Beck-Schimmer, B. *Sevoflurane ameliorates gas exchange and attenuates lung damage in experimental lipopolysaccharide-induced lung injury*. *Anesthesiology*. 2009; 111(6): S. 1238-48.
145. Reutershan, J., Basit, A., Galkina, E.V., Ley, K. *Sequential recruitment of neutrophils into lung and bronchoalveolar lavage fluid in LPS-induced acute lung injury*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005; 289(5): S. L807-15.
146. Mihic, S.J., Ye, Q., Wick, M.J., Koltchine, V.V., Krasowski, M.D., Finn, S.E., Mascia, M.P., Valenzuela, C.F., Hanson, K.K., Greenblatt, E.P.,

- Harris, R.A., Harrison, N.L. *Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABA(A) and glycine receptors*. Nature. 1997; 389(6649): S. 385-9.
147. Olsen, R.W. *GABA(A) receptor: Positive and negative allosteric modulators*. Neuropharmacology. 2018; 136(Pt A): S. 10-22.
148. Johansson, D., Shannon, O., Rasmussen, M. *Platelet and neutrophil responses to Gram positive pathogens in patients with bacteremic infection*. PLoS One. 2011; 6(11): S. e26928.
149. Kirschenbaum, L.A., Aziz, M., Astiz, M.E., Saha, D.C., Rackow, E.C. *Influence of rheologic changes and platelet-neutrophil interactions on cell filtration in sepsis*. Am J Respir Crit Care Med. 2000; 161(5): S. 1602-7.
150. Grommes, J., Alard, J.E., Drechsler, M., Wantha, S., Mörgelin, M., Kuebler, W.M., Jacobs, M., von Hundelshausen, P., Markart, P., Wygrecka, M., Preissner, K.T., Hackeng, T.M., Koenen, R.R., Weber, C., Soehnlein, O. *Disruption of platelet-derived chemokine heteromers prevents neutrophil extravasation in acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med. 2012; 185(6): S. 628-36.
151. Lam, F.W., Burns, A.R., Smith, C.W., Rumbaut, R.E. *Platelets enhance neutrophil transendothelial migration via P-selectin glycoprotein ligand-1*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 2011; 300(2): S. H468-H75.
152. Adams, W., Espicha, T., Estipona, J. *Getting Your Neutrophil: Neutrophil Transepithelial Migration in the Lung*. Infect Immun. 2021: S.
153. Huang, G.S., Li, C.Y., Hsu, P.C., Tsai, C.S., Lin, T.C., Wong, C.S. *Sevoflurane anesthesia attenuates adenosine diphosphate-induced P-selectin expression and platelet-leukocyte conjugate formation*. Anesth Analg. 2004; 99(4): S. 1121-6, table of contents.
154. Wacker, J., Lucchinetti, E., Jamnicki, M., Aguirre, J., Härter, L., Keel, M., Zaugg, M. *Delayed inhibition of agonist-induced granulocyte-platelet aggregation after low-dose sevoflurane inhalation in humans*. Anesth Analg. 2008; 106(6): S. 1749-58.
155. Fan, Y., Wang, H., Ma, Q. *Effects of sevoflurane and propofol anesthesia on intraoperative endothelial cell function in patients undergoing laparoscopic cholecystectomy*. J Int Med Res. 2020; 48(10): S. 300060520918407.

