

Universitätsklinik Tübingen
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Direktor: Prof. Dr. med. Peter Rosenberger

**„Einfluss von Netrin-4 auf die
Neutrophilen-Endothel-Interaktion“**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Kohler, Tobias

2023

Dekan:	Professor Dr. rer. nat. Bernd Pichler
1. Berichterstatter:	Professor Dr. med. Peter Rosenberger
2. Berichterstatter:	Professor Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Tag der Disputation:	16.10.2023

Meiner verstorbenen Tante Iris

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	7
TABELLENVERZEICHNIS	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
1 EINLEITUNG	12
1.1 Netrin-4.....	12
1.1.1 Struktur und Funktionen	13
1.1.2 Interaktionspartner.....	15
1.1.3 Bedeutung im Rahmen inflammatorischer Prozesse	16
1.2 Interaktion neutrophiler Granulozyten mit dem Endothel.....	17
1.2.1 Selektine und ihre Liganden	19
1.2.2 Integrine	20
1.2.3 Weitere Regulationsmechanismen	22
1.2.4 Modulation im Rahmen von Hypoxie und Inflammation	23
1.3 Hypoxie und Ischämie-Reperfusionsschaden	25
1.3.1 Myokardinfarkt.....	27
1.4 Fragestellung.....	29
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 Material.....	30
2.1.1 Geräte und Utensilien	30
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.3 Reagenzien und Lösungen.....	33
2.1.4 Zelleexperimente	34
2.1.5 ELISAs	35
2.1.6 RNA-Isolation und qPCR.....	35
2.1.7 Granulozytenisolation und Durchflusszytometrie	36
2.1.8 Adhäsionsflusskammern.....	37
2.1.9 Murine Tierversuche.....	37
2.1.10 Histologie	38
2.1.11 Puffer und Lösungen aus eigener Herstellung	39
2.1.12 Software	40
2.2 Hypoxie von HMEC-Zellen	41
2.2.1 Zelllinien und -kultur	41
2.2.2 Hypoxiekammer und Versuchsablauf	42
2.2.3 Konditionen	43
2.2.4 Netrin-4-Konzentration im Überstand mittels ELISA	43
2.2.5 mRNA-Analyse mittels qPCR	44
2.2.6 Immunfluoreszenz-Färbung von HMEC-Zellen	49

2.3	Netrin-4-Stimulation von neutrophilen Granulozyten	51
2.3.1	Blutentnahme und Granulozytenisolation mittels Percoll-Methode.....	51
2.3.2	Konditionen und Stimulation	52
2.3.3	Durchflusszytometrische Analyse der Adhäsionsmoleküle	54
2.4	Adhäsionsflussskammern	55
2.4.1	Blutentnahme	57
2.4.2	Konditionen, Stimulationen und Antikörper-Inkubationen.....	57
2.4.3	Mikroskopie, Auswertung und Parameter	58
2.5	Transwell Migration Assay.....	58
2.5.1	Blutentnahme und Granulozytenisolation mittels Percoll-Methode.....	59
2.5.2	Konditionen und Stimulation	59
2.5.3	Versuchsablauf und Analyse	60
2.6	Leukozyten-Intravitalmikroskopie des Ischämie-Reperfusionseffekts am murinen M. cremaster	61
2.6.1	Versuchstiere und Gruppen.....	61
2.6.2	Versuchsablauf und Präparation.....	62
2.6.3	Intravitalmikroskopie, Auswertung und Parameter.....	62
2.7	Murines myokardiales Ischämie-Reperfusionsmodell mittels temporärer LAD-Okklusion	63
2.7.1	Versuchstiere und Gruppen.....	63
2.7.2	Operationen und Euthanasie	64
2.7.3	Infarktgrößenbestimmung.....	67
2.7.4	Immunfluoreszenzhistologie	68
2.8	Statistik.....	71
3	ERGEBNISSE	73
3.1	Netrin-4 während Hypoxie in Endothelzellen.....	73
3.1.1	ELISA-Detektion von sezerniertem Netrin-4 im Überstand	73
3.1.2	Genexpressionsanalysen von Netrin-4 mit RT-PCR	74
3.1.3	Immunfluoreszenzmikroskopie von Netrin-4	76
3.2	Zelluläre Effekte von Netrin-4 auf neutrophile Granulozyten	77
3.3	Einfluss von Netrin-4 auf die Adhäsion und Transmigration von neutrophilen Granulozyten	80
3.3.1	Adhäsionsverhaltensanalyse neutrophiler Granulozyten mit Adhäsionsflussskammern.....	80
3.3.2	Untersuchung des Adhäsions- und Transmigrationsverhaltens mittels M. cremaster-Intravitalmikroskopie	84
3.3.3	Transmigrationsverhalten neutrophiler Granulozyten im Transmigrations-Assay	87
3.4	Auswirkung von Netrin-4 auf den akuten Ischämie-Reperfusionsschaden im Rahmen einer Myokardischämie	88
3.4.1	Einfluss einer exogenen Netrin-4-Applikation	88
3.4.2	Sekretion von Netrin-4.....	89

3.4.3	Auswirkungen einer Netrin-4-Depletion	92
3.4.4	Wirkung gewebespezifischer Knockouts von Netrin-4	94
3.4.5	Effekte eines Neogenin-Knockouts in Bezug auf die Netrin-4- Wirkung	98
4	DISKUSSION	100
4.1	Interpretation der vorliegenden Ergebnisse	100
4.1.1	Expression von Netrin-4 in Endothelzellen während Hypoxie	100
4.1.2	Effekte von Netrin-4 auf die Migrationsbiologie von neutrophilen Granulozyten	102
4.1.3	Netrin-4-Wirkung auf einen myokardialen Ischämie- Reperfusionsschaden	107
4.2	Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Datenlage	109
4.3	Klinische und therapeutische Implikationen	114
4.4	Limitationen	122
4.5	Schlussfolgerung und Perspektive	125
5	ZUSAMMENFASSUNG	127
6	LITERATURVERZEICHNIS	129
7	EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	141
8	VERÖFFENTLICHUNGEN	142

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematischer Aufbau von Netrin-4	13
Abbildung 2: Flusskammeraufbau	56
Abbildung 3: Darstellung der LAD-Ligatur	66
Abbildung 4: Netrin-4 Konzentration im Überstand von Endothelzellen	73
Abbildung 5: Netrin-4-Expression von Endothelzellen auf 18S normalisiert...	75
Abbildung 6: Immunfluoreszenz von HMEC-Zellen	77
Abbildung 7: Expressionsveränderung von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von PMNs	78
Abbildung 8: Rollgeschwindigkeit humaner PMNs in Flusskammer	81
Abbildung 9: Vorgehen zur Messung der Rollgeschwindigkeit im Flusskammer-Modell	82
Abbildung 10: Ergebnisse des murinen In-vivo-M.-Cremaster-Modells	85
Abbildung 11: Vorgehen zur Messung der Rollgeschwindigkeit im murinen M. cremaster-Modell	85
Abbildung 12: Anzahl an transmigrierten PMNs in Transwell Migration Assay	88
Abbildung 13: Infarktgrößen und Serum-cTnl-Spiegel nach LAD- Okklusionsmodell mit exogener Netrin-4-Applikation	89
Abbildung 14: Serum-Konzentration von Netrin-4 im murinen LAD- Okklusionsmodell	90
Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von histologischen Präparaten muriner Herzen nach myokardialer Ischämie- und Reperfusion mit cTnl	91
Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung von histologischen Präparaten muriner Herzen nach myokardialer Ischämie- und Reperfusion mit VE-Cadh.	91
Abbildung 17: Infarktgrößen und Serum-cTnl-Spiegel nach LAD- Okklusionsmodell mit Netrin-4-Depletion sowie exogener Netrin-4-Applikation	92
Abbildung 18: Transmigration neutrophiler Granulozyten ins murine Myokard	93
Abbildung 19: Infarktgrößen und Serum-cTnl-Spiegel nach LAD- Okklusionsmodell mit gewebespezifischem Netrin-4- Knockout	96
Abbildung 20: Infarktgrößen und Serum-cTnl-Spiegel nach LAD- Okklusionsmodell mit endothelialelem Netrin-4-Knockout	97
Abbildung 21: Infarktgrößen und Serum-cTnl-Spiegel nach LAD- Okklusionsmodell mit Neogenin-Knockout sowie exogener Netrin-4-Applikation	98

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte und Utensilien	30
Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien	31
Tabelle 3: Reagenzien und Lösungen	33
Tabelle 4: Zelleexperimente	34
Tabelle 5: ELISAs	35
Tabelle 6: RNA-Isolation und qPCR	35
Tabelle 7: Granulozytenisolation und Durchflusszytometrie	36
Tabelle 8: Adhäsionsflussskammern	37
Tabelle 9: Murine Tierversuche	37
Tabelle 10: Histologie	38
Tabelle 11: Puffer und Lösungen aus eigener Herstellung	39
Tabelle 12: Software	40
Tabelle 13: Ablauf RNA-Isolation	46
Tabelle 14: Ablauf Umschrieb der RNA in cDNA	47
Tabelle 15: Ablauf RT-qPCR	48
Tabelle 16: Ablauf Immunfluoreszenzfärbung HMEC-Zellen	50
Tabelle 17: Antikörper für HMEC-Immunfluoreszenz	51
Tabelle 18: Stimulationslösungen	52
Tabelle 19: Antikörper für FACS-Staining	53
Tabelle 20: Laser des FACS CANTO II	54
Tabelle 21: Adhäsionsmoleküle für FC	56
Tabelle 22: Antikörper für Flusskammer	57
Tabelle 23: Stimulationslösungen TEM	60
Tabelle 24: Cre-Linien	64
Tabelle 25: Entwässerung und Entparaffinierung	69
Tabelle 26: Entparaffinierung und Rehydrierung	70
Tabelle 27: Antikörper für Histologie	71

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Erklärung
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
AAR	engl.: <i>Area at risk</i> / Risikogebiet
ABTS	2,2'-Azino-di (3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure)
AF	Alexa Fluor
AK	Antikörper
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
cDNA	engl.: <i>complementary DNA</i> / komplementäre DNA
cTnI	engl.: <i>cardiac Troponin I</i> / kardiales Troponin I
DCC	engl.: <i>deleted in colorectal cancer</i> / gelöscht bei Darmkrebs
DNA	engl.: <i>desoxyribonucleic acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
EDTA	engl.: <i>ethylenediaminetetra acid</i> / Ethylenediamintetraessigsäure
EGF	engl.: <i>epidermal growth factor</i> / epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> / Enzymgebundener Immunoassay
FACS	engl.: <i>fluorescence-activated cell sorter</i> / Durchflusszytometrie
FCS	engl.: <i>fetal calf serum</i> / fetales Kälberserum
fMLP	N-Formylmethionin-leucyl-phenylalanin
FSC	engl.: <i>forward scattering</i> / Vorwärtsstreuung
g	engl.: <i>gravity</i> / Beschleunigung
h	engl.: <i>hours</i> / Stunden
HBSS	engl.: <i>Hank's balanced salt solution</i> / Hanks ausgewogene Salzlösung
Hif-1	engl.: <i>hypoxia-inducible factor-1</i> / Hypoxie-induzierter Faktor 1
HMEC	engl.: <i>human microvascular endothelial cells</i> / humane mikrovaskuläre Endothelzellen
hNtn4	Humanes Netrin-4

HUVEC	engl.: <i>human umbilical vein endothelial cells</i> / humane Endothelzellen der Nabelvene
ICAM	engl.: <i>intracellular adhesion molecule-1</i> / intrazelluläres Adhäsionsmolekül-1
ICR	Intercostalraum
IgG	Immunglobulin G
I/R	Ischämie / Reperfusion
kDa	Kilodalton
LAD	engl.: <i>left descending artery</i> / Ramus interventricularis anterior
MFI	engl.: <i>mean fluorescence intensity</i> / mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
min	Minuten
Mio.	Millionen
MIR	engl.: <i>myocardial infarction reperfusion</i> / Herzinfarkt und Reperfusion
ml	Milliliter
mNtn4	Murines Netrin-4
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	engl.: <i>messenger RNA</i> / Boten-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NF-κB	engl.: <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> / Kernfaktor Kappa-Leicht-Ketten-Verstärker aktivierter B-Zellen
NFW	engl.: <i>nuclease free water</i> / Nuklease freies Wasser
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NSTEMI	engl.: <i>non-ST-elevation myocardial infarction</i> / Nicht-ST-Hebungsinfarkt
NTC	engl.: <i>non template control</i> / Negativkontrolle
Ntn4	Netrin-4
PAH	engl.: <i>pulmonary arterial hypertension</i> / pulmonal-arterielle Hypertonie

PBS ⁻	engl.: <i>phosphat-buffered saline</i> (ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺)
PCR	engl.: <i>polymerase chain reaction</i> / Polymerase Kettenreaktion
PEEP	engl.: <i>positive endexpiratory pressure</i> / positiver endexpiratorischer Druck
PFA	Paraformaldehyd
pg	Pikogramm
PMN	engl.: <i>polymorphonuclear neutrophil</i> / neutrophiler Granulozyt
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1
qPCR	engl.: <i>quantitative PCR</i> / quantitative PCR
rhNtn4	rekombinantes humanes Netrin-4
rmNtn4	rekombinantes murines Netrin-4
RNA	engl.: <i>ribonucleic acid</i> / Ribonukleinsäure
ROS	engl.: <i>reactive oxygen species</i> / reaktive Sauerstoffspezies
rpm	engl.: <i>rounds per minute</i> / Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion
SD	engl.: <i>standard deviation</i> / Standardabweichung
sek	Sekunden
SSC	engl.: <i>side scattering</i> / Seitwärtsstreuung
siRNA	engl.: <i>small interfering RNA</i> / kleine interferierende RNA
STEMI	engl.: <i>ST-elevation myocardial infarction</i> / ST-Hebungsinfarkt
TBS	engl.: <i>tris-buffered saline</i> / Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBST	engl.: <i>tris-buffered saline + Tween</i> / Tris gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TIMP	engl.: <i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i> / Gewebeinhibitoren von Metalloproteinasen
TNF- α	engl.: <i>tumor necrosis factor α</i> / Tumor-Nekrose-Faktor α
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	Triphenyltetrazoliumchlorid
t-PA	engl.: <i>tissue-type plasminogen activator</i> / gewebespezifischer Plasminogenaktivator
VEGF	engl.: <i>vascular endothelial growth factor</i> / vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Netrin-4

Netrine gehören neben den Semaphorinen, Slit Proteinen, Ephrinen und den repulsiven Guidance Molekülen zu den Neuronalen Guidance Proteinen (Keller et al., 2021). Bevor näher auf die Funktionen von Netrin-4 eingegangen wird, sollen die Struktur sowie die Systematik der Netrine beleuchtet werden. Die Neuronalen Guidance Proteine – und dementsprechend auch die Netrine – wurden als Proteine erforscht, die eine Rolle in der neuronalen Entwicklung und dort besonders beim Richtungswachstum von Axonen spielen (Ishii et al., 1992, Kennedy et al., 1994, beide zitiert nach Culotti und Kolodkin, 1996, Larrieu-Lahargue et al., 2012).

Das erste entdeckte Protein aus der Familie der Netrine war 1990 UNC-6, welches das axonale Wachstum in der dorsalen und ventralen Körperachse leitet und in *Caenorhabditis elegans* entdeckt wurde (Ishii et al., 1992, zitiert nach Culotti und Kolodkin, 1996, Hedgecock et al., 1990). Alle Netrine gehören der Super-Familie der Laminine an, wobei Laminine strukturelle Komponenten der Basalmembranen sind (Ishii et al., 1992, zitiert nach Rajasekharan und Kennedy, 2009, Yurchenco und Wadsworth, 2004). Die Netrin-Familie umfasst unter anderem Netrin-1, Netrin-2 und Netrin-3 (Serafini et al., 1994, Wang et al., 1999). Zur Familie der Netrine gehören außerdem Netrin-G1 sowie Netrin-G2, welche beide über einen Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker in der Zellmembran verankert sind (Nakashiba et al., 2002, Nakashiba et al., 2000). Das einzige Netrin mit einer größeren Ähnlichkeit zur β -Kette als zur γ -Kette der Laminine ist Netrin-4, das deswegen auch β -Netrin genannt wird (Koch et al., 2000). Bei Netrin-4 handelt es sich um ein nicht-enzymatisches, sezerniertes, extrazelluläres Protein, das intrazellulär in Vesikeln gespeichert wird (Reuten et al., 2016, Zhang et al., 2021, Yin et al., 2000). Die Rolle von Netrin-4 im Zusammenhang mit Hypoxie und Gewebeinfarkt sowie dem Immunsystem ist derzeit nicht ausreichend verstanden, weswegen diese Arbeit durchgeführt wurde.

1.1.1 Struktur und Funktionen

Netrin-4 besteht aus 628 Aminosäuren und analog zu den anderen Netrinen aus sechs verschiedenen Domänen (siehe Abbildung 1) (Yin et al., 2000). Netrine enthalten am N-Terminus beginnend als erstes eine Signalsequenz ,S'. Darauf folgen vier den Lamininen sehr ähnliche Domänen. Als erstes ist die Domäne ,VI' zu nennen, die über ein Drittel von Netrin-4 ausmacht und der β -Kette der Laminine ähnelt (Serafini et al., 1994, Yin et al., 2000). Als nächstes folgen die drei Domänen ,V-1', ,V-2' und ,V-3', die aus EGF- (engl.: *epidermal growth factor*) artigen Wiederholungen bestehen (Serafini et al., 1994). Abgeschlossen wird das Protein am C-Terminus von der Domäne ,C' oder auch ,NTR' genannt, die keiner Domäne der Laminine, sondern der Domäne der TIMPs (engl.: *tissue inhibitors of metalloproteinases*) ähnelt (Bányai und Patthy, 1999, Serafini et al., 1994). Netrin-4 kann sowohl als Monomer als auch als stabileres Dimer existieren (Reuten et al., 2016). Netrin-4 ist eine Komponente von Basalmembranen und in Laminin-Polymere integriert (Schneiders et al., 2007).

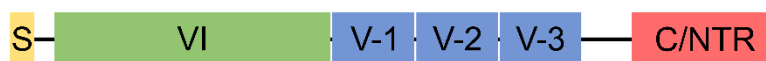


Abbildung 1: Schematischer Aufbau von Netrin-4

Dargestellt sind die sechs verschiedenen Domänen von Netrin-4, Skizze erstellt nach Yin et al. (2000)

Laminin-Netzwerke und Basalmembranen, in die Laminin-Netzwerke eingebaut sind, können durch Netrin-4 zerstört und im Aufbau behindert werden, indem Netrin-4 an die γ -Kette der Laminine bindet (Reuten et al., 2016). Netrin-4 erhöht die Adhäsionsfähigkeit von Endothelzellen an die extrazelluläre Matrix und wird hauptsächlich in Basalmembranen von verschiedenen Organen exprimiert (Koch et al., 2000, Yin et al., 2000, beide zitiert nach Barallobre et al., 2005, Zhang et al., 2021). Wie bereits in Kapitel 1.1 erwähnt, spielt Netrin-4 eine Rolle in der neuronalen Entwicklung und hierbei hauptsächlich als Leiter des axonalen Wachstums (Koch et al., 2000). Ebenfalls hat Netrin-4 bei der Angiogenese eine Funktion: Einige Studien zeigen für Netrin-4 einen anti-angiogenetischen Effekt (Dakouane-Giudicelli et al., 2015, Eveno et al., 2011, Han et al., 2015a, Lejmi et

al., 2008, Lejmi et al., 2014), andere hingegen sprechen von einem pro-angiogenetischen Effekt (Hoang et al., 2009, Lambert et al., 2012, Wilson et al., 2006). Lee und Kollegen folgerten 2020, dass der angiogenetische Effekt vermutlich mit der Konzentration von Netrin-4 zusammenhängt: Netrin-4 in einer niedrigen Konzentration (<200ng/ml) aktiviert kleine endotheliale Vorläuferzellen; in einer hohen Konzentration (>500ng/ml) hingegen wird deren Aktivität gehemmt. Die auto- und parakrine Aktivierung von endothelialen Vorläuferzellen erfolgt durch von Netrin-4 induzierte Angiogenese-Faktoren (Lee et al., 2020). Auch Reuten et al. zeigten bereits 2016, dass Netrin-4 in höheren Konzentrationen (1000nmol/l) ein Ausbilden von schlauchförmigen Strukturen – den Ausgangstrukturen für eine Gefäßbildung – verhindert (Reuten et al., 2016). Ebenfalls induziert Netrin-4 die eng mit der Angiogenese verwandte Lymphangiogenese (Larrieu-Lahargue et al., 2010). Die Netrin-4-vermittelten Effekte sind auch bei HUVEC-Experimenten (engl.: *human umbilical vein endothelial cell*) dosisabhängig. Bei Konzentrationen von 5000ng/ml werden die Proliferation, Migration sowie Invasion vermindert und wird die Apoptose gesteigert; bei Konzentrationen von 100ng/ml verhalten sich die Auswirkungen konträr (Han et al., 2015a). Ein Altern von Endothelzellen wird durch Netrin-4 inhibiert, wohingegen durch einen Netrin-4-Knockout oder anderweitig bedingt erniedrigte Spiegel von Netrin-4 ein schnelleres Altern induziert wird (Zhang et al., 2021). Netrin-4 kann ebenfalls in der Onkologie sowohl einen protektiven als auch einen nicht protektiven Einfluss haben. Allgemein scheinen Netrin-4-abhängige Signalwege bei der Karzinomentstehung eine Rolle zu spielen (Cirulli und Yebra, 2007, zitiert nach Eveno et al., 2013). Eine Überexpression von Netrin-4 führt beim kolorektalen Karzinom zu einem langsameren Wachstum des Primarius, zu einer Reduktion von Lungen- bzw. Lebermetastasen, zu einer Hemmung der tumorassoziierten Angiogenese und zu einer gesteigerten Apoptose (Eveno et al., 2011, Eveno et al., 2013). Beim Magenkarzinom hingegen wirkt Netrin-4 nicht protektiv, da es bei einer Überexpression zu einer Zunahme der Tumorgroße, Migration und Invasion führt (Lv et al., 2015).

1.1.2 Interaktionspartner

Eine besonders starke Bindung hat Netrin-4 zum Integrin $\alpha 6 \beta 1$ (VLA-6, engl.: *very late antigen-6*), das Netrin-4 dosisabhängig binden kann. Generell hat Netrin-4 zu den Integrinen $\alpha 6$ und $\beta 1$ eine starke Bindung, sodass auch die Integrine $\alpha 3 \beta 1$ und $\alpha 6 \beta 4$ gebunden werden können (Larrieu-Lahargue et al., 2011). Netrin-4 ist darüber hinaus in der Lage, an weitere Integrine zu binden, so unter anderem an $\alpha 2 \beta 1$ und $\beta 4$ -Integrine, über die Netrin-4 das Tumorstadium beeinflussen kann (Hu et al., 2012, Yebra et al., 2011). Außerdem kann Netrin-4 den kurzen Arm der $\gamma 1$ -Kette der Laminine sowie Laminin-111 binden (Schneiders et al., 2007).

Aufgrund der Ähnlichkeit von Netrin-4 zu Netrin-1 wird kontrovers diskutiert, ob Netrin-4 an Netrin-1-Rezeptoren binden kann (Lee et al., 2020, Reuten et al., 2016, Lejmi et al., 2008, Takemoto et al., 2011). Cirulli und Yebra beschreiben 2007 in ihrer Übersichtsarbeit zwei Rezeptor-Familien von Netrin-1: die DCC-Familie (engl.: *deleted in colorectal cancer*), bestehend aus dem DCC- und dem Neogenin-Rezeptor, sowie die UNC5-Familie, die aus den UNC5a-, UNC5b-, UNC5c- und UNC5d-Rezeptoren besteht (Cirulli und Yebra, 2007). Für den Neogenin-Rezeptor konnte bereits eine Interaktion mit Netrin-4 in der Tumorentstehung gezeigt werden. Die in Kapitel 1.1.1 beschriebenen Effekte von Netrin-4 im Rahmen eines kolorektalen Karzinoms sowie eines Magenkarzinoms bezüglich Angiogenese, Wachstum des Primärs und Metastasierung sind Neogenin-vermittelt (Eveno et al., 2011, Lv et al., 2015). Im Rahmen der Neuroblastom-Forschung sowie der Angiogenese-Forschung wurde die Bindung von Netrin-4 an den Neogenin-Rezeptor ebenfalls belegt (Villanueva et al., 2017, Villanueva et al., 2019, Lejmi et al., 2008). Ein Zusammenhang zwischen Netrin-4 und Neogenin bei Entzündungsreaktionen konnte noch nicht nachgewiesen werden. Neogenin spielt aber auch bei Entzündungsreaktionen eine Rolle, da sowohl ein Neogenin-Knockout als auch ein Neogenin-Antikörper zu einer Reduktion einer akut herbeigeführten Peritonitis führen können (König et al., 2012). Ein weiterer interessanter und für Netrin-4 relevanter Rezeptor ist der UNC5b-Rezeptor. Bereits 2014 vermuteten Hayano und Kollegen eine mögliche Rezeptor-Ligand-Verbindung zwischen Netrin-4 und UNC5b im Rahmen ihrer

Experimente zur thalamocortikalen Axonverzweigung (Hayano et al., 2014). Zwei Jahre später konnte dann gezeigt werden, dass UNC5b als Rezeptor eine Netrin-4-induzierte Allodynie bewirkt (Hayano et al., 2016). Auch die bereits in Kapitel 1.1.1 beschriebenen Effekte von Netrin-4 auf endotheliale Vorläuferzellen sind UNC5b vermittelt (Lee et al., 2020). Eine Bindung von Netrin-4 an drei weitere Netrin-1-Rezeptoren, UNC5a, UNC5d sowie DCC, wurde ebenfalls bereits beschrieben (Qin et al., 2007, Takemoto et al., 2011, Lejmi et al., 2014). Im Gegensatz zu den oben genannten Autoren zeigten Reuten und Kollegen 2016, dass Netrin-4 in vitro an keinen der untersuchten Netrin-1-Rezeptoren (Neogenin, DCC, UNC5a, UNC5b, UNC5c, UNC5d, DCSAM und A2b) direkt binden kann (Reuten et al., 2016). Bei Versuchen zur endothelialen Zelladhäsion, zur endothelialen Zellmigration oder zu Integrin-abhängigen Signalkaskaden hatte eine Blockade von UNC5b oder dem Neogenin-Rezeptor keinen Effekt auf die Netrin-4-vermittelten Wirkungen (Larrieu-Lahargue et al., 2012).

1.1.3 Bedeutung im Rahmen inflammatorischer Prozesse

Die meisten Studien in Bezug auf die Bedeutung von Netrin-4 bei inflammatorischen Prozessen wurden an Augen durchgeführt. Das liegt daran, dass Netrin-4 insbesondere im Auge und dort vorwiegend in der Kornea und den Membranen hoch exprimiert ist (Li et al., 2012). In einem Experiment mit alkali-verätzten Rattenaugen konnte mittels *Immunostaining* nachgewiesen werden, dass Netrin-4 die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen inhibiert und damit anti-inflammatorisch wirkt (Han et al., 2015a, Han et al., 2015b). Es kommt in humanen Retinae bei inflammatorischen Prozessen im Rahmen einer diabetischen Retinopathie zu einer Erhöhung der Netrin-4-Expression (Crespo-Garcia et al., 2021). Während einer diabetischen Retinopathie steigt die Konzentration von VEGF (engl.: *vascular endothelial growth factor*) im Glaskörper und die Gefäßpermeabilität stark an. Wird nun externes Netrin-4 in den Glaskörper injiziert, so sinkt die Konzentration von VEGF wieder und es kommt zu einem protektiven Effekt durch eine Reduktion der vaskulären Permeabilität (Cao et al., 2017). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass ein Mangel von Netrin-4 eine niedriggradige Entzündung bei Retinopathie beschleunigt und die Anzahl an mononukleären Phagozyten erhöht (Crespo-

Garcia et al., 2021, Crespo-Garcia et al., 2019). Ein Mangel an Netrin-4 könnte bis zu einem – die innere Retina betreffenden – Verlust der Sehfunktion führen (Crespo-Garcia et al., 2019).

In Endothelzellen hingegen wirkt Netrin-4 anti-inflammatorisch. Gezeigt wurde dies über eine Reduktion von Netrin-4, die eine Erhöhung der Inflammation in Endothelzellen zur Folge hatte (Zhang et al., 2021). Inflammatorische Zytokine (TNF- α – engl.: *tumor necrosis factor α* und IL1 β – Interleukin 1 β) reduzieren die Expression von Netrin-4 im Gegensatz zu einer laminaren Flusskondition (Zhang et al., 2021). Inflammatorischer Schmerz soll durch eine transitorische Suppression der Netrin-4-Expression reduziert werden (Hayano et al., 2016), was die Schlussfolgerung zulässt, dass Netrin-4 inflammatorischen Schmerz verstärkt.

1.2 Interaktion neutrophiler Granulozyten mit dem Endothel

Die Interaktion neutrophiler Granulozyten (engl.: *polymorphonuclear neutrophil* – PMN) mit dem Endothel wurde in Studien insbesondere in murinen Experimenten untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente lassen sich aber oftmals nicht direkt auf den Menschen übertragen. In dieser Arbeit werden alle diesbezüglichen Vorgänge im humanen Kontext beschrieben. Kolaczowska und Kubes beschrieben 2013 in ihrer Übersichtsarbeit neutrophile Granulozyten als Leukozyten, die im menschlichen Blut 50-70% der Leukozyten ausmachen und einer der wichtigsten Zelltypen im Rahmen akuter Entzündungen sind. Mittels Adhäsionsmolekülen sind PMNs dazu in der Lage, aktiv als erste Zellen aus der Blutbahn zum Ort der Inflammation zu migrieren und dort unter anderem Antigene zu phagozytieren und anderweitig Pathogene zu eliminieren (Kolaczowska und Kubes, 2013). Neben den neutrophilen Granulozyten gibt es noch die eosinophilen und basophilen Granulozyten. Die Eosinophilen spielen vorwiegend bei allergischen Reaktionen, Asthma sowie der Viren- und Parasitenbekämpfung eine Rolle. Die Basophilen beeinflussen ebenfalls allergische Reaktionen, sind aber generell den Mastzellen relativ ähnlich und setzen Histamin frei (Stone et al., 2010). Im Jahr 2000 zeigte Vestweber in einer Übersichtsarbeit, dass Endothel aus Endothelzellen besteht und die innerste

Schicht von Blut- und Lymphgefäßen darstellt. Endothelzellen spielen eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort, indem sie unter anderem Adhäsionsmoleküle exprimieren, mit denen Leukozyten interagieren können (Vestweber, 2000).

Ebendiese verstärkt auf inflammatorisch aktiviertem Endothel exprimierten Adhäsionsmoleküle ermöglichen den PMNs eine Adhäsion und Interaktion mit dem Endothel sowie den Vorgang der Extravasation, der auch Diapedese genannt wird (Butcher, 1991, Ley et al., 2007). In seiner Übersichtsarbeit beschreibt Springer (1994) den allgemeinen Ablauf der Neutrophilen-Endothel-Interaktion, welcher mit ersten lockeren Bindungen (engl.: *tethering / capturing*) beginnt. Darauf folgt ein Rollen (engl.: *rolling*), welches immer langsamer wird und in eine stationäre Adhäsion (bzw. engl.: *sticking*) übergeht (Springer, 1994). Nachdem die PMNs sich nicht mehr vorwärts bewegen und fest gebunden an das Endothel vorliegen, kommt es zuerst zu einem Strecken und ‚Krabbeln‘ (engl.: *crawling*) – auch gegen die Flussrichtung des Blutes – auf der Suche nach einer idealen Stelle für die anschließende Transmigration (Phillipson et al., 2006). Die Interaktion der PMNs mit dem Endothel tritt insbesondere in post-kapillären Venolen auf (Doerschuk et al., 2000, zitiert nach Simon und Green, 2005). Bereits 1960 wurde die Transmigration von PMNs durch (transzellulär) und zwischen (parazellulär) Endothelzellen beschrieben (Marchesi und Florey, 1960, Williamson und Grisham, 1960). Wie in vielen Versuchsansätzen gezeigt wurde, migrieren die PMNs hierbei in ungefähr 90% der Fälle parazellulär (Carman und Springer, 2008, Feng et al., 1998, beide zitiert nach Sullivan und Muller, 2014). Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Interaktion über verschiedene Arten von Adhäsionsmolekülen. Das generelle Prinzip beschrieben Morikis und Simon in ihrer 2018 verfassten Übersichtsarbeit; laut dieser interagieren zuerst die Selektine bzw. Selektinliganden der PMNs mit den Selektinen des Endothels und ermöglichen ein Rollen. Daraufhin kommt es unter anderem Selektin- und Chemokin-vermittelt zu einer Integrin-Aktivierung und die aktivierten Integrine sorgen dann für eine festere Bindung der PMNs an das Endothel, sodass daraufhin eine Transmigration möglich ist (Morikis und Simon, 2018, Phillipson et al., 2006).

1.2.1 Selektine und ihre Liganden

Selektine sind transmembrane Glykoproteine, die Liganden von benachbarten Zellen binden können. Der erste Kontakt zwischen PMNs und dem Endothel ist meist Selektin-vermittelt (Morikis und Simon, 2018). Unter Scherbeanspruchung im Rahmen des Blutflusses kann ein Rollen der PMNs Selektin-vermittelt sein (McEver, 1994). Die drei verschiedenen Selektine E-Selektin (von engl.: *endothelium*), P-Selektin (von engl.: *platelets*) und L-Selektin (von engl.: *leukocytes*) binden an sialylierte und fucosylierte Kohlenwasserstoffreste ihrer Liganden (McEver et al., 1995).

Entzündetes Endothel exprimiert verstärkt E-Selektin und P-Selektin (Lasky, 1992, Bevilacqua und Nelson, 1993, beide zitiert nach McEver, 1994). Beim Menschen ist P-Selektin für die PMN-Endothel-Interaktion von keiner großen Relevanz, in Mausmodellen ist P-Selektin hingegen bei diesen Prozessen hochrelevant (Liu et al., 2010). P-Selektin wird auf Endothel und Thrombozyten exprimiert, eine Hochregulation der Expression wird durch Mobilisation aus den α -Granula der Thrombozyten bzw. den Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen bewirkt (Collins et al., 2001).

Die Expression von E-Selektin wird transkriptionell zum Beispiel mittels inflammatorischer Zytokine wie TNF- α reguliert (Bevilacqua et al., 1989). Während einer Interaktion mit einem PMN sorgt E-Selektin für eine Polarisierung desselben durch eine Umverteilung der Adhäsionsmoleküle (Schaff et al., 2008). E-Selektin hat viele verschiedene mögliche Bindungspartner auf PMNs. Die relevantesten und in dieser Arbeit thematisierten Bindungspartner von E-Selektin sind L-Selektin (nur bei Menschen Bindungspartner, nicht bei Mäusen), P-Selektin-Glykoprotein-Ligand 1 (PSGL-1) und CD44 (Zöllner et al., 1997, McEver und Cummings, 1997, Katayama et al., 2005). Zusätzlich dazu ist E-Selektin auch noch in der Lage, an verschiedene Integrine zu binden, so zum Beispiel an LFA-1 oder Mac-1 (Kotovuori et al., 1993).

L-Selektin wird auf allen Arten von Leukozyten und auf PMNs besonders auf den Mikrovilli-Spitzen exprimiert (Picker et al., 1991). Es kann einen Komplex mit PSGL-1 eingehen, welcher langsames Rollen initiiert sowie wichtig für die Aktivierung von LFA-1 ist (Stadtman et al., 2013).

Erstmals wurde PSGL-1 1992 von Moore und Kollegen als ein Homodimer beschrieben, das wie L-Selektin vorwiegend auf Spitzen der Mikrovilli exprimiert wird (Moore et al., 1992, Bruehl et al., 1997). Der erste Kontakt zwischen Endothelzellen und Granulozyten im fließenden Blut entsteht über Mikrovilli (Beesley et al., 1979). PSGL-1 ist der einzige Ligand, der alle drei Selektine binden kann (Moore, 1998, Moore et al., 1992, Sako et al., 1993). Dabei können P- und L-Selektin nahe des N-Terminus an die gleiche oder an überlappende Stellen binden, während E-Selektin an eine weitere Bindestelle bindet (McEver und Cummings, 1997, zitiert nach Zarbock et al., 2011). Bei der Interaktion von PMNs mit Endothel werden diese aktiviert und PSGL-1 wird vom Lamellopodium (vorderes, dem Endothel zugewandtes Ende) und intrazellulären Kompartimenten ans Uropodium (hinteres, dem Endothel abgewandtes Ende) bewegt (Bruehl et al., 1997). PSGL-1 kann also folglich vor Aktivierung des PMN durch das Endothel besonders gut mit dem Endothel über E-Selektin interagieren. Nach Aktivierung und der sich anschließenden Umverteilung kann PSGL-1 dann aber vorwiegend über L-Selektin mit anderen PMNs und über P-Selektin mit Thrombozyten interagieren (Moore, 1998). PSGL-1 ist insbesondere für die initiale PMN-Bindung von Bedeutung, allerdings interagieren und unterstützen sich PSGL-1 und CD44, die beiden Haupt-E-Selektin-Liganden, immer gegenseitig (Hidalgo et al., 2007).

