

Aus dem Bereich der Experimentellen und Klinischen Pharmakologie
und Toxikologie

Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Der ADAM17-vermittelte Einfluss von *Pseudomonas aeruginosa* auf Junctions- und Adhäsionsmoleküle
in Lungenepithelzellen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2025

vorgelegt von
Noah Andres
geboren am 21.10.1999 in Merzig

1	PUBLIKATIONEN.....	4
2	ZUSAMMENFASSUNG	5
3	SUMMARY	6
4	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	7
5	EINLEITUNG	8
5.1	ADAMs – “A DISINTEGRIN AND METALLOPROTEINASE” ENZYME.....	8
5.1.1	STRUKTUR	8
5.1.2	FUNKTION	9
5.1.2.1	<i>Ectodomain-Shedding</i>	9
5.1.2.2	<i>Regulated intramembrane proteolysis (RIPing)</i>	10
5.2	ADAM17.....	11
5.2.1	STRUKTUR	11
5.2.2	SUBSTRATE UND FUNKTION	12
5.2.3	REGULATION	13
5.3	PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	14
5.3.1	BEDEUTUNG ALS ERREGER HUMANER INFESTIONEN	14
5.3.2	PATHOGENITÄT	15
5.3.3	PNEUMONIE	16
5.4	DIAPYDESE VON LEUKOZYTEN.....	16
5.4.1	DER EINFLUSS VON ADAM17 AUF DIE ADHÄSION.....	18
5.4.2	TRANSMIGRATION.....	18
5.4.2.1	Parazelluläre Transmigration und die Rolle von JAM-A	18
5.4.2.1.1	Der Einfluss von ADAM17 auf JAM-A und die leukozytäre Transmigration	20
5.5	FRAGESTELLUNG.....	20
6	MATERIAL UND METHODEN.....	22
6.1	VERWENDETE MATERIALIEN	22
6.1.1	GERÄTE	22
6.1.2	CHEMIKALIEN UND ENZYME	22
6.1.3	ANTIKÖRPER	23
6.1.4	SHRNA-SEQUENZEN	24
6.1.5	ZELLKULTURMEDIENT	25
6.1.6	ZELLINIEN UND BAKTERIENSTÄMME	25
6.1.7	PUFFER UND LÖSUNGEN	25
6.2	ZELLKULTUR	26
6.2.1	HUMANE ZELLEN	26
6.2.1.1	A549-Zellen	26
6.2.1.2	THP-1 Zellen	27
6.2.2	<i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	28
6.2.2.1	Vorbereitung für Versuche mit bakterieller Stimulation	28
6.3	VERSUCHE.....	29
6.3.1	VORBEREITUNG DER ZELLEN.....	29
6.3.1.1	Herstellung von ADAM17 <i>Knockdown</i> Zellen mittels lentiviraler Transduktion	29
6.3.1.2	Aussaat und Vorinkubation der Zellen	30

6.3.2	VERSUCHSDURCHFÜHRUNGEN	30
6.3.2.1	Stimulation von A549-Zellen mit <i>P. aeruginosa</i> zur Untersuchung des JAM-A Sheddings ...	30
6.3.2.2	Stimulation von A549-Zellen mit hitzeinaktivierten <i>P. aeruginosa</i> zur Beurteilung des JAM-A Sheddings.....	31
6.3.2.3	Adhäsionsassay zur Beurteilung der Adhäsion von THP-1 Zellen an A549-Zellen nach Stimulation mit <i>P. aeruginosa</i>	31
6.3.2.4	Survival Assay zum Vergleich der Überlebensfähigkeit von A549-Zellen mit unterschiedlicher ADAM17 Aktivität bei Infektion mit <i>P. aeruginosa</i>	32
6.4	ANALYSEVERFAHREN	32
6.4.1	PROTEINBESTIMMUNG MITTELS BCA-ASSAY	32
6.4.2	WESTERN BLOT	33
6.4.2.1	Proteindenaturierung mit Lämmli Puffer	33
6.4.2.2	Herstellung eines Polyacrylamid-Gels	33
6.4.2.3	Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
6.4.2.4	Western Blot Transfer	34
6.4.2.5	Block unspezifischer Antikörper-Bindestellen mit Milch-Lösung	35
6.4.2.6	Inkubation der Membran mit den Primär- und Sekundärantikörpern.....	35
6.4.2.7	Entwickeln der Membran mittels <i>Enhanced Chemiluminescence</i> (ECL) Verfahren.....	35
6.4.2.8	„Stripping“ der Membran zur Inkubation mit weiteren Antikörpern.....	36
6.5	AUSWERTUNG	36
6.5.1	AUSWERTUNG DES WESTERN BLOTS MIT <i>AIDA IMAGE ANALYZER V.4.14</i>	36
6.5.2	NORMALISIERUNG DER PROTEINMENGE DES WESTERN BLOTS	37
6.5.3	AUSWERTUNG DES ADHÄSIONSASSAYS MIT DER <i>GEN5 MICROPLATE READER AND IMAGER SOFTWARE</i>	37
6.5.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG MIT <i>GRAPHPAD PRISM 5</i>	38
7	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>39</u>
7.1	EINFLUSS VON ADAM17 AUF DAS <i>ECTODOMAIN-SHEDDING</i> VON JAM-A NACH BAKTERIELLER STIMULATION	39
7.1.1	PHARMAKOLOGISCHE INHIBITION VON ADAM17 FÜHRT ZU VERMINDERTEM <i>ECTODOMAIN-SHEDDING</i> VON JAM-A NACH BAKTERIELLER STIMULATION	39
7.1.2	<i>KNOCKDOWN</i> VON ADAM17 FÜHRT ZU VERMINDERTEM <i>ECTODOMAIN-SHEDDING</i> VON JAM-A NACH BAKTERIELLER STIMULATION.....	40
7.2	STIMULATION MIT HITZEINAKTIVIERTEN BAKTERIEN BEWIRKT KEIN VERSTÄRKTES <i>ECTODOMAIN-SHEDDING</i> VON JAM-A	42
7.3	EINFLUSS VON ADAM17 AUF DIE LEUKOZYTÄRE ADHÄSION AM EPITHEL NACH BAKTERIELLER STIMULATION	43
7.3.1	PHARMAKOLOGISCHE INHIBITION VON ADAM17 FÜHRT ZU EINER VERSTÄRKTEN LEUKOZYTÄREN ADHÄSION NACH STIMULATION MIT <i>P. AERUGINOSA</i>	44
7.3.2	<i>KNOCKDOWN</i> VON ADAM17 FÜHRT ZU EINER VERSTÄRKTEN LEUKOZYTÄREN ADHÄSION NACH STIMULATION MIT <i>P. AERUGINOSA</i>	45
7.4	EINFLUSS VON ADAM17 AUF DAS ÜBERLEBEN VON A549-ZELLEN NACH BAKTERIELLER STIMULATION	47
8	<u>DISKUSSION</u>	<u>49</u>
8.1	AUSWIRKUNGEN DER INHIBITION VON ADAM17 AUF DIE LEUKOZYTÄRE DIAPEDESE AM LUNGENEPIHEL....	49
8.2	PHARMAKOLOGISCHE ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN UND AUSBLICK AUF WEITERE MÖGLICHE UNTERSUCHUNGEN.....	52
8.3	KRITISCHE BETRACHTUNG DER DURCHGEFÜHRTEN VERSUCHSREIHEN	54
9	<u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>56</u>

<u>10</u>	<u>LEBENS LAUF.....</u>	<u>61</u>
10.1	PERSÖNLICHE DATEN	61
10.2	AUSBILDUNG	61
10.3	FACHKENNTNISSE.....	61
<u>11</u>	<u>DEKLARATION (EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG).....</u>	<u>62</u>
<u>12</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>63</u>

1 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert. Einige Ergebnisse sind Bestandteil der folgenden Publikation:

- Aljohmani A, **Andres NN**, Yildiz D (2022) *Pseudomonas aeruginosa* alters critical lung epithelial cell functions through activation of ADAM17. Cells 11:2303
DOI: [10.3390/cells11152303](https://doi.org/10.3390/cells11152303)

2 Zusammenfassung

Die Migration von Leukozyten durch den epithelialen Zellverband spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort im Rahmen einer durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachten Pneumonie. Dabei beeinflussen Junktions- und Adhäsionsmoleküle die Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten am Epithel sowie deren Transmigration durch den Zellverband erheblich. Einige dieser Moleküle wie L-Selektin, ICAM-1, VCAM-1 oder JAM-A sind Substrate von ADAM17 und unterliegen daher dem *Ectodomain-Shedding* durch die membranständige Protease. Dieser Prozess beschreibt die proteolytische Spaltung solcher Transmembranproteine nahe der Plasmamembran, welche zur Freisetzung von einzelnen Fragmenten in den extrazellulären Raum führt. Der generelle Aktivitätszustand von ADAM17 bestimmt somit das Vorliegen der Junktions- und Adhäsionsmoleküle in der Membran, die Generierung der löslichen Varianten, sowie die Permeabilität des Zellverbands. Das Hauptziel der vorliegenden Dissertation war die Untersuchung des ADAM17-vermittelten Einflusses von *Pseudomonas aeruginosa* auf die zellassoziierte Expression von Junktions- und Adhäsionsmolekülen in Lungenepithelzellen sowie der zellphysiologischen Konsequenzen. Die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass *in vitro* eine Infektion von A549-Epithelzellen mit *Pseudomonas aeruginosa* mit einer gesteigerten Aktivität von ADAM17 einhergeht. Mittels pharmakologischer Inhibitionsversuche und shRNA-vermittelter Geninaktivierung konnte gezeigt werden, dass diese bakteriell hervorgerufene Aktivitätssteigerung ein erhöhtes *Ectodomain-Shedding* des Junktionalen Adhäsionsmoleküls-A (JAM-A) bedingt. Des Weiteren geht dies mit einer reduzierten Adhäsionsfähigkeit von THP-1 Zellen (als Leukozytenmodell) an Epithelzellen mit gesteigerter enzymatischer Aktivität von ADAM17 einher. Diese Aktivierung von ADAM17 führt zusätzlich zu einem verringerten Überleben der Epithelzellen nach *Pseudomonaden*-Infektion. Zusammenfassend kann somit gesagt werden, dass die Aktivierung von ADAM17 in alveolären Lungenepithelzellen nach einer *Pseudomonaden*-Infektion zu einem höheren Zellschaden und einer Zerstörung der epithelialen Barriere führt. Auf Basis dieser Ergebnisse wäre eine Inhibition von ADAM17 als Therapieoption während einer pulmonalen Infektion denkbar, was jedoch in weiterführenden translationalen Studien näher untersucht werden muss.

3 Summary

The migration of leukocytes through the epithelial cell layer plays an important role in the immune response in the context of pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. Junctional and adhesion molecules significantly influence the ability of leukocytes to adhere to the epithelium and their transmigration through the cell layer. Some of these molecules such as L-selectin, ICAM-1, VCAM-1 or JAM-A are substrates of ADAM17 and are subjected to ectodomain-shedding by the transmembrane protease. This process describes the proteolytic cleavage of such transmembrane proteins near the plasma membrane, which leads to the release of individual fragments into the extracellular space. Thus, the activation status of ADAM17 thus determines the presence of junctional and adhesion molecules in the membrane, the generation of soluble variants and the permeability of the cell assembly. The main objective of this dissertation was to investigate the ADAM17-mediated influence of *Pseudomonas aeruginosa* on the cell-associated expression of junctional and adhesion molecules in lung epithelial cells and the cell physiological consequences.

The results obtained in this study show that *in vitro* infection of A549 epithelial cells with *Pseudomonas aeruginosa* is associated with an increased activity of ADAM17. Using pharmacological inhibition experiments and shRNA-mediated gene inactivation, it was observed that this bacteria-induced increase in activity causes increased ectodomain-shedding of the junctional adhesion molecule A (JAM-A). Furthermore, this led to a reduced adhesion capacity of THP-1 cells (as a leukocyte model) to epithelial cells with increased enzymatic activity of ADAM17. This activation of ADAM17 also caused reduced survival of epithelial cells upon infection with *Pseudomonas*. In summary, activation of ADAM17 in alveolar lung epithelial cells after *Pseudomonas aeruginosa* infection led to increased cell damage and disruption of the epithelial barrier. Based on these results, inhibition of ADAM17 could be a conceivable therapeutic option during pulmonary infection, but this needs to be investigated in more detail in further translational studies.

4 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Ampère
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AIDS	<i>Acquired Immun Deficiency Syndrome</i>
APS	Ammoniumpersulfat
BCA-Assay	Bicinchoninsäure-Assay
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester
CANDIS	<i>Conserved ADAM17 dynamic interaction sequence</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>Enhanced Luminol</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
FCS	fötales Kälberserum
fl	<i>full length</i>
g	Gewichtskraft
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
hAELVi	<i>Human Alveolar Epithelial Lentivirus immortalized</i>
ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
KD	<i>Knockdown</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
MAP	<i>Mitogen-activated protein</i>
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor k-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
OD	Optische Dichte
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	<i>Phosphat-buffered saline</i>
PECAM	<i>Platelet endothelial cell adhesion molecule</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PSGL-1	P-Selektin Glykoprotein Ligand-1
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute / Umdrehungen pro Minute</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamid Gel Electrophoresis</i>
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
TAPI-1	<i>TNF-α Protease Inhibitor-1</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
THB	Todd-Hewitt-Bouillon
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VLA-4	<i>Very late antigen-4</i>

5 Einleitung

5.1 ADAMs – “A disintegrin and metalloproteinase” Enzyme

Bei der „A disintegrin and metalloproteinase“ (ADAM) Familie handelt es sich um eine Gruppe von Transmembranproteinen, die proteolytische Eigenschaften besitzen und für ein großes Spektrum physiologischer Funktionen im menschlichen Organismus verantwortlich sind. ADAM-Proteasen werden anhand ihrer biochemischen Eigenschaften in die Superfamilie der Zinkproteasen eingeordnet [66]. Insgesamt enthält das menschliche Genom 21 Gene für ADAM-Proteasen, jedoch kodieren lediglich 13 dieser Gene für ADAM-Proteasen mit proteolytischer Aktivität [16].

5.1.1 Struktur

ADAM-Proteasen weisen eine typische Struktur auf, welche sich aus mehreren Untereinheiten zusammensetzt (Abbildung 1). Dabei handelt es sich um eine C-terminale zytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne, eine EGF-ähnliche Domäne, die nur bei einigen Vertretern der Gruppe vorhanden ist, eine cysteinreiche Domäne, eine Disintegrindomäne sowie eine Metalloproteinase-Domäne. In der inaktiven Form existiert zusätzlich eine N-terminale Prodomäne, welche das katalytische Zentrum blockiert und so die Funktionsfähigkeit des Enzyms beeinflusst. Um das Enzym in den aktiven Zustand zu überführen, muss die Prodomäne zunächst abgespalten werden [33]. Die extrazellulären Domänen der Enzyme sind C-förmig angeordnet, wobei diese Formgebung Einfluss auf die Substratspezifität haben könnte [18, 68].

Die endständige Metalloproteinase-Domäne enthält das katalytische Zentrum mit einer für ADAM-Proteasen typischen Zink-bindenden Domäne. Dieses Zink-Ion wird tetraedrisch von Stickstoffatomen koordiniert, welche Bestandteil der Histidin-Aminosäuren aus einer HEXXHXXGXXHD Sequenz sind. Die in der beschriebenen Sequenz auch enthaltene Glutaminsäure fungiert als katalytische Base, indem sie Wassermoleküle polarisiert und so über eine nukleophile Reaktion die Spaltung der Peptidbindung innerhalb des Substratproteins bewirkt [70]. Die folgende Disintegrindomäne setzt sich aus zwei Subsegmenten zusammen, deren Struktur neben Disulfid-Brücken auf der Bindung von Kalzium-Ionen basiert. Die Bezeichnung „Disintegrin“ stammt von Enzymen, welche in Schlangengiften entdeckt wurden und deren Funktion darin besteht, die Thrombozytenaggregation zu unterbinden [24]. Dabei weisen sie die Fähigkeit auf, Integrine zu binden, was ebenso für die Disintegrindomäne der ADAM-Proteasen beschrieben ist, um darüber Zell-Zell oder Zell-Matrix Interaktionen ermöglichen zu können [70]. Die cysteinreiche Domäne setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen, welche möglicherweise an der Erkennung von Substraten beteiligt

sind [18, 69]. Die anschließende Transmembrandomäne dient der Verankerung des Proteins innerhalb der Zellmembran. Um innerhalb der Zelle die korrekte Lokalisation als membranständiges Molekül zu erreichen ist eine Signalsequenz notwendig, die der Prodomäne N-terminal vorausgeht. Die C-terminale zytoplasmatische Domäne enthält eine PXXP-Sequenz in ein- oder mehrfacher Ausführung, welche als Bindungsstelle für Proteine mit SH3-Resten fungieren kann [66]. Über diese Interaktion kann eine Phosphorylierung durch verschiedene Kinasen stattfinden, von denen angenommen wird, dass sie nach Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden die Aktivität der ADAM-Proteasen regulieren können [16].

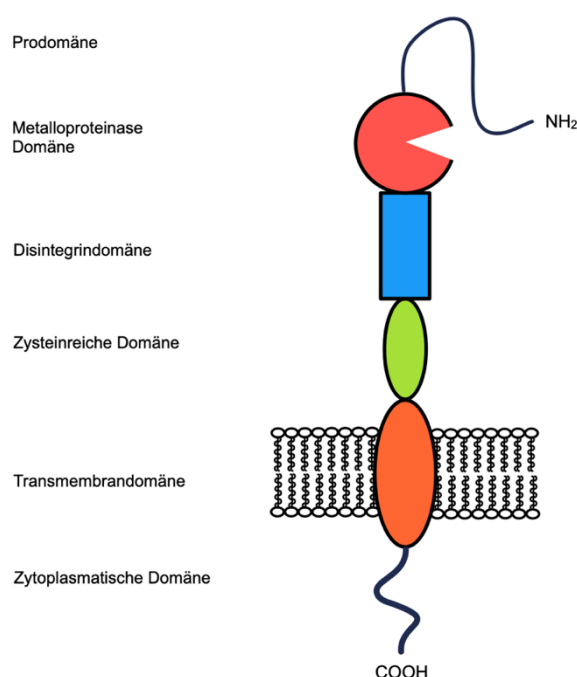


Abbildung 1: Allgemeine Struktur der ADAM-Proteasen; erstellt nach Kato et al., 2018 [38]; ADAM-Proteasen setzen sich von intrazellulär nach extrazellulär aus folgenden Untereinheiten zusammen: C-terminale zytoplasmatische Domäne, Transmembrandomäne, cysteinreiche Domäne, Disintegrindomäne sowie Metalloproteinase-Domäne. Zusätzlich dazu besitzt das Enzym im inaktiven Zustand eine N-terminale Prodomäne.

5.1.2 Funktion

5.1.2.1 Ectodomain-Shedding

Eine Aufgabe der ADAM-Proteasen besteht darin, weitere Proteine, die sich auf der Zellmembran befinden, nahe der Zelloberfläche proteolytisch zu spalten. Dieser als „*Ectodomain-Shedding*“ bezeichnete Prozess induziert ein Freisetzen von löslichen Fragmenten dieser Proteine in den Extrazellulärraum. Bekannte Substrate, die diesem Prozess unterliegen sind beispielsweise TNF- α oder der Interleukin-1-Rezeptor [83]. Durch Bindung an Rezeptoren können diese löslichen Fragmente einen Bestandteil von autokrinen, parakrinen oder endokrinen Signaltransduktionskaskaden darstellen. Ein Beispiel hierfür ist die Spaltung von EGF-ähnlichen Wachstumsfaktoren, zu denen Betacellulin, Amphiregulin und *transforming growth factor* (TGF) *alpha* gehören [81]. Das proteolytische Spalten von zellständigen Effektormolekülen kann nicht nur eine Bindung von Proteinen an ihre

Rezeptoren bedingen, sondern umgekehrt auch zum Ausbleiben der Signalweiterleitung führen, wenn diese über zellständige Proteine vermittelt wird. Andererseits kann das *Ectodomain-Shedding* auch die Funktion des verbleibenden zellständigen Proteinrestes beeinflussen und so über juxtakrine oder autokrine Kommunikation an der zellulären Kommunikation teilhaben [16].

Darüber hinaus reguliert das *Ectodomain-Shedding* von Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die Bindungen von extrazellulären Botenstoffen sowie die nachfolgenden Signaltransduktionsschritte [16]. Da beispielsweise auch Rezeptoren wie der Interleukin-1- und Interleukin-6-Rezeptor Substrate von ADAM17 sind [83], kann so durch verstärktes *Ectodomain-Shedding* durch die Protease die Wirkung der jeweiligen Liganden auf die Zelle abgeschwächt werden, um so die Immunantwort zu beeinflussen.

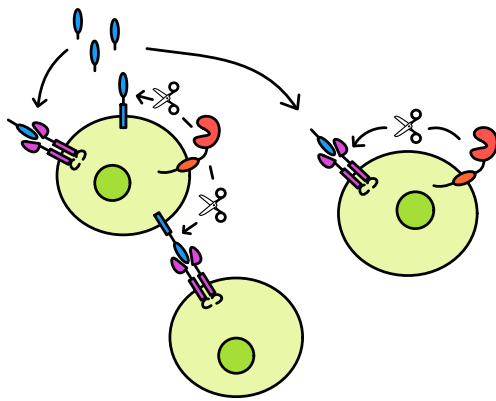


Abbildung 2: Signalübertragung mittels *Ectodomain-Shedding*; erstellt nach Saad et al., 2019 [64]; Durch die proteolytische Spaltung membranständiger Moleküle mit nachfolgender Freisetzung löslicher Fragmente dieser Moleküle nimmt ADAM17 Einfluss auf die zelluläre Kommunikation. So ist ADAM17 in der Lage, lösliche Mediatoren in den Extrazellulärraum freizusetzen, um darüber Rezeptoren dieser zu aktivieren (in Abbildung Zelle oben links). Umgekehrt kann auch durch die Proteolyse von Rezeptoren eine Aktivierung solcher verhindert werden (in Abbildung Zelle rechts). Durch diese genannten Mechanismen kann auch die Unterbindung einer juxtakrinen Signaltransduktion erfolgen (in Abbildung Zelle unten links).