156. Cai, K., Nanga, R.P.R., Lamprou, L., Schinstine, C., Elliott, M., Hariharan, H., Reddy, R., Epperson, C.N. *The Impact of Gabapentin Administration on Brain GABA and Glutamate Concentrations: A 7T 1H-MRS Study*. *Neuropsychopharmacology*. 2012; 37(13): S. 2764-71.
157. Newton, V.L., Guck, J.D., Cotter, M.A., Cameron, N.E., Gardiner, N.J. *Neutrophils Infiltrate the Spinal Cord Parenchyma of Rats with Experimental Diabetic Neuropathy*. *J Diabetes Res*. 2017; 2017: S. 4729284.
158. Lubick, K., Radke, M., Jutila, M. *Securinine, a GABAA receptor antagonist, enhances macrophage clearance of phase II C. burnetii: comparison with TLR agonists*. *Journal of leukocyte biology*. 2007; 82(5): S. 1062-9.
159. Ivetic, A. *A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour*. *Cell Tissue Res*. 2018; 371(3): S. 437-53.
160. Ivetic, A., Hoskins Green, H.L., Hart, S.J. *L-selectin: A Major Regulator of Leukocyte Adhesion, Migration and Signaling*. *Front Immunol*. 2019; 10: S. 1068.
161. Wang, S.-Z., Smith, P.K., Lovejoy, M., Bowden, J.J., Alpers, J.H., Forsyth, K.D. *Shedding of L-selectin and PECAM-1 and upregulation of Mac-1 and ICAM-1 on neutrophils in RSV bronchiolitis*. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 1998; 275(5): S. L983-L9.
162. Rahman, I., Collado Sánchez, A., Davies, J., Rzeniewicz, K., Abukssem, S., Joachim, J., Hoskins Green, H.L., Killock, D., Sanz, M.J., Charras, G., Parsons, M., Ivetic, A. *L-selectin regulates human neutrophil transendothelial migration*. *J Cell Sci*. 2021; 134(3): S.
163. Almulki, L., Noda, K., Amini, R., Schering, A., Garland, R.C., Nakao, S., Nakazawa, T., Hisatomi, T., Thomas, K.L., Masli, S., Hafezi-Moghadam, A. *Surprising up-regulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) in endotoxin-induced uveitis*. *Faseb j*. 2009; 23(3): S. 929-39.
164. Gardiner, E.E., De Luca, M., McNally, T., Michelson, A.D., Andrews, R.K., Berndt, M.C. *Regulation of P-selectin binding to the neutrophil P-selectin counter-receptor P-selectin glycoprotein ligand-1 by neutrophil elastase and cathepsin G*. *Blood*. 2001; 98(5): S. 1440-7.

165. Wilby, M.J., Hutchinson, P.J. *The pharmacology of chlormethiazole: a potential neuroprotective agent?* CNS Drug Rev. 2004; 10(4): S. 281-94.
166. Harmon, D., Coleman, E., Marshall, C., Lan, W., Shorten, G. *The effect of clomethiazole on plasma concentrations of interleukin-6, -8, -1beta, tumor necrosis factor-alpha, and neutrophil adhesion molecule expression during experimental extracorporeal circulation.* Anesth Analg. 2003; 97(1): S. 13-8, table of contents.
167. Ma, X., Sun, Q., Sun, X., Chen, D., Wei, C., Yu, X., Liu, C., Li, Y., Li, J. *Activation of GABAA Receptors in Colon Epithelium Exacerbates Acute Colitis.* Frontiers in Immunology. 2018; 9(987): S.
168. Lee, M., Schwab, C., Mcgeer, P.L. *Astrocytes are GABAergic cells that modulate microglial activity.* Glia. 2011; 59(1): S. 152-65.
169. Forkuo, G.S., Nieman, A.N., Kodali, R., Zahn, N.M., Li, G., Rashid Roni, M.S., Stephen, M.R., Harris, T.W., Jahan, R., Guthrie, M.L., Yu, O.B., Fisher, J.L., Yocum, G.T., Emala, C.W., Steeber, D.A., Stafford, D.C., Cook, J.M., Arnold, L.A. *A Novel Orally Available Asthma Drug Candidate That Reduces Smooth Muscle Constriction and Inflammation by Targeting GABAA Receptors in the Lung.* Mol Pharm. 2018; 15(5): S. 1766-77.
170. Jiang, T., Ma, X., Chen, H., Jia, H., Xiong, Y. *Diazepam ameliorated myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of C-C chemokine receptor type 2/tumor necrosis factor-alpha/interleukins and Bcl-2-associated X protein/caspase-3 pathways in experimental rats.* J Vet Med Sci. 2021; 83(12): S. 1965-76.
171. Malaguarnera, M., Balzano, T., Castro, M.C., Llansola, M., Felipo, V. *The Dual Role of the GABA(A) Receptor in Peripheral Inflammation and Neuroinflammation: A Study in Hyperammonemic Rats.* Int J Mol Sci. 2021; 22(13): S.
172. Zhu, Z., Shi, Z., Xie, C., Gong, W., Hu, Z., Peng, Y. *A novel mechanism of Gamma-aminobutyric acid (GABA) protecting human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) against H(2)O(2)-induced oxidative injury.* Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 2019; 217: S. 68-75.
173. Hsing, C.H., Lin, M.C., Choi, P.C., Huang, W.C., Kai, J.I., Tsai, C.C., Cheng, Y.L., Hsieh, C.Y., Wang, C.Y., Chang, Y.P., Chen, Y.H., Chen, C.L., Lin, C.F. *Anesthetic propofol reduces endotoxic inflammation by inhibiting reactive oxygen species-regulated Akt/IKK β /NF- κ B signaling.* PLoS One. 2011; 6(3): S. e17598.