CD44 (HCAM) ist ein transmembranäres Glykoprotein, dessen Hauptligand Hyaluronsäure ist (Idzerda et al., 1989, Naor et al., 2002). CD44 kontrolliert vor allem die Geschwindigkeit des Rollens und ist für die Polarisierung der PMNs nach Bindung an E-Selektin und damit für die Umverteilung von L-Selektin und PSGL-1 mitverantwortlich (Hidalgo et al., 2007).

1.2.2 Integrine

Integrine sind Transmembranproteine und werden für festere Bindungen, wie langsames Rollen, Adhäsion, *Crawling* und auch die finale Transmigration von PMNs, benötigt (Ley et al., 2007). Eine Aktivierung der Integrine geschieht oftmals durch Selektine und / oder Chemokine; die Mechanismen dahinter sind entweder ein *Inside-Out*- oder ein *Outside-In-Signaling* (Ley et al., 2007, zitiert nach Yago et al., 2018, Ley et al., 1993, Zarbock et al., 2007, beide zitiert nach

Zarbock und Ley, 2009). Alle Integrine bestehen aus einer der 18 α -Untereinheiten und einer der 8 β -Untereinheiten (Hemler, 1999, Plow et al., 2000, van der Flier und Sonnerberg, 2001, alle drei zitiert nach Hynes, 2002). In dieser Arbeit werden LFA-1, bestehend aus β 2-Integrin (CD18) und α L-Integrin (CD11a), und Mac-1, bestehend aus β 2-Integrin (CD18) und α M-Integrin (CD11b), als einzige Integrine ausführlich behandelt (Plow et al., 2000). Alle β 2-Integrine sind als Leukozyten-Integrine bekannt, weil ihre Expression auf Leukozyten begrenzt ist (Kishimoto et al., 1989, zitiert nach Springer, 1990). Bei einer Aktivierung durch Selektine und / oder Chemokine erhöhen die PMNs die Expression und Affinität von CD18 innerhalb weniger Sekunden (Lum et al., 2002, Green et al., 2003, Ma et al., 2004, alle drei zitiert nach Simon und Green, 2005).

Die Integrine der Leukozyten binden an Proteine mit Super-Immunglobulin-Struktur des Endothels (Staunton et al., 1988, Springer, 1994). In dieser Arbeit soll allerdings nur auf einen Vertreter der Superfamilie der Immunglobuline, nämlich ICAM-1 (engl.: *intracellular adhesion molecule-1*, CD54), eingegangen werden (Staunton et al., 1988). ICAM-1 ist essenziell für eine Adhäsion und das spätere *Crawling* von PMNs und wird hauptsächlich vom Endothel und in sehr niedrigen Spiegeln auch von Leukozyten und dementsprechend ebenfalls von PMNs exprimiert (Ley et al., 2007, zitiert nach Lefort und Ley, 2012, Dustin et al., 1986, Wang et al., 1997).

LFA-1 hat drei mögliche Konformationen. Eine Konformationsänderung, und damit eine Aktivierung aus dem inaktivem Stadium, läuft meist über ein *Inside-out-Signaling* ab (Nishida et al., 2006). Bei einer Aktivierung geht die extrazelluläre Domäne dabei zunächst in einen intermediären Zustand über. Es folgt der Übergang in einen hochaffinen Zustand, der feste Bindungen an ICAM-1 und damit Adhäsion vermitteln kann (Nishida et al., 2006, Lefort und Ley, 2012, Lefort et al., 2012). LFA-1 ist insbesondere für das Rollen und das erste Adhären von Neutrophilen wichtig, indem LFA-1 an ICAM-1 bindet (Salas et al., 2004, Chesnutt et al., 2004, beide zitiert nach Ley et al., 2007). Langsames Rollen wird überwiegend durch eine Selektin-bedingte Aktivierung vermittelt, für eine Adhäsion wird eine Chemokin-induzierte Aktivierung benötigt (Kuwano et

al., 2010). Das Integrin LFA-1 kann aber neben seiner Funktion als verankerndes Adhäsionsmolekül auch als mechanosensitiver Rezeptor wirken, der externe Kräfte in intrazelluläre chemische Signale umwandelt (Morikis und Simon, 2018). Das zweite thematisierte β 2-Integrin ist Mac-1. Dieses ist im Gegensatz zu LFA-1 neben der Vermittlung von langsamem Rollen primär wichtig für eine feste Adhäsion, ein *Crawling* und dann die Transmigration (Phillipson et al., 2006, Dunne et al., 2002, Yago et al., 2018). Beim *Crawling* kommt es zu einer Umverteilung von Mac-1, dessen Konzentration am Lamellopodium der PMNs ansteigt (Ley et al., 2007, zitiert nach McEver, 2015). Mac-1 wird hauptsächlich intrazellulär in sekretorischen sekundären und in spezifischen Vesikeln gelagert und bei Aktivierung (z. B. durch fMLP (N-Formylmethionin-leucyl-phenylalanin)) sehr schnell innerhalb weniger Minuten durch Fusion der Granula mit der Zellmembran an die Zelloberfläche verschoben (Sengeløv et al., 1993). Mac-1 spielt eine große Rolle bei der Zellausbreitung und Zellpolarisation und ist für ein starkes Outside-In-Signaling zuständig (Li et al., 2018).

Scherbeanspruchungen, die zum Beispiel durch den Blutstrom ausgelöst werden, haben eine Wirkung auf β 2-Integrine (CD18) und regulieren die PMN-Endothel-Interaktion (Fukuda und Schmid-Schönbein, 2002). Prozesse wie *Crawling* und Transmigration werden unter Scherbeanspruchung β 2-Integrin-abhängig induziert (Pick et al., 2013). Dabei sind die beteiligten Integrine abhängig von der Stärke der Scherbeanspruchung (Li et al., 2018). Die CD18-Expression sinkt unter Scherbeanspruchung, allerdings steigt die Konzentration von CD18 an der Kontaktstelle zwischen den PMNs und dem Endothel durch eine Umverteilung von CD18 an der Zellmembran an, was die Migration erleichtert (Fukuda und Schmid-Schönbein, 2003).

1.2.3 Weitere Regulationsmechanismen

Als weitere besonders wichtige Regulationsmechanismen sind die Chemokine zu nennen, die vollständigkeithalber thematisiert werden, in dieser Arbeit aber nicht explizit untersucht wurden.

Für jede der Subkategorien der Chemokine gibt es entsprechende Chemokin-Rezeptoren, die alle auf Zellen des Immunsystems exprimiert werden und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind (Murphy et al., 2000, Loetscher et al.,

2000, Thelen, 2001, alle drei zitiert nach Moser et al., 2004). Die Bindung an ihre Rezeptoren bewirkt letztendlich unter anderem eine Aktivierung von Integrinen auf den PMNs (Stadtman und Zarbock, 2012).

Chemokine sind besonders für die LFA-1-Aktivierung wichtig (siehe Kapitel 1.2.2). In Kombination mit Selektinen genügen sehr kleine Konzentrationen an Chemokinen und in hohen Konzentrationen reichen Chemokine allein aus, um LFA-1 zu aktivieren (Morikis und Simon, 2018, Yago et al., 2018). Neben den Chemokinen können auch andere Zytokine und pro-inflammatorische Moleküle über diverse Mechanismen PMNs rekrutieren und so eine Transmigration initiieren (Phillipson et al., 2006).

1.2.4 Modulation im Rahmen von Hypoxie und Inflammation

Hypoxie bezeichnet eine Unterversorgung von Gewebe mit Sauerstoff. Inflammation ist eine nicht-spezifische Immunantwort auf eine Gewebeschädigung. Vorwiegend eine Transmigration von Immunzellen, besonders von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, aus der Blutbahn ins Gewebe ist charakteristisch für eine Entzündung (Ferrero-Miliani et al., 2007). Am wichtigsten zur Bekämpfung einer akuten Entzündung ist die Emigration von PMNs aus dem Blut (Grant, 1973, Hurley, 1983, beide zitiert nach Feng et al., 1998). Die Theorie, dass Hypoxie Inflammation induzieren kann, ist mittlerweile durch die Kenntnisse von Hypoxie-Signalwegen bestätigt (Eltzschig und Carmeliet, 2011). So kann zum Beispiel NF- κ B (engl.: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*) durch niedrige Sauerstoff-Konzentrationen aktiviert werden (Koong et al., 1994). NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der selbst durch viele verschiedene Faktoren (z. B. virale Infektionen, inflammatorische Zytokine oder LPS) induziert werden kann. NF- κ B reguliert eine Vielzahl an Genen, vorwiegend aber Gene im Rahmen einer inflammatorischen Antwort und des Immunsystems (Baeuerle und Henkel, 1994, Siebenlist et al., 1994, beide zitiert nach Baldwin, 1996).

Inflammation als Reaktion auf Hypoxie ist zum Beispiel bei Nierentransplantationen eine schwerwiegende Komplikation, wenn es Ischämie-bedingt zur Gewebe-Hypoxie kommt (Krüger et al., 2009). Einer der wichtigsten molekularen Triggermechanismen bei Hypoxie basiert auf Hif-1 (engl.: *hypoxia-inducible*

factor-1). Hif-1 ist ein Sauerstoff-sensitiver Transkriptionsaktivator, der für die Induktion von Genen sowie die Adaption und das Überleben von Zellen in Hypoxie zuständig ist (Wang und Semenza, 1996, zitiert nach Kallio et al., 1997, Semenza, 1998, Wang et al., 1995). Hif-1 besteht aus zwei Untereinheiten: Zum einen aus Hif-1 β , welches durchgehend exprimiert wird und Sauerstoff-unabhängig vorliegt; zum anderen aus Hif-1 α , welches eine Halbwertszeit von 5 Minuten hat und Sauerstoff-unabhängig produziert wird (Salceda und Caro, 1997, Huang et al., 1996, Wang et al., 1995). Allerdings wird Hif-1 α in Hypoxie stabilisiert und aus dem Zytoplasma in den Nukleus transloziert, wo es mit Hif-1 β das transkriptionell aktive Hif-1 bildet (Huang et al., 1996, Kallio et al., 1997, Ke und Costa, 2006).

Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, werden die Adhäsionsmoleküle von entzündetem Endothel verstärkt exprimiert (Ley et al., 2007), weswegen es zu verstärkter Interaktion und dementsprechend auch zu verstärkter Transmigration kommen kann. Explizit nachgewiesen wurde die verstärkte Expression der Adhäsionsmoleküle im Rahmen einer Inflammation für E-Selektin und ICAM-1. Die Expression dieser beiden Adhäsionsmoleküle wird durch NF- κ B reguliert und induziert (Whitley et al., 1994, Lewis et al., 1994, Ledebur und Parks, 1995). Je höher die Konzentration der inflammatorischen Stimuli (in diese Studie fMLP), desto stärker werden neben dem Endothel auch die PMNs aktiviert und es kommt zur verstärkten Diapedese (Feng et al., 1998). PMNs müssen beim Transmigrieren zuerst die Endothelzellen passieren (innerhalb von zwei bis fünf Minuten) und anschließend die Basalmembran, was deutlich mehr Zeit benötigt (Ley et al., 2007). Entzündete Endothelzellen können ihre Zell-Zell-Kontakte und einzelne Moleküle so umverteilen, dass die Transmigration stark begünstigt und beschleunigt wird (Shaw et al., 2001, Ley et al., 2007).

Die in diesem Kapitel beschriebenen Prozesse werden weitestgehend durch pro-inflammatorische Zytokine ausgelöst, die im Rahmen einer Zytokin-Antwort auf Hypoxie sowie Inflammation ausgeschüttet werden (Jeong et al., 2003).

1.3 Hypoxie und Ischämie-Reperfusionsschaden

Ischämie bezeichnet eine Minderdurchblutung oder einen Durchblutungsausfall. Das heißt neben einer Unterversorgung mit Sauerstoff, einer Hypoxie, kommt es auch zu weiteren Unterversorgungen, zum Beispiel der Glukosezufuhr oder dem Abtransport von Stoffwechselabfallprodukten.

Zu einer Ischämie und der dadurch bedingten Hypoxie kommt es durch einen Verschluss eines arteriellen Gefäßes, zum Beispiel durch einen Embolus oder Atherosklerose. Ischämie und Reperfusion (I/R) spielen bei verschiedenen Krankheitsbildern eine Rolle, so unter anderem bei akuten Herzinfarkten, Schlaganfällen, Niereninfarkten, Kreislaufstillständen sowie bei Operationen (Wallace und Linden, 2010, Ryan et al., 2005, beide zitiert nach Eltzschig und Eckle, 2011). Das Modell des akuten murinen Herzinfarktes soll in dieser Arbeit beispielhaft verwendet werden, um die Rolle von Netrin-4 im Rahmen des Ischämie-Reperfusionssyndroms besser zu verstehen.

Ein kurzes Intervall von Ischämie und dementsprechend auch von Hypoxie können Zellen natürlicherweise überleben. Die Schwere und Irreversibilität der Schäden korrelieren mit der Ischämiedauer: Bereits nach 20 Minuten kommt es zu ersten irreversiblen Schäden und Zelluntergängen in Gehirn und Herz (Abela und Homer-Vanniasinkham, 2003, Bulkley 1987, Ordly et al., 1993, alle drei zitiert nach Kalogeris et al., 2016).

Obwohl deswegen eine schnelle Reperfusion von Nöten ist, da sonst das komplette Gewebe abstirbt, führt eine Reperfusion über verschiedene Mechanismen paradoxerweise zu weiteren Gewebeschäden über die Ischämie-bedingten Schäden hinaus (Piper et al., 1998, Yellon und Baxter, 1999, beide zitiert nach Yellon und Hausenloy, 2007, Hearse et al., 1973). Dieser Reperfusionsschaden kann bis zu 50% des eigentlichen Schadens bei Tierversuchen im Modell des akuten Myokardinfarkts ausmachen (Yellon und Hausenloy, 2007). Im Tierversuch mit Hunden wurde gezeigt, dass die Größe eines akuten Infarktes ohne Reperfusion kleiner ist; nach einer Woche hingegen sind die Infarktgrößen in der Gruppe ohne Reperfusion deutlich größer als bei den reperfundierten Tieren (Ginks et al., 1972). Die kurzfristige Zunahme der Infarktgröße unter Reperfusion kann auf mehrere Gründe zurückgeführt werden.

Während der Reperfusion kommt es zu einer erhöhten Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen, Zytokinen und anderen pro-inflammatorischen Mediatoren, die mittels einer sterilen Inflammation sowohl PMNs als auch das Endothel aktivieren und dadurch – wie in Kapitel 1.2 beschrieben – die Interaktion von Endothel und PMNs verbessern und so letztendlich die Transmigrationsrate erhöhen (Jordan et al., 1999, Chen und Nuñez, 2010). Außerdem kommt es durch die Unterversorgung der Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen zu einem anaeroben Stoffwechsel, was unter anderem zu einem niedrigeren pH-Wert sowie später zu einem Energiemangel in Form eines ATP-Mangels führt und dadurch zu einer Zunahme des Infarktschadens (Kalogeris et al., 2016). Mehrere Gründe, wie zum Beispiel ein Ausfall der Na^+/K^+ -ATPase, führen über den Verlust des osmotischen Gleichgewichtes zu Ödemen und angeschwollenen Zellen, die dann ein kapilläres *No-Reflow*-Phänomen bedingen können (Raffelmann und Kloner, 2002, Engler et al., 1983, beide zitiert nach Dirksen et al., 2007).

Irreversibel geschädigtes Gewebe wird nun als das infarzierte Areal bezeichnet und macht einen Teil des ischämischen Areals aus. Die Postinfarkt-Phase kann in eine inflammatorische und eine regenerative Phase unterteilt werden (Blankestijn et al., 2001). Direkt nach der Ischämiephase, also schon während der Reperfusion, beginnt die inflammatorische Phase, (Fischbein et al., 1978, zitiert nach Holmes et al., 2005). Während der ersten 24 Stunden reagieren PMNs mit dem entzündeten Endothel wie in Kapitel 1.2 beschrieben und sind damit die ersten Immunzellen, die in das betroffene Gebiet einwandern (Ma et al., 2013). Die neutrophilen Granulozyten zerstören Kollagennetzwerke, degranulieren und setzen dadurch viele Metabolite wie reaktive Sauerstoffspezies (ROS – engl.: *reactive oxygen species*), Chemokine, Elastasen und weitere degenerative Enzyme frei (Przyklenk et al., 1987, Borregaard und Cowland, 1997, beide zitiert nach Heymans et al., 1999). Die Zahl der Neutrophilen nimmt nach zwei Tagen kontinuierlich ab, da sie bei den späteren Umbauprozessen nicht mehr benötigt werden (Mallory et al., 1939, Schoen, 1994, beide zitiert nach Maekawa et al., 2002). Monozyten hingegen sind für die Umbauprozesse sehr wichtig: Ihre Anzahl steigt zeitversetzt nach den PMNs bis

zum siebten Tag an und bleibt für ungefähr zwei Wochen nach der Ischämie erhöht (Nahrendorf et al., 2007).

1.3.1 Myokardinfarkt

Die Koronare Herzkrankheit, deren akute Manifestation ein Herzinfarkt sein kann, ist die häufigste Ursache für Mortalität und Morbidität weltweit und in der westlichen Welt eine der häufigsten Diagnosen für eine Hospitalisierung von Patienten (Virani et al., 2020, Xiao et al., 2019). Laut Schätzungen haben jährlich mehr als 7 Millionen Menschen weltweit einen Herzinfarkt. Bei dem akuten Myokardinfarkt handelt es sich meist um einen Verschluss einer Koronararterie, der eine insuffiziente Durchblutung in dem versorgenden stromabwärts liegenden Gebiet zur Folge hat (Falk et al., 1995, Libby, 2001, beide zitiert nach White und Chew, 2008). Die Größe und Lokalisation des betroffenen Bereiches sind dementsprechend abhängig vom Ort des Thrombus, der bestimmt, welche Gebiete nicht mehr versorgt werden. Auch bei der Ausdehnung des Infarktes gibt es große Unterschiede, so kann sich dieser über alle Wandschichten (transmural) oder auch nur auf eine einzelne Schicht erstrecken (Spodick, 1980, Edson, 1960, beide zitiert nach Freifeld et al., 1983).

Bereits in den 1960er Jahren diskutierten russische Wissenschaftler die Zusammenhänge zwischen Atherosklerose und dem akuten Myokardinfarkt (Grown, 1958). Bei Menschen ist in ungefähr 75% der Fälle der Grund für einen Herzinfarkt die Ruptur einer durch Atherosklerose bedingten Plaque, an deren Stelle sich ein Thrombus bildet. Dieser Thrombus unterbindet eine Versorgung des stromabwärts liegenden Gebietes (von Scheidt et al., 2017). Ein biochemischer Marker für Herzschäden ist unter anderem das kardiale Troponin I (cTnI, engl.: *cardiac Troponin I*), eines der kardialen Troponine, die die Biomarker erster Wahl bei Verdacht auf einen Herzinfarkt sind und von beschädigten Myozyten freigesetzt werden. Bei Verdacht auf einen akuten Herzinfarkt wird unter anderem die Konzentration von cTnI im Blut gemessen, die bei Diagnose, Therapie und Patientenmanagement Aufschlüsse geben kann (Maynard et al., 2000, McDonough et al., 1999, beide zitiert nach Kemp et al., 2004).

Um eine adäquate Therapie einleiten zu können, ist es wichtig, anhand eines durchgeführten Elektrokardiogramms als erstes zwischen STEMI (engl.: *ST-*

elevation myocardial infarction) und NSTEMI (engl.: *non-ST-elevation myocardial infarction*) zu unterscheiden. Bei einem NSTEMI ist eine zeitnahe Revaskularisierung nicht so entscheidend wie bei einem STEMI (Mitsis und Gragnano, 2021). Die angestrebte Therapie ist bei einem STEMI eine möglichst zeitnahe Revaskularisierung, insbesondere bei Hochrisikopatienten spätestens zwei Stunden nach Aufnahme (Collet et al., 2021). Eine frühe Reperfusion ist wichtig, da durch diese die Größe des endgültigen Infarktes begrenzt wird und die Infarktgröße mit der Mortalität und der funktionellen Beeinträchtigung des Herzens korreliert (Burns et al., 2002, zitiert nach Gibbons et al., 2004, Ginks et al., 1972). Allgemein gesagt ist der Reperfusionszeitpunkt nach thrombotischem Verschluss am relevantesten für das Outcome und damit auch für die Prognose (Yellon und Hausenloy, 2007). Eine Revaskularisierung kann durch verschiedene Mechanismen wie die perkutane transluminale Koronarangioplastik (PTCA), eine medikamentöse Lyse oder eine Bypass-Operation erreicht werden.

Eine Ischämie des Herzgewebes durch Okklusion einer Koronararterie hat ein infarziertes Gebiet zur Folge, das anschließend in Narbengewebe umgebaut wird (beschrieben in Kapitel 1.3). Diese Ischämie und der darauffolgende Infarkt haben viele mögliche Komplikationen, die alle entscheidend für die Prognose sind. Die Komplikationen können in akute und späte unterteilt werden. Eine ventrikuläre Arrhythmie ist eine schwerwiegende akute Komplikation und tritt entweder ischämie- oder reperfusionsbedingt auf (Manning und Hearse, 1984, Osmancik et al., 2008). Eine akute Nebenwirkung ist außerdem der kardiogene Schock, an dem die Hälfte der betroffenen Patienten ver stirbt (Hochmann et al., 1999, zitiert nach White und Chew, 2008). Eine Herzinsuffizienz kann sowohl eine akute als auch eine späte Komplikation sein und ist eine der häufigsten Ursachen für ein schlechtes Outcome (Gassler und Topol, 1999). Es gibt viele mechanisch bedingte Spätkomplikationen wie die Ruptur einer Herz wand, des Septums oder eines Papillarmuskels mit anschließendem Mitralklappen prolaps, der eine schwerwiegende Mitralklappeninsuffizienz nach sich zieht (White und Chew, 2008). In der ersten Woche ist eine infarktbedingte Myokardruptur (beispielsweise Ventrikelseptumdefekt) für 15-30% der Todesfälle verantwortlich (Birnbäum et al., 2003, Wehrens und Doevendans, 2004, beide zitiert nach

Holmes et al., 2005). Der Hauptrisikofaktor für einen späteren plötzlichen Herztod ist eine Dilatation des linken Ventrikels nach einem Herzinfarkt (White et al., 1987).

Neutrophile Granulozyten leiten mit einer Entzündungsreaktion (beschrieben in Kapitel 1.3) die Wundheilung ein (Ma et al., 2013). Von besonderem Interesse in dieser Arbeit sind die neutrophilen Granulozyten sowie deren Wirkung auf einen Reperfusionsschaden im Rahmen eines Herzinfarktes. In Depletionsversuchen von PMNs konnte gezeigt werden, dass bei einer Neutrophilen-Depletion eine Reduktion des infarzierten Areals im Herzinfarkt-Modell von über 40% und ein geringerer Gewebeschaden feststellbar sind (Litt et al., 1989, Romson et al., 1983). Derzeit gibt es keine ausreichenden pharmakologischen Ansätze, die die Ausprägung des Reperfusionsschadens im Rahmen eines Herzinfarktes reduzieren. Um potentielle Therapieansätze für die Zukunft zu entwickeln, wird in dieser Arbeit der Einfluss von Netrin-4 auf den Reperfusionsschaden untersucht.

1.4 Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertation soll die Interaktion von PMNs mit dem Endothel unter Netrin-4-Einfluss untersucht werden. Das Interesse gilt zunächst der Frage, ob und durch welche Zellen Netrin-4 unter hypoxischen Bedingungen sezerniert wird. Im Falle eines regulatorischen Einflusses von Hypoxie auf die Netrin-4-Sekretion soll die Rolle von Hif-1 α bei diesem Prozess ermittelt werden.

Weiterhin geht es darum, die Auswirkungen von Netrin-4 auf die neutrophilen Granulozyten und deren Adhäsionsmoleküle zu beleuchten. Das Hauptaugenmerk der Versuche liegt aber auf der Modulation der Interaktion von PMNs mit dem Endothel durch Netrin-4, welche beispielsweise die Rollgeschwindigkeit der PMNs beeinflussen könnte. Hierbei soll unter anderem die Rolle des Netrin-1-Rezeptors Neogenin auf die Vermittlung dieser Effekte untersucht werden. Ebenfalls sollen Netrin-4-Effekte auf Infarktschäden im Rahmen einer myokardialen Ischämie und Reperfusion beleuchtet werden, wobei mit Netrin-4-Knockouts und exogenen Netrin-4-Applikationen gearbeitet werden soll. Sollten sich Effekte zeigen, könnten diese Ansätze für die Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten bieten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Utensilien

Tabelle 1: Geräte und Utensilien

Produktbezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Aqua dest. Herstellungs-Gerät Typ 1 Reinstwassersystem Purelab flex 2	PF2XXXXM1	Veolia Water Technologies, Paris, Frankreich
Brutschrank Binder CB220	9040-0108	Binder GmbH, Tuttlingen
Brutschrank Heraeus Cytoperm 2, CO ₂ /O ₂	51011660	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Einbettssystem	EG 1150 H	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Flockeneisbereiter	AF 103	Scotsman, Milano, Italien
Gewebeinfiltrationsautomat	TP 1020	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Hypoxiekammer	Invivo ₂ 400	Ruskin Technology, Bridgend, UK
Hypoxiekammergas	Gas Mixer Q	Ruskin Technology, Bridgend, UK
Inkubationsschüttler Infors HT	Ecotron	Infors AG, Einsbach
Inkubator Heraeus Oven	50042293	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Kühlplatte für das modulare Einbettssystem	EG1150C	Leica Biosystems GmbH, Nussloch
Magnetrührer (RCT)	301565	IKA Labortechnik, Staufen
Mehrkanalpipette Eppendorf Research plus 10-100µl	3125000036	Eppendorf AG, Hamburg
Mehrkanalpipette Eppendorf Research plus 300µl	3125000052	Eppendorf AG, Hamburg
Messzylinder 50ml 250ml 1000ml 2000ml	7520175 7520186 7520193 7520194	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt
Mikroskop	DM-IL	Leica Microsystems, Bensheim
Mikrowelle	MM817ASM	Robert Bosch Hausgeräte GmbH, München
Paraffinstreckbad, 35°C	HI1210	Leica Biosystems GmbH, Nussloch
Paraffinstrecktisch, 42°C	HI1220	Leica Biosystems GmbH, Nussloch
Pinsel Goldtoray	5408	Lukas-Nerchau GmbH, Düsseldorf
Pinzette anatomisch	HSC_052-13	Karl Hammacher GmbH, Solingen
PIPETBOY acu 2	155019	INTEGRA, Biebertal

Pipetten Eppendorf reference		Eppendorf AG, Hamburg
0,5-10µl	4924000029	
10-100µl	4924000053	
100-1000µl	4924000088	
Pipetten Eppendorf research		Eppendorf AG, Hamburg
0,5-10µl	3120000020	
10-100µl	3120000046	
100-1000µl	3120000062	
Pipetten Eppendorf research plus		Eppendorf AG, Hamburg
0,5-10µl	3123000020	
10-100µl	3123000047	
100-1000µl	3123000063	
Plattenzentrifuge	C1000-PEQ-230EU	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Reagenzienständer	T217.1 HC25.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rocking Shaker	7-0952	NeoLab, Heidelberg
Rührstab	P211.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Skalpell	NO 10	FEATHER, Osaka, Japan
Spatel	HWH_227-00	Karl Hammacher GmbH, Solingen
Sterilbank	HB 2472	Heraeus instruments, Hanau
TECAN multiplatereader infinite M200 pro	30050303	Tecan Austria GmbH, Grödig, Österreich
Ultraschallhomogenisator Bandelin Sonopuls	UW70 / Sonopuls GM 70	Bandelin electronic GmbH, Berlin
Vortex Genie 2	G560E	Scientific Industries, New York, USA
Waage	ALS 160-4A	Kern und Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad (37°C)	1083	GFL, Großburgwedel
Zentrifuge (Eppendorf-Cups)	5417 R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Heraeus Megafuge 1.OR	75003060	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zentrifuge Heraeus Multifuge X1	75004210	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Zentrifuge (neoLab Mini-Zentrifuge)	3-1810	neoLab, Heidelberg
Zentrifuge (Mini-Zentrifuge ROTALABO)	T464.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien

Produktbezeichnung	Produktnummer	Hersteller
96 WellMicroplate F-Bottom	655101	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Aluminiumfolie	AA76.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Deckgläser (quadratisch, 22 × 22mm)	E-4132	neoLab, Heidelberg für Gerhard Menzel B.V.&Co.KG, Braunschweig

Deckgläser (rechteckig, 24 × 60mm)	01-2460/5	R. Langenbrinck, Emmendingen
Falthandtuchpapier SMA 201	2173708	Igefa, Berlin
Filterspitzen steril		Nerbe plus, Winsen
10µl kurz	07-602-8300	
100µl	07-642-8300	
1000µl	07-693-8300	
Handschuhe, Nitrile Powder-Free (Größe M)	290419	ABENA, Zörbig
Handschuhe, RNA-fest (Größe M)	942202	Paul Hartmann Ges.m.b.H., Wiener Neudorf, Österreich
Kanülen BD Microlance 27G	302200	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
25G	300600	
Mehrkanalpipettenspitzen epT.I.P.S. Standard 200µl	0030 000.870	Eppendorf, Hamburg
Microtome Blade R35	02.075.00.005	Feather, Osaka, JPN
Monovette (9ml), Citrat	02.1067.001	Sarstedt AG, Nümbrecht
Monovette (9ml), neutral	02.1726.001	Sarstedt AG, Nümbrecht
Objektträger (normal), 76 × 26mm	03-0004	R. Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger (SuperFrost Plus), 75 × 25mm	03-0060	R. Langenbrinck, Emmendingen
Parafilm M Verschlussfolie	5170002	Omnilab, Bremen
Petrischalen Cellstar (60 × 15mm)	628160	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10µl)	612-1477	Ratiolab, Dreieich
Pipettenspitzen epT.I.P.S. Standard (100µl)	685280	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen Ultratip (1000µl)	686290	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße flacher Deckel (0,2ml)	PEQL82-0620-A	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Reaktionsgefäße Reagiergefäß (0,5ml)	72.699	Sarstedt AG, Nümbrecht
Reaktionsgefäße Eppendorf-Style (1,5ml)	0030 125.150	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße Reaktion Tubes (1,5ml)	616201	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße Reaktion Tubes schwarz (1,5ml)	AA80.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Reaktionsgefäße Reaktion Tubes (2ml)	623201	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße Cellstar Tubes (15ml)	188271	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße Falcon (50ml), 352070	10788561	Corning Life Science, Corning, USA
Safety Multifly 21G Nadeln (Blutabnahme)	85.1638.235	Sarstedt AG, Nümbrecht

Stripette Serological Pipet Costar Falcon		Corning Life Science, Corning, USA
1ml, 356521	11513630	
5ml, 356543	10156420	
10ml, 356551	10608261	
25ml, 356525	10024420	
Spritzen, 1ml	303172	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Spritzen, 2ml	4606027V	B Braun, Melsungen
Tesa Film Kristall-Klar	57405	tesa SE, Norderstedt
Tupfer Pur-Zellin	143 253	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Neubauer Zählkammer 10µl	M-NZ	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt

2.1.3 Reagenzien und Lösungen

Tabelle 3: Reagenzien und Lösungen

Produktbezeichnung	Produktnummer	Hersteller
ABTS	A1888-2G	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Aceton	24201	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ammoniumchlorid	131121	AppliChem GmbH, Darmstadt
Aqua, 10ml	2351744	B Braun, Melsungen
Bovines Serum Albumin (BSA)	A3294	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Casein	C-7078	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ⁻ (PBS ⁻)	D8537	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline ⁺ (PBS ⁺)	D8662	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
EDTA	E-7889	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ethanol (nicht rein)	64-17-5	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn
Ethanol (rein)	A3678	AppliChem GmbH, Darmstadt
fMLP	F3506	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Formaldehyd-Lösung 37%	7398.1	Carl Roth GmbH Karlsruhe
Glycerol	G5516	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Hanks Balanced Salts (HBSS ⁻) ohne Kalzium, Magnesium	14170112	Gibco / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Hanks' Balanced Salts (HBSS ⁺)	14025050	Gibco / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heparin-Stammlösung	C02814	LEO Pharma GmbH, Neu-Isenburg
Isotonische Kochsalzlösung (0,9% NaCl, 120ml)	1313124	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Isotonische Kochsalzlösung (0,9% NaCl, 10ml)	2350748	B Braun, Melsungen
Mercaptoethanol	M-7522	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Methanol	32214	Honeywell, Charlotte, USA
Natriumacid (NaN ₃)	S8032	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	52455	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumcitrat	3580.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Natriumhydrogencarbonat	1063290500	Merck KGaA, Darmstadt
Netrin-4 Protein (rekombinant human)	1254-N4	R&D Systems, Minneapolis, USA
NP-40 (10%) (Igepal CA-630)	I3021	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
PBS ⁻ (Brausetablette)	18912-014	Gibco/ Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PBS ⁻ (Pulver für 10X)	D5652	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Percoll™	17-0891-01	GE Healthcare Bio Sciences Chalfont St. Giles, UK
Phosphatase-Inhibitor (Protease und Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail)	78442	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Salzsäure (HCl)	A3452	AppliChem GmbH, Darmstadt
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	L4509	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Türks Lösung	93770	Merck KGaA, Darmstadt
Tris Glycine 10X	1610771	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tris HCl	A3452	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trizma base (Tris base)	T1503	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Triton® X-100	A9779	AppliChem GmbH, Darmstadt
Tween20	A4974	AppliChem GmbH, Darmstadt
Wasserstoffperoxid 30%	H1009	Merck KGaA , Darmstadt
Xylol	131769	AppliChem GmbH, Darmstadt
Zitronensäure	8.18707	Merck KGaA , Darmstadt

2.1.4 Zellexperimente

Tabelle 4: Zellexperimente

Produktbezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Accutase® solution	A6964	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Antibiotische, antimykotische Lösung	A5955	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Epidermal Growth Factor, human recombinant	C-60170	PromoCell GmbH, Heidelberg
FCS (fetales calf serum)	S0615	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
G418 – BC Sulfate	A 291-25	Biochrom AG, Berlin
Hydrocortison	354203	BD Biosciences - Pharmingen, San Diego, USA
L-Glutamin Solution	G7513	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Medium MCDB 131	10372019	Gibco / Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Transwellplatte (24 Wells) 3,0µm Poren, 3472	10317701	Corning Life Science, Corning, USA
Zellkulturflasche Gewebekulturflasche 250cm ² , 90076	X846.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe für Corning Life Science, Corning, USA

Zellkulturflasche zum Anzüchten 250cm ² , 3290	10327342	Corning Life Science, Corning, USA
Zellschaber 3010	10702192	Corning Life Science, Corning, USA
Zellschalen 6 mal 35 × 10mm	657160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.5 ELISAs

Tabelle 5: ELISAs

Produktbezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Abdeckfolien für ELISA Platten	600238	Biozym Biotech Trading GmbH, Wien
ELISA-Kit For Netrin 4	SEB835Hu	Cloud-Clone Corp., Katy, USA
ELISA-Kit For Troponin I Type 3	SEA578Mu	Cloud-Clone Corp., Katy, USA
Maus-Netrin-4 (NTN4) ELISA-Kit	CSB- EL016129MO	Cusabio, Houston, USA