5.1.2.2 Regulated intramembrane proteolysis (RIPing)

Neben dem *Ectodomain-Shedding* besteht die regulierte intramembrane Proteolyse (*Regulated intramembrane proteolysis* (RIPing)) als weiterer Mechanismus, über den ADAM-Proteasen an zellulärer Signaltransduktion beteiligt sind. Nach erfolgtem *Ectodomain-Shedding* kommt es durch weitere Spaltung der zurückgebliebenen transmembranen Fragmente und intrazellulärer Freisetzung von Spaltfragmenten (*Intracellular domain* (ICD)) zum Auslösen einer Signalkaskade [16]. Die prominentesten Beispiele für diesen Vorgang stellen der Notch-Signalweg [72] und die Prozessierung von APP [54] dar. Im Fall des Notch-Signalweges führt die durch Ligandenbindung induzierte regulierte intramembrane Proteolyse des Notch-Rezeptors zur Translokation dessen intrazellulärer Domäne (NICD) in den Zellkern, wo es zur weiteren Signaltransduktion kommt [76]. Durch folgende Beeinflussung der zellulären Transkription spielt die intrazelluläre Domäne (NICD) so eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Zellen [72].

5.2 ADAM17

ADAM17 wurde 1994 entdeckt [83] und initial als TNF- α freisetzendes Enzym (engl. „*tumor necrosis factor converting enzyme*“ (TACE)) beschrieben [23]. ADAM17 wird ubiquitär von humanen Zellen exprimiert, darunter hämatopoetischen Zellen [85], Neuronen [83] sowie Endothel- und Epithelzellen [40]. Die herausragende Bedeutung von ADAM17 für die Differenzierung von Zellen und die Entwicklung des Organismus wird anhand der Tatsache deutlich, dass ADAM17 defiziente Mäuse nicht lebensfähig sind und schwere Abnormalitäten aufweisen [58], welche auf der fehlenden Freisetzung von Wachstumsfaktoren beruhen.

5.2.1 Struktur

Die grundlegende Struktur sowie deren Funktion ähnelt derer der übrigen Mitglieder der ADAM-Familie, weist jedoch eine Besonderheit in der Zusammensetzung der molekularen Untereinheiten auf. So enthält das Molekül nicht die oben genannte cysteinreiche Domäne und keine EGF-ähnliche Domäne, wobei die zwischen Disintegrindomäne und Transmembrandomäne befindliche Domäne als „membran-proximale“ Domäne bezeichnet wird [83]. Diese „membran-proximale“ Domäne dient der Substraterkennung [47] sowie der Regulierung des Enzyms (5.2.3). Zusätzlich weist ADAM17 eine sogenannte CANDIS Domäne auf, eine kurze Sequenz, welche sich zwischen der Transmembrandomäne und der membran-proximalen Domäne befindet [83]. Auch diese Region spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der enzymatischen Aktivität [15]. Der strukturelle Aufbau von ADAM17 ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

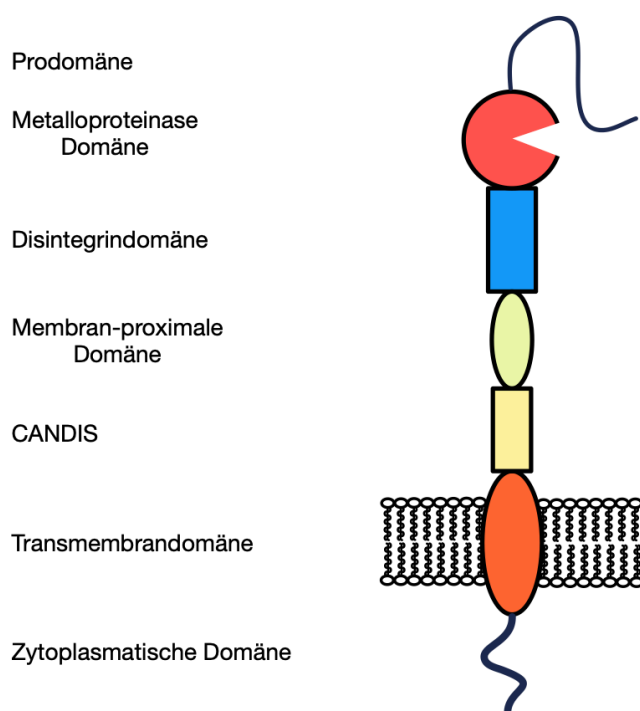


Abbildung 3: ADAM17 Struktur; erstellt nach Zunke, Rose-John, 2017 [83]; ADAM17 setzt sich aus folgenden Untereinheiten zusammen (von intrazellulär nach extrazellulär): C-terminale zytoplasmatische Domäne, Transmembrandomäne, CANDIS Region, membran-proximale Domäne, Disintegrindomäne, Metalloproteinase-Domäne. Zusätzlich dazu besitzt das Enzym im inaktiven Zustand eine N-terminale Prodomäne.

5.2.2 Substrate und Funktion

Nach aktuellem Stand sind über 80 Substrate bekannt, die von ADAM17 gespalten werden können. Diese von ADAM17 prozessierten Proteine können funktionell in vier Kategorien eingeteilt werden: 1) Regulation des Immunsystems, 2) Regulation von Wachstum und Differenzierung von Zellen, 3) Regulation der Zelladhäsion, 4) ohne Zuordnung [83]. Ein Überblick über die wichtigsten Substrate ist in Tabelle 1 dargestellt.

Bezüglich der Rolle von ADAM17 für die Regulation des Immunsystems lässt sich eine vorwiegend proinflammatorische Wirkung erkennen. Beispielsweise zeigt sich bei Mäusen, die eine Deletion des für ADAM17 kodierenden Genes in Leukozyten aufweisen, kein septischer Schock nach Injektion von Lipopolysacchariden und D-Galaktosamin [32]. Das jedoch prominenteste Beispiel für ein entzündungsförderndes Zytokin ist TNF- α . ADAM17 ist sowohl für die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins als auch für die Freisetzung löslicher Fragmente seines Rezeptors verantwortlich, welcher in seiner löslichen Form eine neutralisierende Funktion ausübt [32]. Aufgrund der herausragenden Bedeutung im komplexen System der Immunregulation ist es entscheidend, die Aktivität von ADAM17 genau zu regulieren, um eine ausreichende Abwehr von Pathogenen zu ermöglichen und gleichzeitig ein Überschießen der Immunantwort zu verhindern. Ist das Gleichgewicht innerhalb der Immunregulation gestört können unterschiedliche Erkrankungen die Folge sein, die pathophysiologisch mit einer Überaktivität von ADAM17 einhergehen. So zeigt sich beispielsweise bei Rheumatoider Arthritis oder auch bei Multipler Sklerose eine verstärkte Expression des Enzyms [11, 60].

Neben der Wirkung durch die Prozessierung von Zytokinen, Chemokinen oder weiterer löslicher Mediatoren ist ADAM17 auch über den Einfluss auf Adhäsionsmoleküle in der Lage, die Immunantwort zu regulieren. Um eine Einwanderung von Leukozyten in von entzündlichen Prozessen betroffene Gewebe zu ermöglichen, ist zunächst eine Adhäsion dieser Leukozyten am Endothel notwendig [44]. Diese Adhäsion wird über Adhäsionsmoleküle vermittelt, welche zum Teil Substrate von ADAM17 darstellen [83]. So geht beispielsweise ein vermehrtes *Ectodomain-Shedding* der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 [18] mit einer verminderten leukozytären Adhäsion einher [19]. Daran anschließend folgt die Transmigration der Leukozyten durch den Zellverband, welche durch die dort vorhandenen junctionalen Moleküle maßgeblich beeinflusst wird [44]. Auch diese junctionalen Moleküle gehören zu den Substraten, die von ADAM17 gespalten werden können [83].

Auf den spezifischen Einfluss von ADAM17 auf Adhäsion und Transmigration wird in späteren Kapiteln genauer eingegangen (5.4.3 und 5.4.4.1.2.).

Tabelle 1: Substrate von ADAM17; Tabelle erstellt nach Zunke und Rose-John, 2017 [83]; Zu sehen sind wichtige Substrate von ADAM17, sowie die Unterteilung dieser in Untergruppen

Immunsystem	Differenzierung und Entwicklung	Adhäsion	Weitere
IL1-R _{II}	TGF α	ALCAM	ACE-2
IL6-R	Hb-EGF	CD44	APP
IL15-R	AREG	CD62 (L-Selektin)	APP-like protein 2
CX3CL1	Epigen	Collagen XVII	Carbonic hydrolase 9
M-CSFR	EREG	Desmoglein 2	Prion protein
TNF-R _I	NRG1	EpCam	Ebola virus gp
TNF-R _{II}	FLT-3L	ICAM-1	EPCR
LDL-R	KL-1	JAM-A	GPIba
SORL1	KL-2	L1-CAM	GPV
SORT1	Jagged	NCAM	GPVI
SORCS1	DLL1	Nectin-4	Klotho
SORCS3	Notch1	SynCAM1	Muc-1
TNF- α	GH-R	VCAM-1	NPR
Lymphotoxin α	IGF2-R		Pre-adipocyte factor
RANKL (TRANCE)	HER4		Ptpz

5.2.3 Regulation

Aufgrund der komplexen und bedeutsamen Rolle, die ADAM17 für die Aufrechterhaltung physiologischer Gleichgewichte innehält, ist es für den Organismus entscheidend, die Aktivität des Enzyms genau zu regulieren [21]. Ein wichtiger Regulationsmechanismus besteht in der Veränderung der zellulären Lokalisation von ADAM17, welche den Zugang des Enzyms zu seinen Substraten bestimmt. Die Translation von ADAM17 findet in das Endoplasmatische Retikulum der Zelle hinein statt, wo große Mengen des Proteins in seiner inaktiven Form verbleiben. Um das Enzym in den aktiven Zustand zu versetzen, muss zunächst die N-terminale Prodomäne im Golgi-Netzwerk durch Pro-Proteinkonvertasen wie Furin abgespalten werden. Der Transport der inaktiven Proform von ADAM17 aus dem Endoplasmatischen Retikulum heraus in das Golgi-Netzwerk wird von iRhom1 und iRhom2 koordiniert [48]. Im Falle einer übermäßigen Verlagerung von aktivem ADAM17 auf die Zellmembran kann hingegen auch eine Clathrin-vermittelte Internalisierung des Enzyms stattfinden und so eine

übermäßige Proteolyse von Substraten verhindern [48]. Ein weiterer Regulationsmechanismus besteht in der Phosphorylierung von ADAM17, die eine Aktivierung des Enzyms bewirken kann. Dazu wurden einige Aminosäuren identifiziert, welche das Ziel dieser biochemischen Modifikation sein können und sich innerhalb der zytoplasmatischen Domäne befinden [23]. Eine aktive PKC beispielsweise führt über eine intrazelluläre Kaskade zu einer Aktivierung der MAP-Kinase ERK, die in der Lage ist ADAM17 zu phosphorylieren [48]. Eine weitere MAP-Kinase, welche durch Phosphorylierung in der Lage ist, die Aktivität von ADAM17 zu modulieren ist p38 MAPK [49, 30]. Neben diesen beiden Mechanismen besteht auch die Möglichkeit, die Proteinstruktur von ADAM17 auf der Zelloberfläche zu beeinflussen und so über Konformationsänderungen die Substratzugänglichkeit zu definieren. Diese Konformationsänderungen werden durch die Bindung von Phosphatidylserin an die membran-proximale Domäne von ADAM17 bewirkt. So ist die Zelle in der Lage, durch die Konzentration des sich auf der Zellmembran befindlichen Phosphatidylserins die Aktivität von ADAM17 zu regulieren [48].

ADAM17 weist eine geringe basale Aktivität auf, welche zum einen durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 [27] und TNF- α [8] gesteigert wird. Andere Regulationsfaktoren sind Wachstumsfaktoren (z.B. der „*Epidermal growth factor*“ (EGF)), Histamin, Thrombin [49, 30], und PMA [27]. „*Fibroblast growth factor*“, „*Transforming growth factor β* “ und „*Nerve growth factor*“ bewirken eine Aktivierung von ADAM17 durch Phosphorylierung [27]. Zu den Stimulatoren gehören ebenfalls bakterielle Faktoren, wie zum Beispiel Lipopolysaccharide, welche als häufig konservierte Bestandteile bakterieller Strukturen zu den mitogenen Stoffen des Immunsystems gezählt werden [13].

5.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Bei *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) handelt es sich um ein Gram-negatives, stäbchenförmiges, bewegliches und fakultativ aerob wachsendes Enterobakterium. *P. aeruginosa* kommt im Erdboden, als Nass- und Pfützenkeim sowie als nosokomialer Keim innerhalb medizinischer Einrichtungen vor [12].

5.3.1 Bedeutung als Erreger humaner Infektionen

Bei den häufig durch *P. aeruginosa* hervorgerufenen Infektionen handelt es sich insbesondere um Pneumonien, Harnwegsinfekte und Blutstrominfektionen [62]. Auch gastrointestinale Infekte oder Hautinfektionen können durch den Erreger verursacht werden [4]. *P. aeruginosa* wird auch als „Opportunistischer Keim“ bezeichnet, da schwerwiegende Infektionen eher selten bei Immungesunden auftreten [12] und stattdessen größtenteils spezifische

Patientengruppen betroffen sind. Besonders im klinischen Umfeld jedoch stellen Infektionen mit *P. aeruginosa* ein bedeutendes Gesundheitsrisiko dar. Nosokomiale Infektionen mit diesem Erreger gehen insbesondere auf Intensivstationen mit hoher Morbidität und Mortalität einher [35]. Grundsätzlich sind vorwiegend immunkompromittierte Patienten betroffen, wie solche mit Krebsleiden oder AIDS. Weiterhin gehören auch speziell Menschen mit Verbrennungen, nicht-heilenden Diabetischen Wunden, invasivem medizinischen Fremdmaterial oder Augenverletzungen zur Risikogruppe für eine Infektion. Aufgrund seines häufigen Vorkommens in Feuchthabitaten sind auch solche Patienten, die auf den Einsatz von Beatmungsgeräten angewiesen sind, vermehrt betroffen [12]. Übermäßig häufig leiden auch an Mukoviszidose erkrankte Patienten an einer Infektionen oder Besiedelung mit *P. aeruginosa*, wobei der Keim je nach untersuchter Population bei bis zu 40% der Erkrankten nachgewiesen werden konnte [35]. Die Behandlung durch Antibiotikatherapie gestaltet sich zunehmend schwieriger, da *P. aeruginosa* Resistenzen gegenüber einer Vielzahl an Antibiotika aufweist [39], wie beispielsweise viele Substanzen aus der Gruppe der Aminoglykoside, der β -Laktam-Antibiotika oder der Chinolone [31, 57].

5.3.2 Pathogenität

Pseudomonas aeruginosa weist eine Vielzahl an Pathogenitätsfaktoren auf, welche für die Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen [62]. Dazu zählen sowohl Bestandteile der bakteriellen Zelle selbst (Endotoxine) als auch durch sie sezernierte Substanzen (Exotoxine) [62].

Ein wichtiges Strukturelement der bakteriellen Zellwand stellen Lipopolysaccharide (LPS) dar. Diese vermitteln weiterhin eine Bindung des Bakteriums an den Wirt und verursachen zusätzlich eine Schädigung des betroffenen Gewebes [25, 62]. Außerdem trägt die Ausbildung eines Flagellums und von Pili dazu bei, dem Bakterium die Ausbildung eines Biofilms zu ermöglichen, welcher den Erreger bestmöglich vor dem Immunsystem und der Einwirkung von Antibiotika schützen kann [84]. Als wichtiger Bestandteil dieses Biofilmes dienen Alginate. Zu den sezernierten Exotoxinen zählen Zytotoxine wie ExoU, ExoT, ExoS oder ExoY, welche mithilfe spezieller Transportsysteme direkt in Zellen des Wirtsorganismus eingebracht werden können. Dort entfalten sie dem Bakterium nützliche Wirkungen wie etwa eine Hemmung der Phagozytoseaktivität oder der Zellmigration [82]. Ein prominentes Exotoxin von *P. aeruginosa* stellt außerdem ExoA dar, das über eine Hemmung der ADP-Ribosyltransferase Aktivität die Proteinbiosynthese negativ beeinflusst [60]. Zudem verfügt *P. aeruginosa* über Pyocyanin, ein Toxin mit Redoxaktivität, das mit einer Reihe von zellulären Funktionen interagiert und so eine Schädigung hervorrufen kann [1]. Zusätzlich sezerniert der Erreger verschiedene Proteasen wie LasA und LasB Elastasen, Alkaline protease A oder LipC Lipasen. Auch Phospholipasen, Esterasen und weitere lytische Enzyme fallen in diese Gruppen [10]. Durch diese Proteasen

wird der gewebeschädigende Effekt im Rahmen einer Infektion zusätzlich verstärkt. Aufgrund der zunehmenden Resistenz gegenüber einer Vielzahl an Antibiotika [39] sind neue Therapiestrategien erforderlich, welche gegebenenfalls auch eben diese Virulenzfaktoren oder aber ihre zellulären Targets adressieren.

5.3.3 Pneumonie

Bei der Pneumonie handelt es sich um eine Entzündung des interstitiellen Lungengewebes beziehungsweise der Alveolen [2], die typischerweise Symptome wie Fieber und produktiven Husten hervorrufen kann [65, 34]. Abhängig vom Ort der stattgefunden Infektion kann die Einteilung in eine ambulant erworbene Pneumonie und eine nosokomiale Pneumonie erfolgen [20]. Insbesondere im Rahmen von nosokomial erworbenen Pneumonien lässt sich besonders häufig *P. aeruginosa* als Erreger nachweisen [57]. Die Infektion der Lunge mit *P. aeruginosa* ruft eine Immunreaktion hervor, an der verschiedenste Zelltypen beteiligt sind, so auch Leukozyten und Epithelzellen [20]. Diverse zelluläre Bestandteile von *P. aeruginosa* können von lokalen Zellen mithilfe von „*Pattern Recognition Rezeptoren*“ erkannt werden, woraufhin es durch Aktivierung einer intrazellulären Signaltransduktionskaskade zur erhöhten Konzentration von NFκB kommt. Infolgedessen kommt es zur Initiierung der Immunantwort durch die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren. Wie in 5.2.3.1 erläutert geht eine erhöhte Konzentration von NFκB auch mit einer erhöhten Aktivität von ADAM17 einher, sodass die Protease auch auf den Verlauf der beschriebenen Entzündungsreaktion Einfluss nimmt. Im Rahmen der Immunreaktion kommt es nun zu einer Phagozytose der Pathogene durch aktivierte Makrophagen, Neutrophile Granulozyten und Dendritischen Zellen mit nachfolgender Antigenpräsentation gegenüber B-Zellen und T-Zellen [20].

5.4 Diapedese von Leukozyten

Im Verlauf der Immunantwort auf Infektionen stellt das Einwandern von Leukozyten in das betroffene Gewebe einen entscheidenden Schritt zur Abwehr der Pathogene dar [55]. Dazu migrieren Leukozyten durch Endothel hindurch, um so lokal verschiedenste Aufgaben zu erfüllen [17]. Der hierfür notwendige Prozess setzt sich aus einer Kaskade mehrerer Teilschritte zusammen. Im betroffenen Gewebe kommt es beim Kontakt zwischen den Leukozyten und dem Endothel beziehungsweise dem Epithel zunächst zur Ausbildung schwächerer Bindungen, dem sogenannten Rolling, im weiteren Verlauf durch stärkere Bindung zum Arrest beziehungsweise zur Adhäsion und infolgedessen zur parazellulären oder transzellulären Transmigration [45].

Die Wechselwirkung zwischen Immunzellen und Endothelzellen durch die Bindung von sogenannten Selektinen an den jeweils zugehörigen Liganden bewirkt eine Verlangsamung der Leukozyten und ermöglicht so ein Anhaften dieser an Epithel oder Endothel [3], dem sogenannten Rolling. Dabei spielen insbesondere die Selektine L-Selektin, P-Selektin und E-Selektin eine entscheidende Rolle [37], indem sie beispielsweise mit dem Liganden PSGL1 interagieren [52, 45]. Neben der Wirkung der Selektine können auch Integrine am Vorgang des Rollings beteiligt sein. Insbesondere bei Monozyten [34] und Lymphozyten [6] spielt die Interaktion von $\alpha_4\beta_1$ -Integrin (auch als VLA-4 bezeichnet) beziehungsweise $\alpha_4\beta_7$ -Integrin mit VCAM1 eine wichtige Rolle für diesen Schritt. Weiterhin ist auch die Bindung von LFA-1, auch bekannt als $\alpha_L\beta_2$ -Integrin, an ICAM-1 am Rolling beteiligt, insbesondere auch beim Übergang in den Leukozytenarrest [39, 47].

Um einen Arrest der Leukozyten auf dem Zellverband zu erzielen, muss der Leukozyt aktiviert werden, um so verstärkte Bindungen, beispielsweise an ICAM-1, aufbauen zu können [9]. Diese Aktivierung wird durch Chemokine hervorgerufen, welche durch das Endothel präsentiert werden und über eine G-Protein gekoppelte Signalkaskade zur Aktivierung von Integrinen und darüber zum Arrest führt [68]. Bei diesen Integrinen handelt es sich beispielsweise um die bereits genannten LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$ -Integrin) und VLA-4 ($\alpha_4\beta_1$ -Integrin), deren Avidität zur Bindung an ihren jeweiligen Liganden durch die Chemokinwirkung gesteigert wird. Wichtige Liganden sind dazu die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 beziehungsweise VCAM-1 [42].

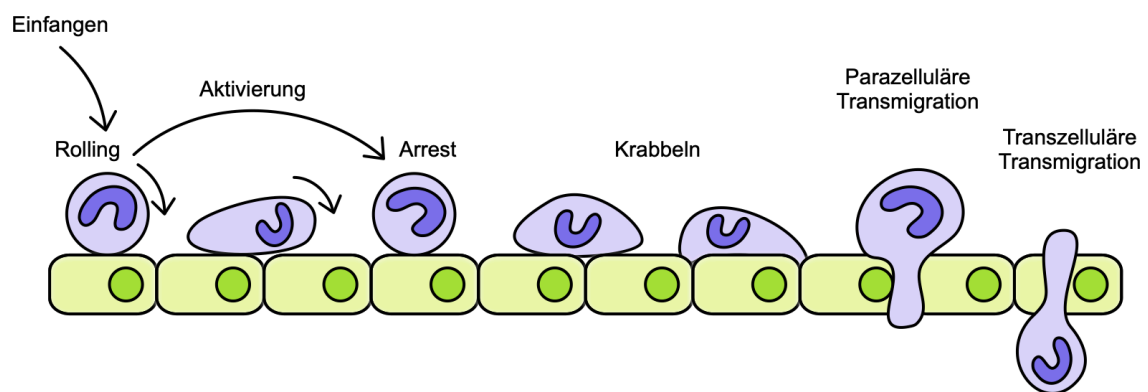


Abbildung 4: Leukozytenadhäsion und Transmigration; erstellt nach Ley et al., 2007 [45]; Dargestellt ist die Kaskade, die zur Extravasion von Leukozyten notwendig ist. Bei Kontakt des Leukozyten mit dem Zellverband des Endothels kommt es zur Interaktion, welche durch Ausbildung molekularer Bindungen ein Einfangen des Leukozyten hervorruft. Durch weitere Verstärkung dieser Bindungen kommt es zum Rolling des Leukozyten sowie zum Arrest. Nachdem eine ausreichend feste Bindung hergestellt ist, krabbelt der Leukozyt über den Zellverband, um eine geeignete Position zur parazellulären oder transzellulären Transmigration aufzufinden.