174. Chen, M.S., Lin, W.C., Yeh, H.T., Hu, C.L., Sheu, S.M. *Propofol specifically reduces PMA-induced neutrophil extracellular trap formation through inhibition of p-ERK and HOCl*. Life Sci. 2019; 221: S. 178-86.
175. Chen, C.Y., Tsai, Y.F., Huang, W.J., Chang, S.H., Hwang, T.L. *Propofol inhibits endogenous formyl peptide-induced neutrophil activation and alleviates lung injury*. Free Radic Biol Med. 2018; 129: S. 372-82.
176. Meier, A., Chien, J., Hobohm, L., Patras, K.A., Nizet, V., Corriden, R. *Inhibition of Human Neutrophil Extracellular Trap (NET) Production by Propofol and Lipid Emulsion*. Front Pharmacol. 2019; 10: S. 323.
177. Kim, J.K., Silwal, P., Kim, Y.J., Jeon, S.M., Kim, I.S., Lee, J.-Y., Heo, J.Y., Lee, S.-H., Bae, J.-W., Kim, J.-M., Park, J.B., Jo, E.-K. *Gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 4 coordinates autophagy, inflammation, and immunometabolism to promote innate immune activation*. Autophagy Reports. 2023; 2(1): S. 2181915.
178. Küper, C., Beck, F.X., Neuhofer, W. *Toll-like receptor 4 activates NF- κ B and MAP kinase pathways to regulate expression of proinflammatory COX-2 in renal medullary collecting duct cells*. Am J Physiol Renal Physiol. 2012; 302(1): S. F38-46.
179. van der Bruggen, T., Nijenhuis, S., van Raaij, E., Verhoef, J., van Asbeck, B.S. *Lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor alpha production by human monocytes involves the raf-1/MEK1-MEK2/ERK1-ERK2 pathway*. Infect Immun. 1999; 67(8): S. 3824-9.
180. Kitanaka, N., Nakano, R., Sugiura, K., Kitanaka, T., Namba, S., Konno, T., Nakayama, T., Sugiya, H. *Interleukin-1 β promotes interleukin-6 expression via ERK1/2 signaling pathway in canine dermal fibroblasts*. PLoS One. 2019; 14(7): S. e0220262.
181. He, W., Qu, T., Yu, Q., Wang, Z., Lv, H., Zhang, J., Zhao, X., Wang, P. *LPS induces IL-8 expression through TLR4, MyD88, NF-kappaB and MAPK pathways in human dental pulp stem cells*. Int Endod J. 2013; 46(2): S. 128-36.
182. Bhat, R., Axtell, R., Mitra, A., Miranda, M., Lock, C., Tsien, R.W., Steinman, L. *Inhibitory role for GABA in autoimmune inflammation*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2010; 107(6): S. 2580-5.

183. Ye, L., Gao, Y., Mok, S.W.F., Liao, W., Wang, Y., Chen, C., Yang, L., Zhang, J., Shi, L. *Modulation of alveolar macrophage and mitochondrial fitness by medicinal plant-derived nanovesicles to mitigate acute lung injury and viral pneumonia*. Journal of Nanobiotechnology. 2024; 22(1): S. 190.
184. Chintagari, N.R., Liu, L. *GABA receptor ameliorates ventilator-induced lung injury in rats by improving alveolar fluid clearance*. Critical Care. 2012; 16(2): S. R55.
185. Bhandage, A.K., Hellgren, C., Jin, Z., Olafsson, E.B., Sundström-Poromaa, I., Birnir, B. *Expression of GABA receptors subunits in peripheral blood mononuclear cells is gender dependent, altered in pregnancy and modified by mental health*. Acta Physiologica. 2015; 213(3): S. 575-85.
186. Dutta, S., Sengupta, P. *Men and mice: Relating their ages*. Life Sciences. 2016; 152: S. 244-8.
187. Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin. *S3-Leitlinie Analgesie, Sedierung und Delirmanagement in der Intensivmedizin (DAS-Leitlinie 2020)*. AWMF Online. 2020. Abgerufen am: 01.05.2024. Abgerufen von: https://register.awmf.org/assets/guidelines/001-012I_S3_Analgesie-Sedierung-Delirmanagement-in-der-Intensivmedizin-DAS_2021-08.pdf.
188. Falk-Petersen, C.B., Tsonkov, T.M., Nielsen, M.S., Harpsøe, K., Bundgaard, C., Frølund, B., Kristiansen, U., Gloriam, D.E., Wellendorph, P. *Discovery of a new class of orthosteric antagonists with nanomolar potency at extrasynaptic GABAA receptors*. Scientific Reports. 2020; 10(1): S. 10078.
189. Neumann, S., Boothman-Burrell, L., Gowing, E.K., Jacobsen, T.A., Ahring, P.K., Young, S.L., Sandager-Nielsen, K., Clarkson, A.N. *The Delta-Subunit Selective GABAA Receptor Modulator, DS2, Improves Stroke Recovery via an Anti-inflammatory Mechanism*. Frontiers in Neuroscience. 2019; 13(1133): S.