2.1.6 RNA-Isolation und qPCR

Tabelle 6: RNA-Isolation und qPCR

Produktbezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Abdeckfolie für PCR-Platten	MSB1001	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
C1000™ Thermal Cycler	1841000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
CFX96 Real Time System PCR- Gerät	1845096	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
iScript™ cDNA Synthesis Kit	1708891	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
iTaq™ Universal SYBR®Green Supermix	1725124	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiplate® PCR Plates™ 96Well clear	MLL9601	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Multiplate® PCR Plates™ 96Well clear	MLL9651	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Nuclease Freies Wasser	A7398	AppliChem, Darmstadt
NucleoSpin RNA 2	740955.250	Macherey-Nagel GmbH & Co, Düren
Primer Netrin-4 forward	cag aca tag act ggt gtc atg aag tt	biomers.net, Ulm
Primer Netrin-4 reverse	aca ttg acc tca aca tga gta cct t	biomers.net, Ulm
Primer 18S forward	gta acc cgt tga acc cca tt	biomers.net, Ulm
Primer 18S reverse	cca tcc aat cgg tag tag cg	biomers.net, Ulm

Spektrophotometer	Nanodrop2000	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
T100 Thermal Cycler für cDNA Umschrieb	1861096	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.1.7 Granulozytenisolation und Durchflusszytometrie

Tabelle 7: Granulozytenisolation und Durchflusszytometrie

Produktbezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Anti-CD11a-AK mouse anti-human PE	555384	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Anti-CD11a-akt.-AK mouse anti- human FITC	363404	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD11b-AK mouse anti-human FITC	301324	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD11b-akt.-AK mouse anti- human PE	301406	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD44-AK mouse anti-human	103001	Biolegend San Diego, USA
Anti-CD45-AK rat anti-mouse FITC	553079	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Anti-CD62L mouse anti-human Pacific Blue	304826	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD66b mouse anti-human Pe-Cy7	305116	Biolegend, San Diego, USA
Anti-Ly6G-AK rat anti-mouse FITC	551460	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Anti-Ly6G-AK rat anti-mouse PE	127608	Biolegend, San Diego, USA
Beads anti-mouse	552843	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Beads anti-rat	552844	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Catometer Setup and Tracking Beads	642412	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
FACSClean	340345	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
FACSFlow	342003	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
FACS-Gerät	FACSCanto 2	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
FACSRinse	340346	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
FACSShutdown	334224	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
FACS Tubes Falcon 352052	10579511	Corning Life Science, Corning, USA
Goat anti-rat AF 488	A21480	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mouse IgG2b-AK FITC	MG2B01	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

Pasteur-Pipette	86.1172	Sarstedt AG, Nümbrecht
Zellkultur Röhrchen Cellstar, 12ml	163160	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.1.8 Adhäsionsflusskammern

Tabelle 8: Adhäsionsflusskammern

Produktbezeichnung	Produktnummer	Hersteller
5 Minuten-Epoxy (2 × 100g - Härter + Harz)	1551000	R&G Faserverbundwerkstoffe GmbH, Waldenbuch
Anti-CD11a-AK mouse anti-human	16-0119-81	TF/Invitrogen, Carlsbad, USA
Anti-CD11b-AK mouse anti-human	14-0113-81	TF/Invitrogen, Carlsbad, USA
Anti-CD162-AK mouse anti-human	328802	Biolegend, San Diego, USA
Anti-CD44-AK mouse anti-human	103001	Biolegend San Diego, USA
Anti-CD62L-AK mouse anti-human	304820	Biolegend San Diego, USA
Anti-Neo1-AK goat anti-human	AF1079	R&D Systems, Minneapolis, USA
E-Selektin	724-ES	R&D Systems, Minneapolis, USA
Glaskapillaren (0,02 × 0,2 × 600mm)	5002-600	CM Scientific, Dublin, Irland
ICAM-1	720-IC	R&D Systems, Minneapolis, USA
Mikroskop (Orthoplan Durchlichtmikroskop)	834086	Ernst Leitz GmbH, Wetzlar
Nagellack Gel look		Cosnova, Frankfurt
P-Selektin (recombinant human)	ADP3	R&D Systems, Minneapolis, USA
Tubes (0,58 × 0,58mm ID)	427411	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA
Video-Kamera	C10600 ORCA-R	Hamamatsu, Hamamatsu, Japan
Wasserbad (37°C)	1003	GFL, Großburgwedel

2.1.9 Murine Tierversuche

Tabelle 9: Murine Tierversuche

Produktbezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Anti-Ly6G-AK rat anti-mouse PE	127601	Biolegend, San Diego, USA
Beatmungsgerät Servo Ventilator	900C	Siemens, München
Bipolar-Gerät	ICC 50	Erbe, Tübingen
Bipolar-Pinzette	20195-021	Erbe, Tübingen
Dumont-Pinzette, Style N5, H/P Grade, Dumoxel	E0103-N5-PO	Science Services, München
Einbettkassette	09-0403	R. Langenbrinck, Emmendingen
Emission-Bildsplitter	optoSplit II	Cairn Research, Faversham, Great Britain
Evans-Blue	E2129	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Infusomat Syringe Pump	SP100I2	World Precision Instruments, Sarasota USA
Kamera Orca Flash 4.0	C11440-42U30	Hamamatsu, Hamamatsu, Japan
Kanüle BD Insyte 22G	381223	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA

Faden		Ethicon Inc., Somerville, USA
4-0 Prolene	EH6722	
8-0 Prolene	2XTG17	
Mikroskop (Murine Tierexperimente)	S2X12	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
OP-Tisch inklusive Rektalsonde und Wärmerückkopplung	08321	Klaus Effenberger Med.-Techn. Gerätebau, Pfaffing
Paraffinöl	8904.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Pentobarbital Narcoren	798-594	Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Ingelheim am Rhein
Polyethene Tubing 0,4mm ID, 0,8mm AD	800/110/140	Smiths Medical, Minneapolis, USA
Schere Dental	BC 170	Aesculap AG, Tuttlingen
Schneidevorrichtung: Adult Mouse Heart Slicer	HSMA001-1	Zivic Instruments, Pittsburgh, USA
Thoraxretraktor: Sicherheitsnadeln 38mm	99.227.83	Buttinette Textil-Versandhaus GmbH, Wertingen
TTC-Lösung	17779	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Venöse Klemme Typ V1	350-501-1V1	Micromed Medizintechnik GmbH, Wurmlingen
Venöse Klemme Typ V2	350-501-1V2	Micromed Medizintechnik GmbH, Wurmlingen

2.1.10 Histologie

Tabelle 10: Histologie

Produktbezeichnung	Produktnummer	Hersteller
Citrat-Puffer (Demaskierungspuffer)	H-3300	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Färbegestell	H552.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Färbekasten	H554.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Konfokalmikroskop	Stellaris 8	Leica Microsystems, Mannheim
Konfokalmikroskop - Fluoreszenzmikroskop	DM6 CFS	Leica Microsystems, Mannheim
Konfokalmikroskop - Bedienelement	STP8000	Leica Microsystems, Mannheim
Mikrotom	RM2235	Leica Biosystems GmbH, Nussloch
Normal IgG goat	31245	TF/Invitrogen, Carlsbad, USA
Normal IgG rabbit	31235	TF/Invitrogen, Carlsbad, USA
Normal IgG rat	sc-2026	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Normal Serum chicken	sc-2479	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Normal Serum donkey	ab7475	Abcam, Cambridge, Great Britain
PAP-Pen Immunostaining	MKP-1	Kisker Biotech, Steinfurt
Präparatmappen	AXK6.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Präparatkasten	K335.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Primär-AK: cTnl rabbit anti-mouse	sc-15368	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Primär-AK: Hif-1α rabbit anti-human	NB100-134	Novus Bio, Centennial, USA
Primär-AK: Ly6G rat anti-mouse	ab25377	Abcam, Cambridge, Great Britain
Primär-AK: Ntn4 goat anti-mouse	AF1132	R&D Systems, Minneapolis, USA
Primär-AK: Ntn-4 mouse anti-human	MAB1254	R&D Systems, Minneapolis, USA
Primär-AK: Ntn4 rabbit anti-mouse	bs-6711R	Bioss Antibodies, Boston, USA
Primär-AK: VE-Cdh. goat anti-mouse	AF1002	R&D Systems, Minneapolis, USA
Roti®-Mount FluorCare DAPI	HP20.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sekundär-AK: AF 647 chicken anti-rat	A21472	TF/Invitrogen, Carlsbad, USA
Sekundär-AK: AF 546 donkey anti-rabbit	A10040	TF/Invitrogen, Carlsbad, USA
Sekundär-AK: AF 488 donkey anti-mouse	A21202	TF/Invitrogen, Carlsbad, USA
Sekundär-AK: AF 488 donkey anti-goat	A11055	TF/Invitrogen, Carlsbad, USA
Sekundär-AK: AF 594 goat anti-mouse	A11005	TF/Invitrogen, Carlsbad, USA
Sekundär-AK: AF 647 goat anti-rabbit	A21244	TF/Invitrogen, Carlsbad, USA
Type F Immersion liquid	11513859	Leica Microsystems, Wetzlar

2.1.11 Puffer und Lösungen aus eigener Herstellung

Tabelle 11: Puffer und Lösungen aus eigener Herstellung

<u>Tris-Puffer / TBS (10X)</u>		<u>Lyse Puffer</u>	
Tris Base	60,5g	Ammoniumchlorid	4g
NaCl	90g	Natriumhydrogencarbonat	420mg
H ₂ O	1l	EDTA	18,5mg
auf pH 7,6 einstellen		H ₂ O	500ml
<u>HMEC-1 Medium</u>		<u>RIPA-Puffer</u>	
MCDB 131	500ml	Tris Base	790mg
FCS	50ml	H ₂ O	75ml
EGF	100µl	NaCl	900mg
Hydrocortison	100µl	32% HCL auf pH-Wert 7,4 einstellen	
L-Glutmanin	25ml	10%NP-40	10ml
Antibiotikum / Antimikotikum	5ml	500mM EDTA	0,2ml
		H ₂ O auf 100ml auffüllen	

<u>ABTS Lösung</u>		<u>Citratpuffer</u>	
Citratpuffer	5ml	Zitronensäure	24,01g
ABTS	28mg	Natriumcitrat	36,8g
H ₂ O ₂	50µl	H ₂ O	250ml
H ₂ O	45ml	auf pH 4,2 einstellen	
<u>Alkoholchlorsäure</u>		<u>Tris HCl-Lösung 1 M (pH 6,8)</u>	
HCl 25%ig	10ml	Tris HCl	15,76g
Ethanol 70%ig	1000ml	H ₂ O	100ml
<u>Percoll 63%</u>		<u>Percoll 72%</u>	
Percoll	63ml	Percoll	72ml
PBS ⁻ (10X)	7ml	PBS ⁻ (10X)	8ml
PBS ⁻ (1X)	30ml	PBS ⁻ (1X)	20ml
<u>FACS Färbepuffer</u>		<u>Cell fix</u>	
H ₂ O	1l	Facs Färbepuffer	40ml
Brausetablette PBS ⁻	2	Formaldehyd (37%ig)	1ml
BSA	10g	Methanol	140ml
Natriumacid (NaN ₃)	5ml		

2.1.12 Software

Tabelle 12: Software

Produktbezeichnung	Hersteller
AxioVision 4.8.2.0	Zeiss, Oberkochen
CFX Manager 3.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Evolution-Capt	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Excel 2016	Microsoft, Redmond, USA
FACSDiva Software 9	Becton Dickinson, Heidelberg
Flow Jo 10	FlowJo LCC, Ashland, USA
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
Imaging Software, NIS-Elements Advanced Research 4.20 / 4.30	Nikon, Japan
Imaging Software, NIS-Elements Advanced Research Analysis 4.20	Nikon, Japan
Nano Drop 2000 1.6	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Magellan 7.2	Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz
PowerPoint 2016	Microsoft, Redmond, USA
Word 2016	Microsoft, Redmond, USA

2.2 Hypoxie von HMEC-Zellen

Um das Verhalten von Endothelzellen auf Hypoxie zu untersuchen, wurden Zellversuche in einer Hypoxiekammer in vitro durchgeführt. Die Zellen sowie deren Überstand wurden anschließend mittels verschiedener Methoden untersucht.

2.2.1 Zelllinien und -kultur

Für die Zellexperimente wurden als Zelllinien HMEC-1 und HMEC-1 mit einem stabilen Hif-1 α -Knockout verwendet. Hierbei steht HMEC-1 für *Human Microvascular Endothelial Cell Line*. Versuche mit menschlichen Endothelzellen waren lange Zeit aufgrund der schweren Isolation und der limitierten Lebensspanne dieser Zellen schwer durchführbar. Ades et. al beschrieben 1992 als erste die Transfektion von HMECs mit einem Plasmid, das für das Simian Virus 40 A Gen Produkt codiert ist. Dadurch werden eine Zellimmortalisierung und eine stabile Zelllinie mit typischen Eigenschaften für Endothelzellen erreicht. Die HMEC-1-Zellen weisen nun typische Oberflächenmarker wie CD31 und CD36 sowie Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 und CD44 auf (Ades et al., 1992). Der stabile Hif-1 α -Knockout in der HMEC-1-Zelllinie wurde bereits vor vielen Jahren herbeigeführt. Um diesen Knockout zu induzieren, wurde ein Vektor von InvivoGen (sogenannte psiRNA) durch Elektroporation in die Zellen transfiziert. Dieser Vektor sorgt innerhalb dieser Zellen für eine kontinuierliche Produktion einer siRNA (engl.: *small interfering ribonucleic acid*). Diese siRNA sorgt permanent dafür, dass das Hif-1 α -Gen ausgeknockt wird. Die Hif-1 α -psiRNA ist gegen G418 (Genetecin) resistent und Genetecin daher als Selektionsmarker im Zellmedium enthalten.

Die verwendeten Zellen wurden zu Beginn der Versuche aus einer Temperatur von -160°C aufgetaut und in Zellkulturflaschen in HMEC-Medium ausgesät. In einem Brutschrank wurden die Zellen bei 37°C mit einer Gaszusammensetzung von 5% CO₂ und 21% O₂ kultiviert. Die Zellen wurden nach mikroskopischer Wachstumskontrolle zwei Mal wöchentlich passagiert. War die Konfluenz nicht ausreichend für eine Passage, wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Bei einer Passage wurde zuerst das alte Medium abpipettiert, daraufhin wurden die Zellen

mit 10ml warmen PBS⁻ (engl.: *phosphat-buffered saline*) unter leichtem Schwenken gewaschen, wurde das PBS⁻ abpipettiert und anschließend wurden die Zellen mit 3ml warmer Accutase beschichtet. Nach 10-minütiger Inkubationszeit im Brutschrank wurde die Ablösung der Zellen mikroskopisch überprüft und die Reaktion durch Zugabe von 3ml HMEC-Medium abgestoppt. Die abgekugelten HMEC-Zellen wurden nun eins zu vier geteilt und in jede Zellkulturflasche wurden erneut 20ml warmes HMEC-Medium hinzugegeben. Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt.

2.2.2 Hypoxiekammer und Versuchsablauf

Beide Zelllinien wurden auf Veränderungen und ihr Sekretionsverhalten im Rahmen einer Hypoxie untersucht. Für die Versuchsdurchführungen wurden jeweils zwei konfluent bewachsene Zellkulturflaschen verwendet. Das Vorgehen war hierbei anfangs dasselbe wie bei der Passage der Zellen, nur wurden die HMEC-Zellen nach Accutase-Ablösung nicht in Zellkulturflaschen ausgesät. Entweder wurden 2,5ml der Zellen mit Medium in 35 × 10mm 6-Well-Platten (für Kapitel 2.2.4 und Kapitel 2.2.5) oder 1ml der Zellen mit Medium auf 4-Well-Objektträger (für Kapitel 2.2.6) ausgesät. Es wurden hierbei pro Zellkulturflasche 80ml Medium hinzugegeben, um die gleiche Zelldichte an HMEC-Zellen pro Milliliter HMEC-Medium wie bei einer normalen Passage zu erreichen. Nach drei Tagen wurde das Wachstum der Zellen in dem jeweiligen Gefäß mikroskopisch kontrolliert und bei 90%iger Konfluenz der Versuch begonnen. Mindestens 6 Stunden vor Beginn des Versuches wurden für diesen das HBSS⁺ (engl.: *Hank's balanced salt solution*) bzw. HMEC-Medium in die Hypoxiekammer (37°C, 5% CO₂ und 2% O₂) und in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Zu den definierten Zeitpunkten wurden die 4-Well-Objektträger bzw. die 6-Well-Platten in die Hypoxiekammer und die Kontrollen in einen normoxischen Inkubator (37°C, 5% CO₂ und 21% O₂) gestellt. Die Zellen wurden immer zuerst gewaschen (jeweils mit 600µl) und anschließend mit 1ml HBSS⁺ oder HMEC-Medium zur Versuchsdurchführung bedeckt. Nach Ablauf des Versuches wurden die Zellen aus der Hypoxiekammer oder dem Inkubator herausgeholt, die Überstände (nur wenn diese aus HBSS⁺ bestanden) abpipettiert, bei -20°C eingefroren und die Zellen entweder gefärbt oder mit RNA-Lyse-Puffer bedeckt.

2.2.3 Konditionen

Die unterschiedlichen Konditionen waren 6 verschieden lange Zeitintervalle, welche die Zellen in der Hypoxiekammer verbrachten: 0, 1, 2, 4, 12 und 24 Stunden. Die Zellen, deren Überstände für ELISAs (engl.: *enzyme-linked immunosorbent assay*) gedacht waren, verbrachten 0 bis 4 Stunden in einer Hypoxiekammer und die Zellen für Immunfluoreszenz 0, 2 und 12 Stunden. Hierbei wurden die Zellen nacheinander in die Hypoxiekammer gegeben, sodass alle Inkubationszeiträume gleichzeitig endeten und alle Zellen gleichzeitig aus der Hypoxiekammer herausgeholt werden konnten. Parallel zu den Zellen in der Hypoxiekammer gab es für jede Kondition die gleiche Anzahl an Kontrollen, welche die Zeit in einem normoxischen Inkubator verbrachten.

Auf Objektträgern für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen mit 1ml HMEC-Medium inkubiert. Die HMEC-Zellen in den 6-Well-Platten wurden, wenn die Überstände für die ELISAs (siehe Kapitel 2.2.4) verwendet werden sollten, mit HBSS⁺ gewaschen und später mit 1ml HBSS⁺ inkubiert. Das Zellmaterial hier wurde zusätzlich für eine qPCR (engl.: *quantitative polymerase chain reaction*; siehe Kapitel 2.2.5) genutzt. Zusätzlich wurde nur für die qPCRs der identische Versuchsablauf mit den 6-Well-Platten mit HMEC-Medium statt HBSS⁺ in Normoxie durchgeführt, um die Auswirkungen der Nährstoffskarenz (bei HBSS⁺) sowie von Hypoxie beurteilen zu können. Alle Versuche wurden mit beiden Zelllinien mehrmals durchgeführt.

2.2.4 Netrin-4-Konzentration im Überstand mittels ELISA

Um die Konzentration des sezernierten Netrin-4 im Überstand zu messen, wurden mit den unverdünnten Überständen aus den Zellexperimenten (siehe Kapitel 2.2.2 bzw. Kapitel 2.2.3) ELISAs durchgeführt. Zur Durchführung der ELISAs wurde ein geeignetes Kit von Cloud-Clone Corp. zur Detektion von humanem Netrin-4 (hNtn4) verwendet (SEB835Hu). Der Versuch wurde anhand der beigelegten Anleitung von Cloud-Clone Corp. durchgeführt. Dieses Kit funktioniert als Doppel-Antikörper Sandwich-ELISA. Das Prinzip basiert darauf, dass das zu untersuchende Protein – in diesem Falle Netrin-4 – in der Lage ist, an die mit einem *Capture*-Antikörper gegen das Zielprotein beschichtete ELISA-

Platte zu binden. Anschließend wird ein biotinylierter *Detection*-Antikörper hinzugegeben, der das an die Platte gebundene zu untersuchende Protein bindet. Als nächstes wird das Enzym Meerrettich-Peroxidase mit einem Avidin-Tag hinzugefügt, welches dadurch an das Biotin des *Detection*-Antikörpers binden kann. Das Enzym Meerrettich-Peroxidase reduziert das später hinzugegebene Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und oxidiert das ebenfalls hinzugefügte Reduktionsmittel Tetramethylbenzidin (TMP), das sich daraufhin blau färbt. Abgestoppt wird diese Reaktion durch die Zugabe von Schwefelsäure, wobei es zu einem gleichmäßigen gelblichen Farbumschlag kommt. Im Versuch wurde daraufhin die ELISA-Platte zügig in den Tecan-Multiplate-Reader gegeben und es wurden die Extinktionen bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen. Anhand dieser Ergebnisse war es später mittels einer Standardkurve möglich, die einzelnen Konzentrationen von Netrin-4 im Überstand zu errechnen. Die Standardkurve wurde anhand der Anleitung durchgeführt und ausgewertet.

2.2.5 mRNA-Analyse mittels qPCR

Zur Quantifizierung der Genexpression von Netrin-4 in den HMEC-Zellen nach unterschiedlich langen Inkubationsdauern (siehe Kapitel 2.2.3) wurde eine quantitative real-time Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) durchgeführt. Ausgangsmaterial hierfür waren die HMEC-Zellen, aus denen zuerst die RNA isoliert und diese anschließend in komplementäre DNA (cDNA, engl.: *complementary desoxyribonucleic acid*) umgeschrieben wurde. Erst dann war es möglich, die RT-qPCR durchzuführen. Diese wurde mit Zellmaterial aus den 35 × 10mm 6-Well-Platten durchgeführt, hierbei allerdings sowohl mit HMEC-Medium als auch mit HBSS⁺ als Überstand.

RNA-Isolation

Um einen RNA-Verlust durch ubiquitär vorkommende RNAsen zu vermeiden, wurden bei allen RNA-Versuchen dickere RNA-feste Handschuhe getragen und diese sowie alle Oberflächen gründlich mit RNase Away gereinigt. Auch wurden alle Schritte bis zur fertigen Isolation unter einer Abzugshaube durchgeführt, um eine Verunreinigung zu vermeiden und um einen Schutz vor gesundheitsschädlichen Stoffen zu erhalten.

Die Isolation der RNA wurde mittels des RNA-NucleoSpin RNA 2-Kits von Macherey-Nagel GmbH & Co nach Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zusätzlich zu dem Kit wurde noch β -Mercaptoethanol, 96%iges reines Ethanol sowie 70%iges reines Ethanol benötigt. Als erstes wurden auf jedes der 35 × 10mm Wells (siehe Kapitel 2.2.2) jeweils 350 μ l der RA1- β -Mercaptoethanol-Lösung (hergestellt aus der RA1-Lösung aus dem Kit und β -Mercaptoethanol im Verhältnis 100:1) gegeben. Diese Lösung fungierte als Lysepuffer der HMEC-Zellen und bricht unter anderem Disulfidbrücken auf. Mit einem Schaber wurden nun nach kurzer Inkubationszeit die Zellen von der Platte losgekratzt und wurde die Zelllysate-Lösung mit einer Pipette in einen Eppendorf-Cup gegeben. Vor Beginn der eigentlichen Isolation wurde der Eppendorf-Cup nochmals gevortext und im Anschluss daran herunter gespinnt. Die weiteren Schritte fanden alle bei Raumtemperatur (RT) statt und sind in Tabelle 13 beschrieben. Die Reaktionsgefäße entstammten hierbei alle dem Kit und die angegebenen Volumina beziehen sich immer auf eine Probe.

Tabelle 13: Ablauf RNA-Isolation

Vorgang	Volumen	Zeit / Beschleunigung
Zelllysate in violettes Filter (steht in Sammelgefäß)	350µl	1min / 11g
Violettes Filter verwerfen		
70%iges Ethanol hinzugeben; Präzipitat durch 5-maliges Pipettieren auflösen	350µl	
Lösung in blaues Filter (in neuem Sammelgefäß)	700µl	30sek / 11g
Durchfluss verwerfen; MDB hinzugeben	350µl	1min / 11g
Durchfluss verwerfen; Lösung für DNA-Verdau ansetzen: DNase reaction buffer im Verhältnis 9:1 mit DNase 1	95µl	15min ruhen
RA2-Lösung hinzugeben	200µl	30sek / 11g
Blaues Filter in ein neues Sammelgefäß stellen; RA3-Lösung hinzugeben	600µl	30sek / 11g
Durchlauf verwerfen; RA3-Lösung hinzugeben	250µl	2min / 11g
Filter in Eppendorf-Cup stellen; RNase freies H ₂ O hinzugeben	50µl	1min / 11g

RNA-Konzentrationsbestimmung

Frühestens zwei Tage nach der RNA-Isolation wurden die Proben auf Eis wieder aufgetaut. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde das Nanodrop Spektrophotometer verwendet. Die Eppendorf-Cups mit der RNA wurden nach dem Auftauen zuerst gevortext und dann sehr kurz abzentrifugiert. Der Nanodrop wurde zuerst mit von RNase freiem Wasser (NFW) gereinigt, dann wurde ein Leerwert mit 1,5µl NFW gemessen. Die Proben wurden direkt vor dem Messen nochmals kurz gevortext und als Doppelwert ebenfalls mit jeweils 1,5µl gemessen. Die Mittelwerte wurden bei einer Schwankung kleiner 5% verwendet, bei größeren Unterschieden wurde beide Messungen wiederholt. Außerdem wurde die Reinheit der RNA-Proben anhand des 260/280 Quotienten, der die Absorption der Wellenlänge bei 260nm (typisch für RNA) bzw. 280nm (typisch für DNA) misst, verifiziert. Bei einer reinen RNA-Probe beträgt dieser Quotient 2,0.

Umschrieb der RNA in cDNA

Für die quantitative real-time Polymerase Kettenreaktion wird keine RNA, sondern DNA benötigt. Deswegen ist ein Umschrieb von RNA in DNA vonnöten. Die benötigte Masse an RNA für den Umschrieb betrug immer 1µg RNA, das dafür benötigte Volumen wurde über die gemessene RNA-Konzentration errechnet. Dieses Volumen wurde in einen RNase freien 200µl Eppendorf-Cup gegeben und mit NFW auf 15µl aufgefüllt. Zusätzlich wurden pro Eppendorf-Cup noch 1µl iSkript Reverse Transkriptase sowie 4µl 5x iSkript ReactionMix aus dem iSkript cDNA Synthesis Kit von BioRad hinzugegeben und der Mix wurde im Eppendorf-Cup nochmals heruntergespinnt. In dem iSkript cDNA Synthesis Kit war eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die zusätzlich eine Ribonuklease-Aktivität hat, um den RNA-Strang nach der erfolgten DNA-Synthese abbauen zu können, enthalten. Außerdem befand sich in dem Kit eine DNA-abhängige DNA-Polymerase, um den komplementären Strang zu synthetisieren und so eine doppelsträngige DNA zu erhalten. Der Umschrieb erfolgte im Thermocycler von BioRad mit dem in Tabelle 14 aufgeführten Programm.

Tabelle 14: Ablauf Umschrieb der RNA in cDNA

Vorgang	Zeit in min	Temperatur in °C
Priming	5	25
reverse Transkription	20	46
Inaktivierung der reversen Transkriptase	1	95
Herunterkühlen	∞	4

Nach dem Herunterkühlen der umgeschriebenen cDNA auf 4°C wurden die Eppendorf-Cups aus dem Thermocycler genommen, herabgespinnt, mit 140µl NFW aufgefüllt, gevortext und daraufhin entweder zur Weiterverwendung auf Eis gelagert oder bei -80°C eingefroren.

RT-qPCR

Mit der aus RNA umgeschriebenen doppelsträngigen cDNA konnte nun eine quantitative real-time-PCR durchgeführt werden. Diese erfolgte, um bestimmte Abschnitte der DNA nicht nur gezielt vervielfältigen und detektieren zu können,

sondern um die quantitative Genexpression von Netrin-4 genau nachvollziehen zu können. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurde die relative Genexpression errechnet, indem die Genexpression von Netrin-4 zusätzlich noch auf ein *House-Keeping*-Gen normalisiert wurde. Ein *House-Keeping*-Gen ist ein Gen, das möglichst in allen Geweben konstant exprimiert wird und effektunabhängig ist, dessen Expression also auch unter verschiedenen Behandlungen konstant bleibt. In diesem Falle wurde 18S als *House-Keeping*-Gen verwendet.

Zur Detektion der DNA-Fragmente wurde SYBRGreen verwendet. Dieser Farbstoff hat eine hohe Bindungsaffinität zu doppelsträngiger DNA und interkaliert mit dieser. Ungebunden fluoresziert dieser Farbstoff nicht, sondern erst in Verbindung mit doppelsträngiger DNA. Dadurch kann mittels einer Fluoreszenzintensitätszunahme die Amplifikation quantifiziert werden.

Die cDNA-Proben wurden in die PCR-Platte immer als Tripletten pipettiert. In jedes Well wurden 4µl der cDNA-Lösung hineingegeben, die Masse der cDNA pro Well betrug folglich 25µg. In jedes Well kamen außerdem noch 5µl NFW, 1µl des Primer Mixes und 10µl iTaq Universal SYBR Green Supermix. Der Primer Mix wurde dabei vorab aus 20µl Forward Primer, 20µl Reverse Primer und 160µl NFW hergestellt. Nachdem ein Volumen von 20µl in jedes Well pipettiert worden war, wurde die Platte mit einer Abdeckfolie verschlossen, in einer Plattenzentrifuge abzentrifugiert und in einen Thermocycler gestellt. In diesem lief dann folgendes, in Tabelle 15 dargestelltes, Programm ab.

Tabelle 15: Ablauf RT-qPCR

Vorgang	Zeit in sek	Temperatur in °C	Wiederholung
Erste Denaturierung	30	95	
Denaturierung	5	95	Beginn Zyklus
Hybridisierung	20	64,5	
Polymerisation		72	
Messung der Fluoreszenz			39x zu Punkt 2
Abschluss	10	95	

Die Temperatur bei der Hybridisierung, also der Anlagerung des Primers an die DNA-Einzelstränge, ist Primer-spezifisch. Um die spezifische Temperatur für die

Netrin-4-Primer herauszufinden, wurde vor der ersten PCR eine Schmelzkurve mit 0,5°C unterschiedlichen Temperaturen bei der Hybridisierung (zwischen 60°C und 67°C liegen die meisten Hybridisierungstemperaturen) erstellt. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe mit Doppelwerten erstellt; hierbei wurden folgende Verdünnungen aus der cDNA-Probe von 24h Hypoxie mit NFW verwendet: 1:2, 1:4, 1:8 und 1:16; bei den Negativkontrollen (engl. *non template control*: NTC) wurde die Probe durch NFW ersetzt. Für jeden Primer wurde ein eigener Standard hergestellt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CFX Manager Software von BioRad, die auch die Normalisierung auf das *House-Keeping*-Gen mittels der $\Delta\Delta C_q$ -Methode errechnete.

2.2.6 Immunfluoreszenz-Färbung von HMEC-Zellen

Es wurden Immunfluoreszenzfärbungen erstellt, um nicht die Sekretion, sondern die Expression von Netrin-4 sowie Hif1 α in der Zelle und auf der Zellmembran darzustellen. Dazu wurden die mit HMEC-Zellen bewachsenen Objektträger, die in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Inkubationszeiten in der Hypoxiekammer durchlaufen hatten, gefärbt. Zu Beginn des Versuches wurde in ausreichender Menge TBST (0,1% Tween) und daraus unter anderem eine 1%ige und 5%ige BSA-Lösung (Bovine Serumalbumin-Lösung) hergestellt. Die 5%ige BSA-Lösung wurde immer zum Blocken verwendet, die 1%ige BSA-Lösung zur Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper (AK). Außerdem wurde zu jeder BSA-Lösung immer noch Normalserum in der Verdünnung 1:100 hinzugegeben. Das Donor-Tier des Normalserums war hierbei immer an das Donor-Tier des folgenden Sekundärantikörpers angepasst. Nachdem alle Objektträger gleichzeitig aus der Hypoxiekammer geholt worden waren, wurden sie nach dem in Tabelle 16 beschriebenen Verfahren behandelt.

Tabelle 16: Ablauf Immunfluoreszenzfärbung HMEC-Zellen

Vorgang	Substanz	Volumen/Well	Zeit
Waschen	PBS ⁺	500µl	5min
Waschen	TBST	500µl	5min
Zellen fixieren	4%iges PFA	400µl	10min
2x Waschen	TBST	500µl	5min
Blocken	5%iges BSA	500µl	45min
Inkubation 1. Primär-AK, 4°C	1%iges BSA	300µl	o/n
3x Waschen	TBST	500µl	5min
Inkubation 1. Sekundär-AK	1%iges BSA	300µl	40min
3x Waschen	TBST	500µl	5min
Blocken	5%iges BSA	500µl	45min
Inkubation 2. Primär-AK	1%iges BSA	300µl	60min
3x Waschen	TBST	500µl	5min
Inkubation 2. Sekundär-AK	1%iges BSA	300µl	40min
3x Waschen	TBST	500µl	5min
Kammer entfernen			
Einbetten	ROTI Mount DAPI		
Erstes Trocknen	Bei RT, dunkel		60min
Zweites Trocknen	Bei 4°C, dunkel		o/n

Alle Inkubationszeiten liefen hierbei bis zum Einbetten in einer eigens konstruierten feuchten Dunkelkammer bei Raumtemperatur auf einer Wippe mit 20rpm (engl.: *rounds per minute*) ab. Eine Ausnahme bildeten jedoch die Inkubationen über Nacht. Diese liefen zwar ebenfalls in einer geschlossenen Kammer ab, allerdings bei 4°C im Kühlschrank. Nach dem Trocknen im Kühlschrank wurden die Objektträger frühestens am nächsten Tag unter dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert.

Die Materialien für diese Versuche finden sich in Kapitel 2.1.10 (Histologie). Die verwendeten Antikörper werden in Tabelle 17 genannt. Parallel zu den Färbungen wurden sowohl Immunglobulin G (IgG)- als auch negativ-Kontrollen als Referenzfärbungen durchgeführt.

Tabelle 17: Antikörper für HMEC-Immunfluoreszenz

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Hif1 α -AK rabbit anti-human	Novus Bio	1:100
Netrin-4-AK mouse anti-human	R&D Systems	1:20
AF 488 donkey anti-mouse	TF/Invitrogen	1:500
AF 647 goat anti-rabbit	TF/Invitrogen	1:500

2.3 Netrin-4-Stimulation von neutrophilen Granulozyten

Um herauszufinden, ob und wie sich die Adhäsionsmoleküle neutrophiler Granulozyten nach Netrin-4-Stimulation verändern, wurden die folgenden Durchflusszytometrie-Versuche mit einem FACS-Gerät (engl.: *fluorescence activated cell sorting*) durchgeführt.

2.3.1 Blutentnahme und Granulozytenisolation mittels Percoll-Methode

Für die Stimulationsversuche wurde menschliches Blut verwendet. Die Blutdonatoren waren hierbei junge, gesunde Männer im Alter von 22 bis 35 Jahren. Die Blutentnahme fand unter sterilen Bedingungen durch einen Arzt statt. Nach einer Hautdesinfektion wurde eine Vene mittels Butterfly-Kanüle punktiert und es wurde Blut in mehrere Citratröhrchen entnommen.

Das Blut wurde zur Abkühlung bei Raumtemperatur 30min stehengelassen. Schon vor der Blutentnahme wurden zwei Percoll-Lösungen – 63%ig und 72%ig – hergestellt und auf Raumtemperatur erwärmt. In durchsichtige 12ml Röhrchen wurden mit Stripetten jeweils vorsichtig 4ml 72%ige Percoll-Lösung einpipettiert, welche ganz langsam mit 4ml 63%iger Percoll-Lösung überschichtet wurden. Nach einer optischen Kontrolle bezüglich einer Phasentrennung wurde die 63%ige Percoll-Lösung mit 4ml Citratblut langsam überschichtet. Das Röhrchen wurde nun verschlossen und bei 500g, Raumtemperatur und für 29min ohne Bremse zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurden der Plasmaüberstand sowie die Lymphozyten-Monozyten-Bande verworfen und die PMNs mit einer Einwegpipette in ein auf Eis gelagertes 50ml Falcon-Gefäß überführt. Das Falcon wurde auf 50ml mit 4°C kaltem, selbst hergestelltem Erythrozyten-Lyse-Puffer aufgefüllt und für 10min

auf Eis zum Lysieren stehen gelassen. Anschließend wurde das Falcon mit 200g bei 4°C für 10min mit Bremse zentrifugiert und der Überstand danach dekantiert. Das PMN-Pellet wurde mittels einer 25ml Stripette in 10ml HBSS⁻ resuspendiert. Von diesen 10ml wurden nach kurzem Schwenken 10µl entnommen und in 90µl Türk'sche Lösung gegeben. Diese Lösung wurde gevortext und davon wurden wiederum 10µl in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Parallel dazu wurde das Falcon mit HBSS⁻ auf 50ml aufgefüllt und zum Waschen nochmals mit 200g bei 4°C für 10min mit Bremse zentrifugiert. Die absolute Anzahl an PMNs ergab sich aus der Zahl der PMNs in den vier Eckkammern der Zählkammer, die mit 250.000 multipliziert wurde. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand wieder dekantiert und das PMN-Pellet in dem errechneten Volumen HBSS⁻ resuspendiert, sodass die Konzentration 10 Mio. PMNs/ml betrug.