5.4.1 Der Einfluss von ADAM17 auf die Adhäsion

Bei einigen der am oben beschriebenen Prozess beteiligten Proteinen handelt es sich um Substrate von ADAM17. Sowohl ICAM-1, VCAM-1 als auch L-Selektin können durch das Enzym proteolytisch gespalten werden [83]. L-Selektin wird auf der Oberfläche vieler Leukozyten exprimiert und unterliegt bei Aktivierung von ADAM17 einem vermehrten *Ectodomain-Shedding* [19]. Die Auswirkung einer so hervorgerufenen Verminderung der Oberflächenkonzentration zeigen Tang et al. (1998). Sie weisen infolge einer Reduktion von L-Selektin auf der Leukozytenoberfläche um 50% auch eine um 50 – 70% reduzierte lymphozytäre Migration in Gewebe hinein nach [70, 22]. Umgekehrt lässt sich nachweisen, dass eine Hemmung des *Sheddings* von L-Selektin mit einer erhöhten Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel und infolgedessen mit einer vermehrten Leukozytenaktivierung einhergeht [29, 22]. Insgesamt zeigt sich somit, dass eine Hemmung der proteolytischen Spaltung von L-Selektin mit einer verstärkten Leukozytenadhäsion und infolgedessen mit einer vermehrten Transmigration durch den Zellverband einhergeht [19]. Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 befinden sich auf der Oberfläche von Endothelzellen. Dort unterliegen sie als Substrat von ADAM17 dem *Ectodomain-Shedding* und werden bei Stimulation der Endothelzelle vermehrt proteolytisch gespalten [18]. Es ist anzunehmen, dass durch die verminderte Konzentration dieser Proteine auf der Endothelzelloberfläche ein vergleichbarer Effekt wie durch die Reduktion von L-Selektin hervorgerufen wird [19]. Weiterhin ist das lösliche Fragment von ICAM-1 in der Lage, an Integrine auf der Leukozytenoberfläche zu binden und so eine Bindung dieser an zellgebundene Adhäsionsmoleküle zu unterbinden [18]. Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass *Ectodomain-Shedding* durch ADAM17 die Adhäsion von Leukozyten auf einem endothelialen Zellverband vermindert [14].

5.4.2 Transmigration

Infolge der Leukozytenadhäsion kommt es durch intrazelluläre Signaltransduktion der Endothelzelle zur verstärkten Expression eben dieser Integrine auf der Zelloberfläche und damit zur Induktion der Transmigration [45]. Zusätzlich zeigt sich die Ausbildung von Mikrovilli, welche ICAM-1 Bündel auf ihrer Oberfläche exprimieren und den Leukozyten umgeben [19, 33].

5.4.2.1 Parazelluläre Transmigration und die Rolle von JAM-A

Die Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen im Rahmen der Adhäsion über die Bindung von $\beta 2$ -Integrin an ICAM-1 bewirkt eine Phosphorylierung von VE-Cadherin, welches einen Bestandteil der Zell-Zell Verbindungen der Endothelzellen darstellt. Dies bewirkt eine

Auflockerung der Zellkontakte, was eine parazelluläre Passage des Leukozyten ermöglicht [19, 73]. Infolgedessen durchwandert der Leukozyt den Zellzwischenraum, indem er aufeinanderfolgend Bindungen mit JAM-A eingeht [19, 78]. Weitere Moleküle, die als Rezeptoren oder Bindestellen zur Transmigration beitragen sind JAM-B, JAM-C, PECAM-1, ICAM-2 oder auch CD99 [75].

Bei JAM-A handelt es sich um ein transmembranöses Glykoprotein [50], welches neben Claudin, Occludin, Cadherinen und weiteren Molekülen am Aufbau von *Tight junctions* und *Adherens junctions* beteiligt ist [75]. JAM-A setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen: einer extrazellulären Untereinheit, bestehend aus zwei immunglobulin-ähnlichen Domänen, einem Transmembransegment und einer zytoplasmatischen Untereinheit. Das Protein wird auf der Oberfläche von Thrombozyten, einer Reihe von Leukozyten sowie Endothelzellen und Epithelzellen exprimiert [52, 76]. Jeweils zwei JAM-A Moleküle einer Zelle dimerisieren im membrandistalen Bereich und bilden die Form eines invertierten U. Diese Homodimere binden an ein weiteres Paar dimerisierter JAM-A Moleküle der benachbarten Zelle, was als homophile Interaktion bezeichnet wird. Diese homophilen Bindungen beeinflussen die Permeabilität des endothelialen oder epithelialen Zellverbandes [52, 75], indem sie die *Tight junctions* der Zellkontakte stabilisieren und so zu einer verminderten parazellulären Transmigration führen [75, 50]. Neben seiner Funktion in der Aufrechterhaltung der Integrität des Zellverbandes dient JAM-A auch der Mediation der parazellulären Transmigration von Leukozyten. JAM-A bildet hierzu eine Art molekularen Reißverschluss, welcher durch Trennung homophiler Interaktionen zwischen JAM-A Molekülen benachbarter Endothelzellen beziehungsweise Epithelzellen nach Ausbildung neuer heterophiler oder homophiler Bindungen an Liganden des transmigrierenden Leukozyten öffnet und die Passage ermöglicht [43, 75]. Bei den genannten heterophilen Bindungen handelt es sich um Interaktionen zwischen endotheliale JAM-A und LFA-1, einem Integrin auf der Leukozytenoberfläche. Es konnte gezeigt werden, dass LFA-1 in der Lage ist, die homophile JAM-A Bindung zu destabilisieren und stattdessen selbst eine Bindung mit dem Molekül einzugehen [79], wodurch es zu einem Eindringen des Leukozyten in den Zellzwischenraum kommen kann [40]. Zusätzlich zur Interaktion durch LFA-1 tragen auch homophile JAM-A-JAM-A Bindungen zwischen Leukozyt und Epithelzelle beziehungsweise Endothelzelle zur Passage der Immunzelle bei [77].

Neben der bereits beschriebenen parazellulären Migration, besteht auch die Möglichkeit für Leukozyten, direkt durch die Endothelzelle beziehungsweise die Epithelzelle hindurchzumigrieren. Bei diesem Vorgang kommt es durch Signaltransduktion nach ICAM-1 Bindung zur Verschiebung von weiteren ICAM-1 Molekülen in Regionen der Zelle, welche viel Aktin und Caveolae enthalten. Diese Caveolae formieren gemeinsam mit ICAM-1 sogenannte

vesikulo-vakuolare Organellen, welche die Ausbildung eines intrazellulären Kanals ermöglichen, welchen der Leukozyt zur Passage nutzen kann [45].

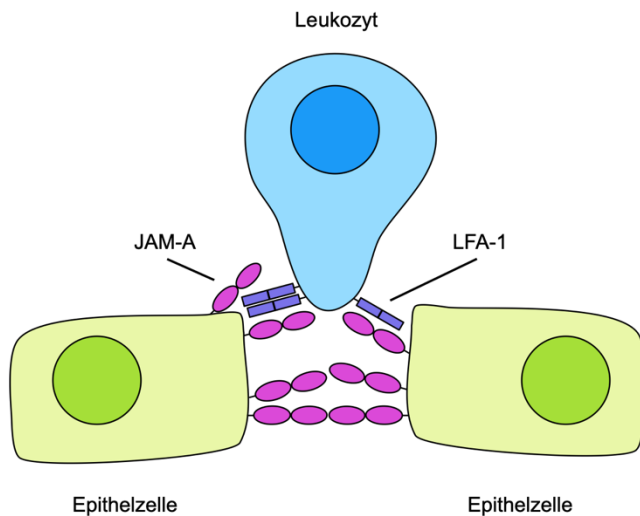


Abbildung 5: Rolle von JAM-A bei der Transmigration von Leukozyten; modifiziert nach Weber et al., 2007, [77]; Dimerisierte JAM-A Moleküle einer Zelle binden an ein weiteres Paar dimerisierter JAM-A Moleküle und sind so für die Integrität des Zellverbandes mitverantwortlich. Im Rahmen der leukozytären Transmigration dient JAM-A als Mediator, indem die JAM-A Bindung zwischen benachbarten Zellen gelöst wird und stattdessen eine Bindung mit Liganden des transmigrierenden Leukozyten (LFA-1 oder weiteres JAM-A) eingegangen wird. Dieser Vorgang ähnelt dem Öffnen eines Reißverschlusses, weshalb man hier auch vom sogenannten „Molekularen Reißverschluss“ spricht.

5.4.2.1.1 Der Einfluss von ADAM17 auf JAM-A und die leukozytäre Transmigration

JAM-A stellt ein wichtiges Substrat von ADAM17 dar (Tabelle 1), sodass durch den Einfluss der Protease die Zahl an JAM-A Molekülen auf der Oberfläche von Epithelzellen herabgesetzt werden kann. Zusätzlich dazu kommt es zur Freisetzung von löslichen Fragmenten von JAM-A. Es ist anzunehmen, dass diese löslichen Fragmente von JAM-A ebenso an LFA-1 auf der Leukozytenoberfläche binden können. In diesem Fall stünde dieses nicht mehr zur Verfügung, um durch Interaktion mit JAM-A auf der Epithelzelle den molekularen Reißverschluss zu öffnen, was mit einer verminderten Transmigration einherginge [40]. Aufgrund dieses Mechanismus würde eine erhöhte Aktivität von ADAM17 mit einer verminderten Transmigration einhergehen. Neben dem beschriebenen Effekt muss jedoch auch beachtet werden, dass eine erhöhte Aktivität des Enzyms auch mit einer verminderten Konzentration an JAM-A in den Zell-Zell-Kontakten des Zellverbandes verbunden ist. Dieser Umstand bedeutet eine verstärkte Permeabilität des Endothels beziehungsweise des Epithels, was der Transmigration von Leukozyten durchaus förderlich sein könnte. So konnte daher auch gezeigt werden, dass eine Inhibition von ADAM17 die leukozytäre Transmigration deutlich vermindert [13].

5.5 Fragestellung

Es ist bekannt, dass eine Stimulation mit *P. aeruginosa* in Epithelzellen zu einer Aktivierung von ADAM17 führt. Im Rahmen dieser Arbeit soll nun der Einfluss dieser Aktivierung auf die

Leukozytenadhäsion und Leukozytentransmigration während einer bakteriellen Infektion genauer untersucht werden.

Hierzu werden drei spezifische Fragestellungen untersucht.

1. Einfluss der ADAM17-Aktivierung auf die Spaltung von Junctionsmolekülen: Veränderungen der Barriereigenschaften, welche den Durchtritt von niedermolekularen Stoffen, Proteinen sowie Leukozyten begünstigen, können durch die Spaltung von Adhäsions- und Junctionsmolekülen begünstigt werden. Daher soll untersucht werden, ob die Steigerung der ADAM17-Aktivität in Epithelzellen zu einer gesteigerten Spaltung von JAM-A führt.

2. Einfluss der ADAM17-Aktivierung auf die Leukozyten-Adhäsion: Eine verstärkte Spaltung von Adhäsionsmolekülen wie z.B. L-Selektin, ICAM-1 oder VCAM-1 verursacht möglicherweise eine Veränderung der Leukozytenadhäsion. Es soll untersucht werden, ob die Aktivierung von ADAM17 nach bakterieller Adhäsion die Adhäsion von Leukozyten am Epithel verändert.

3. Veränderungen der Barriere: Veränderungen der epithelialen Barriere werden nicht nur durch Veränderungen des Zellzusammenhaltes, sondern auch durch das Überleben der Zellen gesteuert. Es soll nun untersucht werden, ob ADAM17 einen Einfluss auf das Überleben der epithelialen Zellschicht nach bakterieller Infektion besitzt.

Weiterhin soll der Fragestellung nachgegangen werden, ob die genannte Aktivitätssteigerung lediglich durch die Anwesenheit der bakteriellen Partikel selbst hervorgerufen wird oder ob für die entsprechende Signaltransduktion die Wirkung bakterieller Toxine notwendig ist.

Die durchgeführten *in vitro*-Versuche dienen dazu, die Immunantwort betreffende Vorgänge während einer durch *P. aeruginosa* hervorgerufenen Pneumonie besser zu verstehen und damit neue therapeutische Angriffspunkte zu identifizieren.

6 Material und Methoden

6.1 Verwendete Materialien

6.1.1 Geräte

In Tabelle 2 sind die in dieser Arbeit verwendeten Geräte aufgelistet, welche über eine normale Laborausstattung hinausgehen.

Tabelle 2: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Inkubator (für A549-Zellen und THP-1 Zellen)	Binder
Inkubator MMM (für <i>P. aeruginosa</i>)	Medcenter Einrichtungen GmbH
LAS-3000	Fujifilm
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH
Lionheart FX automated microscope	BioTek Instruments GmbH
Neubauer Zählkammer	Marienfeld Germany
Sterilbank LaminAir HB2448 (für <i>P. aeruginosa</i>)	Heraeus Instruments
Sterilbank SAFE 2020 (für A549-Zellen und THP-1 Zellen)	Thermo Scientific
Stromquelle E802 (für Gelelektrophorese)	Consort
Stromquelle PowerPacHC (für Western Blot Transfer)	Bio-Rad
Zentrifuge 4-16 C (Well-Platten)	Sigma-Aldrich
Zentrifuge Heraeus Megafuge16R Centrifuge	Thermo Scientific
Zentrifuge Z 233 MK	Hermle

6.1.2 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien wiesen den Reinheitsgrad pro analysis (p.a.) auf und wurden von den aufgeführten Firmen bezogen. In Tabelle 3 sind gesonderte Chemikalien aufgeführt, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Enzyme

Chemikalie / Enzym	Anmerkung und Hersteller
Ammoniumpersulfat	AppliChem
BCA-Reagenzien	Perkin Elmer
Calcein-AM	Calcein-Acetoxymethylester ist ein zell-permeabler Stoff, welcher in dieser Form nicht fluoreszierend ist. Mithilfe intrazellulärer Esterasen wird der Acetoxymethylester hydrolysiert, wodurch das Calcein zu seiner grün-fluoreszierenden Form konvertiert wird. Somit kann Calcein-AM dazu genutzt werden, lebendige Zellen mit grünem Fluoreszenzfarbstoff anzureichern. Der in DMSO gelöste Stoff wurde bei Abcam bestellt und in einer Konzentration von 4 mM geliefert.
ECL-Reagenzien Western Lightning Plus ECL: Enhanced Luminol Reagent Plus und Oxidizing Reagent Plus	Perkin Elmer
EZ-Run Proteinmarker	Fisher Bioreagents
PMA	PMA, auch Phorbol-12-myristate-13-acetate, führt über eine hochpotente Aktivierung der Proteinkinase C zu einer Aktivitätssteigerung von ADAM17. Der weiße Feststoff wurde bei Sigma-Aldrich/Merk bestellt und in der Konzentration 10 mM in DMSO gelöst.
Polyacrylamid	Fisher Bioreagents
TAPI-1	Bei TAPI-1, auch TNF- α -Protease-Inhibitor-1 oder N-(R)-[2-(Hydroxyaminocarbonyl)methyl]-4-methylpentanoyl-L-naphthylalanyl-L-alanine, 2-aminoethyl Amide, handelt es sich um Inhibitor von ADAM17 und weiterer Metalloproteinasen. Der Feststoff wurde von Sigma-Aldrich bezogen und in der Konzentration 10 mM in DMSO gelöst.
TEMED	Roth
β -Mercaptoethanol	AppliChem

6.1.3 Antikörper

In Tabelle 4 sind Antikörper aufgeführt, die zur Durchführung der Analyseverfahren benötigt wurden. Alle Antikörper wurden in TBS-Lösung verdünnt, um eine bessere Lagerung bei 4 °C zu ermöglichen und so eine Wiederverwendbarkeit zu gewährleisten.

Tabelle 4: Verwendete Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller	Anwendung
ADAM17-Antikörper	Kaninchen	Invitrogen	Verdünnung 1:1000 in 1 % BSA + 0,5 % NaN ₃ in TBS- Lösung gelöst; Endkonzentration 0,1 µg/ml
Anti-Kaninchen-Antikörper		GE Healthcare	
Anti-Maus-Antikörper		GE Healthcare	
GAPDH-Antikörper	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	Verdünnung 1:1000 in 1 % BSA + 0,5 % NaN ₃ in TBS- Lösung gelöst; Endkonzentration 0,4 µg/ml
JAM-A-Antikörper	Maus	BD Transduction Laboratories	Verdünnung 1:1000 in 1 % BSA + 0,5 % NaN ₃ in TBS- Lösung gelöst; Endkonzentration 250 ng/ml
β-Aktin-Antikörper	Kaninchen	Abcam	Verdünnung 1:1500 in 1 % BSA + 0,5 % NaN ₃ in TBS- Lösung gelöst; Endkonzentration 0,1 µg/ml

6.1.4 shRNA-Sequenzen

In Tabelle 5 sind die zum *Knockdown* verwendeten und in lentivirale Vektoren einklonierte shRNA-Sequenzen [61] aufgeführt.

Tabelle 5: Verwendete shRNA-Sequenzen

Betreffendes Zielgen	shRNA-Sequenz
ADAM17 (<i>Knockdown</i> 1)	AGGAAAGCCCTGTACAGTA
ADAM17 (<i>Knockdown</i> 2)	GAAACAGAGTGCTAATTTA
Kontrolle (<i>Scramble</i>)	CCGTCACATCAATTGCCGT

6.1.5 Zellkulturmedien

In Tabelle 6 sind verschiedene Zellkulturmedien und Chemikalien aufgeführt, welche verwendet wurden, um eine Kultivierung der verwendeten Zellreihen (A549, THP-1) sowie der Bakterien in Gefäßen zu ermöglichen.

Tabelle 6: Verwendete Zellkulturmedien

Zellkulturmedien und Chemikalien	Hersteller
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Thermo Fisher scientific
Fötale Kälberserum	Promocell
Gibco™ RPMI 1640 Medium	Thermo Fisher Scientific
Phosphat-buffered saline	Sigma-Aldrich
Todd-Hewitt-Bouillon Medium	Roth
Trypsin-EDTA-Lösung	Sigma-Aldrich

6.1.6 Zelllinien und Bakterienstämme

In Tabelle 7 sind die Zelllinien und der Bakterienstamm aufgeführt, die zur Durchführung der Versuche verwendet wurden.

Tabelle 7: Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme

Zelllinie / Bakterienstamm	Beschreibung	Zellkulturmedium
A549 Zellen	Humane Alveolarepithelzellen (Adenokarzinom)	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
<i>P. aeruginosa</i> (PA103)	Humanpathogenes Bakterium	Todd-Hewitt-Bouillon Medium
THP-1 Zellen	humane leukämische Zelllinie (akute monozytäre Leukämie; monozytenähnliche Eigenschaften)	Gibco™ RPMI-1640 Medium

6.1.7 Puffer und Lösungen

In Tabelle 8 sind Puffer und Lösungen aufgeführt, die zur Analyse der durchgeführten Versuche benötigt wurden.

Tabelle 8: Verwendete Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung mit Lagerungstemperatur	Zusammensetzung und Hersteller
Blottingpuffer Lagerung bei 4 °C	70 % H ₂ O 10 % 10x SDS (AppliChem) 20 % Methanol (UdS – Zentrales Chemielager)
Elektrophoresepuffer Lagerung bei 4 °C	90 % H ₂ O 10 % SDS (AppliChem)
Lämmli Lagerung bei – 20 °C	8 % SDS (AppliChem) 120 mM Tris (Roth) pH 6,8 0,01 % Bromphenolblau (Pharmacia Biotech) 20 % Glycerin (Roth) mit H ₂ O auf gewünschtes Volumen auffüllen
Lysepuffer Lagerung bei – 20 °C	5 mM Tris (Roth) 1 mM EGTA (Sigma Aldrich) 250 mM Saccharose (Roth) 0,1 % SDS (AppliChem) 1 % TritonX-100 (VWR Life Science) 1 x Complete (Roche) 1 mM Na ₃ VO ₄ (Roth) 1 mM PMSF (AppliChem) 10 mM 1,10-Phenanthrolin (VWR Chemicals)
Magermilch Lagerung bei 4 °C	5 % Magermilchpulver Skimmed Milk Powder (Sucofin) 95 % H ₂ O
Sammelgelpuffer Keine Lagerung	0,5 mM Tris (Roth) 0,4 % SDS (AppliChem) pH 6,81
Strippingpuffer Lagerung bei 4 °C	200 mM Glycin (Roth) 0,1 % SDS (AppliChem) pH 2,2
TBS Lagerung bei Raumtemperatur	50 mM Tris (Roth) 150 mM NaCl pH 7,5 mit HCl erreichen
Trenngelpuffer Keine Lagerung	1,5 mM Tris (Roth) 0,4 % SDS (AppliChem) pH 8,8

6.2 Zellkultur

6.2.1 Humane Zellen

6.2.1.1 A549-Zellen

Bei den verwendeten A549-Zellen handelt es sich um eine humane Zellreihe, die aus dem Lungenkarzinom eines 58-Jahre alten Amerikaners kaukasischer Abstammung entnommen

wurde. Durch die Mutation im Rahmen der Tumorgenese zeigen die A549-Zellen einen transformierten immortalen Phänotyp, der eine Nutzung als permanente Zellkultur erlaubt. Die als adhärenter Monolayer wachsenden Zellen weisen Ähnlichkeiten mit Pneumozyten Typ II auf, sodass sie als Modell für das Lungenepithel verwendet werden können. Die Zellen wurden in T75 Kulturflaschen kultiviert, wobei im Inkubator eine Temperatur von 37 °C und ein CO₂ Gehalt von 5 % vorherrschte. Beim benötigten Nährmedium handelte es sich um Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), dem 10 % fötales Kälberserum hinzugesetzt wurde (Vollmedium). Auf den Zusatz von Antibiotika wurde aufgrund der Infektionsversuche verzichtet.