7 Eigenständigkeitserklärung

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin (Zentrum für medizinische Forschung) unter Betreuung von Prof. Dr. Franziska Konrad durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Konrad und Dr. Kristian-Christos Ngamsri.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Dr. Ngamsri und Diplom-Biologin Frau Jutta Gamper-Tsigaras von mir eigenständig und in Zusammenarbeit mit Dr. Kristian Ngamsri sowie Frau Anika Fuhr durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

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

Göttingen, den 12.07.2025

8 Veröffentlichungen

Teile der Rohdaten dieser Arbeit wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht (137):

Fuhr A, Roediger R, Simelitis M, Gamper-Tsigaras J, Templin M, Kormann M, Antkowiak B, Rudolph U, Köhler D, Rosenberger P, Ngamsri KC, Konrad FM. *Regulation of neutrophil migration in acute pulmonary inflammation by extraneuronal $\alpha 1$ gamma-aminobutyric acid_A receptors*. Cell Death Dis. 2025 Apr 18;16(1):313. doi: 10.1038/s41419-025-07488-1. PMID: 40251174; PMCID: PMC12008292.

Die entsprechenden Daten wurden in der Legende der jeweiligen Abbildung im Ergebnisteil mit § gekennzeichnet.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die auf die eine oder andere Art und Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein erster Dank gilt Franziska Konrad für die Überlassung des Themas ebenso wie für ihr Vertrauen in mich, ihre Unterstützung und ihre Betreuung sowohl im Labor als auch darüber hinaus.

Des Weiteren möchte ich Kristian Ngamsri und Anika Fuhr danken, die mich als Betreuende bei meiner Tätigkeit im Labor begleitet haben und als Ansprechpartner:innen bei Fragen oder Problemen stets für mich da waren.

Ein weiterer Dank gilt Jutta Gamper-Tsigaras, deren Erfahrung und Unterstützung im Labor mir mehr als nur einmal den Tag gerettet hat. Ebenso möchte ich auch den anderen medizinisch-technischen Assistent:innen des anästhesiologischen Labors Tübingen danken.

Auch meinen Mitdoktoranden Tobias K. und Tobias K. (das muss eigentlich ein Glitch in der Matrix sein) möchte ich von Herzen danken, sie haben jede Mittagspause zu einem Event gemacht und mich einmal vor dem Aspirationstod bewahrt.

Meinen Freund:innen gebührt ein großer Dank und großer Respekt dafür, dass sie meine Dissertation und mich die letzten Jahre über ertragen haben. Besonders bei meinen ehemaligen Mitbewohnern Jonas, Jan und Alessandro möchte ich mich dafür bedanken, dass sie eine zweite Familie für mich geworden sind, während ich zwischen Labor und Lockdown pendelte. Luisa danke ich von Herzen dafür, dass sie mich auch an schweren Tagen wieder aufgebaut hat und für mich da war, wenn ich sie brauchte. Lara möchte ich dafür danken, dass sie mich auf den letzten Metern unterstützt und mich quasi über die Ziellinie gepusht hat und dafür, wie aufrichtig sie sich mit mir freuen wird, wenn dieses Projekt endgültig abgeschlossen ist. Te quiero.

Ein herzlicher Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, die mir das Studium überhaupt erst ermöglicht haben, mich in meinem Tun immer bekräftigt haben und einfach die großartigste Familie sind, die man sich vorstellen kann.

Meinen letzten und größten Dank möchte ich an all die Mäuse richten, die unwissend und unfreiwillig für meine Dissertation ihr Leben gelassen haben. Wenn es einen Himmel gibt, wünsche ich euch, dass seine Vorratskammer reich an Käse und arm an Katzen ist. Ruhet in Frieden.