2.3.2 Konditionen und Stimulation

In ein FACS-Tube wurden jeweils 50µl der isolierten PMN-Lösung (0,5 Mio. PMNs) gegeben. Als nächstes wurden 500µl einer Stimulationslösung hinzu pipettiert, woran sich eine Inkubation der PMNs mit Stimulationslösung für 45min im Schüttelinkubator bei 37°C und 50rpm anschloss. Die Stimulationslösungen sind in Tabelle 18 dargestellt und enthielten rekombinantes humanes Netrin-4 (rhNtn4), BSA und / oder fMLP in spezifischen Verdünnungen in HBSS⁺.

Tabelle 18: Stimulationslösungen

Stimulationslösung	Ntn4 / BSA	fMLP
HBSS ⁺ / BSA	BSA in 1:100	
HBSS ⁺ / Ntn4	Ntn4 in 1:100	
HBSS ⁺ / BSA + fMLP	BSA in 1:100	fMLP in 1:1000
HBSS ⁺ / Ntn4 + fMLP	Ntn4 in 1:100	fMLP in 1:1000

Die Stimulation wurde mittels Waschen beendet. Das Waschen beinhaltete eine Zugabe von 1ml eiskaltem HBSS⁻, gefolgt von einer Zentrifugation bei 200g und 4°C für 10min und einer Dekantierung des Überstands. Anschließend erfolgte die Resuspension des Pellets in 100µl eiskaltem FACS-Färbepuffer. Die Proben wurden daraufhin auf Eis gelagert.

Das *Staining* für die Durchflusszytometrie erfolgte mit einem Antikörper-Mix. Die gekoppelten fluoreszenten Farbstoffe des Antikörpers waren hierbei sehr lichtempfindlich. Deswegen wurden dunkle Eppendorf-Cups verwendet und es wurde auf eine lichtgeschützte Durchführung des Versuches geachtet. Außerdem dienten als Kontrollen noch zwei weitere FACS-Tubes, die als Stimulationslösung HBSS⁺ / BSA und keine Antikörper des Antikörper-Mixes erhalten hatten. Eines der beiden Tubes erhielt hierbei als Negativkontrolle gar keine Antikörper, das Zweite erhielt als Positivkontrolle eine IgG-Kontrolle von 2µl für den FITC-Antikörper. Alle anderen Tubes erhielten einen der Antikörper-Mixe. Die Zusammensetzung des Ersten bestand aus anti-CD11b, anti-CD11b-akt., anti-CD66b und anti-CD62L; die Zusammensetzung des Zweiten war anti-CD11a, anti-CD11a-akt. und anti-CD66b. Der dritte Antikörper-Mix war komplexer aufgebaut. Er bestand aus einem anti-CD44-AK, an den am Abend zuvor ein AF488-markierter sekundärer Antikörper gebunden worden war sowie anti-CD66b. Bei diesem Experiment wurde als Positivkontrolle nicht der FITC IgG-AK genutzt, sondern der Sekundär-AK allein.

Tabelle 19: Antikörper für FACS-Staining

Antikörper	Hersteller	Menge pro Tube
Anti-CD11a-AK mouse anti-human PE	Becton, Dickinson and Company	10µl
Anti-CD11a-akt.-AK mouse anti-human FITC	Biolegend	2µl
Anti-CD11b-AK mouse anti-human FITC	Biolegend	1µl
Anti-CD11b-akt.-AK mouse anti-human PE	Biolegend	1µl
Anti-CD62L-AK mouse anti-human Pacific Blue	Biolegend	1µl
Anti-CD66b-AK mouse anti-human Pe-Cy7	Biolegend	1µl
Anti-CD44-AK mouse anti-human	Biolegend	1µl
AF488-AK chicken anti-rat	LF/Invitrogen	1µl

Vor dem 30-minütigen *Staining* der stimulierten PMNs im Kühltank mit den in Tabelle 19 aufgeführten Antikörpern wurden die FACS-Tubes nochmals gevortext. Nach dem *Staining* wurden die PMNs ein letztes Mal nach bekanntem Prinzip gewaschen, dekantiert und abschließend in 400µl CellFix resuspendiert.

Diese Lösung wurde erneut gevortext und anschließend lichtgeschützt verwahrt, bis die jeweilige durchflusszytometrische Analyse der Adhäsionsmoleküle begonnen wurde.

2.3.3 Durchflusszytometrische Analyse der Adhäsionsmoleküle

Durchgeführt wird die Durchflusszytometrie mit einem FACS-Gerät. Um einzelne Zellen sicher als PMNs identifizieren zu können, wurden die isolierten PMNs unter anderem mit einem Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Antikörper gegen CD66b (ein Oberflächenmarker von PMNs) (Paulsen et al., 2013) gefärbt.

Als FACS-Gerät diente das FACS CANTO II von Becton, Dickinson and Company, das mit 3 verschiedenen, in Tabelle 20 aufgeführten Lasern ausgestattet ist.

Tabelle 20: Laser des FACS CANTO II

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

Die Messungen wurden mit der Software BD FACSDiva, das *Gating* und die Berechnung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI, engl.: *mean fluorescence intensity*) mit der Software FlowJo durchgeführt.

Vor einer Messung am FACS-Gerät wurde stets ein *Cytometer Setup and Tracking* durchgeführt, um die Laser zu kalibrieren. Für diese Grund-Kalibrierung wurden die *Cytometer Setup Tracking Beads* von Becton, Dickinson and Company verwendet. Nach der Kalibrierung wurden die Proben analysiert. Hierbei wurden pro Probe 50000 Zellen vermessen, daraufhin folgte dann die nächste Probe. Nach Beendigung der Messungen wurde ein 30-minütiges Reinigungsprotokoll durchgeführt.

Um eine Kompensation zu erstellen, wurden zu Beginn der Messversuche Einzelfärbungen (engl.: *single stainings*) für jeden Farbstoff durchgeführt. Dazu wurden 100µl FACS-Waschpuffer mit jeweils 1 Tropfen *Beads* mouse anti-human von Becton, Dickinson and Company und dem jeweiligen Antikörper, mit

demselben Volumen wie beim normalen *Staining* (siehe dafür Tabelle 19), in einen Eppendorf-Cup gegeben. Eine Probe erhielt keinen Antikörper, sondern nur einen Tropfen *Beads* und fungierte damit als Negativkontrolle. Die Gefäße wurden nun nach kurzem Vortexen für 10min auf 4°C gestellt; auch bei diesen Schritten wurde möglichst lichtgeschützt gearbeitet. Nach der Inkubationszeit wurden die Eppendorf-Cups auf der höchsten Stufe bei 4°C für 1min zentrifugiert, wurde der Überstand dekantiert, das nicht-sichtbare Pellet in 200µl FACS-Waschpuffer resuspendiert, in FACS-Tubes überführt und dann bis zur Verwendung lichtgeschützt verwahrt.

Zur Identifikation einzelner Zellpopulationen wird das Prinzip des *Gatings* genutzt. Da es sich bei den Proben bereits um isolierte PMNs handelte, war ein *Gating* an sich nicht notwendig. Um aber ausschließlich unversehrte ganze Zellen in die Analyse einzuschließen, wurde dennoch ein SSC-FSC-*Gating* (engl.: *side scattering - forward scattering*) durchgeführt. Das folgende *Gating* mit CD66b diente der Qualitätsüberprüfung der PMN-Isolation. Nach dem *Gating* wurde für weitere Analysen nur die PMN-Population verwendet und bei dieser die MFIs der jeweiligen Antikörper mittels FlowJo Software errechnet.

2.4 Adhäsionsflussskammern

Die Adhäsionsflussskammern stellen ein artifizielles System dar, mit dessen Hilfe die Interaktion von Blutzellen – insbesondere von PMNs – mit einzelnen Adhäsionsmolekülen des Endothels untersucht werden kann. Als erstes wurden die Flussskammern gebaut (eine fertig gebaute Flusskammer ist in Abbildung 2 dargestellt). Dazu wurde mit Hilfe von zwei dünnen Streifen Nagellack ein kleines quadratisches Deckglas auf einem Objektträger befestigt, sodass das Deckglas circa 2mm in Richtung Objektträgermitte lag. Nun wurde von einer Glaskapillare (CM Scientific) ein 3,5cm langes Stück abgetrennt und mittig auf das Deckglas gelegt, sodass es in etwa 3mm über den Objektträger hinausstand. Im Anschluss daran wurde die Glaskapillare mit einem zweiten quadratischen Deckglas und Nagellack fixiert. Dabei war es wichtig, dass die Glaskapillare ihre parallele Position zu den Seitenkanten beibehielt, ansonsten musste die Glaskapillare repositioniert werden. Eine *Coating*-Solution wurde zum *Coating* vorbereitet,

diese enthielt verschiedene in Tabelle 21 beschriebene Adhäsionsmoleküle in bestimmten Massenkonzentrationen.

Tabelle 21: Adhäsionsmoleküle für FC

Adhäsionsmolekül	Zielkonzentration in µg/ml	Volumen in µl
BSA	100	5
E-Selektin	5	2,5
Ntn4	10	5
P-Selektin	50	12,5
ICAM	5	6,25

Die Lösung wurde mit NaCl (0,9%ig) auf 50µl aufgefüllt. Meist wurde ein *Zweifach-Coating* (E-Selektin und ICAM) oder *Einfach-Coating* (nur E-Selektin) verwendet. Es wurden aber auch alle anderen möglichen Kombinationen mit den in Tabelle 21 aufgeführten Proteinen durchgeführt. Die Glaskapillaren wurden mithilfe einer Pipette gecoatet, wobei jeweils ein Tropfen der *Coating*-Lösung an das überstehende Ende der Glaskapillare gehalten und, durch Kapillarkräfte bedingt, eingezogen wurde. Die Glaskapillare inkubierte daraufhin für zwei Stunden.

Nun wurde ein auf ca. 30cm zurecht geschnittener, dünner Gummischlauch über die Glaskapillare gestülpt, welcher davor mit NaCl (0,9%ig) gespült wurde. Der Schlauch, die Glaskapillare und die Deckgläser wurden anschließend mit einem Tropfen Epoxid-Kleber auf die gemeinsame Schnittstelle aneinander fixiert. Nach zwei Stunden *Coating* wurden die Glaskapillaren mit einer Casein-Lösung geblockt und für eine weitere Stunde inkubiert.

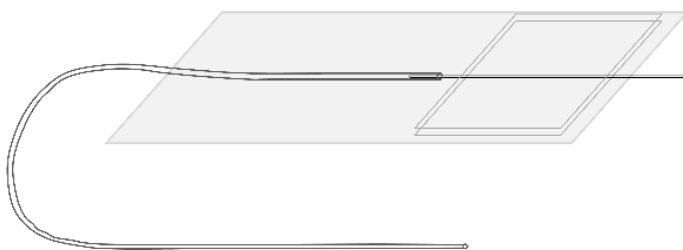


Abbildung 2: Flusskammeraufbau

2.4.1 Blutentnahme

Die Blutentnahmen folgten immer dem gleichen Ablauf (siehe Kapitel 2.3.1). Zur Antikoagulation wurden dem Vollblut bei diesem Versuch 10IE Heparin/ml hinzugefügt.

2.4.2 Konditionen, Stimulationen und Antikörper-Inkubationen

Das abgenommene und heparinisierte Blut wurde nun gegebenenfalls 45 Minuten vor Beendigung des Casein-Blocks mit Antikörpern, die in Tabelle 22 aufgeführt sind, in einem Wasserbad bei 37 Grad für 15min präinkubiert.

Tabelle 22: Antikörper für Flusskammer

Antikörper	Zielkonzentration in µg/ml Blut	Benötigtes Volumen des AKs in µl	Konzentration des AKs µg/µl
Anti-L-Selektin-AK	20	20	0,5
Anti-PSGL-1-AK	20	20	0,5
Anti-LFA-1-AK	10	5	1
Anti-Mac-1-AK	10	5	1
Anti-Neo-1-AK	10	25	0,2
Anti-CD44-AK	5	5	0,5

Die benötigten Volumina sind für 500µl Gesamtvolumen ausgerechnet, das sich auf 50µl Stimulationslösung und 450µl Blut bzw. Antikörper-Lösung mit Blut (mit Blut auf 450µl aufgefüllt) aufteilt. Die Antikörper-Präinkubation entfiel, wenn keine AK benötigt wurden.

Nach den 15min Präinkubation in einem 37°C warmen Wasserbad wurden die Blutproben mit Netrin-4 oder einer BSA-Kontrolle stimuliert. Die Konzentration von Netrin-4 betrug in der Blutprobe nach Stimulation 1µg/ml, die der BSA-Kontrolle 10µg/ml. Um diese Konzentrationen zu erreichen, wurden zu den 450µl Blut bzw. Blut-Lösung jeweils 50µl Netrin-4 bzw. BSA-Kontroll-Lösung gegeben. Beide Lösungen wurden mit einer 1:10 Verdünnung in PBS⁻ hergestellt. Nach weiteren 30min Inkubation im 37°C warmen Wasserbad konnte nun mit der Flusskammeranalyse gestartet werden.

2.4.3 Mikroskopie, Auswertung und Parameter

Die Flusskammer wurde auf einer Deckglaskonstruktion auf dem Objektträgertisch mit Tesafilm fixiert. An das freie überstehende Ende der Glaskapillare wurde ein Spritzenkonus gehalten, in dem sich das fertig stimulierte und inkubierte Blut befand. Durch das Fallenlassen des Schlauchs von derselben Höhe, auf der sich die Glaskapillare zu Beginn befand, wurde, durch die Schwerkraft und die Kapillarkräfte bedingt, das Blut durch die Glaskapillare gezogen. Auf dem Bildschirm konnte nun ein Blutfluss beobachtet werden. Nachdem sich dieser stabilisiert hatte, wurde die komplette Kapillare mittels Mikroskops durchgesehen und an den repräsentativsten Stellen wurden mit den meisten rollenden neutrophilen Granulozyten die 10-sekündigen Videos (jeweils 5-10 pro Flusskammer) aufgenommen.

An einem Computer wurden die Videos mit der Software ‚Imaging Software, NIS-Elements Advanced Research Analysis‘ (Version 4.20) ausgewertet. Die Auswertung erfolgte verblindet, sodass beim Auswerten nicht bekannt war, zu welcher Kondition das jeweilige Video gehörte. Zur Analyse wurden PMNs, die sich mindestens 5sek lang gleichmäßig langsam und ohne zu springen in dem gefilmten Ausschnitt bewegten, verwendet. Wenn ein PMN für geeignet befundet wurde, wurden sein Startpunkt und sein Zielpunkt des gleichmäßigen Rollens markiert und über die Strecke in Pixel die Geschwindigkeit, die sogenannte Rollgeschwindigkeit, ermittelt. Sollte das gleichmäßige Rollen eines jeweiligen PMNs nicht das ganze Video anhalten, wurde die Zeit der gleichmäßigen Bewegung notiert. Die Rollgeschwindigkeit wurde mittels Excel errechnet; hierbei wurde die gemessene Strecke in Pixel zuerst mit 0,32 multipliziert und daraufhin durch die Sekunden-Anzahl des gleichmäßigen langsamen Rollens geteilt. Die Rollgeschwindigkeiten der verschiedenen Konditionen konnten nun miteinander verglichen werden.

2.5 Transwell Migration Assay

Ein Transmigration Assay ist eine Methode, mit der man die Transmigration von PMNs durch eine Endothelschicht in vitro simulieren kann. Die neutrophilen Granulozyten werden hierbei durch einen Chemokingradienten dazu angeregt,

einen Epithelzell-Monolayer zu durchwandern. Verwendet wurden Transwell-platten mit jeweils 24 Wells. In jede Transwell-Kammer (insgesamt 12), die in einem inneren Well stand, wurden drei Tage vor Beginn des Versuches 10.000 HMEC-Zellen pipettiert. Die HMEC-Zellen wurden davor, wie in Kapitel 2.2.1 erklärt, aus ihrer Zellkulturflasche mit Accutase abgelöst und daraufhin wurde die Ablösereaktion mit Medium abgestoppt. Um eine genaue Zellanzahl in jede Transwell-Kammer pipettieren zu können, wurde mit 10µl dieser HMEC-Zell-Lösung mikroskopisch die Konzentration von HMEC-Zellen pro ml Medium bestimmt. Die Lösung wurde so weit verdünnt, dass die Konzentration 2×10^5 HMEC-Zellen / ml HMECC-Medium betrug. Jede Transwell-Kammer erhielt nun 50µl dieser Lösung und wurde anschließend auf 1ml Gesamtvolumen mit HMEC-Medium aufgefüllt.

Einen Tag vor Beginn des Versuches wurden die Farbe und Qualität des Mediums untersucht und wurde bei Bedarf ein Medienwechsel in den Transwell-Kammern durchgeführt. Am Versuchstag wurde mikroskopisch überprüft, ob die benötigte 90%ige Konfluenz der HMEC-Zellen gegeben war.

2.5.1 Blutentnahme und Granulozytenisolation mittels Percoll-Methode

Die Blutentnahme und die Granulozytenisolation erfolgte wie bereits in Kapitel 2.3.1 aufgeführt. Allerdings war bei diesem Versuch die benötigte Konzentration 2×10^7 PMNs/ml Lösung und nicht die sonst übliche Konzentration von 10^7 PMNs/ml Lösung. Deswegen wurde die Lösung nach dem Auszählen in der Neubauer Zählkammer auf 2×10^7 PMNs/ml Lösung verdünnt.

2.5.2 Konditionen und Stimulation

Bei diesem Versuch gab es zwei verschiedene Stimulantien, die in Tabelle 23 genannt sind, und eine Negativkontrolle, bestehend aus HBSS⁺ allein. Es wurden pro Well immer 50µl Lösung benötigt; die Lösung wurde mit HBSS⁺ jeweils auf 50µl aufgefüllt.

Tabelle 23: Stimulationslösungen TEM

Stimulationslösung	Menge Ntn4- / BSA-Lsg. in μl	Masse Ntn4 / BSA in μg
HBSS ⁺ (neg. Kontr.)	0	0
HBSS ⁺ / BSA	10	1
HBSS ⁺ / Ntn4	10	0,1

2.5.3 Versuchsablauf und Analyse

Die äußeren Basalwells wurden mit 900 μl HBSS⁺ und fMLP (1:1000 Verdünnung) – reines HBSS⁺ als Negativkontrolle – befüllt. Das fMLP diente hierbei als Chemokin, das die neutrophilen Granulozyten zur Transmigration durch die Membran und die Endothelzellen veranlassen sollte. Das Medium in den Transwell-Kammern wurde abgekippt, anschließend wurden die Transwell-Kammern in einem Becherglas mit 37°C warmen HBSS⁺ gespült, abgeschüttelt und umgedreht auf ein Zellstofftuch gestellt. Die Transwell-Kammern wurden nun in die mit HBSS⁺ und fMLP befüllten äußeren Wells gestellt. Nun wurden auf jede Transwell-Kammer 50 μl (50 μl $\pm$ 10⁶ PMNs) der isolierten PMNs und 50 μl der jeweiligen Stimulationslösung pipettiert. Zur Transmigration kamen die Transwell-Platten in einen Schüttelinkubator, in dem sie, mit einem Deckel versehen, bei 37°C, 20rpm und für 90min inkubierten. In den Schüttelinkubator wurden zusätzlich zwei Eppendorf-Cups mit jeweils 50 μl PMN-Lösung gelegt, die später als Standardreihe zur Eichung bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung dienen sollten. Nach erfolgter Transmigration folgte die Lyse der PMNs für die Myeloperoxidase-(MPO) Messung. Dazu wurden die Transwell-Kammern aus den äußeren Basalwells entfernt. In die äußeren Basalwells wurden nun 50 μl Citratpuffer und 50 μl 10fach TritonX100 hinzugefügt. Die Standard Tubes erhielten zusätzlich zu den 50 μl Citratpuffer und 50 μl 10fach TritonX100 noch 850 μl HBSS⁺. Die Transwell-Platten wurden über den äußeren Wells mit Parafilm verschlossen und für 20min auf Eis mit 80rpm inkubiert. Die Parafilmbedeckung wurde mittig mit einem Skalpell eingeritzt und anschließend für jeweils 20sek pro Basalwell mit Ultraschall bestrahlt. Nun wurde eine Standardreihe mit jeweils 500 μl vorpipettiertem HBSS⁻ angesetzt, die später als Kalibrierungslinie diente.

Es folgte eine MPO-Messung mithilfe des TECAN-Readers. Die Myeloperoxidase ist ein Enzym, das die Bildung von hypochlorischer Säure (HOCl) aus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Salzsäure (HCl) katalysiert und in den Granula neutrophiler Granulozyten vorkommt. Die Aktivität der MPO ist proportional zur Anzahl der transmigrierten PMNs. ABTS (2,2'-Azino-di[3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonsäure]) ist ein Substrat der MPO und kann zum Nachweis eingesetzt werden. Nach Umsetzung durch MPO entsteht das grünliche ABTS-Kation.

Alle Proben wurden für die MPO-Messung als Doppelwerte in eine 96-Well-Platte pipettiert. Es wurden jeweils 50 μl der lysierten PMN-Lösung und 75 μl des frisch hergestellten ABTS-Puffer in ein Well gegeben. Die Wells wurden geschwenkt, die Luftblasen abgestochen und abschließend im Dunkeln für circa 10min inkubiert. Nach der Inkubation wurden am TECAN bei 405nm Wellenlänge mit der MPO-Methode vermessen. Mittels der Rohwerte und der Standardkurve (Standard 1 waren genau 1.000.000 Zellen/ml) war es später möglich, die Anzahl der transmigrierten PMNs zu bestimmen.

2.6 Leukozyten-Intravitalmikroskopie des Ischämie-Reperfusionseffekts am murinen M. cremaster

2.6.1 Versuchstiere und Gruppen

Die Versuchstiere waren 10 bis 14 Wochen alte männliche Hausmäuse (*Mus musculus*). Die Unterbringung erfolgte bei Raumtemperatur und in Käfigen zu je max. 5 Mäusen in der Tierhaltung des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Eberhard Karls Universität Tübingen. Ein regelmäßiger Hell-Dunkel-Rhythmus war gewährleistet. Alle Tiere erhielten geeignetes Vollwertfutter und Wasser ad libitum. Durch das Regierungspräsidium Tübingen wurde die Genehmigung für die Tierversuche erteilt (Genehmigungsnummer Tierversuchsantrag A09/19G).

Die im Folgenden als Wildtyp-Tiere (WT) bezeichneten Mäuse waren vom Typ C57Bl/6N und wurden von Charles River bezogen. Die im Folgenden als Netrin-4^{-/-} oder Netrin-4-Knockout-Tiere bezeichneten Mäuse waren ebenfalls auf einem C57Bl/6N-Hintergrund gezüchtete Mäuse vom homozygoten Genotyp

C57BL/6N-Ntn4^{tm1a(KOMP)Wtsi/Mmucd}. Der funktionelle Ganzkörper-Gen-Knockout via Missense-Mutation und fehlender mRNA-Synthese wurde mittels mRNA-Sequenzierung gesichert.

Die Versuchsgruppen bestanden aus je 5 Tieren.

2.6.2 Versuchsablauf und Präparation

Zunächst wurden die zu untersuchenden Tiere mittels gewichtsadaptierter Pentobarbital-Injektion (8mg/ml in 0,9% NaCl-Lösung, 80mg/kg KG) betäubt. Bei positivem *Toe-Pinch*-Reflex wurde 1/6 bis 1/3 der Einleitungsdosis zur Aufrechterhaltung der Betäubung nachgegeben. Über eine rektale Temperatursonde sowie eine rückgekoppelte Wärmematte auf dem Operationstisch wurde die Körpertemperatur der Maus konstant bei 37°C gehalten. Anschließend erfolgte die cervikale Präparation der Vena jugularis und die Einbringung eines Katheters. Hierüber wurden über den gesamten Versuchsverlauf alle benötigten Substanzen appliziert (Fluoreszenzfarbstoffe, Proteinlösungen). Der Musculus cremaster wurde unter einem OP-Mikroskop vom Typ Olympus S2X12 präpariert. Hierfür wurde das Skrotum auf einem Objektträger fixiert, der sich etwas höher als der OP-Tisch befand. Nach einer Hautinzision wurde die Skrotalhaut vorsichtig vom Cremastermuskel abpräpariert und der Muskel nach und nach freigelegt. Das Präparationsgebiet wurde durchgehend mit gewärmtem PBS-Puffer mittels Spritzenpumpe feucht gehalten. Der präparierte M. cremaster wurde anschließend mittels 4-0 Randligaturen auf einem Objektträger aufgespannt. Anschließend erfolgte der Transfer der Mikroskopierbühne auf den Objektisch eines Nikon Eclipse Ci-Mikroskops und die intravenöse Applikation von 200µl einer 1:10-Verdünnung eines fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Ly6G-Antikörpers.

2.6.3 Intravitalmikroskopie, Auswertung und Parameter

Mittels 25er WD-Fluoreszenzobjektiv, einer Kamera (Orca Flash 4.0, Hamamatsu), eines dualen Emissions-Bildsplitters und der Nikon NIS Elements AR-Software (Version 4.30) wurden mind. 5 verschiedene Venolen (Durchmesser 20-40µm) ausgewählt und Videoclips mit einer Länge von 10sek mit einer Auflösung von 2048 × 1024 Pixeln bei einer Bildrate von 16/sek

aufgezeichnet (Grundlinie). Anschließend erfolgte die Induktion einer totalen Cremaster-Ischämie mittels Gefäßklemme (Typ V2) am Cremaster-Oberpol. Die erfolgreiche Ischämie war umgehend anhand eines totalen Sistierens des arteriellen Blutflusses im gesamten Cremaster sichtbar. Nach 30min erfolgte die Lösung der Gefäßklemme und die Einleitung einer 30-minütigen Reperusionsphase. Hiernach wurden die gleichen Venolen der Grundlinien-Messungen erneut aufgesucht und 10-sekündige Videoclips aufgenommen (Bezeichnung: I/R).

Die Auswertung erfolgte an einer PC-Workstation mithilfe der Software Nikon NIS Elements (Version 4.30). In den aufgenommenen venolösen Regionen wurde ein Abschnitt von 100µm Länge für die Analyse markiert. Fluoreszenz-markierte Leukozyten, die sich mindestens 7sek im Zielbereich befanden, wurden markiert und auf ihrem Weg durch das Gefäßlumen manuell verfolgt. Mit der Software wurde automatisiert der Parameter Rollgeschwindigkeit (µm/sek) berechnet. Manuell wurde zudem die Anzahl von rollenden Zellen, adhärierenden Zellen (keine Bewegung während der Aufnahme) und transmigrierten Zellen (extravasal) erhoben. Die Werte wurden auf einen Gefäßdiameter von 40µm (entsprechend einer zwei-dimensionalen Fläche von 4000µm²) normalisiert.

2.7 Murines myokardiales Ischämie-Reperusionsmodell mittels temporärer LAD-Okklusion

2.7.1 Versuchstiere und Gruppen

Die Versuchstiere entsprachen in Haltung, Alter und Genehmigung jenen aus Versuch 2.6. Die Versuchsgruppen waren stets bzgl. exaktem Alter und Geschlecht ‚gematched‘. Die WT- und Netrin-4^{-/-}-Tiere kamen auch bei diesem Versuch zum Einsatz. Zusätzlich dienten Tiere des Genotyps C57BL/6N-Neo^{1^{Gt}(KST265)Byg} als Ganzkörper-Knockout für Neogenin und werden im Folgenden als Neogenin^{-/-} bezeichnet. Die Generierung einer gewebespezifischen Depletion von Netrin-4 wurde mithilfe des Cre/loxP-Systems realisiert.

Tiere vom Genotyp C57BL/6N-Ntn4^{tm1c(KOMP)Wtsi}/Mbp besitzen loxP-Sites, welche das kritische Exon 5 des Netrin-4-Gens flankieren. Durch Verpaarung mit hemizygoten Tieren mit einer gewebespezifischen Cre-Expression nach

Kopplung an einen konditionellen Promotor kam es in diesen Zellen zu einer Exzision des kritischen Exons und folglich einem Missense-induzierten funktionellen Knockout. Die Genotypisierungen der Zuchtnachkommen erfolgten durch einen externen Dienstleister (Fa. StarSeq, Mainz). Folgende Cre-Linien wurden verwendet:

Tabelle 24: Cre-Linien

Knockout-Name	Cre-Linie	Gewebespezifischer Knockout
Ntn4-HBB-Cre	C57BL/6N-Tg(HBB-cre)12Kpe/J	erythrozytärer Knockout
Ntn4-Lyz2-Cre	B6.129P2-Lyz2tm1(cre)lfo/J	myeloider Knockout
Ntn4-Myh6-Cre	B6.FVB-TG(Myh6-cre)2182Mds/J	kardiomyozytärer Knockout
Ntn4-PF4-Cre	C57BL/6-Tg(Pf4-icre)Q3Rsko/J	thrombozytärer Knockout
Ntn4-Tie2-Cre	B6.Cg-Tg(Tek-cre)12Flv/J	endothelialer Knockout

Cre-Tiere aus den entsprechen Zuchten ohne loxP-Sites um das Exon 5 des Netrin-4-Gens dienten jeweils als Kontrolltiere.

2.7.2 Operationen und Euthanasie

Die Operationen fanden ebenso wie der Versuchsablauf in Kapitel 2.6.2 unter einem Olympus S2X12-Mikroskop statt. Ebenso waren die Narkose und die Temperaturregulation identisch mit denen in Kapitel 2.6.2. 15min nach Pentobarbital-Injektion wurden die Mäuse in Rückenlage auf einem Kork-Operationstisch mittels Extremitäten- und Oberkiefer-Ligaturen fixiert. Nach negativem *Toe-Pinch*-Reflex wurde der Hals von ventral median inzidiert. Anschließend erfolgte die stumpfe Präparation der Speicheldrüsen und der Schilddrüse. Nach einem kaudalen Querschnitt durch die prätracheale Muskulatur wurde diese stumpf nach lateral abpräpariert, wodurch die Trachea von ventral frei einsehbar war. Nun erfolgte eine orotracheale Intubation unter Sicht mit einer 22-Gauge-Insyte-Kanüle. Nach erfolgreicher Intubation erfolgte die druckkontrollierte Ventilation mittels eines Servo900C (Siemens) mit einer FiO₂ von 1,0, einer Frequenz von 110/min, einem PIP von 20mbar, einem PEEP

(engl.: *positive end-expiratory pressure*) von 5mbar und einem I:E-Verhältnis von 1:3.

Nun wurde die linksseitige Karotisloge stumpf freipräpariert und die A. carotis communis langstreckig unter Schonung des Nervus vagus freipräpariert. Das kraniale Ende (an der Bifurkation der A. carotis communis in interna und externa) wurde mittels einer 4-0 Prolene Ligatur verschlossen und das Fadenende unter leichter Spannung der Arterie am Tisch fixiert. Am kaudalen Ende der präparierten Carotis wurde eine lose Ligatur vorgelegt und knapp distal hiervon eine Mikrogefäßklemme (Typ V1) eingebracht. Nun wurde das Gefäß am kranialen Ende proximal der Ligatur mit einer Mikroschere eingeschnitten und ein Katheter in das Lumen bis zur Gefäßklemme eingeführt und bis zum Verschwinden der Spitze im thorakalen Gefäßbereich vorgeschoben und anschließend endgültig fixiert. Der Katheter wurde in eine Spritzenpumpe eingelegt, welche mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt und mit einer Laufrate von 100µl/h eingestellt war.

Nun erfolgte die mediane Inzision der ventralen Thoraxhaut und eine stumpfe Abpräparation derselben zur linkslateralen hinteren Axillarlinie. Mithilfe einer bipolaren Elektrohautschere erfolgte eine links parasternale Thorakotomie vom 2. Intercostalraum (ICR) bis zur unteren Thoraxapertur. Zur Spreizung des Zugangs wurden Retraktoren zu beiden Seiten im 3. – 4. ICR platziert. Nach stumpfer Abpräparation des Perikards und stumpfer Durchtrennung des linken Nervus phrenicus erfolgte die Unterstechung des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie (engl.: *left descending artery*, LAD) ca. 1mm unterhalb des linken Vorhofohrs mit Prolene-Nahtmaterial der Größe 8-0. Nach kurzer Anfeuchtung der Herzvorderfläche mit 37°C warmer physiologischer Kochsalzlösung wurde ein ca. 2mm langes Stück Plastiktubing über beide Fadenenden gefädelt. Die Fadenenden wurden nun über jeweils eine Umlenkrolle gelegt und mit jeweils einem Gewicht von 1g behängt, um einen Herzinfarkt herbeizuführen. Bei den Kontrollen wurde kein Gewicht an die Fäden gehängt, sodass die LAD geöffnet blieb (vgl. Abbildung 3). Der vollständige Verschluss der LAD war durch ein Verblassen des von der LAD versorgten Vorderwandmyokards innerhalb weniger Sekunden und durch ein visuelles



Die Reperfusionsphase wurde durch Abhängen der Gewichte eingeleitet, sodass die LAD wieder vollständig durchblutet werden konnte. Das zuvor leicht weißliche Gebiet färbte sich durch eine Hyperämie sofort wieder rötlich.

66

Karotiskatheter, begleitet vom Einstellen der maschinellen Beatmung, wobei die Mäuse in tiefer Narkose starben.

Die Mäuse, bei denen diese Operation so durchgeführt wurden, werden als MIR-Tiere (engl.: *myocardial infarction reperfusion*) bezeichnet. Die Kontroll-Tiere werden als Sham-Tiere (von engl.: *shine* – scheinen) bezeichnet. Bei deren Operationen waren fast alle Schritte identisch, allerdings wurde die Ligatur um die LAD nicht zugezogen und blieb offen, weswegen es zu keiner Unterbindung des koronaren Blutflusses in der LAD kam.

2.7.3 Infarktgrößenbestimmung

2.7.3.1 Bestimmung des infarzierten Areal mittels TTC-Färbung

Bei den Mäusen, bei deren Herzen die Infarktgröße bestimmt werden sollte, wurde die koronare Ligatur nun irreversibel zugeknotet und danach über den Karotiskatheter 300-600µl Evans Blue (1% Evans Blue in PBS⁻, Sigma-Aldrich) gespritzt. Nun wurden die Herzen entnommen, dabei alle Gefäße herznah abgetrennt, die Herzen abgetupft und daraufhin für 10min bei -20°C eingefroren. Das Herz wurde nun mittels einer Matrix (Zivic Instruments) in 1mm dicke Scheiben geschnitten und für 10min in 37°C warmen 2ml 1% Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung (TTC-Lösung) gefärbt. Daraufhin wurden die Herzschnitte für einen Tag in 3,7%ige-Formalinlösung gelegt und nach 24h zwischen zwei herkömmlichen Objektträgern im Wasserbad mittels Mikroskopkamera (Leica) fotografiert. Die Evans Blue-Lösung färbt nicht-ischämische Areale blau, die TTC-Färbung färbt NADPH und somit vitales Gewebe rot. Nekrotisches avitales Gewebe nimmt keine Färbung an (weiß). Der ischämische Bereich, das sogenannte Risikogebiet (engl. *area at risk* – AAR), sowie der infarzierte nekrotische Bereich wurden nun in ein Verhältnis zueinander gesetzt (Infarktgröße / AAR) und dieses Verhältnis wird als Infarktgröße der Area at risk angegeben. Je höher dieser Wert ist, desto größer ist der Infarktschaden.

2.7.3.2 Troponin-Konzentrationsbestimmung im Serum mittels ELISA

Die gewonnenen Mausserumproben (siehe Kapitel 2.7.2) wurden unverdünnt mithilfe eines ELISA-Kits für Troponin I Type 3 von Cloud-Clone Corp.

entsprechend den Herstellervorgaben nach dem in Kapitel 2.2.4 beschriebenen Verfahren analysiert.

2.7.3.3 Netrin-4-Konzentrationsbestimmung im Serum mittels ELISA

Ebenso wurden für den Netrin-4-ELISA die gewonnenen Mausserumproben (siehe Kapitel 2.7.2) unverdünnt mithilfe eines ELISA-Kits für Maus-Netrin-4 von Cusabio entsprechend den Herstellervorgaben analysiert.