Ein Medienwechsel erfolgte spätestens nach 2 Tagen, um eine ausreichende Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten. Sobald Konfluenz in Form eines geschlossenen Monolayers erreicht wurde, erfolgte eine Passagierung der Zellen. Dazu wurde zunächst das Medium mithilfe einer Pasteurpipette abgesaugt. Daraufhin wurden die Zellen mit 9 ml PBS gewaschen, welches wieder mit einer weiteren Pasteurpipette abgesaugt wurde. Im Anschluss daran wurden 3 ml einer Trypsin Lösung zu den A549-Zellen hinzugegeben und diese für einige Zeit im Inkubator belassen, sodass die optimale Temperatur für die enzymatische Reaktion erreicht werden konnte. Das Trypsin dient dazu, adhärenente Zellen durch die enzymatische Spaltung von Proteinen, die für die Zelladhäsion verantwortlich sind, zu lösen, wodurch eine effiziente und homogene Ablösung ermöglicht wird. So konnten die adhärenenten Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst werden, was zusätzlich durch leichtes Klopfen gegen die Flasche unterstützt wurde. Nach vollständigem Lösen der Zellen wurde die Reaktion durch Hinzugabe von 7 ml neuem DMEM + 10 % FCS-Medium abgestoppt. Um eine möglichst homogene Verteilung der Zellen in dieser Zellsuspension zu erreichen, wurde eine mehrmalige Resuspension der Lösung mithilfe einer serologischen Pipette durchgeführt. Zur Passagierung wurde nun 1 ml der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche überführt, in welcher sich bereits 13 ml an neuem Medium befanden.

6.2.1.2 THP-1 Zellen

Die THP-1 Zelllinie stellt eine humane leukämische Zelllinie dar, welche aus dem Blut eines einjährigen Jungen mit akuter monozytärer Leukämie gewonnen wurde [74]. Die Zellen weisen monozytenähnliche Eigenschaften auf und werden daher hier als Modell für Monozyten beziehungsweise Leukozyten allgemein genutzt. Die Zellen wurden als Suspensionskultur in T75 Kulturflaschen gezüchtet und im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Beim verwendeten Medium handelt es sich um Gibco™ RPMI 1640 Medium.

Nach drei beziehungsweise nach vier Tagen fand eine Passagierung statt. Dazu wurde die Zellsuspension zunächst in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, welches bei 300x g bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert wurde. Daraufhin wurde der Überstand mithilfe

einer Pasteurpipette abgesaugt und das Pellet mit 10 ml neuem Medium resuspendiert. Aus dieser Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und unter das Deckglas einer Neubauer Zählkammer pipettiert. Durch Auszählen unter dem Lichtmikroskop wurde so die Zelldichte der Suspension bestimmt. Im Folgenden konnte so errechnet werden, welches Volumen dieser Zellsuspension zu welchem Volumen an neuem Gibco™ RPMI 1640 Medium hinzugegeben werden muss, um 12 ml der Dichte 200.000 Zellen pro ml zu erhalten. Diese neue THP-1-Zellsuspension wurde nun in eine neue T75 Kulturflasche überführt.

6.2.2 *Pseudomonas aeruginosa*

Bei *Pseudomonas aeruginosa* handelt es sich um ein Gram-negatives Stäbchenbakterium, welches zur Gruppe der Nonfermenter zählt. Das Bakterium ist strikt aerob und aufgrund seiner lophotrichen Begeißelung sehr beweglich. Der hier verwendete Stamm trägt die Bezeichnung PA103. Die Kultivierung fand sowohl auf Blutagarplatten als auch in Todd-Hewitt-Bouillon Medium statt, wobei in beiden Fällen eine Inkubation bei 37 °C unter Ausschluss von CO₂ stattfand. Grundsätzlich wurden die Pseudomonaden allerdings nicht in Kultur gehalten, sondern für jeden Versuch aus einem bei – 80 °C verwahrten Bestand entnommen und anhand einer *Standard Operating Procedure* (SOP) vorbereitet.

6.2.2.1 Vorbereitung für Versuche mit bakterieller Stimulation

Um Vergleichbarkeit bei den Versuchen mit bakterieller Stimulation zu erreichen ist es notwendig, zuvor eine standardisierte Bakteriensuspension herzustellen, welche eine definierte Dichte an Pseudomonaden (in einem hohen Stoffwechselzustand einhergehend mit erhöhter Toxinproduktion) enthält. Dazu wurde bereits zwei Tage vor dem durchzuführenden Versuch damit begonnen, aus dem gefrorenen PA103 Bestand heraus zwei Impfösen auf eine Blutagarplatte auszustreichen. Diese Platte wurde bei 37 °C und unter Ausschluss von CO₂ 24 Stunden lang inkubiert. Am Folgetag wurde daraufhin eine Impföse der auf dem Agar gewachsenen Bakterien in 10 ml vorgewärmtes Todd-Hewitt-Bouillon Medium überführt. Die so entstandene Bakteriensuspension wurde wiederrum über Nacht bei 37 °C und 0 % CO₂ im Inkubator belassen, wobei hier zusätzlich eine kreisende Bewegung der Kulturflasche bei 150 rpm stattfand. Am Morgen des Versuchstages wurde mittels photometrischer Messung die optische Dichte (OD) dieser Suspension ermittelt. Daraus wurde das Volumen ermittelt, welches aus der bestehenden Kultur heraus in weitere 10 ml vorgewärmtes Todd-Hewitt-Bouillon Medium pipettiert werden musste, um dort eine optische Dichte des Wertes 0,05 zu erhalten. Damit sichergestellt war, dass sich die Pseudomonaden für jeden Versuch in einem vergleichbaren Stoffwechselzustand befanden, wurde die entstandene Bakteriensuspension für exakt drei weitere Stunden bei 37 °C, 0 % CO₂ und 150 rpm inkubiert. Aufgrund der für

jede Durchführung identischen Bakteriendichte durchliefen die Bakterien in der Kultur die immer gleiche Wachstumskurve, welche mit dem Stoffwechselzustand und somit auch mit der Produktion bakterieller Toxine korreliert. Nach Ablauf der beschriebenen dreistündigen Inkubation wurden 1,8 ml der Suspension in ein Eppendorf Tube gefüllt und bei 8000 rpm und Raumtemperatur 5 Minuten lang zentrifugiert. Im Folgenden wurde der Überstand abpipettiert und das verbliebene Pellet mit 1 ml PBS resuspendiert. Daraufhin wurde die optische Dichte bestimmt und errechnet, welches Volumen dieser Suspension aus *P. aeruginosa* und PBS mit welchem Volumen an reinem PBS zusammengeführt werden muss, um 1 ml einer Suspension der optischen Dichte 1,0 (Toleranzintervall 0,8 – 1,2) herzustellen. Nach der Durchführung wurde dieser Wert durch eine weitere photometrische Bestimmung überprüft. Die so entstandene Bakteriensuspension der Dichte 1,0 enthielt nun 100.000 *Colony forming units* (CFU) pro 10 µl Lösung. Der Wert CFU beschreibt die Anzahl an Individuen, die durch Vermehrung auf einem Agarmedium in der Lage sind, Kolonien zu bilden. In diesem Fall steht die Zahl daher für die Anzahl an lebensfähigen Bakterien, die in der vorliegenden Suspension enthalten sind.

6.3 Versuche

6.3.1 Vorbereitung der Zellen

6.3.1.1 Herstellung von ADAM17 *Knockdown* Zellen mittels lentiviraler Transduktion

Um A549-Zellen zu generieren, die kein oder nur noch geringe Mengen des ADAM17 Enzyms enthalten (*Knockdown*), sollte die Proteinbiosynthese des Enzyms unterbunden werden. Dies wurde mithilfe der RNA-Interferenz durch Small hairpin RNA (shRNA) erreicht. Die notwendige shRNA wurde dazu mithilfe des lentiviralen Expressionsvektors pLVTHM durch virale Infektion in die Zielzellen eingebracht. Zur Herstellung dieser lentiviralen Partikel wurden HEK293T-Zellen verwendet, die mit dem gewünschten pLVTHM-Plasmid (12,5 µg) und zusätzlich mit dem psPAX2-Plasmid (8,13 µg) sowie dem pMD2.G-Plasmid (4,37 µg) transfiziert wurden. Als Transfektionsreagenz wurde jetPEI 2 µL/µg DAN verwendet. 72 Stunden nach der Transfektion wurden die lentiviralen Partikel durch Zentrifugation bei 26000x g für zweieinhalb Stunden aufkonzentriert. Die so erhaltenen Partikel wurden nun in PBS suspendiert und konnten für die Transduktion verwendet werden. Bei den Zielsequenzen, die verwendet wurden, um die Expression von ADAM17 zu verhindern, handelt es sich um AGGAAAGCCCTGTACAGTA (ADAM17-KD1) beziehungsweise GAAACAGAGTGCTAATTTA (ADAM17-KD2). Neben den beiden eigentlichen Zielstrukturen wurde eine weitere Sequenz (CCGTCACATCAATTGCCGT) verwendet, die als *Scramble* Kontrolle diente (unspezifische shRNA). Diese Kontrolle ist notwendig, um einen generellen Einfluss der viralen Partikel sowie der shRNA-Applikation detektieren zu können. Für die Transduktion wurden

A549-Zellen in 6-Well Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % inkubiert. Die Zugabe der lentiviralen Partikel erfolgte in Anwesenheit von 4 µg/ml Polybren, um eine höhere Transduktionseffizienz zu erreichen. Dadurch, dass das pLVTHM-Plasmid zusätzlich zu den shRNA-Zielsequenzen auch für GFP (Grün fluoreszierendes Protein) kodiert, konnte der Erfolg und die Effizienz der Transduktion mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie überprüft werden. Zusätzlich dazu wurde ein Western Blot durchgeführt, um die im Lysat der transfizierten Zellen enthaltene Menge an ADAM17 und damit den Erfolg des *Knockdowns* zu bestimmen.

6.3.1.2 Aussaat und Vorinkubation der Zellen

6-Well Platten oder Zellkulturschalen wurden am Vortag mit 800.000 Zellen, 24-Well Platten mit 250.000 Zellen pro Well in Vollmedium ausgesät. Nach sechsständiger Inkubation zur Adhärenz der Zellen, erfolgte ein Wechsel auf DMEM + 0,5 % FCS. Hierdurch wurde ein übermäßiges Wachstum über Nacht vermieden und eine Normalisierung des zellulären Stoffwechsels erreicht. Nach der weiteren Inkubation über Nacht erfolgte am Versuchstag eine 2-stündige Inkubation in serumfreiem DMEM, um einen Einfluss der Stimulationsversuche durch Wachstumsfaktoren und weitere Serumfaktoren zu unterbinden. Im Falle der pharmakologischen Inhibition von ADAM17 erfolgt eine 30-minütige Vorinkubation mit TAPI-1 bzw. 0,1 % DMSO (Vehicle-Kontrolle). Des Weiteren erfolgte ein Vergleich von Wildtypzellen und *Knockdown*-Zellen. Dies ist entsprechend in den Abbildungsbeschriftungen vermerkt.

6.3.2 Versuchsdurchführungen

6.3.2.1 Stimulation von A549-Zellen mit *P. aeruginosa* zur Untersuchung des JAM-A Sheddings

Die Zellen wurden wie unter 6.3.1.2 beschrieben in 6-Wells ausgesät und vorbereitet. Zur bakteriellen Stimulation wurden jeweils 50 µl der oben genannten Bakteriensuspension der optischen Dichte 1,0 in die entsprechenden Wells pipettiert, was somit einer Hinzugabe von 5.000.000 CFU entspricht. Bei einer erwarteten Zahl von 1.000.000 A549-Zellen entspricht dieses Verhältnis einer *Multiplicity of infection* (MOI) von 5. Diese MOI gibt im Rahmen einer *in vitro* Infektion das Verhältnis von infektiösen Partikeln zu infizierten Zellen an. Daraufhin wurden die Zellkulturschalen bei 37 °C inkubiert. Nach der entsprechenden Stimulationszeit wurden die infizierten Zellen und die entsprechend kontrollbehandelten Zellen auf Eis lysiert. Dies erfolgte durch Zugabe von 200 µl Lysepuffer, welcher zuvor mit 1x Complete versetzt wurde, sowie einem mechanischen Aufschluss. Die Lysate wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 14.000x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und kurzfristig bei – 20 °C gelagert. Die Langzeitlagerung erfolgte bei – 80 °C.

6.3.2.2 Stimulation von A549-Zellen mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* zur Beurteilung des JAM-A Sheddings

Der Versuchsaufbau sowie die Durchführung entsprechen grundsätzlich dem unter 6.3.2.1 genannten Versuch. Zur Bestimmung des Einflusses löslicher Faktoren auf die untersuchten Prozesse wurde der Versuch mit hitzeinaktivierten Bakterienpartikeln durchgeführt. Bei der Hitzeinaktivierung bleiben Zellwand und Form der Partikel erhalten, während die hitzeinstabilen Toxine zerstört werden. Die Bakteriensuspension der OD 1,0 wurde für 40 Minuten bei 70 °C im Heizblock inaktiviert, bevor aus diesem Bestand heraus 50 µl Suspension zu den A549-Zellen gegeben wurde. Weiterhin wurde der Erfolg der Hitzeinaktivierung durch Ausplattieren der inaktivierten Bakteriensuspension im Vergleich zur nicht-inaktivierten Bakteriensuspension auf Agarplatten kontrolliert, auf welchen am Folgetag das Koloniewachstum beurteilt wurde.

6.3.2.3 Adhäsionsassay zur Beurteilung der Adhäsion von THP-1 Zellen an A549-Zellen nach Stimulation mit *P. aeruginosa*

Die Adhäsionsversuche wurden im 24-Well-Maßstab unter zusätzlichem Einschluss von technischen Replikaten aufgrund der erhöhten Variabilität durchgeführt (Zellaussaat siehe 6.3.2.1). Zur bakteriellen Stimulation wurden 10 µl der Bakteriensuspension der OD1 hinzugegeben, um entsprechend der vorausgegangenen Stimulationsversuche mit einer MOI von 5 zu infizieren. Als Modellsystem für adhärierende Monozyten wurden THP-1-Zellen verwendet. Eine THP-1-Zellsuspension mit einer Dichte von 1.000.000 Zellen pro ml (in PBS) wurde mit 1 µM Calcein-AM versetzt und für 30 Minuten unter Ausschluss von Licht inkubiert. Für eine homogene Markierung ist es wichtig, das Reaktionsgefäß während der Inkubationszeit mehrfach vorsichtig zu invertieren. Zur Bestimmung der Anzahl adhärierender Zellen wurde eine Kalibrierungsreihe aus einer seriellen Verdünnung erstellt (Start 1.000.000 Zellen/ml). Dies erlaubt den Vergleich zwischen verschiedenen Versuchen. Das Medium wurde von den A549-Zellen abgesaugt, die Zellen zweimal vorsichtig mit 200 µl PBS gewaschen und jeweils 500 µl der fluoreszenzmarkierten THP-1 Suspension hinzugefügt. Infolgedessen wurde die gesamte 24-Well Platte drei Minuten lang bei 300x g zentrifugiert, wobei die Bremsfunktion der Zentrifuge deaktiviert war, sodass keine entgegengerichteten Kräfte die Zellbindung beeinträchtigen sowie zu einem Ansammeln der Zellen in der Mitte führen konnten. Daraufgehend wurde die THP-1 Zellsuspension wieder abgesaugt und die Zellen dreimal mit 200 µl PBS gewaschen, sodass alle nicht adhärenen THP-1 Zellen entfernt wurden. Letztlich wurde die Fluoreszenz des grünen Fluoreszenzfarbstoffes (Calcein) mithilfe des *Lionheart FX automated microscopes* nach Anregung bei 469 nm und einer Absorption bei 525 nm gemessen und zusätzlich durch eine Bildaufnahme dokumentiert.

6.3.2.4 Survival Assay zum Vergleich der Überlebensfähigkeit von A549-Zellen mit unterschiedlicher ADAM17 Aktivität bei Infektion mit *P. aeruginosa*

Die A549-Zellen wurden in 24-Well Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Zwei Stunden vor der bakteriellen Stimulation wurde das Medium der Zellen durch DMEM ersetzt, welchem kein FCS zugesetzt war. Eine Stunde vor der Infektion wurde das Medium ein weiteres Mal ausgetauscht und durch DMEM ersetzt, welches zusätzlich Calcein-AM in einer Konzentration von 4 µm enthielt, um die Epithelzellen so mit fluoreszierendem Farbstoff zu markieren. Daran anschließend erfolgte die Stimulation dieser A549-Zellen mit *P. aeruginosa* mit einer MOI von 5. Nach der entsprechenden Versuchszeit der A549-Zellen gegenüber den Bakterien fand eine Fotodokumentation und eine Analyse des Calcein-Signals der einzelnen Wells im *Lionheart FX automated microscope* statt. Vor den einzelnen Messungen wurden die entsprechenden Wells mit 200 µl PBS gewaschen und zwischen den einzelnen Handlungen weiter inkubiert.

6.4 Analyseverfahren

6.4.1 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay

Der Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay) stellt ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration der vorliegenden Probe dar. Diese Informationen sind entscheidend, um in dem in Folge durchgeführten Western Blot Proben mit gleicher Proteinmenge aufzutragen und so einen quantitativen Vergleich zwischen den Proben zu ermöglichen. Der Assay beruht grundsätzlich auf der als Biuret-Reaktion bekannten Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} in alkalischem Medium bei Anwesenheit von Proteinen bestehend aus drei oder mehr Aminosäuren. Diese können als Chelatoren einen Komplex mit den Kupferionen bilden. Dadurch korreliert die Menge an reduzierten Kupferionen mit der Menge an enthaltenem Protein. In einer weiteren Reaktion interagiert Cu^{+} mit Bicinchoninsäure (BCA), was zu einer Lilafärbung führt, welche mit einer verstärkten Absorption von Licht der Wellenlänge 562 nm einhergeht. Durch photometrische Messungen im Plattenreader lassen sich so Rückschlüsse über den Proteingehalt der Probe ziehen.

Für die Durchführung wurde eine Standardreihe mit bekannten Proteinproben hergestellt (0,00; 0,01; 0,02; 0,03; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10 µg/µl), um die Korrelation zwischen Absorption im Photometer und Proteingehalt der Lösung herzustellen. Die Proben wurden infolgedessen zweifach (1:100, 1:200) verdünnt, um mehr Messungen zu ermöglichen und so die Messgenauigkeit deutlich zu erhöhen. Nach Mischen von Stammlösung A und B im Verhältnis 50:1 wurden 240 µl dieser Reagenzlösung zu jeweils 30 µl der Verdünnungen der Proben beziehungsweise zu den Standardlösungen hinzugegeben. Die Reaktion erfolgte bei 60 °C für 30 Minuten, gefolgt von der Messung der Lichtabsorption bei 562 nm im Plattenreader. Der

Proteingehalt der einzelnen Proben wurde anhand der Kalibrierungskurve vergleichend ermittelt.

6.4.2 Western Blot

6.4.2.1 Proteindenaturierung mit Lämmli Puffer

Vor der Durchführung der denaturierenden Gelelektrophorese ist es notwendig, die aufzutrennenden Proben zunächst mit Lämmli-Puffer zu versetzen. Dies ermöglicht die vollständige Denaturierung von Proteinen, das heißt die Auflösung der Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur und somit die Auftrennung anhand des Molekulargewichts. Die Ladungsunabhängigkeit wird durch das enthaltene Natriumdodecylsulfat erzielt, welches eine negative Ladung äquivalent zur molekularen Masse einbringt. β -Mercaptoethanol reduziert die Disulfidbindungen und begünstigt dadurch das Auflösen der Proteinstruktur. Außerdem wird durch das Hinzufügen von Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris) ein stabiler pH-Wert eingestellt und eine Reihe von Proteasen inhibiert, wodurch die zu analysierenden Proteine vor einer Degradation geschützt werden. Das im Lämmli Puffer enthaltene Glycerol sowie eine Färbelösung vereinfacht das Pipettieren der Flüssigkeit in die Kammern des Gels, da so eine bessere Sichtbarkeit und eine im Vergleich zur SDS-Lösung erhöhte Dichte erzielt werden. Nach Zugabe des Lämmli Puffers zur Probelösung mit einer 1x Lämmli-Endkonzentration wurden die Proben für 30 Minuten bei 60 °C im Heizblock denaturiert.

6.4.2.2 Herstellung eines Polyacrylamid-Gels

Das zur Elektrophorese verwendete Gel setzt sich aus zwei Komponenten zusammen. Im Sammelgel, welches einen Polyacrylamidanteil von 4 % aufweist, werden die Proteine in einer Ebene fokussiert, um eine gleiche Lokalisation der Proteine zum Start des Trennlaufs zu gewährleisten. Dieser findet im Trenngel statt, das mit einem Polyacrylamidanteil von 10 % dem Lauf der Proteine einen wesentlich höheren Widerstand entgegenhält und so eine bessere Auftrennung ermöglicht.

Die Lösungen für die Gele wurden vor jeder Herstellung nach der in Tabelle 9 angegebenen Zusammensetzung angesetzt. Zwischen die Glasplatten in der Halterungsvorrichtung wurde zunächst das Trenngel gegossen und dieses mit Isopropanol überschichtet, um einen geraden Abschluss ohne Luftblasen zu erreichen. Nach Auspolymerisierung des Gels wurde das Isopropanol entfernt und das Sammelgel in den verbleibenden Raum zwischen den Glasplatten darüber gegossen. Zuletzt wurde ein Kamm in das Sammelgel eingeführt, welcher für die Ausbildung der Taschen verantwortlich war. Nach Auspolymerisierung konnte das Gel nun für die Elektrophorese verwendet werden.

Tabelle 9: Sammelgel und Trenngel

Sammelgel	Trenngel
Sammelgelpuffer: 25 %	Trenngelpuffer: 25 %
Polyacrylamid: 10 %	Polyacrylamid: 25 %
H ₂ O: 64,2 %	H ₂ O: 49,1 %
APS: 0,75 %	APS: 0,75 %
TEMED: 0,05 %	TEMED: 0,15 %

6.4.2.3 Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung der Proteine nach ihrer Masse wurde eine Natriumdodecylsulfat-Gelelektrophorese durchgeführt. Die durch das Natriumdodecylsulfat mit einer gleichartig negativen Ladung versehenen Proteine wandern hier durch das Anlegen einer elektrischen Spannung durch ein Polyacrylamidgel. In Abhängigkeit der Proteinmasse bewegen sich die Proteine dabei unterschiedlich schnell durch das Gel, wodurch nach einiger Zeit die gewünschte Auftrennung zustande kommt, bei der sich Proteine mit niedrigerer molekularer Masse bereits weiter unten im Gel befinden als länger-kettige Proteine.

Nach Einstellen des Gels in die Elektrophoresekammer wurde diese mit Elektrophoresepuffer (Tabelle 8) gefüllt. Infolgedessen wurden 5 µl Proteinmarker (erste Tasche) und das benötigte Volumen der Proben (maximal 45 µl) in die Taschen pipettiert. Daran anschließend wurde für 20 Minuten eine Spannung von 80 V über die Apparatur angelegt, um den Sammellauf durchzuführen. Für den darauffolgenden Trennlauf wurde die Spannung auf 160 V erhöht und so lange aufrechterhalten, bis die Bande mit dem im Lämmli-puffer enthaltenen Farbstoff (Lauffront) das untere Ende des Gels erreicht hatte.