2.7.4 Immunfluoreszenzhistologie

Bei den Mäusen, deren Herzen für Immunfluoreszenz-Färbungen verwendet wurden, wurde durch den Karotiskatheter nach Exsanguination in tiefer Narkose 3ml 3,7%ige-Formalinlösung gespült. Die Herzen wurden entnommen, dabei alle Gefäße herznah abgetrennt, das Herz abgetupft und daraufhin in einer 3,7%ige-Formalinlösung bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Mäuseherzen mussten nun noch entwässert, eingebettet und geschnitten werden. Die Entwässerung und Entparaffinierung liefen hierbei nach dem in Tabelle 25 beschriebenen Programm im Gewebeinfiltrationsautomaten automatisch ab.

Tabelle 25: Entwässerung und Entparaffinierung

Entwässerung		Entparaffinierung	
Substanz	Dauer	Substanz	Dauer
70% Ethanol	1:30h	Xylol	6min
70% Ethanol	1:00h	Xylol	6min
96% Ethanol	1:30h	Xylol	6min
96% Ethanol	1:00h	100% Ethanol	3min
100% Ethanol	1:30h	100% Ethanol	3min
100% Ethanol	1:00h	96% Ethanol	3min
100% Ethanol	1:00h	70% Ethanol	3min
Xylol	1:30h	Aqua. Dest.	5min
Xylol	1:30h	Aqua. Dest.	5min
Xylol	1:00h	Trispuffer 1:10	5min
Paraffin	1:30h	Trispuffer 1:10	5min
Paraffin	1:30h		

Anschließend erfolgte die Paraffineinbettung mittels Einbettssystem. Um die eingebetteten Herzen zu schneiden, wurde ein Mikrotom verwendet. Durch dieses wurden 3µm dicke Schnitte angefertigt, die kurz mithilfe eines Pinsels in ein kaltes Wasserbad gelegt (4°C) und von dort in ein warmes Wasserbad übergeführt (35°C) wurden. Nach vollständiger Streckung und Glättung des Schnitts wurden jeweils drei verschiedene Herzen auf einen Objektträger gezogen und zum Trocknen für 24h auf einen 42°C warmen Paraffinstrecktisch gelegt.

Vor Beginn der Immunfluoreszenzfärbung mussten die Schnitte zunächst entparaffiniert und daraufhin rehydriert werden. Beim Überführen des Färbegestells von der einen in die nächste Substanz wurde das Gestell immer sorgfältig abgetropft. Zur Entparaffinierung und Rehydrierung wurde das in Tabelle 26 aufgeführte Schema genutzt.

Tabelle 26: Entparaffinierung und Rehydrierung

Entparaffinierung		Rehydrierung	
Substanz	Dauer	Substanz	Dauer
Xylol	5min	100% Ethanol	5min
Xylol	5min	100% Ethanol	5min
Xylol	5min	96% Ethanol	5min
		70% Ethanol	5min

Nach der Rehydrierung wurden die Schnitte noch zwei Mal mit destilliertem Wasser und einmal mit TBS (engl.: *tris-buffered saline*) für jeweils 5min gewaschen. Durch die Formaldehyd-Fixierung sowie die Paraffineinbettung kam es zu Quervernetzungen der Proteine. Deswegen wurde nach dem Waschen eine Demaskierung mit Citratpuffer durchgeführt. Die Schnitte wurden für 7min bei circa 700W in der Mikrowelle in einer Plastikküvette erhitzt und dann für 20min abgekühlt. Daraufhin wurden die Schnitte jeweils für 5min einmal mit destilliertem Wasser und zwei Mal mit TBS gewaschen. Als nächstes wurden mit einem Pap Pen Fettringe um die Herzen gezogen. Deswegen wurde fortan nicht mehr in einen Färbekasten, sondern in einer feuchten Kammer inkubiert (siehe Kapitel 2.2.6). Dazu wurden auf jeden Herzschnitt bei allen kommenden Schritten immer 100µl der jeweiligen Lösung gegeben. Das weitere Vorgehen ist in Tabelle 16 beschrieben und wurde identisch zur Immunfluoreszenzfärbung der HMEC-Zellen durchgeführt. Diesem Ablaufschema wurde ab Zeile 6 gefolgt. Die verwendeten Primärantikörper sind in Tabelle 27 aufgeführt:

Tabelle 27: Antikörper für Histologie

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
cTnI-AK rabbit anti-mouse	Santa Cruz Biotechnology	1:50
Hif-1 α rabbit anti-human	Novus Bio	1:100
Ly6G-AK rat anti-mouse	Abcam	1:100
Ntn4-AK goat anti-mouse	R&D Systems	1:25
Ntn4-AK rabbit anti-mouse	Bioss Antibodies	1:20
VE-Cdh. goat anti-mouse	R&D Systems	1:10
AF 488 donkey anti-goat	TF/Invitrogen	1:500
AF 488 donkey anti-mouse	TF/Invitrogen	1:500
AF 546 donkey anti-rabbit	TF/Invitrogen	1:500
AF 594 goat anti-mouse	TF/Invitrogen	1:500
AF 647 goat anti-rabbit	TF/Invitrogen	1:500
AF 647 chicken anti-rat	TF/Invitrogen	1:500

Ziel der Immunfluoreszenzfärbungen war es herauszufinden, ob sich die Netrin-4-Expression bei den verschiedenen Konditionen unterscheidet und ob sich die Anzahl der ins Gewebe eingewanderten PMNs innerhalb der drei Konditionen unterscheidet. Dazu wurden bei jeder Kondition ca. 40 Sichtfelder fotografiert und die vorhandenen PMNs pro Sichtfeld gezählt.

2.8 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Prism 9 von Graph Pad Software nach Beratung durch das Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie (Tübingen). Das für die Genehmigungsverfahren der Tierversuchsvorhaben benötigte Biometrische Gutachten wurde ebenfalls durch das Institut für Klinische Epidemiologie und angewandte Biometrie (Tübingen) angefertigt.

Im Rahmen der Auswertung wurde bei Vergleichen von Gruppen auf Normalverteilung getestet. War diese nicht gegeben, wurden der Median und die 95%-Konfidenzintervalle angegeben und die Unterschiede zwischen den verschiedenen Konditionen mittels Mann-Whitney-U-Test errechnet. War eine Normalverteilung gegeben, wurden das arithmetische Mittel und die

Standardabweichung (mit $\pm$) angegeben sowie die Unterschiede der Gruppen mittels ungepaartem Student's t-Test errechnet.

Als signifikant wurden Ergebnisse mit Irrtumswahrscheinlichkeiten für $p < 0,05$ (*), für $p < 0,01$ (**), für $p < 0,001$ (***) und für $p < 0,0001$ (****) gewertet. Ergebnisse mit Irrtumswahrscheinlichkeiten für $p > 0,05$ wurden als nicht signifikant (ns) bezeichnet.

Alle In-vitro-Versuche wurden mehrfach durchgeführt und repräsentative Ergebnisse sind in dieser Arbeit dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Netrin-4 während Hypoxie in Endothelzellen

3.1.1 ELISA-Detektion von sezerniertem Netrin-4 im Überstand

Die Sezernierung von Netrin-4 in den Überstand wurde mithilfe eines Netrin-4-ELISAs in HBSS⁺ quantifiziert; die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

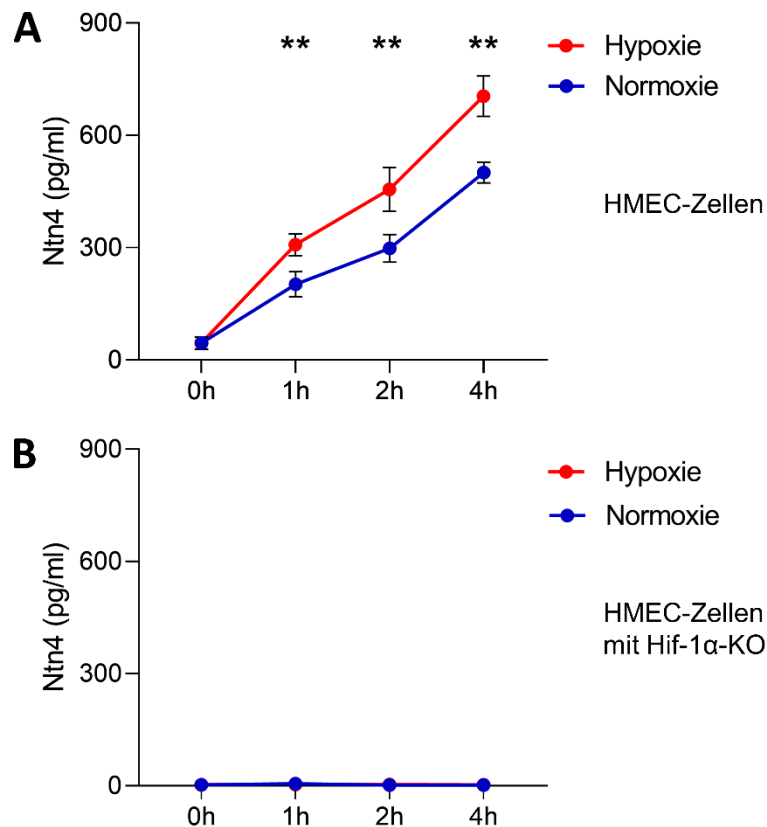


Abbildung 4: Netrin-4 Konzentration im Überstand von Endothelzellen

Abgebildet sind verschiedene Konzentrationen von Netrin-4 zu unterschiedlichen Zeitpunkten in Normoxie und Hypoxie. A: HMEC-Zellen; B: HMEC-Zellen mit Hif1α-KO (Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD (engl.: standard deviation), $n=4$). Signifikanzen beziehen sich auf Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie. Signifikanzniveau: **: $p<0,01$

Beim Zeitpunkt 0 Stunden (entspricht der Grundlinie) betrug die ermittelte Konzentration an Netrin-4 45,5pg/ml ($\pm$ 16,6pg/ml) im Überstand. Im Vergleich zur Normoxie kam es in Hypoxie zu verstärkter Sekretion von Netrin-4 (vgl. Abbildung 4, A). Die Konzentration stieg in Hypoxie im Durchschnitt auf 307,8pg/ml ($\pm$ 29,2pg/ml) nach 1h, über 455,7pg/ml ($\pm$ 58,4pg/ml) nach 2h und

bis auf 704,6pg/ml ($\pm 53,9$ pg/ml) nach 4h. Die Normoxiewerte waren im Vergleich dazu niedriger, von 202,4pg/ml ($\pm 33,6$ pg/ml) stiegen die Werte über 298,1pg/ml ($\pm 36,9$ pg/ml) bis auf 500,4pg/ml ($\pm 27,8$ pg/ml) nach 4h (vgl. Abbildung 4, A). Es zeigte sich sowohl in Hypoxie als auch in Normoxie bei den HMEC-Zellen ein Anstieg des sezernierten Netrin-4 mit Zunahme der Inkubationszeit (vgl. Abbildung 4, A). Über alle Inkubationsdauern hinweg bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Konditionen Hypoxie und Normoxie; es wurde in Hypoxie signifikant mehr Netrin-4 sezerniert als in Normoxie.

Bei den HMEC-Hif1 α -Knockout-Zellen hingegen wurden ausschließlich Netrin-4-Konzentrationen unterhalb der Detektionsschwelle (7,8pg/ml) des ELISAs gemessen.

3.1.2 Genexpressionsanalysen von Netrin-4 mit RT-PCR

Die Genexpression von Netrin-4 wurde mittels RT-qPCR ermittelt und jeweils auf das *House-Keeping*-Gen 18S normalisiert. Auch diese Versuche wurden wieder mit HMEC-Zellen (vgl. Abbildung 5, A) und HMEC-Zellen mit Hif1 α -Knockout (vgl. Abbildung 5, B) durchgeführt und die Ergebnisse werden in Abbildung 5 gezeigt.

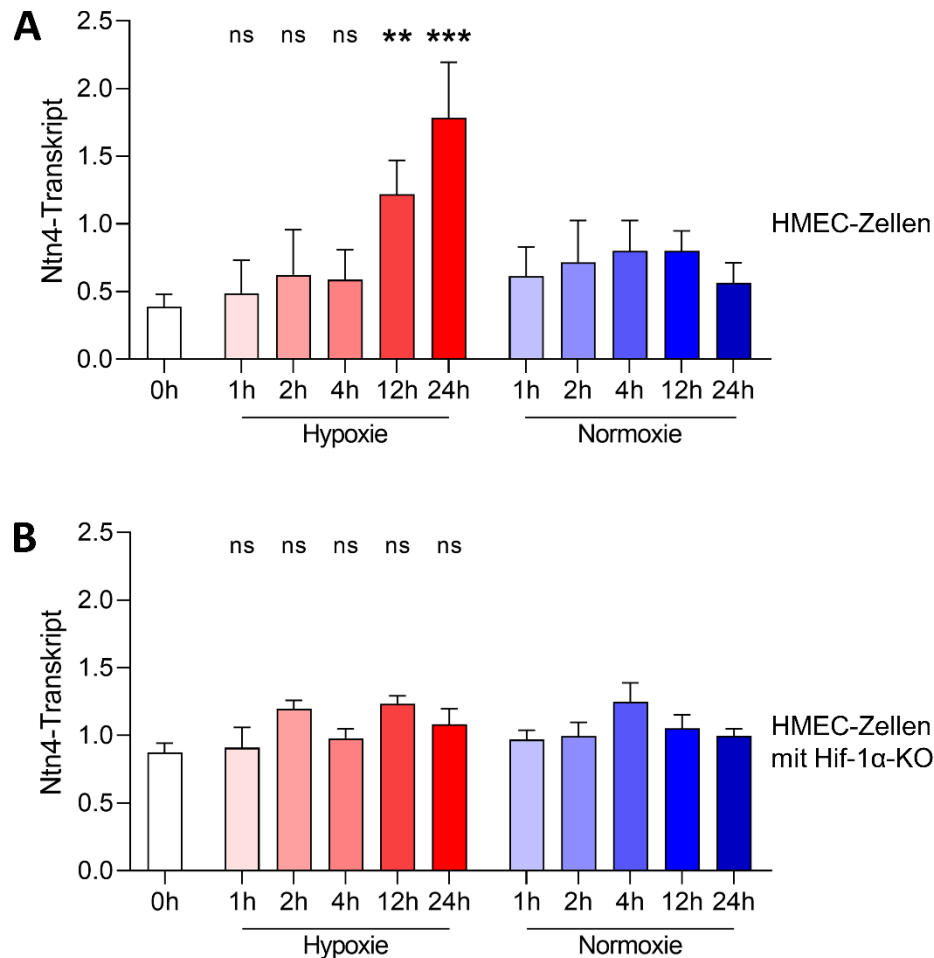


Abbildung 5: Netrin-4-Expression von Endothelzellen auf 18S normalisiert

Die Abbildung zeigt die auf das House-Keeping-Gen 18S normalisierten Expressionen der Netrin-4-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten in Normoxie und Hypoxie. Signifikanzen beziehen sich auf Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie. A: HMEC-Zellen; B: HMEC-Zellen mit Hif-1α-KO (Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n \geq 3$). Signifikanzniveau: ns: $p > 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$

Bei den HMEC-Zellen stieg die auf 18S-normalisierten NTN4-Expression nach 0h Hypoxie von 0,39 ($\pm$ 0,09) über 0,49 ($\pm$ 0,24) nach 1h Hypoxie, 0,62 ($\pm$ 0,33) nach 2h Hypoxie, 0,59 ($\pm$ 0,22) nach 4h Hypoxie, 1,22 ($\pm$ 0,25) nach 12h Hypoxie bis auf 1,78 ($\pm$ 0,41) nach 24h Hypoxie. In Normoxie hingegen blieb die Expression unabhängig von der Inkubationszeit weitestgehend konstant (vgl. Abbildung 5, A). Nach 1h Normoxie lagen die NTN4-Expressionen im Durchschnitt bei 0,61 ($\pm$ 0,22), nach 2h bei 0,72 ($\pm$ 0,31), nach 4h bei 0,80 ($\pm$ 0,23), nach 12h ebenfalls bei 0,80 ($\pm$ 0,15) und nach 24h Normoxie bei 0,56 ($\pm$ 0,15). Es ist folglich erkennbar, dass die mRNA-Expression von Netrin-4 in den HMEC-Zellen während Hypoxie stetig zunahm, wohingegen sie während

Normoxie nicht stetig zunahm. Während der ersten vier Stunden war kein Unterschied zwischen den Konditionen zu verzeichnen, nach 12 Stunden hingegen und nach 24 Stunden bestanden signifikante Unterschiede bezüglich der auf 18S-normalisierten NTN4-Genexpression. In hypoxisch behandelten Zellen war die Genexpression von Netrin-4 im Vergleich zu den Zellen in Normoxie erhöht.

Nach 0h Hypoxie betrug die NTN4-Expression von HMEC-Zellen mit Hif1 α -Knockout 0,87 ($\pm$ 0,07), nach 1h Hypoxie 0,91 ($\pm$ 0,15), nach 2h Hypoxie 1,20 ($\pm$ 0,06), nach 4h Hypoxie 0,98 ($\pm$ 0,07), nach 12h Hypoxie 1,23 ($\pm$ 0,06) und nach 24h Hypoxie 1,08 ($\pm$ 0,11). In Normoxie betrug die Expression nach 1h 0,97 ($\pm$ 0,07), nach 2h 1,00 ($\pm$ 0,10), nach 4h 1,25 ($\pm$ 0,14), nach 12h 1,05 ($\pm$ 0,10) und nach 24h 1,00 ($\pm$ 0,05) (vgl. Abbildung 5, B). Bei den HMEC-Zellen mit Hif1 α -KO blieb die Genexpression von Netrin-4 dementsprechend weitestgehend konstant und unterschied sich nicht zwischen Hypoxie und Normoxie (vgl. Abbildung 5, B).

3.1.3 Immunfluoreszenzmikroskopie von Netrin-4

Es wurden zusätzlich noch Immunfluoreszenzbilder der HMEC-Zellen angefertigt, um neben dem sezernierten Netrin-4 auch das in den Endothelzellen gespeicherte und exprimierte Netrin-4 nachzuweisen (vgl. Abbildung 6).

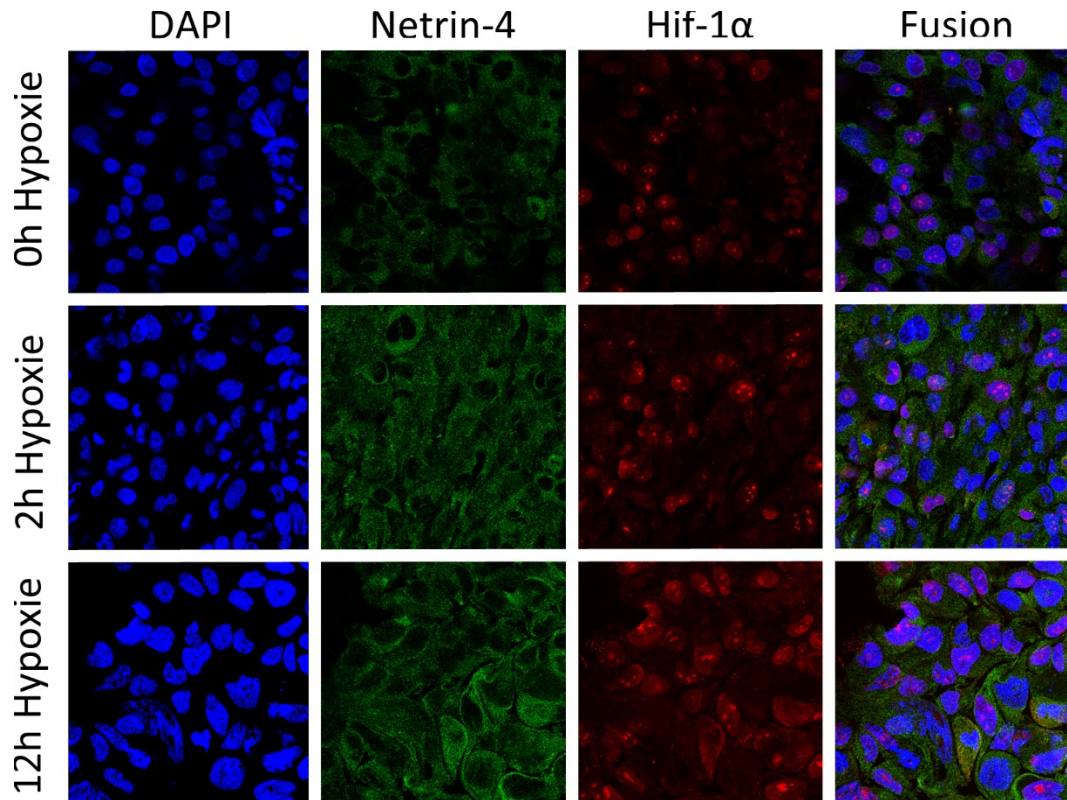


Abbildung 6: Immunfluoreszenz von HMEC-Zellen

Die Darstellung zeigt HMEC-Zellen mit Immunfluoreszenzfärbung nach verschiedenen langen Zeiträumen in Hypoxie. Dargestellt sind jeweils repräsentative Bilder einer Färbung: Färbung gegen Kerne mit DAPI (blau), Färbung gegen Zielprotein Netrin-4 (grün) sowie Hif-1α (rot). Aufnahme am konfokalen Mikroskop in 630facher Vergrößerung.

Mit Zunahme der Inkubationszeit in der Hypoxiekammer nahmen die Intensitäten von Netrin-4 und von Hif-1α zu. Wie die Immunfluoreszenzfärbung von HMEC-Zellen zeigt, wird Netrin-4 überall im Zytosol in Vesikeln gespeichert und auf der Zellmembran exprimiert (vgl. Abbildung 6).

3.2 Zelluläre Effekte von Netrin-4 auf neutrophile Granulozyten

Die Effekte von Netrin-4 auf neutrophile Granulozyten wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Die durchflusszytometrisch untersuchten Adhäsionsmoleküle waren CD11a, CD11b, CD62L, CD44 (siehe Abbildung 7) sowie CD66b als Qualitätsmarker für die Qualität der PMN-Isolation. Nach dem SSC-FSC-Gating waren jeweils deutlich über 90% der isolierten Zellen CD66b positiv.

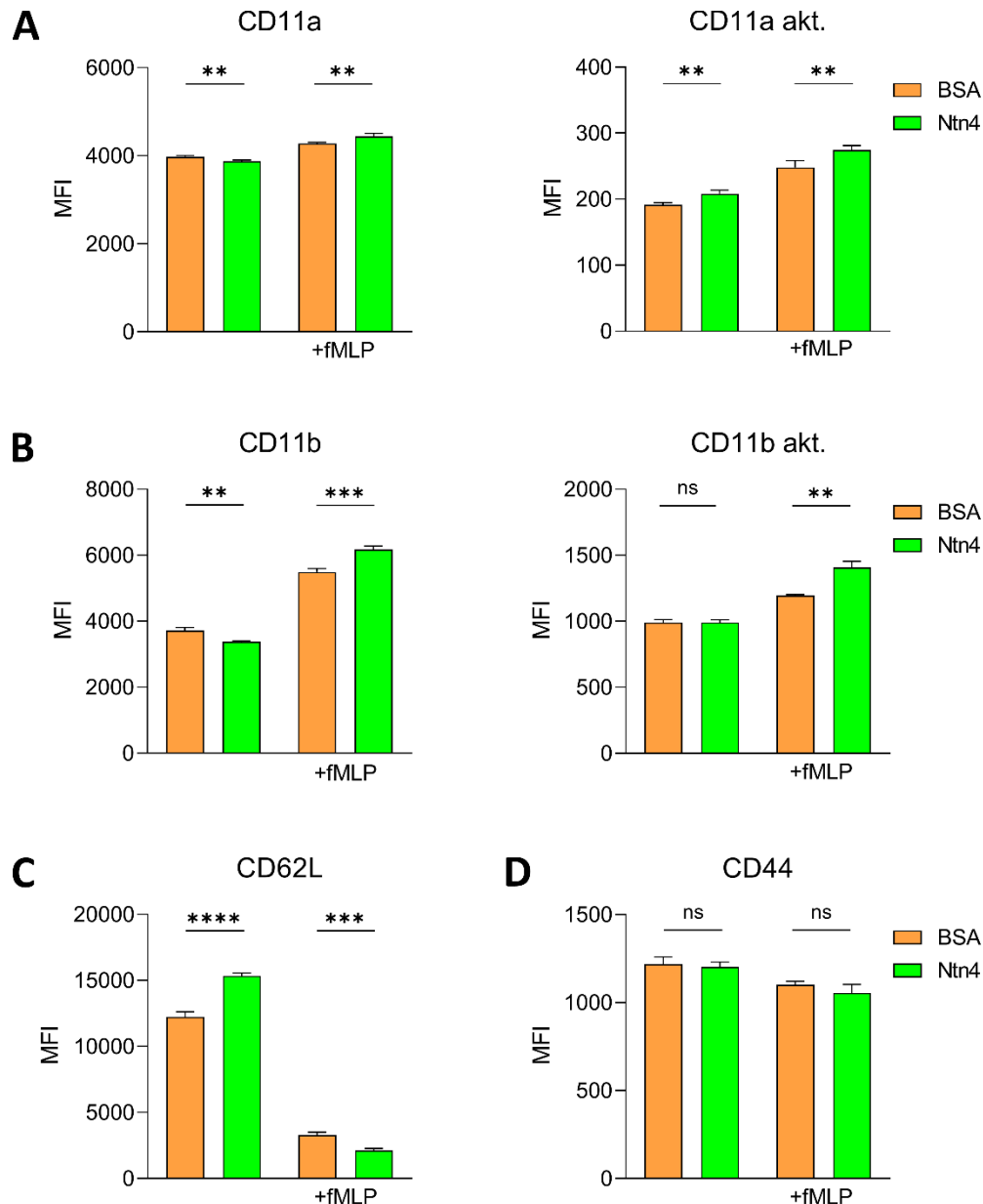


Abbildung 7: Expressionsveränderung von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von PMNs

Die Darstellung zeigt die MFIs aus der Durchflusszytometrie verschiedener Adhäsionsmoleküle. A: CD11a und aktiviertes CD11a; B: CD11b und aktiviertes CD11b; C: CD62L; D: CD44. (Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=4). Signifikanzniveau: ns: $p > 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$

Die mittlere Fluoreszenzintensität und damit die Expression des nicht-aktivierten Adhäsionsmoleküls wurde nach Zugabe von Netrin-4 bei CD11a (von 3974 ± 32 auf 3874 ± 27) und CD11b (von 3719 ± 94 auf 3374 ± 27) heruntergefahren. Wurde hingegen der Kondition mit Netrin-4 noch fMLP hinzugegeben, erhöhte

sich die Expression sowohl im Vergleich zu fMLP und BSA (bei CD11a von 4276 ± 24 auf 4444 ± 62 und bei CD11b von 5490 ± 110 auf 6167 ± 108) als auch zu allen Kombinationen ohne fMLP (vgl. Abbildung 7, A und B). Die Expression von aktiviertem CD11a und CD11b verhielt sich ähnlich wie die der nicht-aktivierten Integrine; wieder war der größte absolute Wert der MFI bei Netrin-4 und fMLP zu finden (akt. CD11a: 274 ± 7 ; akt. CD11b: 1407 ± 47). Auch hier gab es einen signifikanten Unterschied zu BSA und fMLP (akt. CD11a: 248 ± 10 ; akt. CD11b: 1196 ± 7) (vgl. Abbildung 7, A und B). Aktiviertes CD11a hatte auch bei unstimulierten PMNs (kein fMLP als Stimulans) einen signifikanten Unterschied zwischen Netrin-4 und seiner Kontrolle, BSA. Die MFI bei der Netrin-4-Konzentration lag höher als die der BSA-Kontrolle (BSA: 191 ± 4 , Ntn4: 208 ± 5) (vgl. Abbildung 7, A). Bei aktiviertem CD11b war hier kein signifikanter Unterschied vorhanden: 990 ± 24 mit BSA und 991 ± 20 mit Netrin-4 als Stimulans. Eine entgegengesetzte Veränderung hingegen war bei CD62L zu beobachten. Beim Vergleich von BSA und Netrin-4 war eine deutlich höhere MFI mit Netrin-4 als Stimulans (15340 ± 219) als mit der BSA-Kontrolle (12218 ± 413) zu verzeichnen. Allerdings war dies umgekehrt unter der Zugabe von fMLP: hier war die MFI mit Netrin-4 (2100 ± 176) geringer als mit BSA (3281 ± 227). Die MFIs bei CD62L sanken folglich drastisch im Vergleich zu den Konditionen ohne fMLP (vgl. Abbildung 7, C). Bei dem letzten gemessenen Adhäsionsmolekül, CD44, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle und Netrin-4 zu messen (BSA: 1218 ± 42 , Ntn4: 1201 ± 30 , BSA + fMLP: 1100 ± 21 sowie Ntn4 + fMLP: 1054 ± 49).

Es konnte gezeigt werden, dass Netrin-4 das Expressionsverhalten von Adhäsionsmolekülen auf PMNs verändert. Besonders die Expressionszunahme von CD11a und CD11b sowie aktiviertem CD11a und CD11b und die Expressionsabnahme von CD62L zusammen mit fMLP waren signifikant.

3.3 Einfluss von Netrin-4 auf die Adhäsion und Transmigration von neutrophilen Granulozyten

3.3.1 Adhäsionsverhaltensanalyse neutrophiler Granulozyten mit Adhäsionsflussskammern

Der Einfluss von Netrin-4 auf das Adhäsions- und Transmigrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten wurde mit verschiedenen Methoden sowohl in vitro als auch in vivo untersucht. Mithilfe von Adhäsions-Flussskammern wurden die PMN-Endothel-Interaktionen in vitro untersucht und die Rollgeschwindigkeiten von PMNs ermittelt (vgl. Abbildung 8). Ein Ausschnitt einer Kapillare mit markierten Wegen von PMNs ist in Abbildung 9 dargestellt.

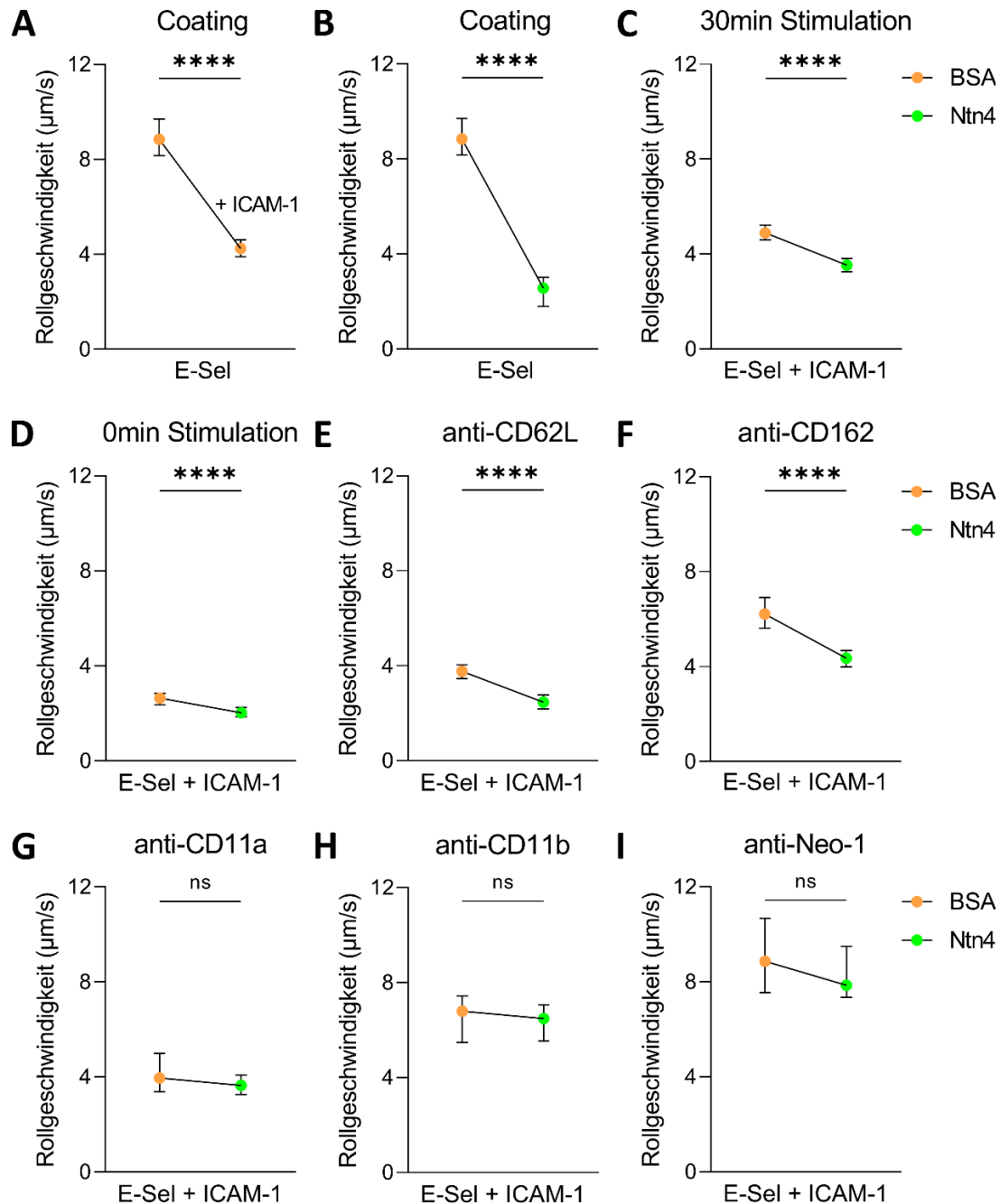


Abbildung 8: Rollgeschwindigkeit humaner PMNs in Flusskammer

Abgebildet sind die Rollgeschwindigkeiten humaner neutrophiler Granulozyten. Dargestellt sind verschiedene Konditionen: A: Vergleich E-Selektin versus E-Selektin mit ICAM-1 als Coating ohne Stimulation; B: E-Selektin als Coating; Vergleich von BSA- und Netrin-4-Stimulation mit 30min Stimulationszeit C: E-Selektin mit ICAM-1 als Coating; Vergleich von BSA- und Netrin-4-Stimulation mit 30min Stimulationszeit; D: E-Selektin und ICAM-1 als Coating; Vergleich von BSA- versus Netrin-4-Stimulation mit 0min Inkubationszeit; E: Bei allen Antikörperinhibitionsversuchen wurde zuerst 15min mit dem Antikörper präinkubiert und danach 30min mit BSA- versus Netrin-4-Stimulation; der erste Blocking-Antikörper war gegen L-Selektin gerichtet; F: Blocking-Antikörper gegen PSGL-1; G: Blocking-Antikörper gegen CD11a (LFA-1); H: Antikörper gegen CD11b (Mac-1); I: Blocking-Antikörper gegen Neogenin (Daten sind Median $\pm$ 95% KI, $n > 50$). Signifikanzniveau: ns: $p > 0,05$, ****: $p < 0,0001$

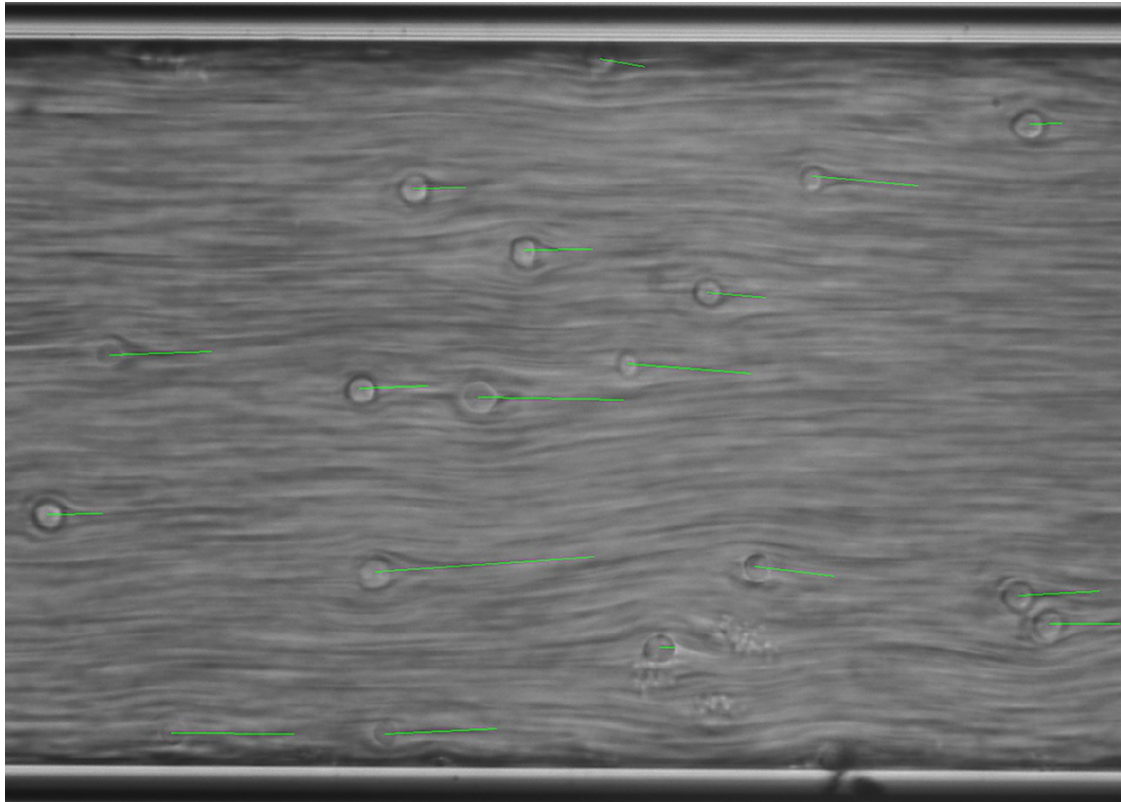


Abbildung 9: Vorgehen zur Messung der Rollgeschwindigkeit im Flusskammer-Modell

Abgebildet ist ein repräsentatives Bild einer Flusskammer zur Messung der Rollgeschwindigkeit der PMNs an der Glaskapillare. Hierbei ist jeweils der Weg eines PMN in 10 Sekunden markiert (grün).

Als Initialversuch wurden verschiedene Einfach-*Coatings* durchgeführt, um herauszufinden, welche Moleküle ein Rollen von PMNs an der Innenwand der Glaskapillare vermitteln können. Hierbei wurden E-Selektin, P-Selektin, ICAM-1, Netrin-4 und BSA verwendet. Unter allen Einfach-*Coatings* war allein E-Selektin in der Lage, ein Rollen zu vermitteln, wobei die Rollgeschwindigkeit im Median $8,84\mu\text{m/s}$ (95% KI von $8,17\mu\text{m/s}$ bis $9,71\mu\text{m/s}$) betrug (vgl. Abbildung 8, A). Nun wurden verschiedene Kombinationen ausprobiert, und zwar Zweifach- und Dreifach-*Coatings*. E-Selektin und ICAM-1 waren in Kombination in der Lage, die Rollgeschwindigkeit signifikant im Vergleich zu einem E-Selektin-Einfach-*Coating* auf einen Median von $4,25\mu\text{m/s}$ (95% KI von $3,90\mu\text{m/s}$ bis $4,61\mu\text{m/s}$) zu verlangsamen (vgl. Abbildung 8, A). Weitere Kombinationen von Molekülen zum *Coating* der Glaskapillare hatten keine Auswirkungen auf die durchschnittliche Rollgeschwindigkeit der PMNs.

Bereits beim Einfach-*Coating* mit E-Selektin trat eine Netrin-4-vermittelte Reduktion der Rollgeschwindigkeit auf. Von einem Median von 8,84 μ m/s (95% KI von 8,17 μ m/s bis 9,71 μ m/s) wurde die Rollgeschwindigkeit nach 30-minütiger Stimulation mit Netrin-4 auf 2,56 μ m/s (95% KI von 1,79 μ m/s bis 3,01 μ m/s) gesenkt (vgl. Abbildung 8, B).

Auch bei einem Zweifach-*Coating* aus E-Selektin und ICAM-1 rollten PMNs mit 30-minütiger Netrin-4-Stimulation signifikant langsamer (Median von 3,54 μ m/s mit einem 95% KI von 3,27 μ m/s bis 3,81 μ m/s) an der Glaskapillare entlang als die mit BSA stimulierte Kontrolle (4,89 μ m/s mit einem 95% KI von 4,59 μ m/s bis 5,22 μ m/s) (vgl. Abbildung 8, C).

Die Effekte von Netrin-4 können sehr schnell vermittelt werden. Eine Applikation von Netrin-4 unmittelbar vor der Versuchsdurchführung in das Blut unterschied sich in dem Netrin-4-vermittelten Effekt nicht von der standardmäßigen Applikation mit einer 30-minütigen Inkubationszeit vor Versuchsbeginn. Bei der BSA-Kontrolle betrug der Median der Rollgeschwindigkeit 2,65 μ m/s (95% KI von 2,37 μ m/s bis 2,85 μ m/s) und fiel mit Netrin-4-Stimulation auf 2,02 μ m/s (95% KI von 1,86 μ m/s bis 2,25 μ m/s) (vgl. Abbildung 8, D). In beiden Konditionen (30min und 0min Stimulation) kam es somit zu einer signifikanten Reduktion der Rollgeschwindigkeit (vgl. Abbildung 8, C, D).

Es wurden auch Versuche mit heparinisiertem Blut durchgeführt, das vor der 30-minütigen Stimulation mit Netrin-4 oder mit BSA-Kontrolle mit verschiedenen Antikörpern präinkubiert wurde. Der Netrin-4-vermittelte Effekt blieb sowohl bei einem Antikörper gegen L-Selektin (Reduktion der Rollgeschwindigkeit von einem Median von 3,77 μ m/s (95% KI von 3,46 μ m/s bis 4,04 μ m/s) auf 2,46 μ m/s (95% KI von 2,18 μ m/s bis 2,76 μ m/s), vgl. Abbildung 8, E) als auch gegen PSGL-1 (Reduktion der Rollgeschwindigkeit von einem Median von 6,22 μ m/s (95% KI von 5,62 μ m/s bis 6,91 μ m/s) auf 4,36 μ m/s (95% KI von 3,99 μ m/s bis 4,68 μ m/s), vgl. Abbildung 8, F) bestehen.

Die Effekte von Netrin-4 waren bei einer Blockade der beiden Integrine CD11a (vgl. Abbildung 8, G) und CD11b (vgl. Abbildung 8, E) aufgehoben. Der Median mit anti-CD11a-Antikörpern lag bei der BSA-Kontrolle bei 3,96 μ m/s (95% KI von 3,38 μ m/s bis 4,99 μ m/s) und mit Netrin-4-Stimulation bei 3,65 μ m/s (95% KI von

3,26µm/s bis 4,09µm/s). Der Median mit anti-CD11b-Antikörpern lag mit der BSA-Kontrolle bei 6,80µm/s (95% KI von 5,48µm/s bis 7,43µm/s) und mit Netrin-4-Stimulation bei 6,49µm/s (95% KI von 5,53µm/s bis 7,06µm/s). Bei diesen beiden Konditionen aber zeigte sich, dass die Anzahl der rollenden PMNs pro Video deutlich niedriger als bei allen anderen Inhibitionsversuchen war.

Bei einer Inhibition von Neogenin kam es ebenfalls zu keiner signifikanten Wirkung von Netrin-4. Der Median der BSA-Kontrolle lag bei 8,87µm/s (95% KI von 7,54µm/s bis 10,68µm/s) und der Median der Netrin-4-Stimulation bei 7,85µm/s (95% KI von 7,35µm/s bis 9,49µm/s) (vgl. Abbildung 8, H).

3.3.2 Untersuchung des Adhäsions- und Transmigrationsverhaltens mittels M. cremaster-Intravitalmikroskopie

Mehrere für das Adhäsions- und Transmigrationsverhalten entscheidende Parameter wurden in der M. cremaster-Intravitalmikroskopie ermittelt. In Abbildung 10 sind die Rollgeschwindigkeit von PMNs sowie die Anzahl der rollenden, adhärierenden und transmigrierten PMNs dargestellt. Abbildung 11 zeigt exemplarisch anhand zweier Bilder das Vorgehen zur Bestimmung der Rollgeschwindigkeit in dem jeweils aufgenommenen Bildausschnitt.

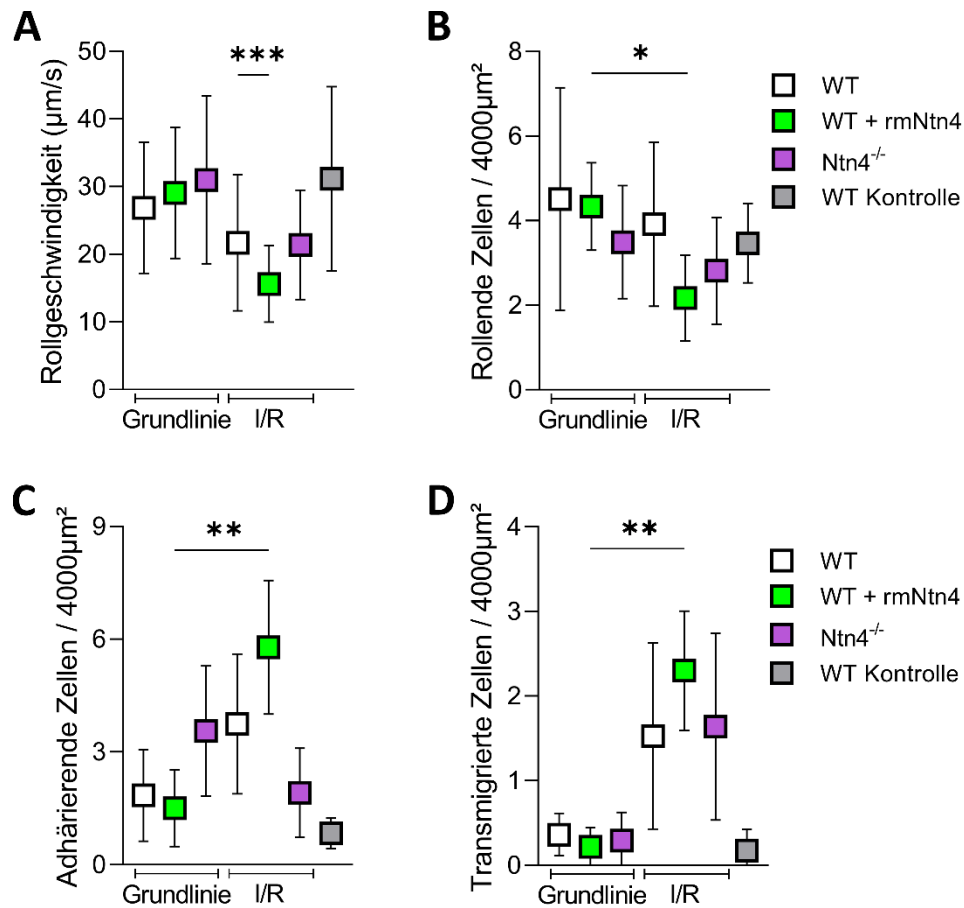


Abbildung 10: Ergebnisse des murinen In-vivo-M.-Cremaster-Modells

Die Abbildung zeigt die Ergebnisse des murinen M.-Cremaster-Modells. A: Die Rollgeschwindigkeiten der PMNs; B: Anzahl der rollenden PMNs auf 4000 μm^2 ; C: Anzahl an adhärierenden PMNs auf 4000 μm^2 ; D: Anzahl an transmigrierten PMNs auf 4000 μm^2 . (Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, n=5 Tiere). Signifikanzniveau: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

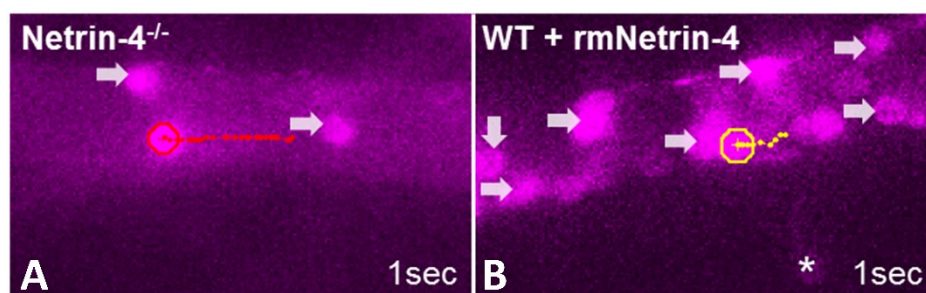


Abbildung 11: Vorgehen zur Messung der Rollgeschwindigkeit im murinen M. cremaster-Modell

Abgebildet sind zwei repräsentative Bilder von Kapillaren des M. cremaster zur Messung der Rollgeschwindigkeit der PMNs am murinen Endothel. Hierbei ist jeweils der Weg eines PMN in 1 Sekunde markiert (A: rot; B: gelb) und einzelne PMNs mit weißen Pfeilen. A: Die zurückgelegte Strecke (35 μm) eines PMNs in einer Netrin-4-Knockout-Maus; B: Die zurückgelegte Strecke (11 μm) eines PMNs in einer Wildtyp-Maus, der Netrin-4 gespritzt wurde.

Die durchschnittliche Rollgeschwindigkeit der PMNs im M. cremaster-Modell nahm bei Wildtyp-Tieren von der Grundlinie ($26,9\mu\text{m/s} \pm 9,7\mu\text{m/s}$) zur Ischämie-Reperfusion hin ($21,7\mu\text{m/s} \pm 10,1\mu\text{m/s}$) signifikant ab. Auch in der nächsten Kondition, den Wildtyp-Mäusen, denen rekombinantes murines Netrin-4 gespritzt wurde, nahm die durchschnittliche Rollgeschwindigkeit der PMNs von der Grundlinie ($29,0\mu\text{m/s} \pm 9,7\mu\text{m/s}$) zur I/R hin ($15,6\mu\text{m/s} \pm 5,6\mu\text{m/s}$) signifikant ab. In der dritten der drei Konditionen gab es ebenfalls eine signifikante Abnahme der durchschnittlichen Rollgeschwindigkeit von der Grundlinie ($31,0\mu\text{m/s} \pm 12,4\mu\text{m/s}$) zur I/R hin ($21,4\mu\text{m/s} \pm 8,1\mu\text{m/s}$). Die durchschnittliche Rollgeschwindigkeit der PMNs nahm auch von den WT-Kontroll-Tieren ($31,2\mu\text{m/s} \pm 13,6\mu\text{m/s}$) zu allen Konditionen mit Ischämie-Reperfusion hin signifikant ab. Bei der Grundlinie unterschieden sich die verschiedenen Konditionen nicht signifikant voneinander, bei den Konditionen mit Ischämie-Reperfusion hingegen gab es einen signifikanten Unterschied der durchschnittlichen Rollgeschwindigkeit zwischen den Wildtyp-Tieren ($21,7\mu\text{m/s}$) und den Netrin-4-Knockout-Tieren ($21,4\mu\text{m/s}$) einerseits und den Mäusen mit Injektion von rmNetrin-4 ($15,6\mu\text{m/s}$) andererseits. Die Rollgeschwindigkeit der PMNs war bei den Mäusen, denen rekombinantes Netrin-4 injiziert wurde, signifikant erniedrigt. Der Netrin-4-Knockout und die Wildtyp-Mäuse unterschieden sich dagegen nicht signifikant (vgl. Abbildung 10, A). Es lässt sich also zusammenfassen, dass PMNs generell während einer Ischämie-Reperfusion langsamer rollten als während der Grundlinie. Bei der Ischämie-Reperfusions-Gruppe reduzierte extern appliziertes Netrin-4 die Rollgeschwindigkeit der PMNs im Vergleich zu den anderen Konditionen.

Die durchschnittliche Anzahl der rollenden PMNs unterschied sich bei Wildtyp-Mäusen mit $4,51 (\pm 2,63)$ und bei Netrin-4-Knockout-Tieren mit $3,49 (\pm 1,34)$ nicht von der Anzahl der rollenden PMNs während einer Ischämie-Reperfusion mit $3,92 (\pm 1,94, \text{WT})$ und $2,81 (\pm 1,26, \text{Ntn4}^{-/-})$. Die einzige signifikante Reduktion trat bei Wildtyp-Tieren mit rmNtn4-Gabe auf; hier reduzierte sich die Anzahl von $4,34 (\pm 1,04)$ bei der Grundlinie auf $2,17 (\pm 1,01)$ mit I/R. Weitere signifikante Unterschiede waren nicht zu verzeichnen, auch nicht im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($3,46 \pm 0,94$) (vgl. Abbildung 10, B).

Die durchschnittliche Anzahl an adhärierenden PMNs unterschied sich beim Wildtyp zwischen der Grundlinie ($1,85 \pm 1,22$) und I/R ($3,74 \pm 1,86$) nicht. Die durchschnittliche Anzahl an adhärierenden PMNs nahm allerdings von der Grundlinie aus bei Wildtyp-Mäusen mit rmNetrin-4-Gabe ($1,50 \pm 1,02$) zur I/R hin ($5,79 \pm 1,78$) zu. Ebenfalls keinen Unterschied zeigte die Anzahl der adhärierenden PMNs bei Netrin-4-KO-Mäusen zwischen Grundlinie ($3,56 \pm 1,73$) und I/R ($1,91 \pm 1,19$). Bei der Kontrollgruppe kam es durchschnittlich zu fast keinen adhärierenden PMNs ($0,83 \pm 0,41$). Deswegen war auch eine signifikante Reduktion der durchschnittlichen Zahl an adhärierenden PMNs von der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Netrin-4-Knockout-Tieren der Grundlinie sowie zu den Wildtyp-Tieren und Wildtyp-Tieren mit rmNtn4-Gabe mit Ischämie-Reperfusion zu verzeichnen. Bei den Mäusen mit Ischämie-Reperfusion bestand ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp-Tieren mit rmNtn4-Gabe und den Netrin-4-Knockout-Mäusen (vgl. Abbildung 10, C).

Die Anzahl der transmigrierten PMNs unterschied sich bei Wildtyp-Mäusen und bei Netrin-4-Knock-out-Mäusen von der Grundlinie (WT: $0,36 \pm 0,25$; Ntn4^{-/-}: $0,29 \pm 0,34$) hin zur I/R (WT: $1,53 \pm 1,10$; Ntn4^{-/-}: $1,64 \pm 1,10$) nicht. Die Anzahl der transmigrierten PMNs bei Wildtyp-Mäusen, denen Netrin-4 injiziert wurde, nahm signifikant von der Grundlinie ($0,22 \pm 0,23$) zur I/R hin ($2,30 \pm 0,71$) zu. Die Kontroll-Mäuse ($0,17 \pm 0,25$) unterschieden sich signifikant von den Tieren aller drei Konditionen mit Ischämie-Reperfusion; innerhalb der Konditionen gab es keine weiteren Unterschiede (vgl. Abbildung 10, D).

3.3.3 Transmigrationsverhalten neutrophiler Granulozyten im Transmigrations-Assay

Für die Transmigration in vitro unter statischen Bedingungen wurde ein Transwell Migration Assay durchgeführt.

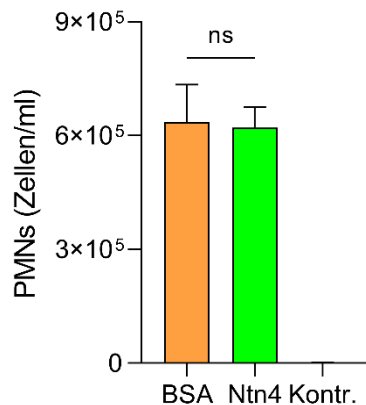


Abbildung 12: Anzahl an transmigrierten PMNs im Transwell Migration Assay

Dargestellt sind die mittels MPO-Messung errechneten verschiedenen Anzahlen an transmigrierten PMNs (Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n \geq 3$). Signifikanzniveau: ns: $p > 0,05$

Technisch funktionierte der Versuch gut, was durch die sehr geringe Anzahl an PMNs in der Negativkontrolle (1040 ± 980) im Vergleich zu den anderen Konditionen erkennbar ist. Allerdings gab es zwischen der Stimulation mit Netrin-4 ($6,21 \times 10^5 \pm 0,54 \times 10^5$) und der Kontrollstimulation mit BSA ($6,36 \times 10^5 \pm 0,98 \times 10^5$) keinen signifikanten Unterschied (vgl. Abbildung 12).

3.4 Auswirkung von Netrin-4 auf den akuten Ischämie-Reperfusionsschaden im Rahmen einer Myokardischämie

3.4.1 Einfluss einer exogenen Netrin-4-Applikation

Mithilfe des murinen myokardialen Ischämie-Reperfusionsmodell wurde der Einfluss von exogen appliziertem Netrin-4 auf die Größe des Infarktschadens sowie auf die Konzentration des kardialen Troponin I im Blutserum untersucht (vgl. Abbildung 13). Ebenfalls dargestellt ist ein Herz eines Wildtyp-Tiers und das Herz eines Wildtyp-Tiers, dem vor Beginn der Reperfusionsphase murines rekombinantes Netrin-4 injiziert wurde.

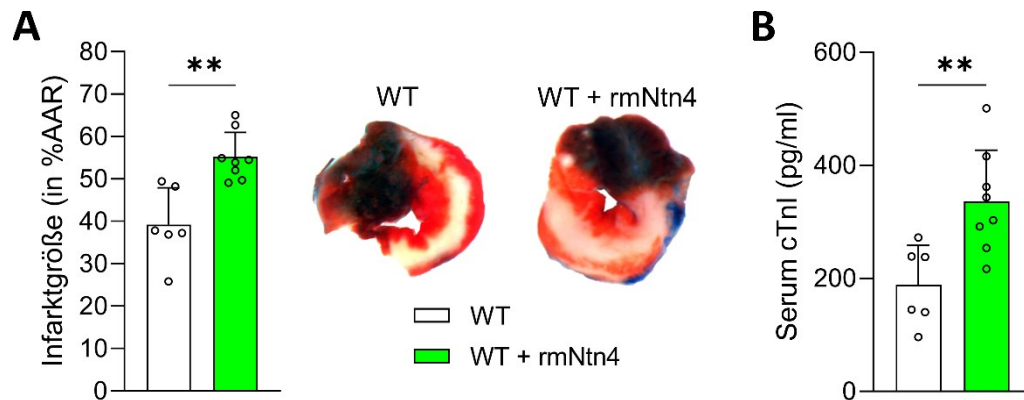


Abbildung 13: Infarktgrößen und Serum-cTnI-Spiegel nach LAD-Okklusionsmodell mit exogener Netrin-4-Applikation

Abgebildet sind jeweils die Infarktgrößen (A) sowie die Serum-cTnI-Spiegel (B) der gleichen Mäuse. Es wurden Wildtyp-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen nach Injektion von rmNetrin-4 verglichen; außerdem abgebildet sind zwei Anschnitte von murinen Herzen, die mit Evans Blue und TTC doppelt gefärbt wurden. Der infarzierte Bereich ist weiß; die Area at risk, bzw. der ischämische Bereich ist rot und das vitale Gewebe ist blau angefärbt. Aufnahme mittels Mikroskopkamera (Leica). Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n \geq 6$; Signifikanzniveau: **: $p < 0,01$

Zusätzlich appliziertes rekombinantes murines Netrin-4 erhöhte die Infarktgröße im Vergleich zu Wildtypen ohne zusätzliche Applikationen. Der infarzierte Bereich nahm hierbei signifikant von 39,2% ($\pm$ 8,7%) auf 55,2% ($\pm$ 5,8%) zu (vgl. Abbildung 13, A). Auch die Serum-cTnI-Spiegel stiegen signifikant auf fast das Doppelte (von 188,2pg/ml $\pm$ 70,3pg/ml auf 335,7pg/ml $\pm$ 91,2pg/ml) im Vergleich zum Wildtyp an (vgl. Abbildung 13, B).

3.4.2 Sekretion von Netrin-4

Die Netrin-4-Sekretion während des myokardialen Ischämie-Reperusionsmodells wurde mithilfe eines ELISAs quantifiziert. Dabei wurden die Netrin-4-Serum-Konzentrationen von zwei Konditionen, WT Sham und WT MIR, miteinander verglichen (vgl. Abbildung 14).

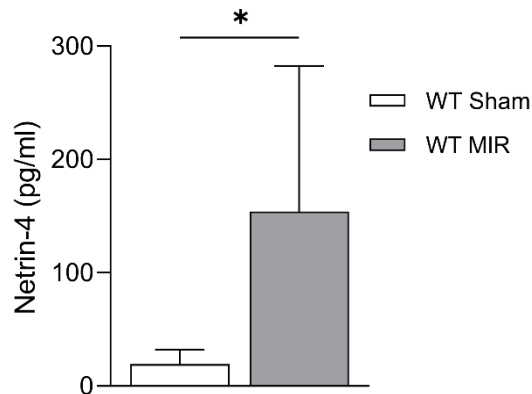


Abbildung 14: Serum-Konzentration von Netrin-4 im murinen LAD-Okklusionsmodell

Abgebildet sind die Konzentrationen von Netrin-4 bei offener (WT Sham) und geschlossener (WT MIR) LAD-Ligatur. Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n \geq 4$; Signifikanzniveau: *: $p < 0,05$

Bei Sham-Mäusen (19,3pg/ml $\pm$ 12,9pg/ml) war die Blutserum-Konzentration von Netrin-4 signifikant niedriger als bei MIR-Mäusen (154,2pg/ml $\pm$ 128,4pg/ml) (vgl. Abbildung 14).

Manche Mäuseherzen wurden nicht mit Evans Blue und TTC gefärbt und daraufhin konserviert, sondern direkt in Formalin fixiert, um später als Histologiepräparate verwendet werden zu können (siehe Kapitel 2.7.4). Um auch histologisch die Sekretion von Netrin-4 nachzuweisen, wurden folgende Färbungen durchgeführt: Eine Immunfluoreszenzfärbung mit DAPI als Marker für Zellkerne (blau), kardialen Troponin I als Marker für Herzmuskelzellen (rot) und Netrin-4 als Zielprotein (grün) (vgl. Abbildung 15) sowie eine Färbung mit dem Endothelmarker VE-Cadherin (rot) statt des Myokardmarkers cTnI (vgl. Abbildung 16). Es wurden jeweils Schnitte zwei verschiedener Konditionen verwendet und zwar von MIR-Tieren (vgl. Abbildung 15, A sowie Abbildung 16, A) sowie von Sham-Tieren (vgl. Abbildung 15, B sowie Abbildung 16, B).

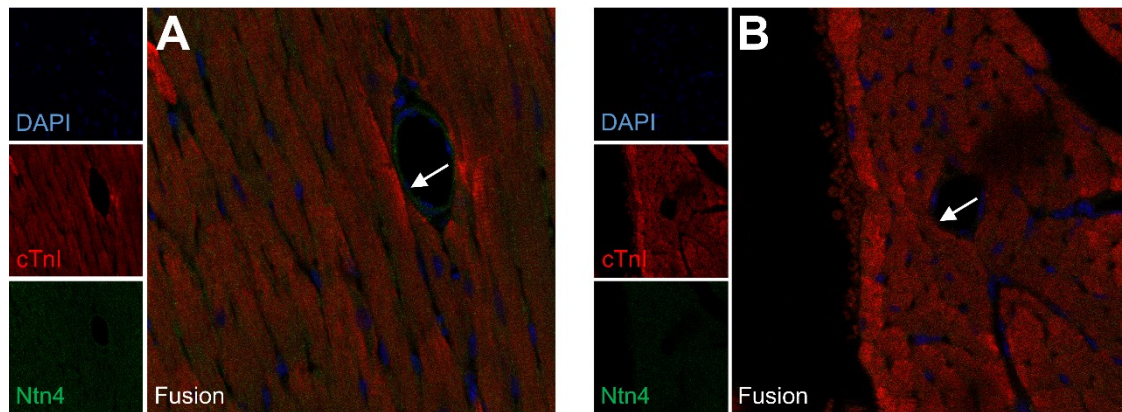


Abbildung 15: Immunfluoreszenzfärbung von histologischen Präparaten muriner Herzen nach myokardialer Ischämie- und Reperfusion mit cTnI

Abbildung zeigt murine Herzen von MIR-Tieren (A) sowie als Kontrolle von Sham-Tieren (B). Färbung gegen Kerne mit DAPI (blau), Färbung gegen Netrin-4 (grün) sowie gegen kardiales Troponin I als Myokardmarker (rot). Mit weißem Pfeil ist das Endothel bzw. die endotheliale Netrin-4-Positivität markiert. Aufnahme am konfokalen Mikroskop in 630facher Vergrößerung.

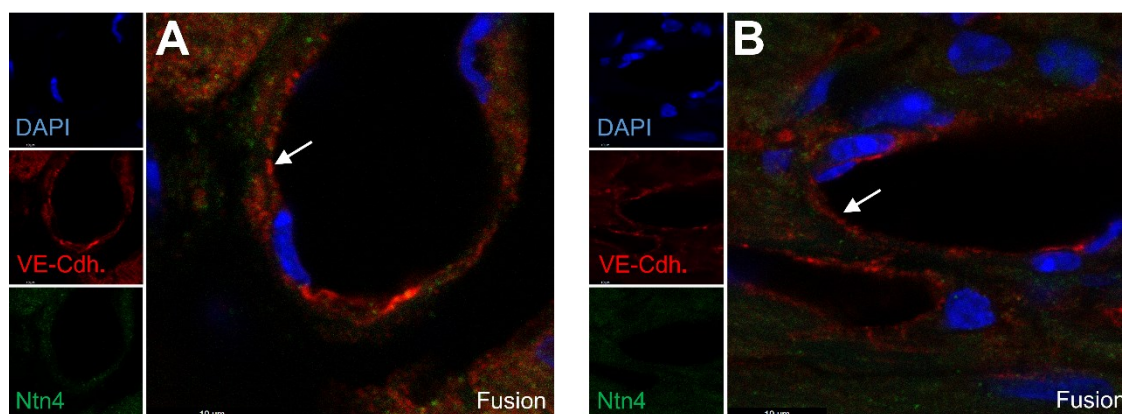


Abbildung 16: Immunfluoreszenzfärbung von histologischen Präparaten muriner Herzen nach myokardialer Ischämie- und Reperfusion mit VE-Cadherin.

Abbildung stellt murine Herzen von MIR-Tieren (A) sowie als Kontrolle von Sham-Tieren (B) dar. Färbung gegen Kerne mit DAPI (blau), Färbung gegen Netrin-4 (grün) sowie gegen VE-Cadherin als Endothelmarker (rot). Mit weißem Pfeil ist das Endothel bzw. endotheliale Netrin-4-Positivität markiert. Aufnahme am konfokalen Mikroskop in 630facher Vergrößerung und 4fachem Zoom.

In den MIR-Hezen (vgl. Abbildung 15, A) war eine höhere Konzentration an Netrin-4 detektierbar als in der Sham-Kontrolle (vgl. Abbildung 15, B). Auch die andere Färbung in Abbildung 16 bestätigte die Ergebnisse aus Abbildung 15. Erneut war mehr Netrin-4 im Wildtyp mit Herzinfarkt detektierbar (vgl. Abbildung 16, A) als in der Kontrolle (vgl. Abbildung 16, B). In beiden Abbildungen ist gut erkennbar, dass Netrin-4 in den MIR-Hezen ubiquitär nachweisbar ist, aber

besonders im Endothel angereichert wird (durch weiße Pfeile in Abbildung 15, A und Abbildung 16, A gekennzeichnet).

3.4.3 Auswirkungen einer Netrin-4-Depletion

Ebenfalls mithilfe des murinen myokardialen Ischämie-Reperfusionsmodell wurden die Auswirkungen einer Netrin-4-Depletion sowie die Auswirkungen einer exogenen Applikation von Netrin-4 bei Mäusen mit einer Netrin-4-Depletion auf die Größe des Infarktschadens sowie auf die Konzentration des kardialen Troponin I im Blutserum untersucht (vgl. Abbildung 17). Dargestellt sind erneut exemplarische Bilder eines Mäuseherzens pro Kondition.

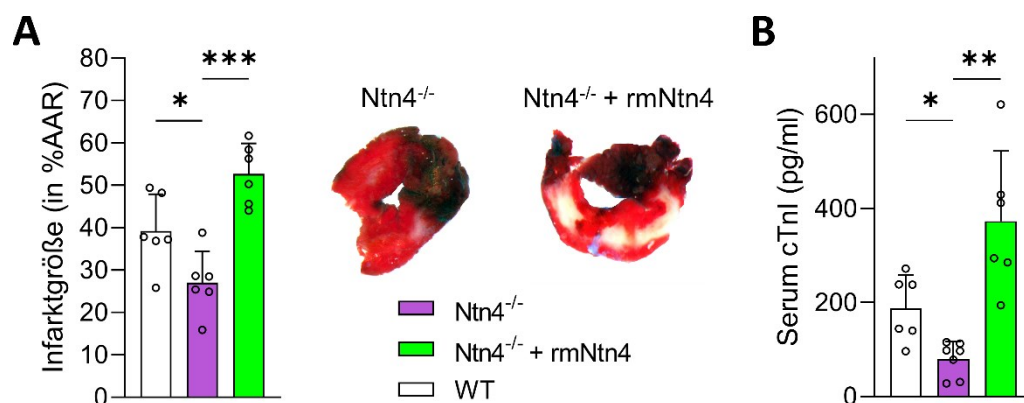


Abbildung 17: Infarktgrößen und Serum-cTnI-Spiegel nach LAD-Okklusionsmodell mit Netrin-4-Depletion sowie exogener Netrin-4-Applikation

Abgebildet sind jeweils die Infarktgrößen (A) sowie die Serum-cTnI-Spiegel (B) der gleichen Mäuse. Dargestellt sind Werte von Wildtyp-Mäusen, Netrin-4-Depletionstieren und Netrin-4-Depletionstieren nach Injektion von rmNetrin-4; außerdem abgebildet sind zwei Anschnitte von murinen Herzen (Netrin-4-Depletionstier sowie Netrin-4-Depletionstier mit exogener Applikation von Netrin-4), die mit Evans Blue und TTC doppelt gefärbt wurden. Der infarzierte Bereich ist weiß; die Area at risk, bzw. der ischämische Bereich ist rot und das vitale Gewebe ist blau angefärbt. Aufnahme mittels Mikroskopkamera (Leica). Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n \geq 6$; Signifikanzniveau: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,0001$

Ein Ganzkörper-Knockout von Netrin-4 wirkte sich protektiv auf die Infarktgröße ($27,0\% \pm 7,4\%$) aus und erniedrigte die Serum-Konzentration von kardialem Troponin I ($80,0\text{pg/ml} \pm 66,2\text{pg/ml}$) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Wurde aber zu dem Ganzkörper-Knockout wiederum rekombinantes Netrin-4 injiziert, so waren die Effekte des Knockouts aufgehoben und die Infarktschäden ($52,7\% \pm 7,1\%$) und cTnI-Spiegel ($372,6\text{pg/ml} \pm 149,9\text{pg/ml}$) (vgl. Abbildung 17) ähnlich

hoch wie beim normalen Wildtyp, dem ebenfalls zusätzlich Netrin-4 injiziert wurde (vgl. Abbildung 13).

Eine Netrin-4-Depletion hatte somit Effekte auf die Herzinfarktschäden und reduzierte diese; die Effekte waren aber bei exogener Applikation von Netrin-4 wieder aufgehoben.

Mit den Formalin-fixierten Herzen des murinen Herzinfarkt-Modells wurde eine weitere Färbung mit DAPI als Marker für Zellkerne (blau), kardialen Troponin I als Marker für Herzmuskelzellen (rot) und Ly6G als Marker für PMNs (grün) durchgeführt. Mit diesen Färbungen konnte in drei verschiedenen Konditionen (Wildtyp Sham, Wildtyp-MIR und Netrin-4-Knockout-MIR) die Anzahl der transmigrierten PMNs bestimmt werden (vgl. Abbildung 18). Dabei verhielt sich die Anzahl der transmigrierten PMNs proportional zum Infarktschaden.