6.4.2.4 Western Blot Transfer

Um die zuvor aufgetrennten Proteine nun auf eine Membran zu übertragen, wurde ein Western Blot Transfer durchgeführt. Auch hier wird ein elektrischer Strom genutzt, um einen Transfer der Proteine zu bewirken. Allerdings wirkt die hier anliegende Spannung orthogonal zu Membran und Gel, sodass die Proteine aus dem Gel heraus in Richtung der Membran migrieren.

Dazu wurde ein sogenanntes „Blottingsandwich“ zusammengesetzt, welches die Membran und das Elektrophorese-gel enthielt. Diese waren nach außen hin beidseits durch jeweils zwei Whatman Filterpapiere und jeweils ein Schaumpolster umgeben. Es muss dabei darauf geachtet werden, dass keine Luftblasen zwischen Gel und Membran eingeschlossen werden. Dieses Sandwich wurde mit leichtem Druck in einer Vorrichtung verschlossen und in einer

Kammer platziert, welche mit Blottingpuffer und einem Block aus Eis der Temperatur – 80 °C gefüllt war. Infolgedessen wurde durch Anschluss einer Stromquelle ein Stromfluss der Stärke 350 mA erreicht und ein Transfer der Proteine innerhalb von 90 Minuten auf die Membran erzielt. Die gesamte Vorrichtung war dabei in einem Kühlraum bei einer Temperatur von 4 °C untergebracht.

6.4.2.5 Block unspezifischer Antikörper-Bindestellen mit Milch-Lösung

Um eine Bindung von Antikörpern an Stellen zu verhindern, die nicht den vorhergesehenen Bindestellen auf dem Zielprotein entsprechen (unspezifische Bindestellen), wurde die Membran für eine Stunde in einer Magermilchpulver-Lösung (Konzentration 5 %) inkubiert. Während dieser Zeit befand sich die Lösung mit der Membran auf einer bewegten Oberfläche, um ein gleichmäßiges Verteilen zu gewährleisten. Im Anschluss wurde die Membran mit TBST gewaschen, um Reste der Milchlösung zu entfernen.

6.4.2.6 Inkubation der Membran mit den Primär- und Sekundärantikörpern

Der Primärantikörper, welcher direkt an das entsprechende Epitop auf dem Protein bindet, wurde über Nacht bei 4 °C in der Antikörperlösung auf der Membran inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Antikörperlösung entfernt und die Membran dreimal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen, um nicht fest gebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der mit einer Peroxidase konjugiert ist, welche nach Zugabe der ECL-Lösung zur Freisetzung von Chemilumineszenz führt. Eine Lösung aus Magermilch und dem Sekundärantikörper (Lösungsverhältnis siehe Tabelle 10) wurde hergestellt und auf die Membran aufgetragen. Nach einer Stunde wurde die Membran erneut dreimal für je 10 Minuten mit TBST gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Tabelle 10: Lösungsverhältnisse der Sekundärantikörper

Antikörper	Lösungsverhältnis in Magermilch
Anti-Hase Antikörper	1:40000
Anti-Maus Antikörper	1:20000

6.4.2.7 Entwickeln der Membran mittels *Enhanced Chemiluminescence* (ECL) Verfahren

Mit Primär- und Sekundärantikörpern markierte Proteine wurden durch *Enhanced Chemiluminescence* nachgewiesen. Hierbei wird das in den ECL-Reagenzien enthaltene Luminol durch eine Peroxidase, konjugiert mit dem Sekundärantikörper, zu einem höheren Energieniveau angeregt. Die nachfolgende Reaktion, die nur an Stellen mit gebundenem

Sekundärantikörper stattfindet, führt zur Emission von Licht. Die Intensität dieses Lichts wird im *LAS-3000 Imaging System* gemessen, um die Anwesenheit des gesuchten Proteins zu bestätigen und seine Menge zu quantifizieren.

Die Membran wurde in Vakuumierfolie eingeschlossen und an drei Seiten verschlossen. ECL-Reagenzien (*Enhanced Luminol Reagent Plus* und *Oxidizing Reagent Plus*) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und 1 ml der Lösung pro Membran wurde in die Folie gegeben. Nach gleichmäßiger Verteilung über der Membran wurde die Lösung vorsichtig ausgestrichen, um Proteinschädigung durch zu starke Einwirkung zu vermeiden. Die Membran wurde im *LAS-3000 Imaging System* platziert, um das Vorhandensein der Proteine nach 15 Sekunden, einer Minute, fünf Minuten und einer Stunde aufzuzeichnen. Vor der Chemilumineszenzaufnahme wurde eine Weißlichtaufnahme erstellt, um den farbigen Proteinmarker darzustellen, der in der Chemilumineszenzaufnahme nicht sichtbar wäre.

6.4.2.8 „Stripping“ der Membran zur Inkubation mit weiteren Antikörpern

Um den Nachweis eines weiteren Proteins auf derselben Membran bei gleicher Spezieskombination der Antikörper oder gleicher Größe der nachzuweisenden Proteine zu ermöglichen, mussten zunächst die zuvor gebundenen Antikörper entfernt werden. Dazu wurde die Membran 13 Minuten lang in „Stripping Puffer“ belassen, wobei sie sich auf einer bewegten Oberfläche befand. Um alle gelösten Antikörper von der Membran zu entfernen, wurde diese dreimal hintereinander für jeweils zehn Minuten mit TBS gewaschen.

6.5 Auswertung

6.5.1 Auswertung des Western Blots mit *AIDA Image Analyzer v.4.14*

Zunächst wurden die Aufnahmen der Chemilumineszenz mit der Weißlichtaufnahme überlagert, um so in einer Abbildung sowohl die Proteinbanden als auch den Proteinmarker sowie Beschriftungen erkennen zu können. Die Densitometrie wurde anschließend mithilfe des *AIDA Image Analyzers* durchgeführt, wobei die Intensität der einzelnen Banden durch das Auflegen des immer gleichen Messbereichs über den entsprechenden Bildbereich bestimmt wurde. Dieser Prozess ermöglichte die quantitative Auswertung der Proteinbanden, indem von den ermittelten Intensitäten die allgemeine Hintergrundintensität des Bildes subtrahiert wurde, um ausschließlich die Intensität der jeweiligen Proteinbanden zu erfassen. Die so entstandenen Daten wurden in einer Excel Tabelle gespeichert.

6.5.2 Normalisierung der Proteinmenge des Western Blots

Die Auswertung der Intensität der Proteinbanden wie in 6.5.1 beschrieben ist alleine unzureichend, um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Banden untereinander zu ermöglichen. Eine fehlerhafte Auftragung der vermeintlich exakt gleichen absoluten Proteinmenge in die Kammern der Elektrophoresevorrichtung könnte zu einer Verzerrung des Ergebnisses führen. Daher war es notwendig, die absoluten Proteinmengen miteinander in Bezug setzen zu können. Dazu wurde eine Ladekontrolle durchgeführt, in welcher Proteine auf der Membran dargestellt wurden, deren Anteil an der Gesamtproteinmenge unabhängig von der Versuchsdurchführung konstant ist. Hierzu wurden die Membranen, welche zuvor auf JAM-A Expression untersucht wurden, „gestrippt“ und in einem weiteren Schritt mit Antikörpern gegen die Proteine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder β -Aktin inkubiert und wie oben beschrieben entwickelt. Um nun die zuvor bestimmte Menge an JAM-A in Relation zur Gesamtproteinmenge im Lysat setzen zu können, konnte der Quotient aus der Intensität der Bande von JAM-A und der Intensität der Bande des zur Ladekontrolle verwendeten Proteins gebildet werden.

Zur besseren Vergleichbarkeit der wiederholten Experimente musste nun noch zusätzlich eine Normalisierung durchgeführt werden, was außerdem eine bessere Quantifizierbarkeit der relativen Veränderung der JAM-A Proteinexpression ermöglicht. Dazu wurden die zuvor ermittelten Quotienten aus der Intensitätsbestimmung von JAM-A und der Ladekontrolle der verschiedenen Lysate auf die Kontrollgruppe bezogen. Dies geschah durch die Bildung eines Quotienten aus den bereits bestimmten Quotienten der jeweiligen Gruppe und dem Quotienten der Kontrollgruppe. Alle hier beschriebenen Berechnungen wurden mithilfe einer Excel Datei angefertigt.

6.5.3 Auswertung des Adhäsionsassays mit der *Gen5 Microplate Reader and Imager Software*

Die Aufnahmen aus dem *Lionheart FX automated microscope* wurden mithilfe der zugehörigen *Gen5 Microplate Reader and Imager Software* angefertigt. Dieses Programm ermöglicht integriert eine Analyse des vorliegenden Bildes. Um eine Aussage über die Menge der adhärenenten GFP-markierten THP-1 Zellen im untersuchten Bereich zu ermöglichen, war es notwendig, die Gesamtfläche zu bestimmen, welche im Bild von den fluoreszenzmarkierten Zellen eingenommen wurde. Diese Analyse wurde von der *Gen5 Microplate Reader and Imager Software* automatisiert vorgenommen, zusammen mit weiteren Informationen und in eine Excel-Tabelle überführt. Um hier eine Vergleichbarkeit zwischen den wiederholten Experimenten zu gewährleisten, musste der so ermittelte Wert zusätzlich mit den Werten der

Standardgerade abgeglichen werden, um auch auf die absolute Zellzahl schließen zu können. Die entsprechenden Berechnungen wurden mithilfe einer Excel-Datei angefertigt.

6.5.4 Statistische Auswertung mit *GraphPad Prism 5*

Alle Daten aus den verschiedenen Versuchsreihen wurden mithilfe der *GraphPad Prism 5* Software graphisch dargestellt und statistisch analysiert. Die zusammengefassten Werte der Versuchsreihen wurden dabei stets als Balkendiagramm dargestellt. Zunächst wurden die Verteilung der generierten Messwerte mithilfe des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Die durchgeführten statistischen Tests sowie die n-Zahlen (unabhängige Versuchsdurchführungen) sind in den Abbildungsbeschriftungen näher angegeben. Das Konfidenzintervall wurde stets auf 95 % festgesetzt und ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als signifikanter Unterschied betrachtet.

7 Ergebnisse

7.1 Einfluss von ADAM17 auf das *Ectodomain-Shedding* von JAM-A nach bakterieller Stimulation

Zunächst sollte untersucht werden, ob sich die bakterielle Stimulation der A549-Zellen mit *P. aeruginosa* auch auf das Shedding von JAM-A auswirkt. Nachdem eine Exposition der Zellen gegenüber dem Pathogen stattgefunden hatte, wurde dazu die im Zelllysate enthaltene Menge JAM-A in einem Western-Blot ausgewertet. Die Auswertung erfolgte sowohl nach zweistündiger Stimulation als auch nach vierstündiger Stimulation.

7.1.1 Pharmakologische Inhibition von ADAM17 führt zu vermindertem *Ectodomain-Shedding* von JAM-A nach bakterieller Stimulation

Um den Einfluss von ADAM17 auf das JAM-A-Shedding untersuchen zu können, wurde zuerst eine pharmakologische Inhibition von ADAM17 mittels TAPI-1 durchgeführt. Eine zweistündige Infektion der A549-Zellen mit *P. aeruginosa* führte zu einer signifikant verminderten Menge des Volllängen-JAM-A (flJAM-A) im Vergleich zu Kontrollzellen. Eine Inhibition von ADAM17 führte zu einer signifikanten Reduktion (um etwa 35%) der induzierten JAM-A-Spaltung, ohne eine basale Änderung der zellassoziierten Expression hervorzurufen (Abbildung 6). Eine längere Infektionszeit von vier Stunden zeigte keine weitere Erhöhung der JAM-A-Spaltung im Vergleich zu der kürzeren Infektionszeit. Allerdings war auch in diesem Fall eine Inhibition der induzierten Spaltung durch ADAM17-Inhibition zu erkennen. Die Analyse der Ladekontrolle zeigte weiterhin eine deutliche Abnahme der Zellzahl bei vierstündiger Infektion im Vergleich zu Kontrollzellen und kürzer infizierten Zellen (Abbildung 6B). Dies spiegelt sich ebenfalls in einer leicht höheren Varianz der Proben untereinander wieder, was an einer erhöhten Standardabweichung erkennbar ist.

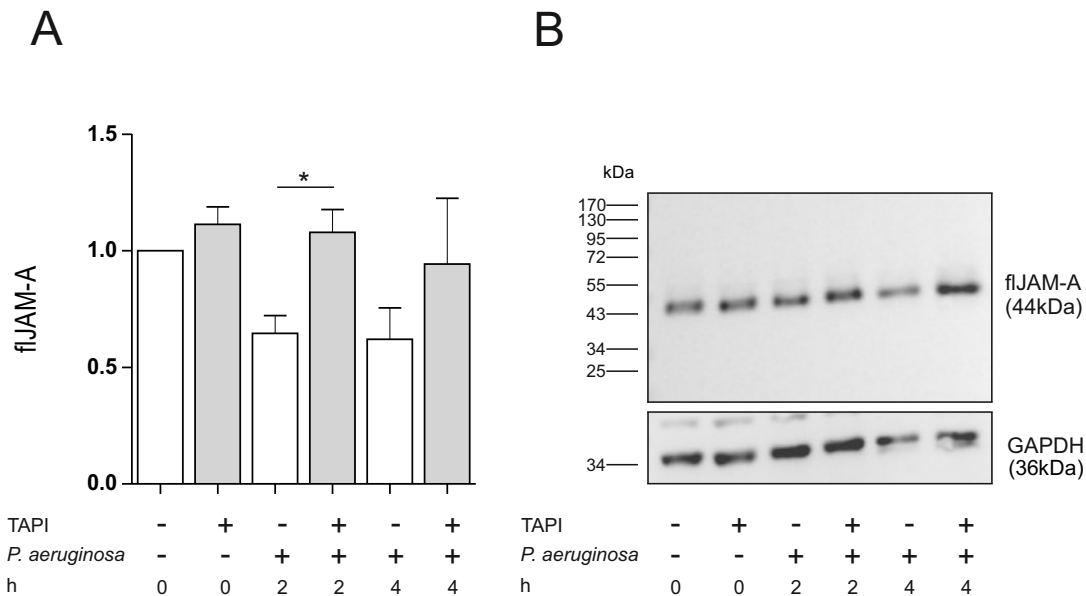


Abbildung 6: A549-Zellen wurden für 30 min mit 10 μ M TAPI-1 oder 0,1% DMSO (Vehikel-Kontrolle) in Medium inkubiert und anschließend mit *P. aeruginosa* (MOI 5) in An- bzw. Abwesenheit des Inhibitors infiziert. Nach null, zwei bzw. vier Stunden wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Die Inkubation erfolgte mit einem gegen den N-Terminus von JAM-A gerichteten Kaninchen-Antikörper und einem adäquaten Sekundärantikörper. Die JAM-A-Expressionsstärke wurde mittels Densitometrie bestimmt. **(A)** Die Daten wurden als Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Normierung erfolgte auf die Expression in der unstimulierten Kontrollgruppe nach Einberechnen der Ladekontrolle. Der statistische Vergleich zwischen zwei Zellgruppen erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (* $p < 0.05$) (der Vergleich zwischen den stimulierten Gruppen mit beziehungsweise ohne pharmakologischer Inhibition von ADAM17 erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test). **(B)** Exemplarischer Western Blot zur Ermittlung der Expression von JAM-A und GAPDH im Zellysate

7.1.2 Knockdown von ADAM17 führt zu vermindertem *Ectodomain-Shedding* von JAM-A nach bakterieller Stimulation

Um den Einfluss von ADAM17 auf das JAM-A-Shedding weiter zu untersuchen und mögliche Fehlerquellen auszuschließen, wurden die im vorangegangenen Versuch gewonnenen Erkenntnisse mithilfe sh-RNA-vermittelter Geninaktivierungsversuche verifiziert. Es ist wichtig zu beachten, dass TAPI-1 nicht ausschließlich ADAM17 hemmt, sondern auch andere Metalloproteinasen beeinflussen kann. Daher können die beobachteten Effekte auf mehrere Enzyme zurückzuführen sein. Hier lässt sich die Verantwortlichkeit möglicher anderer Enzyme, die durch TAPI-1 auch inhibiert werden könnten, weiter ausschließen. Außerdem liefert ein solcher Versuch einen besseren Überblick über das gesamte Enzym ADAM17, da es hier zum vollständigen Fehlen kommt und nicht bloß zur pharmakologischen Interaktion. Zur Optimierung der methodischen Genauigkeit wurden zwei voneinander unabhängige *Knockdowns* (KD1 / KD2) durchgeführt. Vor dem eigentlichen Versuch erfolgte die Validierung

des mittels lentiviraler Transduktion durchgeführten *Knockdowns* mittels Western Blot (Abbildung 7).

In Zellen der *Scramble*-Gruppe, bei welchen ausschließlich eine lentivirale Transduktion mit einer unspezifischen shRNA erfolgte, zeigte sich eine deutliche Proteinexpression der maturen Form (100 kDa) und der Proform (130 kDa) von ADAM17. Im Falle des ersten *Knockdowns* wurde hingegen eine deutliche Verminderung der Expression des Enzyms beobachtet. Es konnten nur noch geringe Mengen der maturen Form nachgewiesen werden, wobei die Proform nicht mehr nachweisbar war. Selbige Beobachtung wurde für Knockdown 2 gemacht, wobei hier die mature Form im Vergleich zum ersten *Knockdown* leicht intensiviert exprimiert wurde, was auf eine geringfügig reduzierte Effektivität der verwendeten shRNA-Sequenz hinweisen könnte. Dieser Unterschied sollte bei der Interpretation der nachfolgenden Experimente gegebenenfalls berücksichtigt werden.

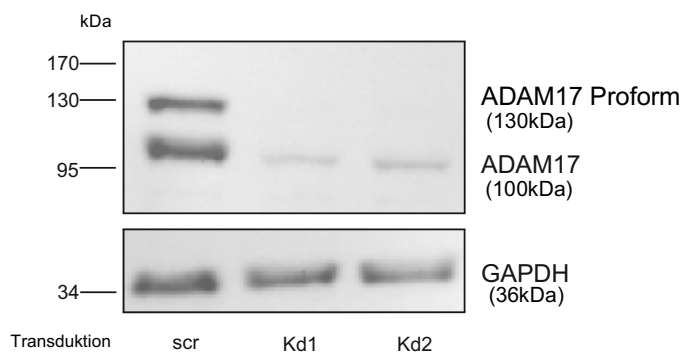


Abbildung 7: A549-Zellen wurden nach erfolgreichem lentiviralem Gentransfer in Medium inkubiert und anschließend lysiert. Die gewonnenen Proben wurden mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Die Inkubation erfolgte mit einem gegen ADAM17 gerichteten Kaninchen-Antikörper und einem adäquaten Sekundärantikörper. Die ADAM17-Expressionsstärke wurde mittels Densitometrie bestimmt. Die Abbildung zeigt einen Western Blot zur Ermittlung der Expression von ADAM17 (Proform bei 130 kDa, aktive Form bei 100 kDa)

Eine vierstündige Infektion von A549-Zellen der *Scramble*-Gruppe mit *P. aeruginosa* führte zu einer verminderten Menge des Volllängen-JAM-A (flJAM-A) im Vergleich zu Kontrollzellen (Abbildung 8). Es ist jedoch zu beachten, dass nach zweistündiger Stimulation in dieser Versuchsreihe, im Gegensatz zum vorausgegangenen Versuch, keine Abnahme von Volllängen-JAM-A festgestellt wurde. Übereinstimmend konnte jedoch auch in dieser Versuchsreihe eine Abnahme innerhalb von vier Stunden detektiert werden. Die genetische Inaktivierung von ADAM17 hingegen führte zu einer Reduktion der induzierten Volllängen-JAM-A-Spaltung. Sowohl in *Knockdown* 1 als auch in *Knockdown* 2 zeigte sich so keine Abnahme der Menge an Volllängen-JAM-A in den stimulierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Beachtet werden muss die in *Knockdown* 1 zugehörigen Zellen durchweg erhöhte Menge an Volllängen-JAM-A im Vergleich zur *Scramble*-Gruppe. Zusammengefasst

zeigten die in dieser Versuchsreihe gewonnenen Ergebnisse eine Reduktion der induzierten JAM-A-Spaltung in Zellen mit genetischer Inaktivierung von ADAM17.

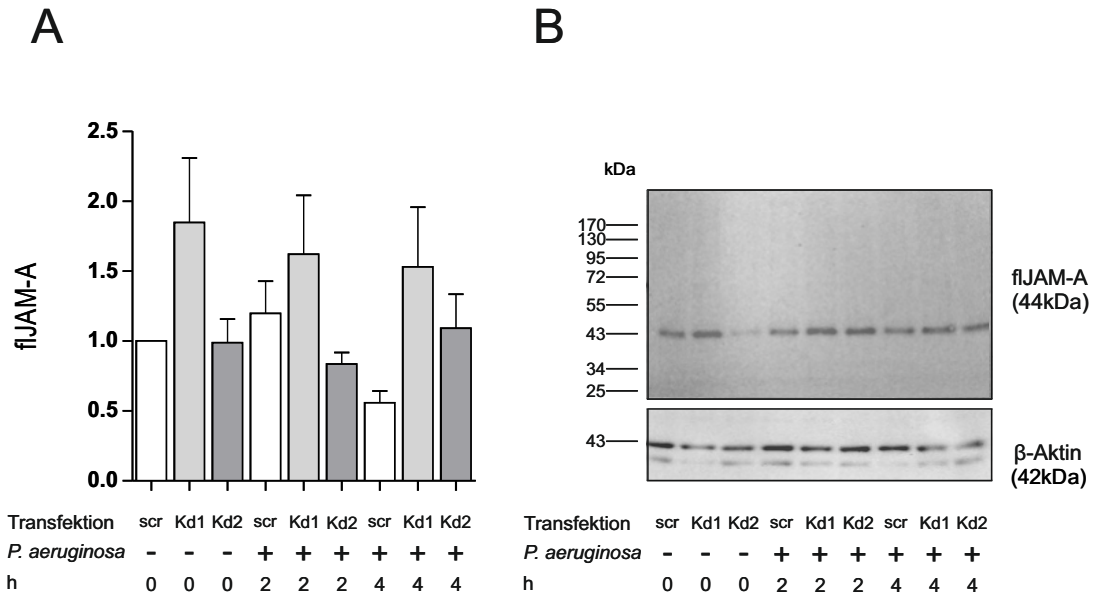


Abbildung 8: A549-Zellen mit (Kd1 und Kd2) beziehungsweise ohne (scr) genetischen *Knockdown* wurden mit *P. aeruginosa* (MOI 5) infiziert. Nach null, zwei bzw. vier Stunden wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Die Inkubation erfolgte mit einem gegen den N-Terminus von JAM-A gerichteten Kaninchen-Antikörper und einem adäquaten Sekundärantikörper. Die JAM-A-Expressionsstärke wurde mittels Densitometrie bestimmt. **(A)** Die Daten wurden als Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Normierung erfolgte auf die Expression in der unstimulierten Kontrollgruppe nach Einberechnen der Ladekontrolle. Der statistische Vergleich zwischen zwei Zellgruppen erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (* $p < 0.05$) (der Vergleich zwischen den stimulierten Gruppen mit beziehungsweise ohne genetischen Knockdown erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test). **(B)** Exemplarischer Western Blot zur Ermittlung der Expression von JAM-A und β -Aktin im Zelllysate

7.2 Stimulation mit hitzeinaktivierten Bakterien bewirkt kein verstärktes *Ectodomain-Shedding* von JAM-A

Bakteriell induzierte Signalkaskaden können zum einen durch die direkte Interaktion des Bakteriums mit der Wirtszelle ausgelöst werden, zum anderen durch die durch das Bakterium freigesetzten Toxine. Um zwischen diesen Möglichkeiten zu differenzieren, wurden die in 7.1 beschriebene Versuche mit hitze-inaktivierten *P. aeruginosa* Keimen wiederholt. Diese Hitzeinaktivierung diente dem Erhalt avitaler Pseudomonaden, die folglich nicht mehr zur Produktion bakterieller Toxine in der Lage waren, wohingegen die bakterielle Struktur weiterhin intakt blieb. Auch für diese Fragestellung wurde der Vergleich zwischen Zellen durchgeführt, die eine physiologische Funktionen von ADAM17 aufwiesen mit Zellen, in denen eben dieses Enzym durch den Inhibitor TAPI-1 gehemmt wurde, um so den Effekt auf die Protease zurückführen zu können.