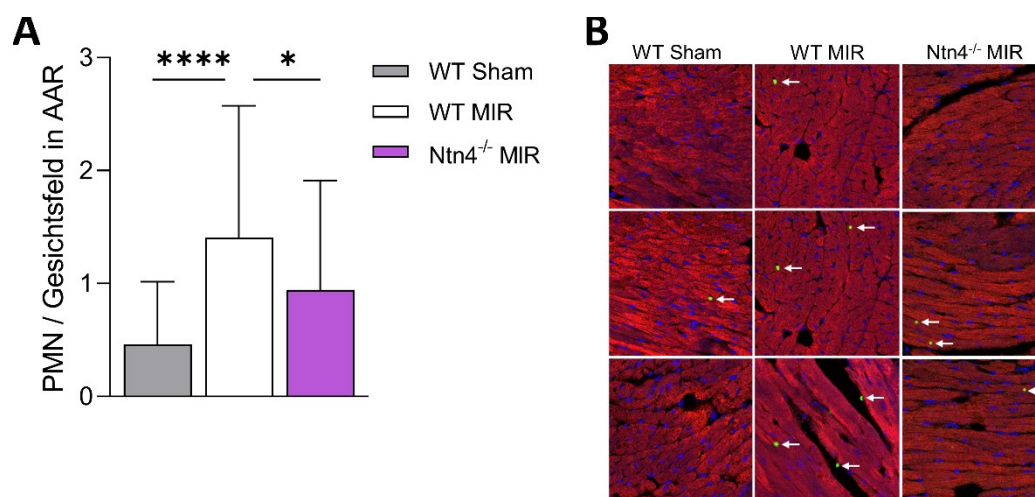


Abbildung 18: Transmigration neutrophiler Granulozyten ins murine Myokard

Abgebildet sind die Anzahlen an transmigrierten PMNs im Bereich der Area at risk pro Sichtfeld (A). Bei B sind repräsentative Fusions-Bilder einer Immunfluoreszenzfärbung dargestellt: Färbung gegen Kerne mit DAPI (blau), Färbung gegen murinen PMN-Marker Ly6G (grün) sowie gegen kardiales Troponin I als Myokardmarker (rot). Aufnahme am konfokalen Mikroskop in 630facher Vergrößerung. Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n \geq 36$; Signifikanzniveau: *: $p < 0,05$, ****: $p < 0,0001$

Es waren signifikant mehr PMNs beim Wildtyp-MIR in das Gewebe eingewandert (im Durchschnitt $1,41 \pm 1,17$ PMNs pro Gesichtsfeld) als beim Wildtyp-Sham (im Durchschnitt $0,46 \pm 0,55$ PMNs pro Gesichtsfeld) und bei den MIR-Netrin-4-

Knockout-Mäusen (im Durchschnitt $0,94 \pm 0,97$ PMNs pro Gesichtsfeld) (vgl. Abbildung 18, A). Exemplarisch sind jeweils drei repräsentative Bilder pro Kondition dargestellt. Auf diesen Bildern ist ebenfalls erkennbar, dass die höchste Anzahl an PMNs beim Wildtyp-MIR eingewandert war, gefolgt von dem Netrin-4-Ganzkörper-Knockout-MIR, während am wenigsten PMNs in die Wildtyp-Sham-Herzen eingewandert waren (vgl. Abbildung 18, B).

Ein Netrin-4-Knockout wirkt sich also protektiv auf den Infarktschaden aus.

3.4.4 Wirkung gewebespezifischer Knockouts von Netrin-4

Mithilfe des murinen myokardialen Ischämie-Reperfusionsmodells wurden weitere Versuche durchgeführt. Es wurden die Auswirkungen verschiedener gewebespezifischer Knockouts (gegen myeloide Zellen (Makrophagen, Mastzellen sowie Monozyten), Erythrozyten, Myokardzellen und Thrombozyten) auf die Größe des Infarktschadens sowie auf die Konzentration des kardialen Troponin I im Blutserum untersucht (vgl. Abbildung 19). Erneut dargestellt sind ebenfalls exemplarische Bilder eines Mäuseherzens pro Kondition.

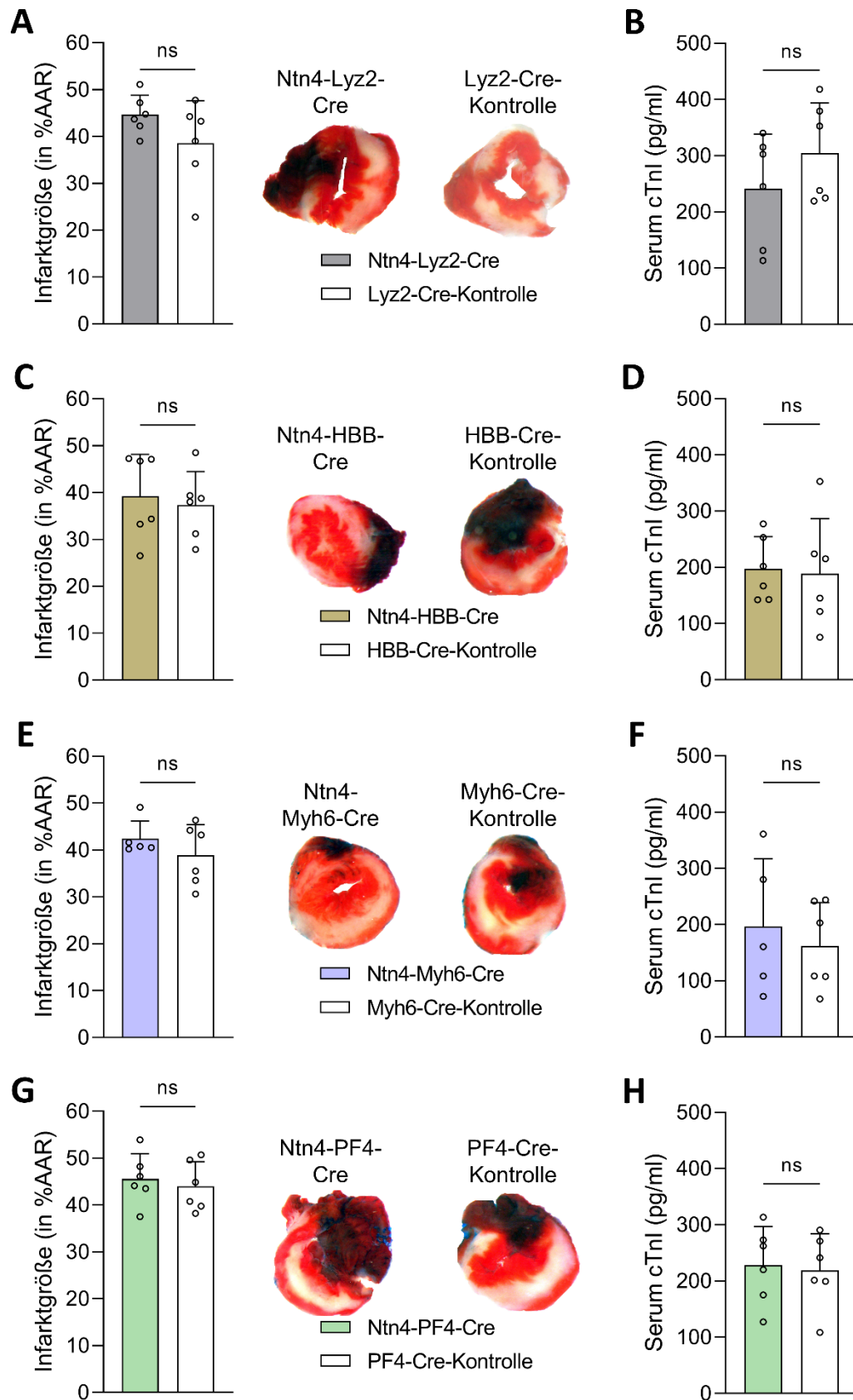


Abbildung 19: Infarktgrößen und Serum-cTnI-Spiegel nach LAD-Okklusionsmodell mit gewebespezifischem Netrin-4-Knockout

Abgebildet sind jeweils die Infarktgrößen (links) sowie die Serum-cTnI-Spiegel (rechts) der gleichen Mäuse sowie zwei Anschnitte der den Konditionen entsprechenden murinen Herzen, die mit Evans Blue und TTC doppelt gefärbt wurden. Der infarzierte Bereich ist weiß; die Area at risk, bzw. der ischämische Bereich ist rot und das vitale Gewebe ist blau angefärbt. Die Konditionen sind: A und B: Ntn4-Lyz2-Cre versus Lyz2-Cre-Kontrollen; C und D: Ntn4-HBB-Cre versus HBB-Cre-Kontrollen; E und F: Ntn4-Myh6-Cre versus Myh6-Cre-Kontrollen; G und H: Ntn4-PF4-Cre versus PF4-Cre-Kontrollen. Aufnahme mittels Mikroskopkamera (Leica). Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n \geq 5$; Signifikanzniveau: ns: $p > 0,05$

Der Netrin-4-Knockout in myeloiden Zellen (Infarktgröße Ntn4-Lyz2-Cre: 44,7% ($\pm$ 4,2%) versus Infarktgröße Lyz2-Cre-Kontrolle: 38,6% ($\pm$ 9,0%)) bewirkte keine signifikanten Unterschiede in der Infarktgröße (vgl. Abbildung 19, A). Auch die Serum-Konzentration des kardialen Troponin I (Ntn4-Lyz2-Cre: 241,4pg/ml ($\pm$ 97,3pg/ml) versus Lyz2-Cre-Kontrolle: 305,4pg/ml ($\pm$ 88,2pg/ml)) unterschied sich nicht signifikant (vgl. Abbildung 19, B).

Ebenfalls waren in dem Netrin-4-Knockout für Erythrozyten keine Unterschiede bei der Infarktgröße festzustellen (Infarktgröße Ntn4-HBB-Cre: 39,2% ($\pm$ 9,0%) versus HBB-Cre-Kontrolle: 37,3% ($\pm$ 7,2%)) (vgl. Abbildung 19, C). Die cTnI-Serum-Konzentrationen unterschieden sich ebenfalls nicht (Serum cTnI Ntn4-HBB-Cre: 197,3pg/ml ($\pm$ 57,4pg/ml) versus HBB-Cre-Kontrolle: 189,1pg/ml ($\pm$ 98,0pg/ml)) (vgl. Abbildung 19, D).

Ebenso verhielt sich das Ergebnis des Netrin-4-Knockouts in Myokardzellen, die Infarktgröße (Ntn4-Myh6-Cre: 42,4% ($\pm$ 3,8%) versus Myh6-Cre-Kontrolle: 38,9% ($\pm$ 6,5%)) (vgl. Abbildung 19, E) und die Serum-Konzentration von cTnI (Ntn4-Myh6-Cre: 196,5pg/ml ($\pm$ 120,9pg/ml) versus Myh6-Cre-Kontrolle: 162,2pg/ml ($\pm$ 76,7pg/ml)) unterschieden sich gleichermaßen beide Male nicht (vgl. Abbildung 19, F).

Die Ergebnisse des Netrin-4-Knockouts von Thrombozyten verhielten sich gleichermaßen: weder bei der Infarktgröße (Ntn4-PF4-Cre: 45,6% ($\pm$ 5,4%) versus PF4-Cre-Kontrolle: 44,0% ($\pm$ 5,3%)) (vgl. Abbildung 19, G) noch bei der cTnI-Konzentration im Serum (Ntn4-PF4-Cre: 228,6pg/ml ($\pm$ 68,5pg/ml) versus PF4-Cre-Kontrolle: 218,8pg/ml ($\pm$ 65,1pg/ml)) (vgl. Abbildung 19, H) waren Unterschiede zu verzeichnen.

Diese vier gewebespezifischen Knockouts zeigten, dass eine Regulation von Netrin-4 in diesen Geweben keinen entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß eines myokardialen Ischämie-Reperfusionsschadens zu haben scheint.

Es wurde noch ein weiterer gewebespezifischer Knockout (in Endothelzellen) mittels des murinen myokardialen Ischämie-Reperfusionsmodell untersucht, wobei ebenfalls exemplarische Bilder eines Mäuseherzens pro Kondition abgebildet sind (vgl. Abbildung 20).

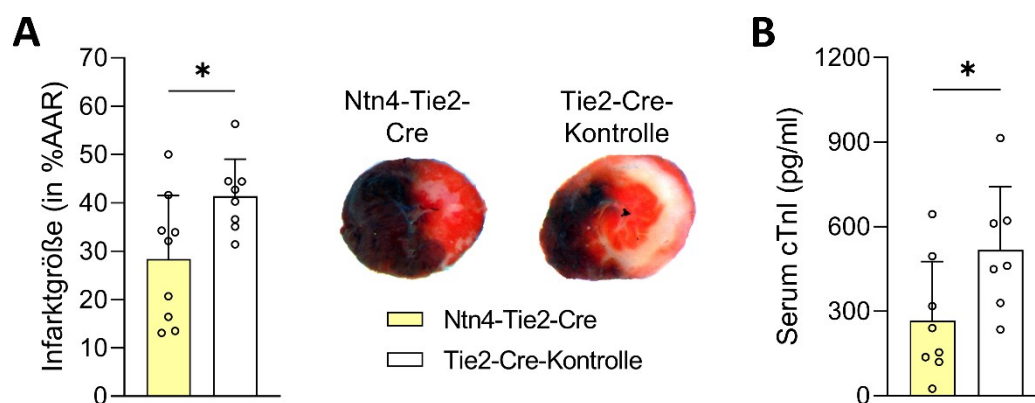


Abbildung 20: Infarktgrößen und Serum-cTnI-Spiegel nach LAD-Okklusionsmodell mit endothelialem Netrin-4-Knockout

Dargestellt sind jeweils die Infarktgrößen (A) sowie die Serum-cTnI-Spiegel (B) der gleichen Mäuse. Es wurden *Ntn4-Tie2-Cre* mit *Tie2-Cre*-Kontrollen verglichen; außerdem abgebildet sind zwei Anschnitte von murinen Herzen, die mit Evans Blue und TTC doppelt gefärbt wurden. Der infarzierte Bereich ist weiß; die Area at risk, bzw. der ischämische Bereich ist rot und das vitale Gewebe ist blau angefärbt. Aufnahme mittels Mikroskopkamera (Leica). Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n=8$; Signifikanzniveau: *: $p<0,05$

Der Netrin-4-Knockout in Endothelzellen (über den Tie2-Promotor) zeigte bei der Infarktgröße (*Ntn4-Tie2-Cre*: 28,4% ($\pm$ 13,1%) versus *Tie2-Cre-Kontrolle*: 41,4% ($\pm$ 7,6%)) signifikante Unterschiede (vgl. Abbildung 20, A). Auch die Serum-Troponin-I-Spiegel (*Ntn4-Tie2-Cre*: 267,1pg/ml ($\pm$ 209,7pg/ml) versus *Tie2-Cre-Kontrolle*: 517,4pg/ml ($\pm$ 223,7pg/ml)) zeigten signifikante Differenzen (vgl. Abbildung 20, B). Ein gewebespezifischer Knockout von Netrin-4 in endothelialen Zellen führte zu geringerer Infarktgröße und niedrigeren Serum-Troponin-I-Spiegeln und wirkte sich somit protektiv auf das Ausmaß eines Infarktschadens aus.

3.4.5 Effekte eines Neogenin-Knockouts in Bezug auf die Netrin-4-Wirkung

Die Auswirkungen eines Neogenin-Knockouts sowie die Auswirkungen einer exogenen Applikation von Netrin-4 bei diesen Tieren wurden auch mithilfe des murinen myokardialen Ischämie-Reperfusionsmodells untersucht. Bei diesem Versuch wurden bei den Mäusen ebenfalls die Größe des Infarktschadens sowie die Konzentration des kardialen Troponin I im Blutserum verglichen und exemplarische Bilder eines Mäuseherzens pro Kondition abgebildet (vgl. Abbildung 21).

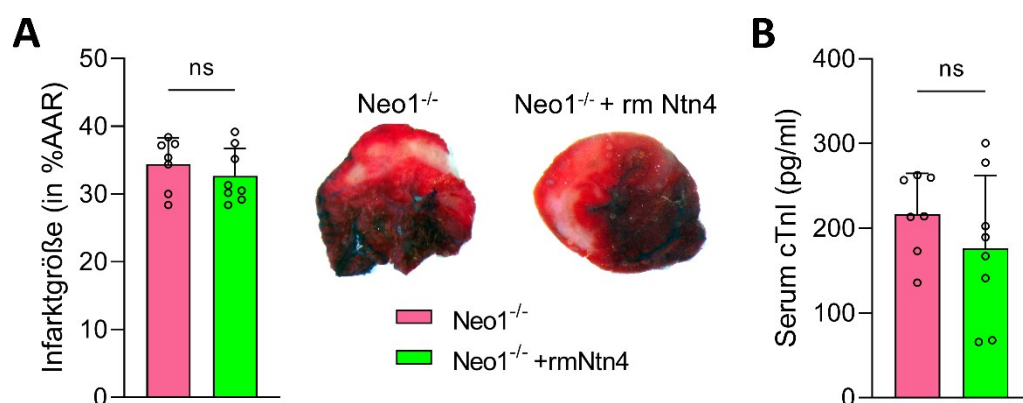


Abbildung 21: Infarktgrößen und Serum-cTnI-Spiegel nach LAD-Okklusionsmodell mit Neogenin-Knockout sowie exogener Netrin-4-Applikation

Abgebildet sind jeweils die Infarktgrößen (A) sowie die Serum-cTnI-Spiegel (B) der gleichen Mäuse. Es wurden Neogenin-Knockout-Mäuse mit Neogenin-Knockout-Mäusen nach Injektion von rmNetrin-4 verglichen; außerdem abgebildet sind beispielhaft zwei Anschnitte von murinen Herzen, die mit Evans Blue und TTC doppelt gefärbt wurden. Der infarzierte Bereich ist weiß; die Area at risk, bzw. der ischämische Bereich ist rot und das vitale Gewebe ist blau angefärbt. Aufnahme mittels Mikroskopkamera (Leica). Daten sind Mittelwerte $\pm$ SD, $n=6$; Signifikanzniveau: ns: $p>0,05$

Bei der Durchführung des Versuches mit Mäusen mit Ganzkörper-Knockout von Neogenin wurde wie beim Ganzkörper-Knockout von Netrin-4 verfahren. Allerdings kommt es hierbei nach der Gabe von rekombinantem murinen Netrin-4 zu keinem signifikanten Unterschied der Infarktschäden (Neo1^{-/-}: 34,5% $\pm$ 3,9% und Neo1^{-/-} + rmNtn4: 32,7% $\pm$ 4,1%) (vgl. Abbildung 21, A). Auch die Serum cTnI-Spiegel unterscheiden sich nicht signifikant (Neo1^{-/-}: 216,5pg/ml $\pm$ 48,4pg/ml und Neo1^{-/-} + rmNtn4: 176,5pg/ml $\pm$ 86,0pg/ml) (vgl. Abbildung 21, B) voneinander. Ein Neogenin-Knockout scheint also eine der Wirkungen von

Netrin-4 – die Erhöhung der Infarktgröße und der Serum-cTnI-Konzentration – zu unterbinden.

4 Diskussion

4.1 Interpretation der vorliegenden Ergebnisse

4.1.1 Expression von Netrin-4 in Endothelzellen während Hypoxie

Die ELISAs der HMEC-Zellen zeigten bei einer Zunahme der Hypoxiedauer eine Zunahme der Konzentration von sezerniertem Netrin-4 im Überstand. Aber auch in den jeweiligen Normoxie-Kontrollen stieg die Sekretion von Netrin-4 mit Zunahme der Inkubationsdauer. Der Anstieg der Netrin-4-Konzentration im Überstand war jedoch nicht so stark wie bei den HMEC-Zellen in Hypoxie. Es bestand zu jeder der drei Inkubationsdauern ein signifikanter Unterschied zwischen den Netrin-4-Konzentrationen im Überstand der hypoxisch und normoxisch inkubierten Zellen. Eine in Hypoxie verstärkte Netrin-4-Sekretion konnte damit belegt werden. Unklar hingegen ist die Tatsache, warum auch in Normoxie die Netrin-4-Konzentrationen über die Zeit konstant zunahmen. Hierfür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Eine Möglichkeit bestünde darin, dass Netrin-4 ein dauerhaft sezerniertes Protein ist. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit besteht darin, dass die Zellen zusätzlich zur Inkubation in Normoxie oder Hypoxie mit einem Überstand bedeckt waren, der immer – auch in Normoxie – dafür sorgte, dass die Zellen nicht ausreichend Sauerstoff erhielten, und es deswegen zu einem Dauerstress der HMEC-Zellen kam. Diese zweite Erklärungsmöglichkeit trifft auf alle In-vitro-Versuche zu und ist damit ein großer Unterschied zu In-vivo-Versuchen. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die Tatsache, dass die HMEC-Zellen für die ELISA-Versuche immer nur mit HBSS⁺ bedeckt waren, weil eine Durchführung der ELISAs mit normalem HMEC-Medium nicht möglich wäre. Im HMEC-Medium sind nämlich entweder Netrin-4 selbst oder Substanzen, die eine Kreuzreaktion an der Netrin-4-Bindungsstelle herbeiführen, enthalten, sodass die Ergebnisse des ELISAs verfälscht wären. Das verwendete HBSS⁺ aber sorgt für eine Nahrungskarenz der Endothelzellen, da es im Gegensatz zum HMEC-Medium keinerlei Nährstoffe enthält. Diese Nahrungskarenz der HMEC-Zellen könnte ein weiterer Faktor sein, der für einen gewissen Stresszustand der HMEC-Zellen sorgt, worauf diese mit einer basalen Sekretion von Netrin-4 in diesem Experiment reagieren. In Hypoxie, bei welcher

kein Sauerstoff mehr durch den Überstand hindurch zu den Zellen diffundieren kann, ist der Stresszustand für die HMEC-Zellen durch den Sauerstoffmangel deutlich höher, was die signifikant höhere Netrin-4-Sekretion erklären würde.

Auf Ebene der Genexpression konnte mittels qPCR ein Anstieg der Expression der NTN4-mRNA in Abhängigkeit von der Hypoxiedauer nachgewiesen werden. In Normoxie hingegen blieb die NTN4-Expression unabhängig von der Inkubationszeit konstant. Auch hier wurden die Expressionen zu den verschiedenen Zeitpunkten zwischen Hypoxie und Normoxie miteinander verglichen. Nach längerer Inkubationszeit bestand jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen in Hypoxie und jenen in Normoxie. So konnte auf Ebene der Genexpression belegt werden, dass eine längere Hypoxie zu einem Anstieg der NTN4-Genexpression führt.

Wie mit Hilfe von Immunfluoreszenz-basierten Färbungen gezeigt wurde, nimmt auch die Expression von Netrin-4 mit Zunahme der Inkubationszeit in Hypoxie zu. Netrin-4 war hierbei überall in der Zelle exprimiert, tendenziell kam es aber vorwiegend auf der Zellmembran – nur von dort aus kann Netrin-4 schließlich sezerniert werden – und im Zytosol vor, wo es sich in vesikulären Strukturen anreichert (Zhang et al., 2021). Hif-1 α hingegen transloziert in Hypoxie hauptsächlich aus dem Zytoplasma in den Zellkern, wo es zusammen mit Hif-1 β das transkriptionell aktive Hif-1 bildet (Huang et al., 1996, Kallio et al., 1997, Ke und Costa, 2006) (siehe Kapitel 1.2.4).

Bei Hif-1 α -KO-Zellen war in den ELISAs weder in Hypoxie noch in Normoxie sezerniertes Netrin-4 nachweisbar. Interessanterweise war es so, dass eine Netrin-4-mRNA-Genexpression sehr wohl vorhanden war, jedoch deutlich niedriger als bei den normalen HMEC-Zellen. Auch diese veränderte sich – ebenso wie die Netrin-4-Sekretion der Hif-1 α -KO-Zellen, die sich in normalen HMEC-Zellen mit Zunahme der Hypoxiedauer erhöhte – weder über die Dauer der Inkubationszeit noch in Abhängigkeit von der jeweiligen Kondition (Hypoxie bzw. Normoxie). Daraus folgt, dass durch den Hif-1 α -Knockout in den HMEC-Zellen, diese Zellen nicht mehr in der Lage sind, Hypoxie-abhängig ihre Genexpression von Netrin-4 zu verändern. Interessant ist die Tatsache, dass überhaupt kein Netrin-4 sezerniert werden konnte, obwohl durchgehend eine

basale NTN4-Genexpression vorhanden war. Diese Beobachtung wiederum erlaubt die Vermutung, Netrin-4 sei eines der von Hif-1 regulierten und induzierten Gene und die Netrin-4-Sekretion könne sowohl in Hypoxie als auch in Normoxie Hif-1 α -abhängig sein. Weitere Studien müssen diesen Zusammenhang molekular genauer beleuchten. Zusammenfassend kann man also sagen, dass in dieser Studie durch verschiedene Methoden und auf unterschiedlichen Ebenen gezeigt werden konnte, dass Endothelzellen unter hypoxischem Einfluss verstärkt Netrin-4 exprimieren und sezernieren.

4.1.2 Effekte von Netrin-4 auf die Migrationsbiologie von neutrophilen Granulozyten

In Flusskammer-Versuchen ließ sich belegen, dass Netrin-4 Effekte auf die Rollgeschwindigkeit von neutrophilen Granulozyten hat. Exogenes Netrin-4 reduziert die Rollgeschwindigkeit humaner PMNs signifikant im Vergleich zu einer BSA-Kontrolle. Ein Rollen von neutrophilen Granulozyten entlang einer künstlichen Kapillare im Flusskammer-Modell war nach *Coating* nur mit E-Selektin bereits möglich. Eine Kombination mit ICAM-1 erniedrigte die Rollgeschwindigkeit nochmals signifikant, da es hier neben den Selektin-vermittelten auch zu Integrin-vermittelten Wechselwirkungen kommt, welche für ein langsames Rollen der PMNs sorgen (Ley et al., 2007). Ein weiteres Adhäsionsmolekül, P-Selektin, scheint die Rollgeschwindigkeit von humanen PMNs nicht zu beeinflussen und war allein, ebenso wie ICAM-1, nicht in der Lage, ein Rollen zu vermitteln. Um auszuschließen, dass PMNs durch Netrin-4, dessen Kontrolle, BSA, oder eine Kochsalz-Lösung dazu in der Lage sind, an dem künstlichen Endothel entlangzurollen, wurden auch diese drei Komponenten mit untersucht. Durch diese Versuchsergebnisse kann angenommen werden, dass die Interaktion der PMNs mit der Glaskapillare ausschließlich durch E-Selektin und ICAM-1 vermittelt war. Die absoluten Rollgeschwindigkeiten verschiedener Durchführungen an verschiedenen Tagen miteinander zu vergleichen, ist im Prinzip nicht möglich, da die Donatoren und die Abnahmezeitpunkte variierten und somit keine Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Versuchstagen gewährleistet werden kann.

Die Netrin-4-vermittelte Reduktion der Rollgeschwindigkeit trat sowohl bei einem Einfach-*Coating* mit E-Selektin als auch bei einem Zweifach-*Coating* mit E-Selektin und ICAM-1 auf. Vermutlich kommt es durch die exogene Applikation von Netrin-4 zu einer Aktivierung der PMNs, wobei die E-Selektin-Liganden der PMNs allein in der Lage zu sein scheinen, eine Reduktion der Rollgeschwindigkeit zu bewirken.

Die Effekte von Netrin-4 traten sowohl nach 30 Minuten Stimulation als auch nach 0 Minuten Stimulation auf, das heißt bei einer direkten Zugabe von Netrin-4 unmittelbar vor Durchführung der Messungen. Diese sehr schnell vermittelten Effekte ermöglichen zwei Schlussfolgerungen: Eine Netrin-4-vermittelte Reduktion der Rollgeschwindigkeit scheint nicht transkriptioneller Natur zu sein. Eine weitere Hypothese besteht darin, dass Netrin-4 als Adaptermolekül fungieren oder über einen Rezeptor direkt für eine Aktivierung von neutrophilen Granulozyten, zum Beispiel über E-Selektin-Liganden, sorgen könnte. Derartige Aktivierungen laufen in der Regel innerhalb weniger Sekunden ab (Zhou et al., 2021).

Die Inhibitionsversuche wurden durchgeführt, um idealerweise bei Inhibition eines Adhäsionsmoleküls ein Ausbleiben der Netrin-4-vermittelten Reduktion der Rollgeschwindigkeit zu messen. Die wichtigsten Liganden von humanem E-Selektin, PSGL-1 und L-Selektin, und von ICAM-1, LFA-1 und Mac-1, sollten untersucht werden (Li et al., 2018, Kansas, 1996, Katayama et al., 2005). Die Inhibition der beiden E-Selektin-Liganden zeigte keinen Effekt. Weder basal unter BSA-Kontrolle noch nach Stimulation mit Netrin-4 kam es zu größeren Unterschieden im Vergleich zu Durchgängen ohne Antikörperinhibition. Bei beiden Antikörper-Inhibitionen war der messbare Effekt von Netrin-4, die Reduktion der Rollgeschwindigkeit, weiterhin nachweisbar. Da ein einfaches E-Selektin-*Coating* für eine Netrin-4-vermittelte Reduktion der Rollgeschwindigkeit ausreichte, scheinen die Netrin-4-vermittelten Effekte abhängig von E-Selektin-Liganden zu sein, auch wenn deren eindeutige Identifikation mittels Antikörper-Inhibitionsversuchen nicht möglich war.

Die Interpretation der Inhibitionsversuche gegen LFA-1 und Mac-1 erscheint weniger eindeutig. Bei beiden Inhibitionen kam es zu einer Aufhebung der

Netrin-4-vermittelten Reduktion der Rollgeschwindigkeit. Netrin-4 scheint hier folglich keine Effekte mehr auf die Rollgeschwindigkeit zu haben. Auffällig war bei der Durchführung und Auswertung des Versuchs jedoch eine starke Dezimierung der durchschnittlichen Anzahl der rollenden PMNs in einem Videoausschnitt im Vergleich zu den Konditionen ohne Antikörper oder zu den Inhibitionsversuchen gegen PSGL-1 oder L-Selektin. Dennoch haben mehrere Versuche klar gezeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen beiden Konditionen gibt.

Eine zusätzlich durchgeführte Neogenin-Inhibition der PMNs sorgte dafür, dass die Netrin-4-vermittelte Reduktion der Rollgeschwindigkeit aufgehoben wurde. Die Neogenin-Rezeptor-Achse scheint demzufolge eine Rolle bei Netrin-4-Effekten zu spielen. Vermutlich interagiert Netrin-4 mit Neogenin und durch diese Interaktion werden Netrin-4-Effekte vermittelt.

Die In-vivo-Leukozyten-Intravitalmikroskopie des Ischämie-Reperfusionseffektes am murinen Musculus Cremaster ermöglicht weitere Erkenntnisse zu den Effekten von Netrin-4 auf neutrophile Granulozyten. Hierbei wurden drei Konditionen festgelegt: Wildtyp-Mäuse als Kontrollen, Wildtyp-Mäuse, denen rekombinantes murines Netrin-4 gespritzt wurde, sowie Mäuse mit Netrin-4-Ganzkörper-Knockout. Auch im murinen Cremaster-Modell wurden Rollgeschwindigkeiten gemessen. Hier wurde allerdings nochmals zwischen zwei Konditionen unterschieden, zwischen der sogenannten Grundlinie ohne eine vorhergehende Ischämie / anschließende Reperfusion (I/R) und der Kondition mit Ischämie-Reperfusion, bei der eine vorhergehende Ischämie bestand und das Aufnehmen der Videos nach einer 30-minütigen Reperfusionsphase erfolgte. Diese Ischämie mit anschließender Reperfusion sorgt für ein entzündlich verändertes Endothel (Jordan et al., 1999, Chen und Nuñez, 2010). Das wiederum erklärt, warum die neutrophilen Granulozyten über alle Konditionen hinweg nach Ischämie-Reperfusion signifikant langsamer rollten. Auf entzündetem bzw. aktiviertem Endothel sind mehr Adhäsionsmoleküle exprimiert (siehe Kapitel 1.2), die die Rollgeschwindigkeit reduzieren (Ley et al., 2007). Exogen appliziertes rmNtn4 reduzierte die Rollgeschwindigkeit bei der Ischämie-Reperfusion nochmals signifikant im

Vergleich zu Konditionen ohne exogene Netrin-4-Applikation (Wildtyp-Mäuse und Ganzkörper-Netrin-4-Knockout-Mäuse). Vermutlich ist hierbei die Konzentration des endogen produzierten murinen Netrin-4 nicht hoch genug, um Effekte auf die Rollgeschwindigkeit zu haben. Dies wäre eine plausible Erklärung, warum es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Rollgeschwindigkeiten bei den Wildtyp-Tieren und jenen mit Ganzkörper-Knockout von Netrin-4 gab. Wurde hingegen exogenes rmNetrin-4 in deutlich höheren als den physiologisch erreichbaren Konzentrationen appliziert, hatte das Netrin-4 eindeutig Auswirkungen auf die neutrophilen Granulozyten und reduzierte deren Rollgeschwindigkeit.

Paradox dazu verhielt sich die Anzahl der rollenden PMNs. Erwartungsgemäß müssten es in der Kondition mit Ischämie-Reperfusion mehr rollende PMNs im Vergleich zur Grundlinie werden. Bei Wildtyp-Mäusen, denen rmNetrin-4 gespritzt wurde, kam es jedoch zu einer Reduktion der Anzahl der rollenden PMNs; in anderen Konditionen unterschieden sich diese nicht.

Die Anzahl an adhätierenden PMNs nahm bei Wildtyp-Mäusen mit Netrin-4-Applikation von der Grundlinie zur Ischämie-Reperfusion hin zu. Diese Zunahme der Anzahl erscheint nachvollziehbar, da eine Adhäsion an entzündetem Endothel deutlich erleichtert ist. Der Einfluss von Netrin-4 auf die Anzahl der adhätierenden Zellen wurde nochmals durch den signifikanten Unterschied zwischen Netrin-4-Knockout-Tieren und den Wildtyp-Tieren mit exogen appliziertem Netrin-4 während Ischämie-Reperfusion betont. Netrin-4 erhöht bei einem entzündeten Endothel und nach Ischämie und anschließender Reperfusion die Anzahl der adhätierenden PMNs.

Die Anzahl an transmigrierten PMNs nahm nur bei Wildtyp-Tieren mit exogen appliziertem rmNetrin-4 signifikant von der Grundlinie zur Ischämie-Reperfusion hin zu. Exogen appliziertes Netrin-4 scheint also die Transmigration von PMNs in post-kapillären Venolen zu fördern.

Wie im M.-Cremaster-Modell gezeigt wurde, sorgte exogen appliziertes Netrin-4 dafür, dass PMNs langsamer am Endothel entlangrollten und verstärkt adhätierten und transmigrierten. Die Menge an endogenem Netrin-4 hingegen schien nicht für messbare Effekte auszureichen, sodass es hier meist im

Vergleich mit Netrin-4-Ganzkörper-Knockout-Tieren zu keinen signifikanten Unterschieden kam. Die Ergebnisse des murinen M.-Cremaster-Modells bezüglich der Rollgeschwindigkeit und deren Reduktion nach exogener Netrin-4-Gabe decken sich mit den Ergebnissen aus den Flusskammer-Versuchen mit menschlichem Blut. Auch dort konnte eine Reduktion der Rollgeschwindigkeit nach exogener Netrin-4-Gabe gemessen werden. Dieses Phänomen kann Bedeutung im Rahmen anderer pathologischer Prozesse erlangen, bei denen größere Mengen von Netrin-4 anfallen, wie beispielsweise bei myokardialen Ischämien.

Die Transmigration von neutrophilen Granulozyten unter statischen Bedingungen wurde in einem Transwell-Migrations-Assay untersucht. Allerdings konnten keine Unterschiede bezüglich der Anzahl an transmigrierten PMNs zwischen der Netrin-4-Stimulation und der BSA-Kontrolle festgestellt werden. Der Hauptunterschied zu den beiden vorherigen Methoden liegt darin, dass beim Transwell-Migrations-Assay keine Strömung vorliegt, sondern die maximale Bewegung durch eine Rüttelplatte erzeugt wird. Das wiederum erlaubt die Interpretation, dass Netrin-4-vermittelte-Effekte auf PMNs – wie die Erhöhung der Transmigrationsrate – flussabhängig sein könnten.

Die Effekte von Netrin-4 auf die Expression der Adhäsionsmoleküle von PMNs wurden durchflusszytometrisch untersucht. Es wurden dabei die mittleren Fluoreszenzintensitäten der Integrine CD11a und CD11b im nicht-aktivierten sowie im aktivierten Zustand und die MFIs von CD62L und CD44 gemessen. Die Expression von nicht-aktiviertem CD11a und CD11b erniedrigte sich mit Netrin-4-Stimulation im Vergleich zu der BSA-Kontrolle. Mit einer Co-Stimulation mit fMLP hingegen erhöhte sich die Expression von CD11a und CD11b sowie von aktiviertem CD11a und CD11b unter Netrin-4-Stimulation und bekräftigt die Ergebnisse des M.-Cremaster-Modells. Dieser Expressionsanstieg spricht dafür, dass Netrin-4 in Kombination mit entzündlichen Stimuli eine Integrin-vermittelte PMN-Endothel-Interaktion begünstigt. Insbesondere die Anstiege des aktivierten CD11a und CD11b nach Netrin-4-Stimulation und Co-Stimulation mit fMLP bestätigen dieses Phänomen. Eine höhere MFI dieser beiden Adhäsionsmoleküle geht vermutlich mit einer verbesserten Interaktion und damit

einer vermehrten Adhäsion und Transmigration einher. Die Ergebnisse der CD62L-Expression belegen einen durch Netrin-4 vermittelten Effekt auch auf CD62L. Ein signifikanter Abfall der Expression bei einer Co-Stimulation mit fMLP war eindeutig festzustellen. Durch entzündliche Stimuli aktivierte PMNs erhöhen die Expression ihrer Integrine, insbesondere von CD11b, und erniedrigen invers dazu die Expression von L-Selektin über einen schnellen Abbau (*rapid shedding*) auf der Zelloberfläche (Kishimoto et al., 1989). Dieser schnelle Abbau geht mit einer Expressionsreduktion von L-Selektin einher, welche laut Ivetic die Methode der Wahl darstellt, um eine Aktivierung von PMNs nachzuweisen (Ivetic, 2018). Eine Netrin-4-Stimulation in Kombination mit einer Co-Stimulation mit fMLP scheint demzufolge pro-inflammatorisch auf PMNs zu wirken, da es unter Netrin-4-Stimulation zu verstärkter Integrinexpression und reduzierter L-Selektin-Expression kam.