Es zeigte sich, dass eine Stimulation der Zellen mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* Keimen zu keiner signifikant veränderten Menge des Volllängen-JAM-A im Vergleich zu Kontrollzellen führte (Abbildung 9). Weder nach zweistündiger noch nach vierstündiger Stimulation war eine Abnahme von Volllängen-JAM-A zu erkennen. Graphisch stellt sich sogar eine leichte Zunahme der Menge an Volllängen-JAM-A über die Zeit dar. Somit zeigte sich kein Unterschied zwischen Zellen mit pharmakologischer Inhibition von ADAM17 mittels TAPI-1 und Zellen mit physiologischer Funktion von ADAM17.

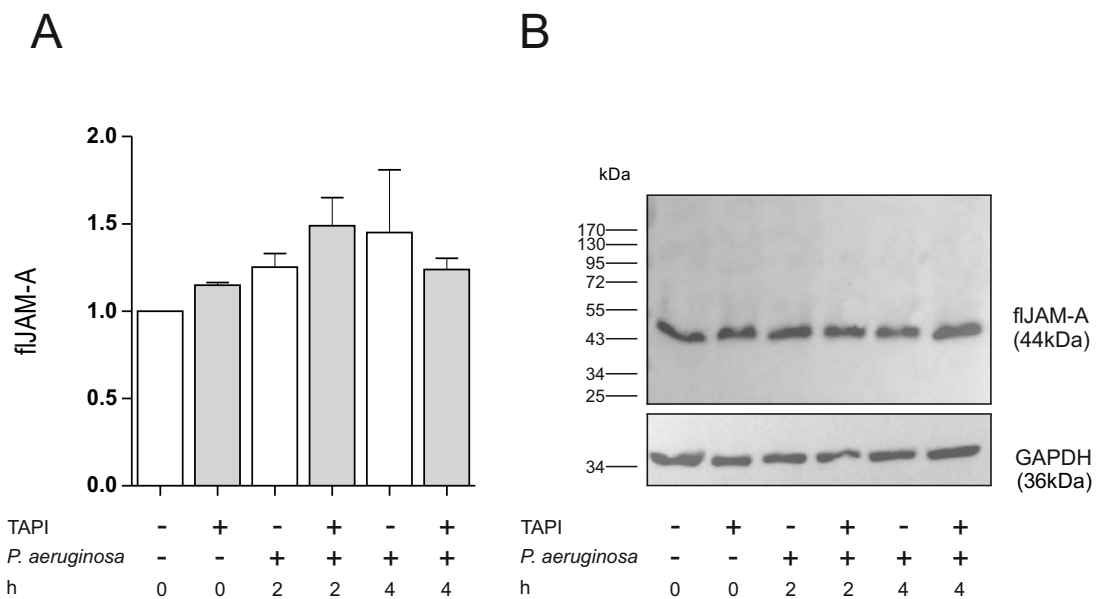


Abbildung 9: A549-Zellen wurden für 30 min mit 10 μ M TAPI-1 oder 0,1% DMSO (Vehikel-Kontrolle) in Medium inkubiert und anschließend mit hitzeinaktivierten *P. aeruginosa* (MOI 5) in An- bzw. Abwesenheit des Inhibitors infiziert. Nach null, zwei bzw. vier Stunden wurden die Zellen lysiert und mittels SDS-Page und Western Blot analysiert. Die Inkubation erfolgte mit einem gegen den N-Terminus von JAM-A gerichteten Kaninchen-Antikörper und einem adäquaten Sekundärantikörper. Die JAM-A-Expressionsstärke wurde mittels Densitometrie bestimmt. **(A)** Die Daten wurden als Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Normierung erfolgte auf die Expression in der unstimulierten Kontrollgruppe nach Einberechnen der Ladekontrolle. Der statistische Vergleich zwischen zwei Zellgruppen erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (* $p < 0.05$) (der Vergleich zwischen den stimulierten Gruppen mit beziehungsweise ohne pharmakologischer Inhibition von ADAM17 erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test). **(B)** Exemplarischer Western Blot zur Ermittlung der Expression von JAM-A und GAPDH im Zelllysat

7.3 Einfluss von ADAM17 auf die leukozytäre Adhäsion am Epithel nach bakterieller Stimulation

Neben dem Einfluss, den JAM-A auf die leukozytäre Transmigration hat, spielt auch eine veränderte Adhäsion von Leukozyten am Epithel eine entscheidende Rolle für die Einwanderung von Immunzellen in das Gewebe. Aus diesem Grund sollte nun auch untersucht werden, ob eine Stimulation der Epithelzellen mit *P. aeruginosa* und die so induzierte Steigerung der enzymatischen Aktivität von ADAM17 Auswirkungen auf diesen Vorgang hat.

Dazu wurde die Adhäsion von THP-1 Zellen, einer monozytären Zelllinie, an das Epithel untersucht, nachdem eine Exposition der Epithelzellen gegenüber *P. aeruginosa* stattgefunden hatte.

7.3.1 Pharmakologische Inhibition von ADAM17 führt zu einer verstärkten leukozytären Adhäsion nach Stimulation mit *P. aeruginosa*

Ähnlich wie in vorausgegangenen Versuchsreihen wurden Zellen mit physiologisch aktivem ADAM17 mit Zellen nach Inhibition von ADAM17 mittels TAPI-1 verglichen. Nach vierstündiger Exposition der Epithelzellen gegenüber den Pseudomonaden war ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Vergleichsgruppen erkennbar (Abbildung 10). Während sich die Adhäsion an Zellen mit inhibierter ADAM17 Protease im Vergleich zu kürzeren Stimulationszeiten nahezu unverändert darstellte, war die Adhäsion von THP-1 Zellen an A549 Zellen mit unbeeinflusster Enzymfunktion stark vermindert. Durchschnittlich war das von adhärenen THP-1 Zellen an Zellen mit inhibiertem ADAM17 stammende Signal etwa vierfach gesteigert zu dem Vergleichswert der an der Kontrollgruppe adhärenen THP-1 Zellen. Nach zweistündiger Stimulation der A549-Zellen mit *P. aeruginosa* war hingegen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen verschiedener Enzymaktivität ersichtlich. Über den zeitlichen Verlauf des Versuchs ließ sich insgesamt eine leichte Abnahme der Menge adhärenen THP-1 Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche keiner bakteriellen Exposition unterlag, erkennen. Eine solche generelle Abnahme ist durch die verringerte Zahl an Epithelzellen zu erklären, welche nach längerer Einwirkung der Pseudomonaden in den Zelltod übergingen. Eine verminderte Adhäsionsfläche für die Leukozytenadhäsion, könnte sich möglicherweise in einem niedrigeren Signal widerspiegeln, weshalb in später beschriebenen Versuchen auch der Zelltod betrachtet wurde (7.4).

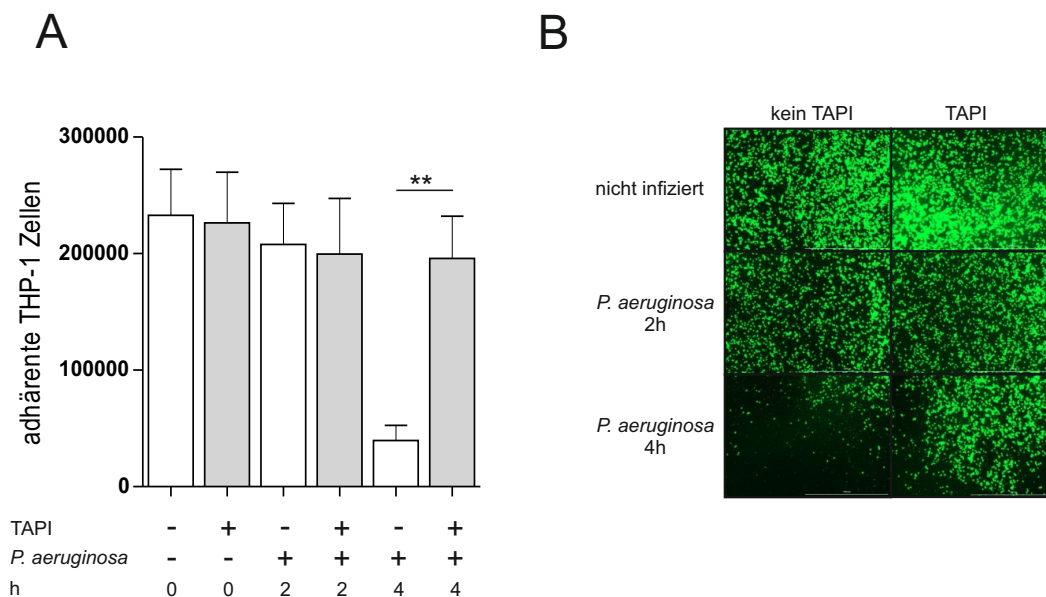


Abbildung 10: A549-Zellen wurden für 30 min mit 10 μ M TAPI-1 oder 0,1% DMSO (Vehikel-Kontrolle) in Medium inkubiert und anschließend mit *P. aeruginosa* (MOI 5) in An- bzw. Abwesenheit des Inhibitors infiziert. Nach null, zwei bzw. vier Stunden wurden die A549-Zellen mit einer Suspension aus fluoreszenzmarkierten THP-1 Zellen versetzt. Nach Zentrifugation gefolgt von mehreren Waschschritten mit PBS wurde mithilfe des *Lionheart FX Automated microscope* die Absorption des Calcein-Signals der fluoreszenzmarkierten THP-1 Zellen ermittelt. Im Vergleich mit der Absorption einer zuvor ermittelten Standardreihe wurde so auf die Menge der adhärenen THP-1 Zellen geschlossen. **(A)** Die Daten wurden als Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Normierung erfolgte auf die Expression in der unstimulierten Kontrollgruppe. Der statistische Vergleich zwischen zwei Zellgruppen erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (* $p < 0.05$) (der Vergleich zwischen den stimulierten Gruppen mit beziehungsweise ohne pharmakologischer Inhibition von ADAM17 erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test). **(B)** Exemplarische Darstellung der mithilfe des *Lionheart* gewonnenen Aufnahme von adhärenen fluoreszenzmarkierten THP-1 Zellen an stimulierten und unstimulierten A549-Zellen.

7.3.2 Knockdown von ADAM17 führt zu einer verstärkten leukozytären Adhäsion nach Stimulation mit *P. aeruginosa*

Die Durchführung dieser Versuchsreihe diente dem Zweck, die in 7.3.1 gewonnenen Ergebnisse und eine Beeinflussung des Ergebnisses durch die Einwirkung des verwendeten Inhibitors TAPI-1 auf weitere Metalloproteinasen zu überprüfen.

Aus diesem Grund wurde auch in dieser Versuchsreihe ein Vergleich zwischen *wild-type* ADAM17 Zellen und ADAM17 *Knockdown* Zellen angestrebt, um bestmöglich den Einfluss der Protease auf die leukozytäre Adhäsion bestimmen zu können. Hierzu wurden die Zellen aus dem in 7.1.2 beschriebenen *Knockdown* verwendet, wobei auch in diesem Fall wieder mit zwei verschiedenen *Knockdown* Varianten gearbeitet wurde, um die Aussagekraft weiter zu steigern.

Die in Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse der Versuchsreihe zeichnen ein ähnliches Bild wie die in 7.3.1 ermittelten Daten. Eine vierstündige Infektion der A549-Zellen der *Scramble* Gruppe, in der ADAM17 in *wild-type* vorlag, bewirkte eine stark verminderte Adhäsion der THP-1 Zellen am Epithel. Im Unterschied zur *Scramble* Gruppe war in den *Knockdown* Gruppen keine vergleichbare Abnahme des von adhären THP-1 Zellen stammenden Signals erkenntlich. Auch hier war das von adhären THP-1 Zellen an Zellen der *Knockdown* Gruppen stammende Signal durchschnittlich etwa vierfach gesteigert zu dem Vergleichswert der an der Kontrollgruppe adhären THP-1 Zellen. Nach zweistündiger Infektion der Zellen mit *P. aeruginosa* ließ sich, vergleichbar mit den im Vorversuch gewonnenen Erkenntnissen, hingegen kein Unterschied in der Adhäsionsfähigkeit der THP-1 Zellen an den A549-Zellen feststellen.

Ähnlich wie bereits im Vorversuch beschrieben, kam es über die Dauer der Versuchsdurchführung zu einer allgemeinen Abnahme des von THP-1 Zellen stammenden Signals, möglicherweise aufgrund eines vermehrten Zelltodes der Epithelzellen nach langer Exposition gegenüber den pathogenen Bakterien (siehe dazu 7.4).

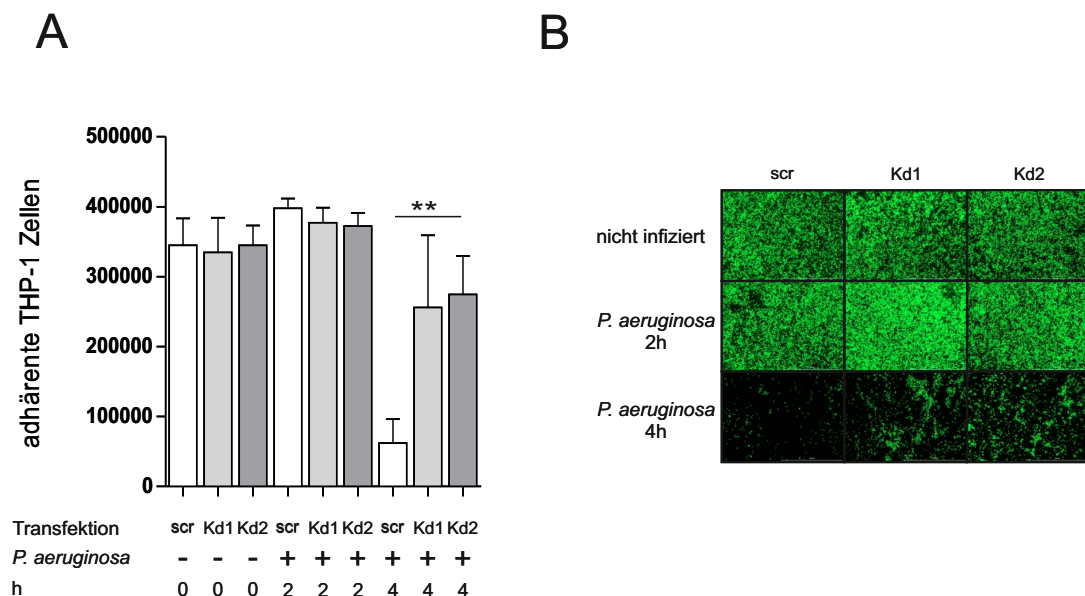


Abbildung 11: A549-Zellen mit (Kd1 und Kd2) beziehungsweise ohne (scr) genetischen *Knockdown* wurden mit *P. aeruginosa* (MOI 5) infiziert. Nach null, zwei bzw. vier Stunden wurden die A549-Zellen mit einer Suspension aus fluoreszenzmarkierten THP-1 Zellen versetzt. Nach Zentrifugation gefolgt von mehreren Waschschritten mit PBS wurde mithilfe des *Lionheart FX Automated microscope* die Absorption des Calcein-Signals der fluoreszenzmarkierten THP-1 Zellen ermittelt. Im Vergleich mit der Absorption einer zuvor ermittelten Standardreihe wurde so auf die Menge der adhären THP-1 Zellen geschlossen. **(A)** Die Daten wurden als Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Normierung erfolgte auf die Expression in der unstimulierten Kontrollgruppe. Der statistische Vergleich zwischen zwei Zellgruppen erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (* $p < 0.05$) (der Vergleich zwischen den stimulierten Gruppen mit beziehungsweise genetischen Knockdown erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test **(B)** Exemplarische Darstellung der mithilfe des *Lionheart* gewonnenen Aufnahme von adhären fluoreszenzmarkierten THP-1 Zellen an stimulierten und unstimulierten A549-Zellen.

7.4 Einfluss von ADAM17 auf das Überleben von A549-Zellen nach bakterieller Stimulation

In vorherigen Versuchen (7.3) zeigte sich ein Unterschied in der Adhäsion von THP-1 Zellen am epithelialen Monolayer abhängig von der Aktivität der Protease ADAM17. Neben der Veränderung im Vorhandensein von Adhäsionsmolekülen könnte auch ein verändertes Überleben der Zellen nach Exposition gegenüber *P. aeruginosa* zu den gemessenen Unterschieden beitragen. Aus diesem Grund sollte allgemein untersucht werden, ob ein veränderter Aktivitätszustand von ADAM17 das Überleben der Zellen bei Infektion mit dem Pathogen positiv oder negativ beeinflusst.

Wie in Abbildung 12 dargestellt, zeigt sich in den unstimulierten Kontrollgruppen, in denen die Signalstärke der A549-Zellen bereits zu Beginn des Versuchs analysiert wurden, bei Inhibition eine leicht erhöhte, aber nicht signifikant veränderte Zellmenge. Im weiteren Verlauf des Versuchs nahm die festgestellte Zelldichte mit Dauer der Exposition weiter ab, sodass nach zwei Stunden beziehungsweise nach vier Stunden jeweils eine niedrigere Signalintensität als in der zeitlich vorausgegangenen Messung gemessen wurde. Vergleichend zeigte sich eine Tendenz zu leicht verbessertem Überleben durch Inhibition von ADAM17, Signifikanz ließ sich durch diese Versuchsreihe allerdings nicht nachweisen.

Insgesamt betrachtet wird durch die gewonnenen Daten jedoch ersichtlich, dass es durch die Einwirkung des Bakteriums auf die Epithelzellschicht zu einem deutlichen Absterben der A549-Zellen kam. Allgemein wurde dabei die Anzahl der vitalen Epithelzellen auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes dezimiert. Mikroskopisch lässt sich erkennen, dass die Integrität des Zellverbandes aus A549-Zellen stark eingeschränkt verbleibt nach bakterieller Stimulation mit den Pseudomonaden.

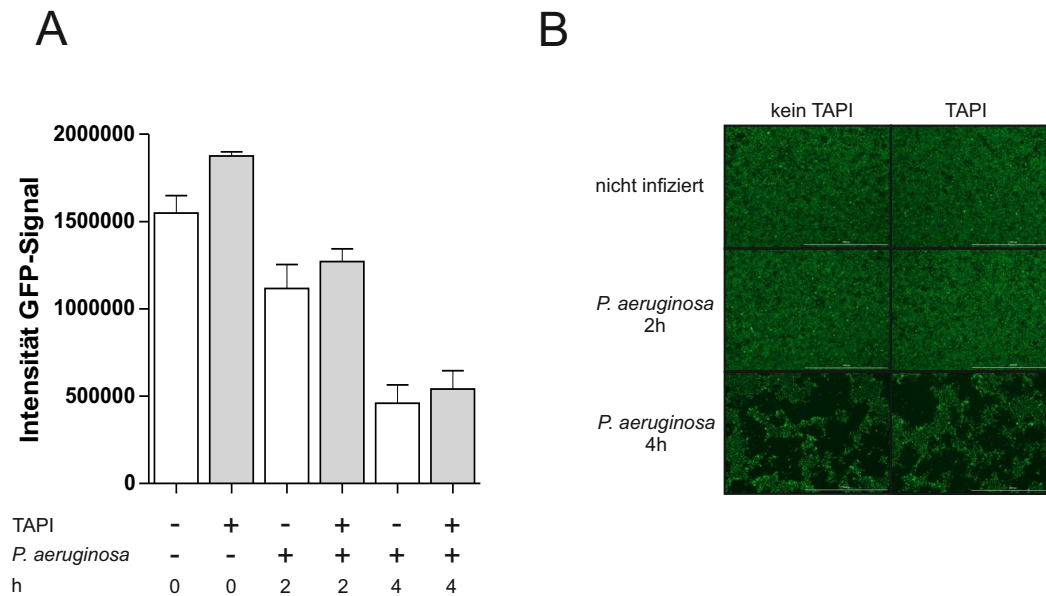


Abbildung 12: A549-Zellen wurden für 30 min mit 10 μ M TAPi-1 oder 0,1% DMSO (Vehikel-Kontrolle) in Medium inkubiert und anschließend mit *P. aeruginosa* (MOI 5) in An- bzw. Abwesenheit des Inhibitors infiziert. Nach null, zwei bzw. vier Stunden wurde das Calcein-Signal der fluoreszenzmarkierten A549-Zellen durch Messung im *Lionheart fx automated microscope* ermittelt. Über die Intensität des Calcein-Signals sollte eine Aussage über die Anzahl vitaler A549-Zellen im epithelialen Zellverband ermöglicht werden. **(A)** Die Daten wurden als Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. Die Normierung erfolgte auf die Expression in der unstimulierten Kontrollgruppe nach Einberechnen der Ladekontrolle. Der statistische Vergleich zwischen zwei Zellgruppen erfolgte mittels zweiseitigem t-Test (* $p < 0.05$) (der Vergleich zwischen den stimulierten Gruppen mit beziehungsweise ohne pharmakologischer Inhibition von ADAM17 erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test). Dargestellt ist die Intensität des Calcein-Signals der fluoreszenzmarkierten A549-Zellen. **(B)** Exemplarische Darstellung der mithilfe des *Lionheart* gewonnenen Aufnahme von GFP-fluoreszenzmarkierten A549-Zellen nach unterschiedlicher Exposition gegenüber *P. aeruginosa*. Darüber ist zwischen der rechten und linken Spalte der Abbildung der Vergleich zwischen den Zellen mit unterschiedlicher ADAM17 Funktion ersichtlich.

8 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde festgestellt, dass ADAM17 eine entscheidende Rolle bei der Regulation von junctionalen Molekülen und Adhäsionsmolekülen durch pulmonale Epithelzellen während einer Infektion mit Pseudomonaden spielt. Insbesondere konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Protease durch eine Infektion mit *P. aeruginosa* hochreguliert werden kann und die Adhäsion von Leukozyten am Epithelzellverband sowie die darauffolgende Transmigration beeinflusst. Die *in vitro* gewonnenen Erkenntnisse lassen vermuten, dass ADAM17 so im Rahmen einer *P. aeruginosa* assoziierten Pneumonie die Immunantwort entscheidend durch Veränderungen in der Expression von junctionalen Molekülen und Adhäsionsmolekülen auf der Epithelzelloberfläche und damit durch die Einwanderung von Immunzellen in das Lungengewebe beeinflusst.

8.1 Auswirkungen der Inhibition von ADAM17 auf die leukozytäre Diapedese am Lungenepithel

Diese Arbeit untersucht durch Betrachtung der leukozytären Adhäsion am Epithel sowie der physiologisch darauffolgenden Transmigration die zur Diapedese notwendigen Teilschritte. Dabei konnte gezeigt werden, dass beide Teilschritte durch eine Aktivitätssteigerung von ADAM17 nach Stimulation mit *P. aeruginosa* beeinflusst werden.

Die Daten, die im dritten Teil der Arbeit gewonnen (7.3) wurden, liefern Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von ADAM17 auf die Leukozytenadhäsion am Epithel. Explizit zeigt sich hier, dass eine Stimulation der Protease durch Exposition der A549-Zellen gegenüber *P. aeruginosa* in einer verminderten Adhäsion von THP-1 Zellen am Epithel resultiert. Wie in 5.4.1 beschrieben handelt es sich bei einer Reihe von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM-1 oder auch L-Selektin um Substrate von ADAM17 [83]. Daher ist anzunehmen, dass diese Proteine nach Aktivierung von ADAM17 einem gesteigerten *Ectodomain-Shedding* unterliegen [18] und daher nach der Exposition gegenüber den Pseudomonaden in verminderter Konzentration auf der Oberfläche der Epithelzellen vorzufinden sind. Infolgedessen ist die Möglichkeit für Leukozyten, mit solchen Proteinen über ihren entsprechenden Rezeptor zu interagieren eingeschränkt, sodass die Adhäsion der Immunzellen am Epithelzellverband deutlich geringer ausfällt [19]. Auch andere Untersuchungen sind zu dem Schluss gekommen, dass beispielsweise eine Hemmung des *Sheddings* von L-Selektin mit einer erhöhten Interaktion der Leukozyten mit Endothel und infolgedessen mit einer vermehrten Leukozytenaktivierung einhergeht [29, 22]. Insgesamt zeigte sich somit, dass eine Hemmung der proteolytischen Spaltung von L-Selektin mit einer verstärkten Leukozytenadhäsion und infolgedessen mit einer vermehrten Transmigration durch den Zellverband einhergeht [19].

Auch *in vivo* konnte durch den Einsatz von Metalloproteinaseinhibitoren ein um 40% verlangsamtes Rolling von Leukozyten hervorgerufen werden, was in dieser Arbeit auf das verminderte Shedding von L-Selektin und die damit verbesserte Adhäsion zurückgeführt wurde [25]. Derselbe Autor konnte nachfolgend auch zeigen, dass durch das verminderte Shedding von L-Selektin die Variabilität der Geschwindigkeit, mit der sich Leukozyten am Zellverband entlang bewegen, gesenkt werden konnte und somit eine stabilere Bindung der Leukozyten resultierte [26]. Neben dem Einfluss auf L-Selektin und die nachfolgende Adhäsion wurde von anderen Autoren auch der Einfluss von ICAM-1 näher untersucht. Auch hier zeigte sich infolge eines verminderten Sheddings von Adhäsionsmolekülen sowohl durch pharmakologische Inhibition als auch durch den Einsatz von siRNA eine verstärkte Adhäsion an Epithelzellen [73].

Die Daten, die im ersten experimentellen Teil dieser Arbeit gewonnen wurden, beleuchten den Einfluss von ADAM17 auf die darauf folgende Transmigration von Leukozyten durch das Epithel. Hier lässt sich erkennen, dass die Stimulation der Protease durch die Exposition gegenüber *P. aeruginosa* ein verstärktes Shedding von JAM-A zur Folge hat, erkennbar an der Abnahme des membranständigen fJAM-A und der Zunahme des löslichen Fragments. Aufgrund dessen, dass diese löslichen Fragmente von JAM-A ebenso an LFA-1 auf der Leukozytenoberfläche binden können, steht dieses nicht mehr zur Öffnung der molekularen interzellulären Bindungen zur Verfügung, was mit einer verminderten Transmigration einherginge [40]. Aufgrund dieses Mechanismus würde eine erhöhte Aktivität von ADAM17 mit einer verminderten Transmigration einhergehen. Die verminderte Konzentration an JAM-A in den Zell-Zell-Kontakten des Zellverbandes jedoch bedeutet eine erhöhte Permeabilität des Epithels, was der Transmigration von Leukozyten durchaus förderlich sein könnte. Eine hohe Aktivität von ADAM17 würde diesem Modell folgend eine verstärkte parazelluläre Transmigration ermöglichen. Die beiden genannten Mechanismen sind daher konträr, wobei der hier durchgeführte Versuch keine Antwort darauf liefern kann, welcher Faktor bezüglich der Transmigration überwiegt. Klärung dieser Frage bietet möglicherweise ein von Ahmad Aljohmani in dieser Arbeitsgruppe durchgeführter Assay, in welchem gezeigt werden konnte, dass durch eine Inhibition von ADAM17 eine vermehrte Transmigration von Leukozyten durch ein Epithel beobachtet werden kann [2]. Auch weitere Autoren haben Hinweise auf eine hemmende Rolle einer erhöhten ADAM17 Aktivität für die Transmigration beobachten können. So ließ sich auch besonders die inhibierende Rolle der löslichen Form von JAM-A in *in vitro* Versuchen bestätigen [40]. Dennoch gab es auch Hinweise, die auf den bereits angesprochenen, gegenteiligen Effekt einer erhöhten ADAM17 Aktivität nach bakterieller Stimulation schließen lassen. So zeigte sich insbesondere für das Modell einer durch Pathogene hervorgerufenen Pneumonie eine Reduktion der durch das Lungenepithel hindurchtretenden Leukozyten, was besonders der in dieser Arbeit betrachteten Fragestellung

nahekommt. In der genannten Arbeit konnte nach Stimulation von ADAM17 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine verminderte Transmigration nach pharmakologischer Inhibition und nach genetischer Inaktivierung nachgewiesen werden [13].

Weiterhin muss auch beachtet werden, ob eine gesteigerte Aktivität von ADAM17 auch die Überlebensfähigkeit der Epithelzellen und damit die Integrität des Zellverbandes allgemein beeinflusst. Selbstverständlich hat auch eben diese Integrität großen Einfluss darauf, in welchem Ausmaß es zur Extravasation von Leukozyten kommt. Neben dem Fehlen der zur Extravasation notwendigen Strukturen würde das zunehmende Fehlen von Epithelzellen auch mit einer Verminderung von Signalmolekülen wie Chemokinen einhergehen, die zur Aktivierung der Leukozyten und Induktion der nachfolgenden Kaskade notwendig sind [53]. Nach Auswertung der hierzu durchgeführten Versuchsreihe (7.4) zeigt sich eine Tendenz zur gesteigerten Überlebensfähigkeit bei Zellen mit reduzierter Aktivität von ADAM17 im Rahmen einer Exposition gegenüber *P. aeruginosa*. Weiterhin wird durch den Versuch ersichtlich, dass es zu einem deutlichen Rückgang der Anzahl vitaler Epithelzellen im zeitlichen Verlauf der Infektion kommt. Dennoch muss beachtet werden, dass der durchgeführte Versuch gewissen Limitationen unterliegt. Der Versuch basierte darauf, das Signal von fluoreszenzmarkierten Zellen im zeitlichen Verlauf der Exposition gegenüber *P. aeruginosa* zu messen, was keine optimale Differenzierung zwischen vitalen Epithelzellen und apoptotischen Zellen ermöglicht. Aufgrund dessen wurde innerhalb der Arbeitsgruppe infolge ein weiterer *Survival Assay* durchgeführt [2], der eine solche Fehlinterpretation ausschließen sollte. Im Gegensatz zu der hier beschriebenen Versuchsreihe konnte dabei nun doch ein signifikanter Überlebensvorteil der Epithelzellen nach Inhibition von ADAM17 bei Infektion mit *P. aeruginosa* festgestellt werden. Auch andere Untersuchungen konnten eine vermehrte Apoptoseinduktion im Zusammenhang mit erhöhter ADAM17 Aktivität nachweisen. So zeigte sich beispielsweise ein vermehrter Zelltod durch Beeinflussung von TNFR1 durch ADAM17 [7]. Eine verbesserte Integrität des Epithelzellverbandes würde letztlich auch mit verbesserter Möglichkeit zur Adhäsion von Leukozyten einhergehen.

Die Gesamtbetrachtung des Einflusses von ADAM17 auf die leukozytäre Diapedese nach bakterieller Stimulation vermittelt den Eindruck einer vorwiegend verminderten Migrationsfähigkeit von Leukozyten durch eine gesteigerte Aktivität der Protease. Neben den hier dargestellten Einflüssen von ADAM17 in Epithelzellen scheint auch die Aktivität der Protease in Leukozyten selbst die Diapedese zu vermindern [85]. Dennoch muss in Betracht gezogen werden, dass einige Auswirkungen der Aktivitätssteigerung diesbezüglich konträr sein können, was die Bedeutung von ADAM17 zur Herstellung eines physiologischen Gleichgewichts zur Steuerung der Immunantwort unterstreichen könnte. Dadurch wird

allerdings nicht ausgeschlossen, dass ein pathologisches Aktivitätsniveau auch mit einer beeinträchtigten Immunreaktion gegenüber Pathogenen wie *P. aeruginosa* einhergehen kann.

8.2 Pharmakologische Anwendungsmöglichkeiten und Ausblick auf weitere mögliche Untersuchungen

Die zunehmende Verbreitung antimikrobieller Resistenzen stellt eine zunehmend große Herausforderung für die Behandlung erkrankter Patienten dar. Daher ist es sinnvoll, verstärkt antiinfektive Strategien zu verfolgen, die ergänzend zur klassischen antibiotischen Therapie die Behandlung bakterieller Infektionen unterstützen können. Eine solche Option besteht darin, schädliche bakterielle Toxine sowie deren Wechselwirkungen mit Wirtszellen und die folgenden Auswirkungen auf solche zu blockieren.

Eine mögliche Inhibition von ADAM17 im Rahmen einer Infektion mit *P. aeruginosa* lässt sich aufgrund der in 8.1 dargelegten Mechanismen als potenzielle Strategie betrachten, um durch verbesserte leukozytäre Migration in betroffenes Gewebe lokal eine erhöhte Clearance zu erzielen. Dadurch wäre der Organismus besser in der Lage, effektiv die bakterielle Infektion zu bewältigen und die Heilungschancen zu erhöhen. Zu dieser Fragestellung durchgeführte *in vivo* Versuche liefern Ergebnisse, die diese Betrachtungsweise unterstützen. So zeigten Mäuse mit genetischem *Knockout* von ADAM17 eine frühere und verstärkte Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu Kontrolltieren [46]. Andere Autoren beschreiben auch eine verbesserte Phagozytose von bakteriellen Pathogenen durch monozytäre Zellen infolge einer verminderten ADAM17 Aktivität in Leukozyten [67]. Insofern zeigt sich ein positiver Effekt auf die Immunantwort im Rahmen bakterieller Infektionen nicht ausschließlich durch Beeinflussung der Enzymaktivität der Epithelzellen, sondern auch in Bezug auf Leukozyten selbst. Neben der vermuteten Auswirkung im Sinne einer verbesserten lokalen zellulären Immunantwort scheinen einige Autoren auch eine erhöhte Überlebensfähigkeit der Epithelzellen durch Inhibition von ADAM17 im Rahmen einer bakteriellen Infektion anzunehmen (8.1) [2, 7]. Ein so verminderter Gewebeschaden trägt ebenso zum verbesserten Krankheitsverlauf bei. Allerdings muss beachtet werden, dass eine Inhibition von ADAM17 eher nur lokal therapeutisch sinnvoll erscheint. Eine vollständige systemische Inhibition der Protease könnte aufgrund der vorwiegend proinflammatorischen Rolle in der Mediation des Entzündungsgeschehens gegenteilig auch zu einer abgeschwächten Immunantwort führen. Infolgedessen steigt das Risiko für einen prolongierten Verlauf der Erkrankung oder für sekundäre Infektionen. Weiterhin ist beispielsweise der EGF-Rezeptor, welcher ein Substrat von ADAM17 darstellt [5], wichtig für die pulmonale Regeneration nach einer Gewebsschädigung, sodass eine Inhibition von ADAM17 hier zu einer Verschlechterung der Gesamtsituation führen könnte [29]. Weiterhin muss einschränkend beachtet werden, dass es sich bei dieser Arbeit ausschließlich um *in vitro*

Versuche handelt. Auch wenn bereits, wie oben genannt, zu verwandten Themen *in vivo* Untersuchungen existieren, ist es dennoch sinnvoll die hier aufgestellten Thesen auch im Tiermodell zu überprüfen. Neben möglichen *in vivo* Versuchen wäre es bereits ein weiterer Schritt, die als Modell für das Lungenepithel verwendete Zellreihe so zu wählen, dass die physiologischen Verhältnisse noch exakter abgebildet werden können. A549-Zellen stellen eine häufig verwendete Zellreihe zur Untersuchung von Pneumozyten dar, allerdings handelt es sich dennoch um entartete Zellen, welche einem Tumor entstammen, sodass sie in einigen Eigenschaften von den gewöhnlichen Lungenepithelzellen abweichen. Problematisch ist beispielsweise, dass A549-Zellen lediglich schwache interzelluläre Tight Junctions ausbilden, welche für diese Fragestellungen allerdings essenziell sind. Eine passender erscheinende Alternative stellt hingegen eine humane Alveolarepithelzelllinie dar, deren Vertreter als hAELVi-Zellen (*human Alveolar Epithelial Lentivirus immortalized*) bezeichnet werden. Diese Zellen weisen Eigenschaften auf, die denen von Pneumozyten Typ I sehr ähnlich sind und sind unter anderem zur Ausbildung funktionsfähiger Tight Junctions fähig [41]. Aus diesem Grund eignet sich diese Zelllinie optimal als Modell zur Untersuchung des Einflusses von ADAM17 auf junctionale Moleküle und Adhäsionsmoleküle. Auch der Versuchsaufbau ließe sich entsprechend modifizieren. Ein Air-Liquid-Interface-Modell würde eine differenzierte Nachbildung des respiratorischen Epithels ermöglichen, indem es verschiedene Zelltypen wie Flimmerepithelzellen und sekretorische Zellen umfasst. Dies könnte helfen, die Rolle von ADAM17 in einem realitätsnäheren Infektionsszenario mit *P. aeruginosa* zu untersuchen, insbesondere hinsichtlich der Beeinflussung der mukoziliären Clearance und der epithelialen Barrierefunktion [43].

Eine weitere potenzielle Strategie, ergänzend in die Behandlung einer durch *P. aeruginosa* hervorgerufenen Pneumonie einzugreifen, ergibt sich aus den Erkenntnissen, die durch die Stimulationsversuche mit avitalen, hitzeinaktivierten Pseudomonaden gewonnen wurden. Die Auswertung zeigte, dass hierbei keine erhöhte Aktivität der Protease feststellbar war. Im Vergleich zu vorherigen Versuchen, bei denen eine Zunahme der enzymatischen Aktivität nach der Exposition von A549-Zellen gegenüber vitalen *P. aeruginosa* beobachtet wurde, legt die Auswertung der hier gewonnenen Daten nahe, dass die bloße Anwesenheit der bakteriellen Zelle nicht ausreichend ist, um denselben Effekt zu erzielen. Im Unterschied zu den hitzeinaktivierten Bakterien sind lebensfähige *P. aeruginosa* weiterhin in der Lage, Exotoxine zu sezernieren, weshalb diese als Stimulanz notwendig erscheinen, um die intrazelluläre Signalkaskade zur Aktivierung des Enzyms einzuleiten. Ein zusätzlich in dieser Arbeitsgruppe durchgeführter Versuch betrachtete die Stimulation von A549-Zellen ausschließlich mit ExotoxinA, dem wohl prominentesten Exotoxin von *P. aeruginosa* [2]. Hier zeigte sich, ähnlich wie in den Stimulationsversuchen, in welchen vitale Bakterien verwendet wurden, eine deutliche Zunahme der enzymatischen Aktivität von ADAM17. Auch andere

Autoren konnten in durchgeführten Versuchen zeigen, dass nicht das Bakterium selbst notwendig ist, um zelluläre Signalkaskaden auszulösen [63]. Somit stellen auch sezernierte Toxine wichtige pharmakologische Zielstrukturen dar. Eine zielgerichtete Therapie könnte dazu beitragen, die oben beschriebene Aktivierung von ADAM17 und der daraus resultierenden Auswirkungen vorzubeugen. Dies würde auch vereinfacht ermöglichen, lokal die Aktivierung von ADAM17 zu verhindern, ohne eine systemische Inhibition vornehmen zu müssen. Des Weiteren wäre es wichtig, in weiterführenden Forschungsprojekten sowohl die Interaktionspartner als auch den daraus resultierenden Aktivierungsprozess molekular aufzuschlüsseln. Beispielsweise wäre es denkbar die Interaktion zwischen den Erregern und den A549-Zellen durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter *P. aeruginosa* Stämme näher zu betrachten. Weiterhin ist es notwendig zu untersuchen, welche Exotoxine in welchem Umfang zur Aktivierung von ADAM17 beitragen. Beispielsweise zeigte sich eine stärkere Aktivierung des Enzyms nach Stimulation von A549-Zellen mit vitalen *P. aeruginosa* als nach Stimulation mit Exotoxin A [2]. Dies lässt die Vermutung zu, dass neben Exotoxin A, dem wohl prominentesten Vertreter, weitere Exotoxine synergistisch zur beschriebenen Aktivierung beitragen.

8.3 Kritische Betrachtung der durchgeführten Versuchsreihen

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen zeigen insgesamt ein kohärentes Ergebnis, müssen jedoch in einigen Aspekten kritisch betrachtet werden. So zeigt sich bei den in 7.1.1 und 7.1.2 beschriebenen Versuchsreihen bei einem Teilergebnis ein Unterschied hinsichtlich der Expositionsdauer, nach welcher es zu einem vermehrten *Ectodomain-Shedding* von JAM-A kommt. Grundsätzlich wären für diese beiden Versuchsreihen jedoch keine Unterschiede zu erwarten, da der gleiche biologische Prozess abgebildet wird. In den folgend durchgeführten Versuchsreihen zum Thema der Leukozytenadhäsion tritt die Aktivierung von ADAM17 erst nach vierstündiger Exposition auf, sodass dieser zeitliche Ablauf als der Wahrscheinlichere betrachtet werden kann. Eine weitere Unklarheit besteht in der Diskrepanz, welche die beiden *Knockdowns* in der zweiten durchgeführten Versuchsreihe aufweisen. Zu erwarten wäre eine vergleichbarere Konzentration innerhalb der Zellen ohne funktionsfähiges ADAM17 gewesen, jedoch zeigte sich eine deutlich erhöhte Konzentration in *Knockdown 1* im Vergleich zu *Knockdown 2*. Diese Diskrepanz ist prinzipiell durch die unterschiedliche Effizienz der beiden *Knockdowns* passend zu erklären, kann aber nicht mit letzter Sicherheit bewiesen werden. Auch der in 7.2 beschriebene Versuch zum Aktivierungsmechanismus nach Exposition gegenüber *P. aeruginosa* unterliegt Limitationen. Neben der mangelnden Fähigkeit der hitzeinaktivierten Pseudomonaden zur Produktion und Sekretion von Toxinen ist auch die Fähigkeit zur Proliferation unterbunden. Daher bleibt die

Gesamtzahl der zur möglichen Stimulation zur Verfügung stehenden Bakterien und damit die MOI im Gegensatz zu den zuvor durchgeführten Versuchen über den zeitlichen Verlauf hinweg unverändert. Prinzipiell könnte die Stimulation von ADAM17 so auch erst ab einer höheren *Multiplicity of infection* (MOI) stattfinden, welche lediglich in den Versuchsreihen mit erhaltener Vermehrungsfähigkeit von *P. aeruginosa* erreicht würde. Daher ist der Rückschluss auf die Verantwortlichkeit der sezernierten Exotoxine nur eingeschränkt möglich. Dennoch erscheint diese Hypothese jedoch insbesondere auch mit den Daten aus dem zuvor beschriebenen Stimulationsversuch mit Exotoxin A plausibel und stimmig. Gegebenenfalls könnte im Zuge weiterer Betrachtungen Versuchsreihen durchgeführt werden, in denen die MOI der avitalen *P. aeruginosa* erhöht wird, um so diese Option auszuschließen. Zusätzlich liegt neben dem Fehlen der Exotoxine im Versuch 7.2 auch ein weiterer Unterschied im Vergleich zu den Versuchen aus 7.1 und 7.3 vor. Auch der allgemein vorliegende Stress, welcher auf die mit vitalen Pseudomonaden stimulierten Zellen einwirkt, könnte den entscheidenden Faktor zur Einleitung der Signalkaskade darstellen. Hierzu kann jedoch auf einen weiteren Versuch verwiesen werden, welcher in dieser Arbeitsgruppe durchgeführt wurde, in welchem die Stimulation mit *S. pneumoniae* anstelle von *P. aeruginosa* durchgeführt wurde [2]. Auch hier ließ sich ein deutlicher Zellstress nach Stimulation mit den Pseudomonaden erkennen, wobei die Hochregulation der enzymatischen Aktivität von ADAM17 ausblieb, was die Verantwortlichkeit der spezifischen Exotoxine unterstreicht. Eine ähnliche Problematik ergibt sich für die in 7.3 beschriebenen Versuche zur Leukozytenadhäsion an bakteriell stimulierten A549-Zellen. Für den Fall, dass die Aktivität von ADAM17 auch Einfluss auf das Überleben der Epithelzellen im Rahmen einer Infektion mit *P. aeruginosa* nimmt (8.1), ist die unterschiedliche Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten nicht ausschließlich auf molekulare Veränderungen im Bereich der Adhäsionsmoleküle zurückzuführen. Auch eine veränderte Integrität des Zellverbandes könnte eine Rolle spielen, wobei sich die Wichtung der einzelnen Einflussfaktoren nicht eindeutig erkennen ließe.

9 Literaturverzeichnis

1. Alatraktchi FA, Svendsen WE, Molin S (2020) Electrochemical Detection of Pyocyanin as a Biomarker for *Pseudomonas aeruginosa*: A Focused Review. *Sensors* 20:5218
2. Aljohmani A, Andres NN, Yildiz D (2022) *Pseudomonas aeruginosa* Alters Critical Lung Epithelial Cell Functions through Activation of ADAM17. *Cells* 11:2303
3. Alon R, Hammer DA, Springert TA (1995) Lifetime of the P-selectin- carbohydrate bond and its response to tensile force in hydrodynamic flow. 374:4
4. Azam MW, Khan AU (2019) Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov Today* 24:350–359
5. Baumgart A, Seidl S, Vlachou P, Michel L, Mitova N, Schatz N, Specht K, Koch I, Schuster T, Grundler R, Kremer M, Fend F, Siveke JT, Peschel C, Duyster J, Dechow T (2010) ADAM17 Regulates Epidermal Growth Factor Receptor Expression through the Activation of Notch1 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res* 70:5368–5378
6. Berlin C, Bargatze RF α 4 Integrins Mediate Lymphocyte Attachment and Rolling under Physiologic Flow. 10
7. Bolik J, Krause F, Stevanovic M, Gandraß M, Thomsen I, Schacht S-S, Rieser E, Müller M, Schumacher N, Fritsch J, Wichert R, Galun E, Bergmann J, Röder C, Schafmayer C, Egberts J-H, Becker-Pauly C, Saftig P, Lucius R, Schneider-Brachert W, Barikbin R, Adam D, Voss M, Hitzl W, Krüger A, Strilic B, Sagi I, Walczak H, Rose-John S, Schmidt-Arras D (2022) Inhibition of ADAM17 impairs endothelial cell necroptosis and blocks metastasis. *J Exp Med* 219:e20201039
8. Bzowska M, Jura N, Lassak A, Black RA, Bereta J (2004) Tumour necrosis factor- α stimulates expression of TNF- α converting enzyme in endothelial cells: Regulation of ADAM17 expression. *Eur J Biochem* 271:2808–2820
9. Campbell JJ, Hedrick J, Zlotnik A, Siani MA, Thompson DA, Butcher EC (1998) Chemokines and the Arrest of Lymphocytes Rolling Under Flow Conditions. *Science* 279:381–384
10. Chadha J, Harjai K, Chhibber S (2022) Revisiting the virulence hallmarks of *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* : a chronicle through the perspective of quorum sensing. *Environ Microbiol* 24:2630–2656
11. Charbonneau M, Harper K, Grondin F, Pelmus M, McDonald PP, Dubois CM (2007) Hypoxia-inducible Factor Mediates Hypoxic and Tumor Necrosis Factor α -induced Increases in Tumor Necrosis Factor- α Converting Enzyme/ADAM17 Expression by Synovial Cells. *J Biol Chem* 282:33714–33724
12. Diggle SP, Whiteley M (2020) Microbe Profile: *Pseudomonas aeruginosa*: opportunistic pathogen and lab rat. *Microbiology* 166:30–33
13. Dreymueller D, Martin C, Kogel T, Pruessmeyer J, Hess FM, Horiuchi K, Uhlig S, Ludwig A (2012) Lung endothelial ADAM17 regulates the acute inflammatory response to lipopolysaccharide. *EMBO Mol Med* 4:412–423
14. Dreymueller D, Pruessmeyer J, Groth E, Ludwig A (2012) The role of ADAM-mediated shedding in vascular biology. *Eur J Cell Biol* 91:472–485
15. Düsterhöft S, Höbel K, Oldefest M, Lokau J, Waetzig GH, Chalaris A, Garbers C, Scheller J, Rose-John S, Lorenzen I, Grötzinger J (2014) A Disintegrin and Metalloprotease 17 Dynamic Interaction Sequence, the Sweet Tooth for the Human Interleukin 6 Receptor. *J Biol Chem* 289:16336–16348
16. Edwards DR, Handsley MM, Pennington CJ (2008) The ADAM metalloproteinases. *Mol Aspects Med* 29:258–289
17. Filippi M-D (2019) Neutrophil transendothelial migration: updates and new perspectives. *Blood* 133:2149–2158
18. Garton KJ, Gough PJ, Philalay J, Wille PT, Blobel CP, Whitehead RH, Dempsey PJ,

-
- Raines EW (2003) Stimulated Shedding of Vascular Cell Adhesion Molecule 1 (VCAM-1) Is Mediated by Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme (ADAM 17). *J Biol Chem* 278:37459–37464
19. Garton KJ (2006) Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 79:1105–1116
 20. Gellatly SL, Hancock REW (2013) *Pseudomonas aeruginosa* : new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis* 67:159–173
 21. Giese AA, Babendreyer A, Krappen P, Gross A, Strnad P, Düsterhöft S, Ludwig A (2021) Inflammatory activation of surface molecule shedding by upregulation of the pseudoprotease iRhom2 in colon epithelial cells. *Sci Rep* 11:24230
 22. Goldberg JB, Pier GB (1996) *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharides and pathogenesis. *Trends Microbiol* 4:490–494
 23. Goos M (2010) ADAM-17: The Enzyme That Does It All. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 45:146–169
 24. Gould R, Polokoff M, Friedmant A-A, Ncook J Disintegrins: A Family of Integrin Inhibitory Proteins from Viper Venoms(43129~). 4
 25. Hafezi-Moghadam A, Ley K (1999) Relevance of L-selectin Shedding for Leukocyte Rolling In Vivo. *J Exp Med* 189:939–948
 26. Hafezi-Moghadam A, Thomas KL, Prorock AJ, Huo Y, Ley K (2001) L-Selectin Shedding Regulates Leukocyte Recruitment. *J Exp Med* 193:863–872
 27. Hall KC, Blobel CP (2012) Interleukin-1 Stimulates ADAM17 through a Mechanism Independent of its Cytoplasmic Domain or Phosphorylation at Threonine 735. *PLoS ONE* 7:e31600
 28. Hancock REW, Speert DP (2000) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat* 3:247–255
 29. Harada C, Kawaguchi T, Ogata-Suetsugu S, Yamada M, Hamada N, Maeyama T, Souzaki R, Tajiri T, Taguchi T, Kuwano K, Nakanishi Y (2011) EGFR Tyrosine Kinase Inhibition Worsens Acute Lung Injury in Mice with Repairing Airway Epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 183:743–751
 30. Heemskerk N, Schimmel L, Oort C, van Rijssel J, Yin T, Ma B, van Unen J, Pitter B, Huveneers S, Goedhart J, Wu Y, Montanez E, Woodfin A, van Buul JD (2016) F-actin-rich contractile endothelial pores prevent vascular leakage during leukocyte diapedesis through local RhoA signalling. *Nat Commun* 7:10493
 31. Hill AT, Gold PM, El Solh AA, Metlay JP, Ireland B, Irwin RS (2019) Adult Outpatients With Acute Cough Due to Suspected Pneumonia or Influenza. *Chest* 155:155–167
 32. Horiuchi K, Kimura T, Miyamoto T, Takaishi H, Okada Y, Toyama Y, Blobel CP (2007) Cutting Edge: TNF- α -Converting Enzyme (TACE/ADAM17) Inactivation in Mouse Myeloid Cells Prevents Lethality from Endotoxin Shock. *J Immunol* 179:2686–2689
 33. Horiuchi K (2013) A Brief History of Tumor Necrosis Factor α – converting Enzyme: An Overview of Ectodomain Shedding. *Keio J Med* 62:29–36
 34. Huo Y, Hafezi-Moghadam A, Ley K (2000) Role of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 and Fibronectin Connecting Segment-1 in Monocyte Rolling and Adhesion on Early Atherosclerotic Lesions. *Circ Res* 87:153–159
 35. Jurado-Martín I, Sainz-Mejías M, McClean S (2021) *Pseudomonas aeruginosa*: An Audacious Pathogen with an Adaptable Arsenal of Virulence Factors. *Int J Mol Sci* 22:3128
 36. Kadono T, Venturi GM, Steeber DA, Tedder TF (2002) Leukocyte Rolling Velocities and Migration Are Optimized by Cooperative L-Selectin and Intercellular Adhesion Molecule-1 Functions. *J Immunol* 169:4542–4550
 37. Kansas G (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* 88:3259–3287

-
38. Kato T, Hagiyaama M, Ito A (2018) Renal ADAM10 and 17: Their Physiological and Medical Meanings. *Front Cell Dev Biol* 6:153
 39. Kerwat K, Graf J, Wulf H (2010) Krankenhaushygiene – Nosokomiale Infektionen. *AINS - Anästhesiol · Intensivmed · Notfallmedizin · Schmerzther* 45:30–31
 40. Koenen RR, Pruessmeyer J, Soehnlein O, Fraemohs L, Zernecke A, Schwarz N, Reiss K, Sarabi A, Lindbom L, Hackeng TM, Weber C, Ludwig A (2009) Regulated release and functional modulation of junctional adhesion molecule A by disintegrin metalloproteinases. *Blood* 113:4799–4809
 41. Kuehn A (2016) Human alveolar epithelial cells expressing tight junctions to model the air-blood barrier. *ALTEX*
 42. Laudanna C, Kim JY, Constantin G, Butcher EC (2002) Rapid leukocyte integrin activation by chemokines: Constantin et al · Chemokines and integrin activation. *Immunol Rev* 186:37–46
 43. Lee RE, Reidel B, Nelson MR, Macdonald JK, Kesimer M, Randell SH (2024) Air-Liquid Interface Cultures to Model Drug Delivery through the Mucociliary Epithelial Barrier.
 44. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678–689
 45. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678–689
 46. Long C, Hosseinkhani MR, Wang Y, Sriramaraio P, Walcheck B (2012) ADAM17 activation in circulating neutrophils following bacterial challenge impairs their recruitment. *J Leukoc Biol* 92:667–672
 47. Lorenzen I, Lokau J, Düsterhöft S, Trad A, Garbers C, Scheller J, Rose-John S, Grötzinger J (2012) The membrane-proximal domain of A Disintegrin and Metalloprotease 17 (ADAM17) is responsible for recognition of the interleukin-6 receptor and interleukin-1 receptor II. *FEBS Lett* 586:1093–1100
 48. Lorenzen I, Lokau J, Korpys Y, Oldefest M, Flynn CM, Künzel U, Garbers C, Freeman M, Grötzinger J, Düsterhöft S (2016) Control of ADAM17 activity by regulation of its cellular localisation. *Sci Rep* 6:35067
 49. Mandell KJ, McCall IC, Parkos CA (2004) Involvement of the Junctional Adhesion Molecule-1 (JAM1) Homodimer Interface in Regulation of Epithelial Barrier Function. *J Biol Chem* 279:16254–16262
 50. Mandell KJ, Holley GP, Parkos CA, Edelhauser HF (2006) Antibody Blockade of Junctional Adhesion Molecule-A in Rabbit Corneal Endothelial Tight Junctions Produces Corneal Swelling. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 47:2408
 51. Martìn-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional Adhesion Molecule, a Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily That Distributes at Intercellular Junctions and Modulates Monocyte Transmigration. *J Cell Biol* 142:117–127
 52. McEver RP, Cummings RD (1997) Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J Clin Invest* 100:485–491
 53. Montresor A, Toffali L, Constantin G, Laudanna C (2012) Chemokines and the Signaling Modules Regulating Integrin Affinity. *Front Immunol* 3:
 54. Murphy G (2008) The ADAMs: signalling scissors in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 8:932–941
 55. Nourshargh S, Alon R (2014) Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. *Immunity* 41:694–707
 56. Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin T-J, Cheng Z (2019) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv* 37:177–192

-
57. Peleg AY, Hooper DC (2010) Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med* 362:1804–1813
 58. Peschon JJ, Slack JL, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA (1998) An Essential Role for Ectodomain Shedding in Mammalian Development. *Science* 282:1281–1284
 59. Plumb J, McQuaid S, Cross AK, Surr J, Haddock G, Bunning RA, Woodroffe MN (2006) Upregulation of ADAM-17 expression in active lesions in multiple sclerosis. *Mult Scler J* 12:375–385
 60. Pollack M (1983) The Role of Exotoxin A in *Pseudomonas* Disease and Immunity. *Clin Infect Dis* 5:S979–S984
 61. Pruessmeyer J, Martin C, Hess FM, Schwarz N, Schmidt S, Kogel T, Hoettecke N, Schmidt B, Sechi A, Uhlig S, Ludwig A (2010) A Disintegrin and Metalloproteinase 17 (ADAM17) Mediates Inflammation-induced Shedding of Syndecan-1 and -4 by Lung Epithelial Cells. *J Biol Chem* 285:555–564
 62. Qin S, Xiao W, Zhou C, Pu Q, Deng X, Lan L, Liang H, Song X, Wu M (2022) *Pseudomonas aeruginosa*: pathogenesis, virulence factors, antibiotic resistance, interaction with host, technology advances and emerging therapeutics. *Signal Transduct Target Ther* 7:199
 63. Raoust E, Balloy V, Garcia-Verdugo I, Touqui L, Ramphal R, Chignard M (2009) *Pseudomonas aeruginosa* LPS or Flagellin Are Sufficient to Activate TLR-Dependent Signaling in Murine Alveolar Macrophages and Airway Epithelial Cells. *PLoS ONE* 4:e7259
 64. Saad, Rose-John, Jenkins (2019) ADAM17: An Emerging Therapeutic Target for Lung Cancer. *Cancers* 11:1218
 65. Schot MJC, Dekker ARJ, Giorgi WG, Hopstaken RM, de Wit NJ, Verheij TJM, Cals JWL (2018) Diagnostic value of signs, symptoms and diagnostic tests for diagnosing pneumonia in ambulant children in developed countries: a systematic review. *Npj Prim Care Respir Med* 28:40
 66. Seals DF, Courtneidge SA (2003) The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev* 17:7–30
 67. Seifert A, Wozniak J, Düsterhöft S, Kasperek P, Sedlacek R, Dreschers S, Orlikowsky TW, Yildiz D, Ludwig A (2020) The iRhom2/ADAM17 Axis Attenuates Bacterial Uptake by Phagocytes in a Cell Autonomous Manner. *Int J Mol Sci* 21:5978
 68. Shamri R, Grabovsky V, Gauguet J-M, Feigelson S, Manevich E, Kolanus W, Robinson MK, Staunton DE, von Andrian UH, Alon R (2005) Lymphocyte arrest requires instantaneous induction of an extended LFA-1 conformation mediated by endothelium-bound chemokines. *Nat Immunol* 6:497–506
 69. Takeda S, Igarashi T, Mori H, Araki S (2006) Crystal structures of VAP1 reveal ADAMs' MDC domain architecture and its unique C-shaped scaffold. *EMBO J* 25:2388–2396
 70. Takeda S (2009) Three-dimensional domain architecture of the ADAM family proteinases. *Semin Cell Dev Biol* 20:146–152
 71. Tang ML, Steeber DA, Zhang XQ, Tedder TF (1998) Intrinsic differences in L-selectin expression levels affect T and B lymphocyte subset-specific recirculation pathways. *J Immunol Baltim Md 1950* 160:5113–5121
 72. Tousseyn T, Jorissen E, Reiss K, Hartmann D (2006) (Make) Stick and cut loose—Disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res Part C Embryo Today Rev* 78:24–46
 73. Tsakadze NL, Sithu SD, Sen U, English WR, Murphy G, D'Souza SE (2006) Tumor Necrosis Factor- α -converting Enzyme (TACE/ADAM-17) Mediates the Ectodomain Cleavage of Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1). *J Biol Chem* 281:3157–3164

-
74. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K (1980) Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26:171–176
 75. Vestweber D (2015) How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nat Rev Immunol* 15:692–704
 76. Wang H, Zang C, Liu XS, Aster JC (2015) The Role of Notch Receptors in Transcriptional Regulation: NOTCH AND TRANSCRIPTION. *J Cell Physiol* 230:982–988
 77. Weber C, Fraemohs L, Dejana E (2007) The role of junctional adhesion molecules in vascular inflammation. *Nat Rev Immunol* 7:467–477
 78. Williams LA, Martin-Padura I, Dejana E, Hogg N, Simmons DL (1999) Identification and characterisation of human Junctional Adhesion Molecule (JAM). *Mol Immunol* 14
 79. Wojcikiewicz EP, Koenen RR, Fraemohs L, Minkiewicz J, Azad H, Weber C, Moy VT (2009) LFA-1 Binding Destabilizes the JAM-A Homophilic Interaction During Leukocyte Transmigration. *Biophys J* 96:285–293
 80. Woodfin A, Reichel CA, Khandoga A, Corada M, Voisin M-B, Scheiermann C, Haskard DO, Dejana E, Krombach F, Nourshargh S (2007) JAM-A mediates neutrophil transmigration in a stimulus-specific manner in vivo: evidence for sequential roles for JAM-A and PECAM-1 in neutrophil transmigration. *Blood* 110:1848–1856
 81. Yamashita Y, Shimada M (2012) The Release of EGF Domain from EGF-like Factors by a Specific Cleavage Enzyme Activates the EGFR-MAPK3/1 Pathway in Both Granulosa Cells and Cumulus Cells During the Ovulation Process. *J Reprod Dev* 58:510–514
 82. Yang J, Tsuei K-SC, Shen E (2022) The role of Type III secretion system in the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* microbial keratitis. *Tzu Chi Med J* 34:8
 83. Zunke F, Rose-John S (2017) The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 1864:2059–2070
 84. (2021) An inside look at a biofilm: *Pseudomonas aeruginosa* flagella biotracking. *Sci Adv* 16
 85. Leukocytes require ADAM10 but not ADAM17 for their migration and inflammatory recruitment into the alveolar space | Elsevier Enhanced Reader. URL: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006497120400515?token=DFAB4D85AC98729E93E6BAC51002629EC5D60FDDAD79CE2259300A58679552C6252F3936B51366AAB8D91A04AFF0E219&originRegion=eu-west-1&originCreation=20221013083203>

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

11 Deklaration (Eidesstattliche Erklärung)

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 2

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir **die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Art und Weise unentgeltlich geholfen:**

	Name/Tätigkeit	Art der Hilfestellung
1.	Dr. rer. nat. Ahmad Aljohmani	Herstellung der lentiviralen Partikel zur Transduktion

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberaterinnen/Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder in ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Die Bedeutung der eidesstattlichen Erklärung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Erklärung sind mir bekannt.

Ort, Datum

Unterschrift der/des Promovierenden

12 Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung vieler Menschen nicht möglich gewesen und ich möchte die Gelegenheit nutzen, mich herzlich bei ihnen zu bedanken.

Mein tiefster Dank gilt meiner Doktormutter und Betreuerin, Prof. Dr. Daniela Yildiz, die mich mit großer fachlicher Expertise, wertvollen Anregungen und unermüdlicher Unterstützung durch meine Promotion geführt hat. Ihre Tür stand mir immer offen und ihre konstruktive Kritik sowie ihr Vertrauen in meine Arbeit haben mich nicht nur wissenschaftlich, sondern auch persönlich wachsen lassen. Für ihre Geduld, Motivation und die vielen ermutigenden Worte bin ich ihr außerordentlich dankbar. Ich danke ihr besonders für die Unterstützung bei der Planung und Ausführung der Versuchsreihen, die Hilfe bei der Auswertung und Einordnung meiner Ergebnisse sowie für ihre Bemühungen bei der schriftlichen Ausführung dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gebührt Dr. rer. nat. Ahmad Aljohmani, der mir mit seiner Erfahrung und seinem beeindruckenden Fachwissen eine unschätzbare Stütze war. Er hat mir in vielen schwierigen Momenten weitergeholfen – sei es durch kluge Ratschläge, durch das gemeinsame Lösen kniffliger experimenteller Probleme oder einfach durch ein offenes Ohr, wenn es mal nicht so lief. Seine Unterstützung hat mir nicht nur geholfen, diese Arbeit zu meistern, sondern mir auch gezeigt, was echte wissenschaftliche Kollegialität bedeutet.

Maria Rieseweber danke ich von Herzen für ihre unschätzbare Hilfe bei der Zellkultur. Ihre präzise Arbeitsweise, ihre Geduld und ihr wertvolles Wissen haben mir nicht nur das Arbeiten erleichtert, sondern auch dazu beigetragen, dass meine Experimente erfolgreich durchgeführt werden konnten. Ihre Unterstützung hat mir nicht nur viele Nerven, sondern auch wertvolle Zeit erspart.

Nina Schnellbach möchte ich für ihre großartige Unterstützung bei den Analyseverfahren, insbesondere beim Western Blot, danken. Ihre Erfahrung und ihr Wissen waren für mich von unschätzbarem Wert und ich habe viel von ihr gelernt. Ohne ihre Hilfe wären viele meiner Ergebnisse nicht in dieser Form möglich gewesen und ich bin ihr für ihre Geduld und ihr Engagement außerordentlich dankbar.

Auch Dr. Guillermo Gharzia möchte ich herzlich danken. Der Austausch mit ihm war stets inspirierend, seine Unterstützung im Labor unbezahlbar und die gemeinsame Zeit – sowohl innerhalb als auch außerhalb des Instituts – hat die Promotion um vieles angenehmer gemacht.

Nicht zu vergessen sind all meine Kolleginnen und Kollegen, die durch ihren fachlichen Rat, die aufmunternden Gespräche und die wunderbare Arbeitsatmosphäre dazu beigetragen haben, dass ich mich stets gut aufgehoben gefühlt habe. Wissenschaft lebt von Austausch und Zusammenarbeit und ich bin dankbar, Teil eines so unterstützenden und freundlichen Umfelds gewesen zu sein.

Abschließend geht mein tiefster Dank an meine Familie und meine Freunde. Ohne ihre bedingungslose Unterstützung, ihr Verständnis und ihre Geduld wäre diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Diese Dissertation ist das Ergebnis vieler Menschen, die mich auf diesem Weg begleitet haben – euch allen gilt mein aufrichtiger und herzlicher Dank.

Tag der Promotion: 27.01.2026

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Matthias Hannig

Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Daniela Yildiz

Prof. Dr. Prof. Dr. sc. nat. Markus Bischoff