Der E-Selektin-Ligand CD44 hingegen scheint gar nicht auf die Netrin-4-Stimulation zu reagieren; es kam zu keiner signifikanten Expressionsänderung. Die Ergebnisse dieses Versuchs bestätigen, dass Netrin-4 einen Effekt auf die Expression von Adhäsionsmolekülen neutrophiler Granulozyten hat.

4.1.3 Netrin-4-Wirkung auf einen myokardialen Ischämie-Reperfusionsschaden

In zwei verschiedenen Mausbedingungen konnte eine Abhängigkeit von Netrin-4 sowohl bei der Infarktgröße als auch bei der Höhe der cTnI-Konzentration gezeigt werden. Exogen appliziertes Netrin-4 erhöhte bei Wildtyp-Tieren den Infarktschaden signifikant im Vergleich zu Wildtyp-Tieren ohne exogen appliziertes Netrin-4. In einem zweiten Versuchsansatz konnten in Tieren mit einem Ganzkörper-Knockout von Netrin-4 deutlich kleinere Infarktschäden als bei Wildtyp-Mäusen verzeichnet werden. Ein Knockout von Netrin-4, der eine Netrin-4-Sekretion verhindert, scheint demzufolge protektiv zu sein. Bei den Knockout-Mäusen konnten nach exogener Applikation von Netrin-4 erhöhte Infarktschäden rekonstituiert werden. Tatsächlich waren die Infarktgrößen und cTnI-Konzentrationen sowohl von WT-Mäusen als auch von Netrin-4-Knockout-Tieren nach exogener Netrin-4-Gabe ähnlich hoch. Eine exogene Applikation von Netrin-4 deutlich über physiologisch erreichbaren Serum-Konzentrationen

scheint demzufolge die Infarktschäden zu vergrößern und die protektiven Effekte des Netrin-4-Knockouts wieder aufzuheben. Dementsprechend scheint nicht nur eine exogene Applikation von Netrin-4, sondern auch die basale Netrin-4-Sekretion die Infarktschäden zu vergrößern.

Die gewebespezifischen Knockouts zeigten alle mit Ausnahme des Endothel-Knockouts keinen signifikanten Effekt. Demzufolge scheint das Netrin-4 nicht von myeloiden Zellen, Erythrozyten, Kardiomyozyten oder Thrombozyten, sondern hauptsächlich und in relevanter Menge für den Ischämie-Reperfusionsschaden von Endothelzellen sezerniert zu werden. Bestätigt wurde dies unter anderem durch die sehr ähnlichen Werte zwischen dem Endothel-Knockout und dem Ganzkörper-Knockout von Netrin-4.

Eine genetische Depletion von Neogenin scheint im Vergleich zum Netrin-4-Ganzkörper-Knockout lediglich geringe Effekte auf die Infarktgröße zu haben. Wie bereits in Kapitel 1.1.2 erklärt, ist Neogenin in erster Linie ein Rezeptor von Netrin-1. Bei exogener Applikation von Netrin-4 zeigten Neogenin-Knockout-Tiere jedoch keine Zunahme des Infarktschadens. Der Wirkmechanismus von Netrin-4 scheint demzufolge von Neogenin abhängig und eventuell sogar Neogenin-vermittelt zu sein. Der nur geringfügig protektive Effekt einer genetischen Neogenin-Depletion auf den Ischämie-Reperfusionsschaden lässt hingegen eine komplexere und promiskuöse Regulation von Neogenin im Rahmen einer Myokardischämie vermuten.

Die Immunfluoreszenzmikroskopie der Mäuseherzen sowie die Netrin-4-Serum-Konzentrationen zeigten eine verstärkte Sekretion von Netrin-4 bei MIR-Herzen im Vergleich zu Sham-Herzen. Somit ist gezeigt, dass Netrin-4 vermehrt bei einem Infarkt sezerniert und in die Blutbahn freigesetzt wird.

Der akute myokardiale Infarktschaden ist größtenteils abhängig von eingewanderten neutrophilen Granulozyten. Je mehr neutrophile Granulozyten in das Gewebe transmigriert sind, desto größer sind die Infarktschäden. In Studien konnte gezeigt werden, dass ein Unterbinden der PMN-Transmigration (zum Beispiel durch Depletion oder Antikörper gegen CD11 und CD18 oder ICAM-1) die Infarktgrößen um 40% reduzieren kann (siehe Kapitel 1.3.1) (Chia et al., 2009, zitiert nach Ma et al., 2013, Romson et al., 1983, Litt et al., 1989).

Exogen appliziertes Netrin-4 ist im Rahmen von Ischämie-Reperusionsprozessen für eine verstärkte Transmigration von PMNs verantwortlich. Im M.-Cremaster-Modell kam es nur nach der Gabe von Netrin-4 zu einem signifikanten Anstieg der PMN-Transmigration, wohingegen ein Netrin-4-Knockout keinen Effekt zeigte. Im LAD-Okklusionsmodell konnte die PMN-Transmigration nach myokardialer Ischämie-Reperfusion ebenfalls durch eine Netrin-4-Gabe gesteigert werden.

4.2 Einordnung der Ergebnisse in die aktuelle Datenlage

Ein Anstieg der Produktion von Netrin-4 in Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen konnte in vitro sowohl auf der Ebene der Genexpression, der Proteinexpression als auch der Sekretion gezeigt werden. Die Versuche wurden hierbei alle mit HMEC-Zellen durchgeführt. Lee und Kollegen arbeiteten 2020 ebenfalls mit menschlichen Endothelzellen, allerdings mit HUVEC-Zellen, die einer Umbilicalvene entstammen. Sie konnten ebenfalls in vitro und mithilfe von Western Blots zeigen, dass mit Zunahme der Hypoxiedauer eine Zunahme der Netrin-4-Expression einhergeht, was die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt (Lee et al., 2020). Zhang und Kollegen zeigten 2021, dass Netrin-4 das am höchsten exprimierte Netrin in Endothelzellen ist. Sie forschten unter anderem mit HUVEC-Zellen, auf denen die meisten ihrer Ergebnisse fußen (Zhang et al., 2021).

In In-vivo-Versuchen an murinen Herzen wurde in dieser Arbeit eine Erhöhung der Netrin-4-Expression in Endothelzellen (sicherer Nachweis durch VE-Cadherin) und Netrin-4-Sekretion ins Blut während einer Ischämie und dementsprechend auch während einer Hypoxie nachgewiesen. Lee und Kollegen verwendeten 2020 für ähnliche Okklusionsversuche die Femoral-Arterie an Mäusebeinen. Auch sie konnten mittels Immunfluoreszenzfärbungen einen Anstieg von Netrin-4 in der ischämischen Kondition im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisen. Sie verwendeten als Endothelmarker CD31, um die Zellen mit einem Anstieg der Netrin-4-Expression sicher als Endothelzellen nachzuweisen (Lee et al., 2020). Die generelle Netrin-4-Expression in Endothelzellen wird durch laminare Scherbeanspruchung erhöht (siehe Kapitel

1.1.1), die in allen von Blut durchströmten Gefäßen vorhanden ist (Zhang et al., 2021).

Eine gesteigerte Netrin-4-Produktion von Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen konnte laut aktuellem Forschungsstand erst in einer Arbeit nachgewiesen werden (Lee et al., 2020). In dieser Arbeit wurde erstmals auf mehreren Ebenen und mit einem anderen Zelltyp von Endothelzellen als HUVECs gezeigt und durch In-vivo-Versuche bestätigt, dass Netrin-4 verstärkt in Hypoxie durch Endothelzellen produziert und sezerniert wird.

Wie bereits in Kapitel 1.2.4 dargestellt, ist der Transkriptionsfaktor Hif-1 ein Schlüsselregulator und für die Induktion von Genen sowie die Adaption und das Überleben von Zellen unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen verantwortlich (Wang et al., 1995, Semenza, 1998, beide zitiert nach Ke und Costa, 2006). In HMEC-Zellen mit Hif-1 α -Knockout ist die Sekretion von Netrin-4 im Gegensatz zu normalen HMEC-Zellen gänzlich unterbunden. Demzufolge scheint die Netrin-4-Expression und insbesondere -Sekretion Hif-1-vermittelt zu sein. NF- κ B kann, wie bereits in Kapitel 1.2.4 erwähnt, auch durch niedrige Sauerstoff-Konzentrationen aktiviert werden (Koong et al., 1994). Unter anderem deswegen kann geschlussfolgert werden, dass in Hypoxie Inflammation induziert wird. Aber auch Inflammation kann hypoxische Signalwege aktivieren. So ist NF- κ B dazu in der Lage, als Transkriptionsfaktor an die Promotor-Region des Hif-1 α -Gens zu binden und so Hif-1 α -abhängige Signalwege zu induzieren (Luo et al., 2019). Die enge Verknüpfung von Hypoxie und Inflammation wurde in vielen Experimenten dieser Arbeit untersucht. Nun sollte man aufgrund der oben aufgeführten Argumentation vermuten, eine reine Inflammation, zum Beispiel mit inflammatorischen Zytokinen wie dem Tumor-Nekrose-Faktor- α oder Interleukin 1 β , führe zu höheren Netrin-4-Konzentrationen. Zhang und Kollegen zeigten 2021 allerdings an HUVEC-Zellen das genaue Gegenteil. Die relativ hohe Grundexpression von Netrin-4 in Endothelzellen wurde durch inflammatorische Zytokine reduziert (Zhang et al., 2021). Dieses Ergebnis verdeutlicht die Komplexität bezüglich der Regulierung der Netrin-4-Expression in lebenden Organismen.

Den Ergebnissen von Reuten und Kollegen aus dem Jahre 2016 zufolge kann Netrin-4 die Polymerisation von Laminin-Netzwerken behindern und bereits vorhandene Basalmembranen zerstören (siehe Kapitel 1.1.1) (Reuten et al., 2016). Diese Fähigkeit würde vollkommen unabhängig von Netrin-4-Effekten auf PMNs erklären, warum unter zusätzlicher Netrin-4-Applikation im murinen M.-Cremaster-Modell deutlich mehr PMNs transmigrieren. Netrin-4 wird sogar in Richtung der Basalmembran sezerniert, was es direkt an einen seiner Wirkorte, die Basalmembran, bringt und damit Effekte erleichtert (Zhang et al., 2021). Auch wurde von Ley und Kollegen in ihrer Übersichtsarbeit 2007 aufgeführt, dass PMNs die Endothelzellen deutlich schneller (zwei bis fünf Minuten) als die Basalmembran (meist über 15 Minuten) passieren können (Ley et al., 2007). Unter hohen Netrin-4-Konzentrationen wäre dann möglicherweise die Transmigration von PMNs erleichtert, da das größte Hindernis, die Basalmembran, leichter zu überwinden wäre. Diese Vermutung scheint möglicherweise durch das murine M.-Cremaster-Modell bestätigt werden zu können; hier war die Anzahl der transmigrierten PMNs in der Kondition mit exogener Applikation von Netrin-4 bei den Tieren mit Ischämie-Reperfusion am höchsten. Im LAD-Okklusions-Modell könnte eine physiologisch unter Ischämie und Reperfusion erreichbare Netrin-4-Konzentration in Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu Netrin-4-Ganzkörper-Knockout-Mäusen für eine erhöhte Transmigration von PMNs ins murine Myokard sorgen. Die Vermutung, dass Netrin-4 auf die Basalmembran und nicht die Endothelzellen selbst wirkt, könnte auch durch den In-vitro-Versuch der Transmigration im Rahmen eines Transmigrations-Assay bestätigt werden. In diesem Versuch mit Endothelzellen und ohne eine Basalmembran kam es zu keinen Unterschieden zwischen der Kondition mit einer zusätzlichen Netrin-4-Applikation und jener ohne. Dementsprechend bietet die Vermutung, Netrin-4 hätte bei der Transmigration auf Endothelzellen selbst keinen Effekt, sondern auf die darunterliegende Basalmembran, Ansätze für weitergehende Forschung. Eine andere Vermutung, die bereits in Kapitel 4.1.2 formuliert wurde, lautet, dass die Netrin-4-vermittelten Effekte im Endothel strömungsabhängig sind. In den beiden In-vivo-Versuchen war jeweils ein Blutfluss vorhanden; der Transmigration-Assay ist dagegen ein Versuch ohne Strömung. Da die Netrin-4-

Expression unter laminarem Fluss von Endothelzellen gesteigert wird (Zhang et al., 2021), wäre ein möglicher Ansatz, davon auszugehen, dass die Netrin-4-vermittelten Effekte ebenfalls strömungsabhängig sind. Für diese Vermutung sprechen auch die Ergebnisse der Flusskammer-Versuche. In diesen Versuchen gab es keine Basalmembran, sondern nur einzelne Adhäsionsmoleküle, und dennoch konnte ein Netrin-4-vermittelter Effekt, die Reduktion der Rollgeschwindigkeit, verzeichnet werden.

Die Netrin-4-vermittelten Effekte sind aber nicht nur im Endothel oder in der Basalmembran nachweisbar. Auch PMNs reagieren mit einer veränderten Expression der Adhäsionsmoleküle auf Netrin-4 (siehe Durchflusszytometrie-Versuche). Ebenfalls konnten in den Flusskammer-Versuchen Netrin-4-Effekte auf PMNs nachgewiesen werden. Verschiedene Studien fanden heraus, dass Netrin-4 oftmals mit Integrinen interagiert und über diese seine zellulären Funktionen ausübt (siehe Kapitel 1.1.2). Mittels spezifischer Liganden-Inhibition durch Antikörper war es mit dem Flusskammer-Modell nicht möglich, ein Adhäsionsmolekül zu finden, das als Ligand für Netrin-4 dient oder der einzige Effektor für eine Reduktion der Rollgeschwindigkeit nach Netrin-4-Applikation ist. Der Effekt von exogen appliziertem Netrin-4, die Rollgeschwindigkeit von PMNs zu reduzieren, konnte auch im murinen M.-Cremaster-Modell bestätigt werden. Im Auge und in der Retina können hohe Konzentrationen von Netrin-4 nachgewiesen werden, weswegen Netrin-4-Effekte dort bereits in Vorarbeiten intensiver untersucht wurden (Li et al., 2012). Netrin-4 inhibiert, wie in Kapitel 1.1.3 dargestellt, im Modell der alkali-verätzten Rattenaugen eine Transmigration von neutrophilen Granulozyten und Makrophagen und wirkt dadurch anti-inflammatorisch (Han et al., 2015a, Han et al., 2015b). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den Befunden dieser Arbeit. Allerdings wirken Proteine oder Substanzen, in diesem Falle Netrin-4, meistens organspezifisch, wobei unter anderem die organspezifische Beschaffenheit des vaskulären Endothels entscheidend ist, settingspezifisch, zeitpunktspezifisch und konzentrationsabhängig. Das bedeutet, dass nicht in allen Organen die beobachteten Effekte identisch sein müssen. In Augen mag Netrin-4 anti-inflammatorisch wirken, in anderen Organen hingegen, z. B. dem Herzen oder Muskelgefäßen, kann Netrin-

4 inflammatorisch wirken und diese Wirkung zum Beispiel sowohl über das Endothel als auch die PMNs vermitteln. Ebenso spielt die Art der Entzündung eine Rolle, so muss zwischen einer sterilen (z. B. nach einer Ischämie mit anschließender Regeneration) und einer nicht-sterilen (z. B. bei einer bakteriellen Infektion) Inflammation unterschieden werden (Chen und Nuñez, 2010). Und auch der Zeitpunkt der betrachteten Inflammation spielt eine Rolle. Zu Beginn einer Entzündung gibt es eine akute Inflammation, woraufhin es später zur Granulation und Narbenbildung kommt (Blankestijn et al., 2001). Dass die Effekte von Netrin-4 konzentrationsabhängig sind und teilweise sehr hohe und sehr niedrige Konzentrationen entgegengesetzte Effekte haben können, wurde bereits mehrfach gezeigt (siehe Kapitel 1.1.1) (Lee et al., 2020, Han et al., 2015a).

Netrin-4 scheint auch bei der Pathophysiologie von pulmonal-arterieller Hypertonie (PAH) eine Rolle zu spielen. In distalen Lungengefäßen ist bei einer PAH eine erhöhte Netrin-4-Expression messbar. Eine Netrin-4-Inhibition könnte bei einer PAH vorteilhaft sein, während eine erhöhte Netrin-4-Serumkonzentration einen umgekehrten Effekt zu haben scheint (Harbaum et al., 2022). Die Netrin-4-Effekte im Rahmen einer PAH erwecken folglich den Anschein, den in dieser Arbeit ermittelten Effekte im Myokardinfarkt ähnlich zu sein.

Bei verschiedenen Tumoren konnte mittlerweile entschlüsselt werden, dass Neogenin der Effekt-vermittelnde Rezeptor von Netrin-4 ist. So vermittelt Netrin-4 unter anderem Effekte wie Anti-Angiogenese in kolorektalen Karzinomen, Zelltod und -migration in Neuroblastomen und Zellproliferation und -invasion in Magenkarzinomen über den Neogenin-Rezeptor (Eveno et al., 2011, Villanueva et al., 2017, Lv et al., 2015). Die Vorstellung von Neogenin als einem Rezeptor für Netrin-4 passt zu den Ergebnissen des Inhibitionsversuchs von Neogenin in den Flusskammern und im LAD-Okklusionsmodell. Allerdings wurde bereits mittels elektrostatischem Oberflächenpotential gezeigt, dass Netrin-4 nicht an Neogenin binden kann, da Netrin-4 für diese Bindung die passenden Sequenzen fehlen. In derselben Arbeit wurde mit einer Biolayer-Interferometrie die Bindungskinetik von Netrin-4 zu Neogenin bestimmt, die erwartungsgemäß nicht

vorhanden war (Reuten et al., 2016). Netrin-4 scheint also nicht direkt mit Neogenin interagieren zu können, aber dennoch Effekte über den Neogeninrezeptor vermitteln zu können. Es gibt, wie in Kapitel 1.1.2 dargestellt, noch weitere Netrin-Rezeptoren, an die Netrin-4 ebenfalls binden kann. Besonders der Rezeptor UNC5b wurde in mehreren Studien als wichtiger Rezeptor für Netrin-4 identifiziert; in dieser Arbeit wurde allerdings eine mögliche Interaktion nicht untersucht (Hayano et al., 2016, Lee et al., 2020).

4.3 Klinische und therapeutische Implikationen

In dieser Arbeit wurden Effekte von Netrin-4 beschrieben, die zu verstärkter Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und zu größeren Gewebeschäden nach myokardialer Ischämie führen. Als mögliche klinische und therapeutische Implikationen kommen demzufolge Hemmungen der Netrin-4 vermittelnden Effekte und Funktionen während der initialen Phase eines Herzinfarkts bzw. vor, während und kurz nach einer nachfolgenden Reperfusion in Betracht.

Zu einem Verschluss einer Koronararterie kommt es, wie bereits in Kapitel 1.3.1 aufgeführt, meist durch eine Thrombusbildung aufgrund der Ruptur einer durch Atherosklerose entstandenen Plaque (von Scheidt et al., 2017). Atherosklerose ist eine chronische, Lipid-verursachte, inflammatorische Erkrankung der Arterienwand unter Einbezug des Immunsystems. Dabei kommt es zu Ablagerungen von LDL-Cholesterin in die Intima (Libby, 2012, Badimon et al., 2012, beide zitiert nach Badimon und Vilahur, 2014). Weitere pathogene Einflüsse wie Zytokine sorgen für eine Verstärkung der Inflammation (Badimon und Vilahur, 2014). Es kommt durch freigesetzte Mediatoren zu einer Einwanderung von Monozyten in die Intima und dort zu einer Aktivierung der Monozyten zu Makrophagen (Glass und Witztum, 2001, Hansson und Hermansson, 2011, beide zitiert nach Fu et al., 2012). Die aktivierten Makrophagen phagozytieren das Cholesterin und setzen Enzyme, wie Matrixmetalloproteasen, frei. Anschließend gehen die Makrophagen in Apoptose und die Matrixmetalloproteasen greifen die Kollagenfasern der Deckplatte an und verdauen die apoptotischen Reste der Makrophagen. Durch diese Prozesse erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für eine Plaqueruptur (Tabas, 2012, Virmani

et al., 2005, beide zitiert nach Badimon und Vilahur, 2014). Kommt es nun zum Einriss der Deckplatte, also zur Plaqueruptur, wird an der Stelle sofort die Blutgerinnung aktiviert und es kommt zur Thrombusbildung, wobei das Gefäß vollständig oder teilweise okkludiert (Badimon und Vilahur, 2014). Neben der Plaqueruptur gibt es noch weitere pathophysiologische Entstehungsmöglichkeiten eines akuten Koronarverschlusses.

Als erste präklinische Therapiemaßnahme soll der Patient beruhigt werden. Bei einer Sauerstoffsättigung von unter 90% soll externer Sauerstoff verabreicht und mithilfe von Opiaten sollen die Schmerzen reduziert werden (Thiele et al., 2017). Eine Revaskularisierung ist die wichtigste Therapieform und insbesondere bei einem STEMI ist eine möglichst zeitnahe Revaskularisierung am relevantesten für die Prognose (Yellon und Hausenloy, 2007). Sie kann durch verschiedene Mechanismen erreicht werden. Die derzeit bezüglich des klinischen Outcomes beste und deswegen bevorzugte Therapieform stellt die perkutane transluminale Koronarangioplastik (PTCA) dar, bei der das okkludierte Koronargefäß mittels Ballonkatheter aufgedehnt wird (Keeley et al., 2003). Bei einer PTCA als Revaskularisierungsmethode soll eine medikamentöse Antikoagulation, typischerweise mit unfraktioniertem Heparin, durchgeführt werden. Neben der Antikoagulation sollte während eines akuten Herzinfarktes immer eine antithrombotische Therapie – zum Beispiel mit P2Y₁₂-Rezeptor-Antagonisten – durchgeführt werden. Danach sollte eine Präventionstherapie – zum Beispiel mit Prasugrel oder Ticagrelor und Aspirin – gegen weitere arterielle Verschlüsse eingeleitet werden (Collet et al., 2021). In ungefähr 75% der Fälle wird nach der PTCA noch ein Stent in das aufgedehnte Gefäß eingelegt. Die zusätzliche Einlage eines Stents ist einer alleinigen Angioplastie im ersten Jahr nach der Intervention bezüglich der Restenosierungsrate überlegen (Zhu et al., 2001). Nach einer Stenteinlage kommt es aber zu einer deutlich höheren Thrombozytenaktivierung als nach alleiniger Angioplastie, weswegen hier stärkere Thrombozytenaggregationshemmer eingenommen werden müssen (Inoue et al., 2000). Es gibt zwei verschiedene Arten von Stents: Stents aus reinem Metall und Medikamenten-beschichtete Stents. Hinsichtlich der Restenosierungs- und Todesrate haben beide Stentarten ein gleiches *Outcome*;

allerdings benötigen Medikamenten-beschichtete Stents weniger Reinterventionen (Kastrati et al., 2007). Ist eine PTCA bei einem STEMI nicht innerhalb von zwei Stunden komplett durchführbar, ist es für das *Outcome* und die Prognose besser, sofort eine alleinige medikamentöse Lysetherapie mit Fibrinolytika (zum Beispiel mit Streptokinase, gewebespezifischer Plasminogen-aktivator (t-PA – engl.: *tissue-type plasminogen activator*) oder rekombinant hergestellten t-PAs, wie unter anderem Alteplase) einzuleiten (Nallamothu et al., 2004, zitiert nach Pinto et al., 2006, Reed et al., 2017). Die dritte Möglichkeit ist eine Bypass-Operation, die erst bei mehrmaliger vorheriger PTCA-Erfolglosigkeit und als letzte Ausweichoption in Erwägung gezogen werden sollte. Eine Bypass-Operation wird standardmäßig bei persistierender klinischer Angina-Pectoris-Symptomatik und nicht während eines STEMI als letzte Therapieoption angewendet, da es sich hierbei um eine große Operation mit zeitlicher Verzögerung am kardioplegisch stillgelegten Herzen handelt. Dabei wird eine Überbrückung der Stenose durch andere Gefäße angestrebt. Dafür kann entweder ein arterielles Gefäß (meist A. thoracica interna) mit einer Koronararterie anastomosiert oder eine Vene (meist V. saphena magna) als Interponat eingesetzt werden.

Eine Reperfusion führt aber paradoxerweise, wie bereits in Kapitel 1.3 aufgeführt, zunächst zu größeren Gewebeschäden, die bis zu 50% des eigentlichen Schadens im Rahmen eines akuten Myokardinfarkts ausmachen können (Yellon und Hausenloy, 2007). Durch eine Neutrophilen-Depletion hingegen ist eine Reduktion des infarzierten Areals im Herzinfarkt-Modell von über 40% und ein geringerer Gewebeschaden feststellbar (siehe Kapitel 1.3.1) (Litt et al., 1989, Romson et al., 1983).

Es gibt aktuell wenig klinisch-therapeutische Daten bezüglich einer Inflammationshemmung durch Inhibition einer PMN-Infiltration bzw. -Transmigration. Wie in Kapitel 1.2 bereits erklärt, sind einige Adhäsionsmoleküle notwendig, um eine Adhäsion und eine anschließende Transmigration von PMNs zu ermöglichen. Eine Inhibition von LFA-1 oder Mac-1 erhöht die Rollgeschwindigkeit der PMNs und erniedrigt die Anzahl an adhärierenden und transmigrierenden PMNs. Allerdings wird eine Transmigration von PMNs durch

keine Integrin-Blockade vollständig inhibiert (Phillipson et al., 2006). Die Inhibition von CD47 (Integrin-assoziiertes Protein) durch einen monoklonalen Antikörper (ab einer Konzentration von 2mM) scheint hingegen die einzige Möglichkeit zu sein, eine PMN-Infiltration vollständig zu hemmen (Liu et al., 2004).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, führt Netrin-4 zu einer verstärkten Adhäsion, Transmigration und Aktivierung von PMNs und eine Netrin-4-Inhibition könnte daher zu einer Hemmung der Netrin-4-vermittelten Effekte auf PMNs im Rahmen eines Herzinfarkts führen. Diese potenziellen Effekte einer Inhibition wären in Bezug auf die Größe des Gewebeschadens erwünscht und protektiv.

In der Literatur sind bereits einige Effekte von Netrin-4 bekannt, deren Inhibition sinnvoll erscheint. Die meisten experimentellen Untersuchungen hingegen diskutieren Netrin-4 selbst als ein mögliches Therapeutikum in anderen Settings, so beispielsweise im Rahmen von Kornealerosionen oder peripheren Gefäßverschlüssen. So konnte im Modell der alkali-verätzten Rattenaugen, bei dem Ratten ein Auge mithilfe einer Applikation einer alkalischen Lösung verätzt und später vier Mal täglich mit Netrin-4 behandelt wurde, gezeigt werden, dass exogen appliziertes Netrin-4 Neovaskularisation in der Kornea inhibiert. Außerdem inhibiert es die Apoptose von Korneazellen, reduziert die VEGF-Konzentration, den kornealen inflammatorischen Index und die Ödem- sowie Narbenbildung in der Kornea. Diese Vorgänge sind protektiv, gerade eine Neovaskularisation der Kornea ist einer der Hauptgründe für korneale Blindheit (Han et al., 2015a). Des Weiteren reduziert Netrin-4 vorwiegend in der akuten Phase der Inflammation die Konzentration proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in der Kornea. Während einer diabetischen Retinopathie erhöht sich die VEGF-Konzentration und eine Injektion von Netrin-4 in den Glaskörper sorgt dann, wie bereits in Kapitel 1.1.3 beschrieben, für eine Konzentrationsreduktion von VEGF (Cao et al., 2017). Netrin-4 scheint demzufolge eine neue mögliche Therapieoption bei Korneaschäden zu sein; aktuell ist die Therapie gegen Neovaskularisation eine Anti-VEGF-Therapie und gegen eine Inflammation des Auges eine Kortison-Therapie (Han et al., 2015a, Han et al., 2015b). Bereits 2008 wurde Netrin-4 als Alternative zur Anti-VEGF-Therapie entdeckt (Lejmi et al., 2008). Auch ist Netrin-4 in der Lage, bei ischämischen Gefäßerkrankungen und

in ischämischen Gebieten über den Rezeptor UNC5b als biologischer Homing-Faktor auf Endothelvorläuferzellen zu wirken und dadurch eine Rekrutierung dieser Vorläuferzellen zu fördern, was Netrin-4 zu einem Therapeutikum in ischämischem Gewebe macht (Lee et al., 2020). Diese Endothelvorläuferzellen haben ein großes therapeutisches Potential und können sowohl bei beschädigten Gefäßwänden eine Re-Endothelialisierung als auch in ischämischen Geweben eine Neovaskularisation fördern (Takahashi et al., 1999, Rafii und Lyden, 2003, beide zitiert nach Lee et al., 2020). Es werden in der Literatur aber auch gegenteilige Effekte von Netrin-4 beschrieben, deren Hemmung über einen Netrin-4-vermittelten Signalweg angestrebt wird. In Neuroblastomen zum Beispiel ist der Netrin-4 / Neogenin-Signalweg ein mögliches Therapieziel: Ein Knockout von Netrin-4 führt in Neuroblastomen zu einer verstärkten Apoptose der Tumorzellen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass Netrin-4 einen Überlebensfaktor darstellt, der die pro-apoptotische Aktivität des Neogenin inhibiert und selbst in Neuroblastomen anti-apoptotisch wirkt (Villanueva et al., 2017). Eine Inhibition der Netrin-4 / UNC5b-Achse kann möglicherweise ebenfalls ein therapeutisches Potential bei einer Tumorthherapie bieten, da Netrin-4 an hypoxischen Tumorstellen die Angiogenese fördert (Lee et al., 2020). In dieser Arbeit wurde insbesondere gezeigt, dass Netrin-4 auch akute Effekte hat, während in der Literatur bislang hauptsächlich langfristige Effekte von Netrin-4 auf Tumore und Neovaskularisation beschrieben wurden. Die akuten Effekte von Netrin-4 auf neutrophile Granulozyten wie eine verstärkte Transmigration, eine verlangsamte Rollgeschwindigkeit und eine Erhöhung der Adhäsionsmolekülexpression haben letztendlich nur kleine Auswirkungen auf den komplexen Ablauf der Endothel-PMN-Interaktion. Netrin-4 scheint demzufolge kein klassisches ‚An-und-Aus-Schalter-Protein‘ zu sein, sondern eher ein Modulator. Dennoch hat Netrin-4 signifikante Effekte auf neutrophile Granulozyten und deren Verhalten sowie auf die Größe des Infarktschadens im murinen Myokardinfarktmodell. Daraus ergeben sich klinische und therapeutische Implikationen für eine Hemmung von Netrin-4, die entweder bereits auf Sekretionsebene erfolgen oder direkt gegen Netrin-4 oder auch gegen Netrin-4-vermittelte Signalwege gerichtet sein könnten. Dadurch wären bei

ischämischen Krankheitsbildern, wie zum Beispiel einem Myokardinfarkt, protektive Maßnahmen möglich, um das Ausmaß von Gewebeschäden einzudämmen.

Den Sekretionsprozess von Netrin-4 zu inhibieren, scheint kein vielversprechender Ansatz zu sein, da Netrin-4 nur eines von vielen sezernierten Proteinen darstellt und zumindest aktuell kein besonderer Sekretionsmechanismus bekannt ist, welcher gezielt inhibiert werden könnte. Die sinnvollsten Optionen sind demzufolge eine intrazelluläre Inhibition von Netrin-4 vor der Translation, eine Inhibition des sezernierten Proteins im Gewebe oder eine Hemmung der Signalwege von Netrin-4, nachdem diese entschlüsselt worden sind. Dabei müssen mehrere Aspekte der Inhibition beachtet werden und es stellen sich folgende Fragen: Wird eine permanente oder nur eine transitorische Inhibition angestrebt? Und soll diese Inhibition organspezifisch, also selektiv, wirken oder ubiquitär den gesamten Organismus betreffen? Aufgrund der bereits in diesem Kapitel aufgeführten nützlichen und protektiven Eigenschaften von Netrin-4, die Netrin-4 selbst als Therapeutikum qualifizieren, ergibt sich das Ziel, eine permanente und ubiquitäre Hemmung von Netrin-4 zu vermeiden. Ein permanenter Ganzkörper-Knockout von Netrin-4, der unter anderem bei den in dieser Arbeit beschriebenen Mäusen verwendet wurde, scheint demzufolge für humane Therapien keine Option zu sein. Eine Inhibition von Netrin-4 könnte zum Beispiel durch Antikörper, Biologicals oder miRNA erfolgen.

Bei MikroRNAs (miRNA) handelt es sich um kurze, nicht codierende RNAs, die die Genexpression hochspezifisch auf posttranskriptioneller Ebene regulieren können und hauptsächlich beim ‚Abschalten‘ von Genen (engl.: *Gene silencing*) eine große Rolle spielen (He und Hannon, 2004). An miRNA-Therapien zur Behandlung eines Myokardinfarkts wird bereits seit einigen Jahren geforscht. (Kamps und Krenning, 2016). Eine miRNA-Therapie zur Myokardinfarktbehandlung wurde 2019 erstmals mit extrazellulären Vesikeln in In-vivo-Tierversuchen erfolgreich durchgeführt. Dabei konnte eine Reduktion der Apoptose und eine verbesserte Herzfunktion erreicht werden (Song et al., 2019). Ein denkbarer Ansatz für eine spezifische Therapie gegen Netrin-4 mit miRNA

könnte möglicherweise der gezielte Abbau der Netrin-4-mRNA in spezifischen Geweben durch eine partielle Komplementarität für eine gewisse Zeitspanne sein. Die miRNA-Technologie ist leider noch sehr aufwändig und teuer. Des Weiteren limitiert das ungünstige Kosten-Nutzen-Verhältnis die Einsatzmöglichkeiten in frühen Entwicklungsstadien.

Biologicals sind Therapeutika, die mittels Biotechnologie oder gentechnisch veränderten Organismen hergestellt werden. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Proteine (z. B. Antikörper, Hormone) und Nukleinsäuren (z. B. DNA, RNA). Der Übersichtlichkeit halber soll es in dieser Arbeit bei Biologicals vorwiegend um Antikörper gehen. Derzeit unterscheidet man drei verschiedene Antikörper: polyklonale, monoklonale und rekombinante Antikörper. Insbesondere bei monoklonalen und rekombinanten Antikörpern handelt es sich inzwischen um etablierte und sehr häufig verwendete Therapeutika. Mittlerweile gibt es einige Antikörper, die zur Myokardinfarktprophylaxe und gegen Atherosklerose eingesetzt werden können (Sabatine et al., 2017, Schwartz et al., 2018, Ridker et al., 2017). Gleichwohl gibt es kaum Antikörper für eine Myokardinfarkttherapie, die weder die Cholesterinspiegel noch die Inflammation reduzieren und damit nicht prophylaktisch gegen ein kardiovaskuläres Ereignis wirken. 2021 wurde eine Studie über Tocilizumab, einen Interleukin-6-Rezeptor-Inhibitor, der möglichst früh nach einem STEMI gegeben werden soll, veröffentlicht. Tocilizumab zeigt in dieser Studie einen Trend zu geringeren myokardialen Nekrosen und kleineren Infarktgrößen (Broch et al., 2021). Ein weiterer Antikörper, der Interleukin-1-Inhibitor Anakinra, reduziert bei Gabe nach einem STEMI die CRP-Konzentration und damit die systemische inflammatorische Antwort sowie die Mortalität und Inzidenz einer neu aufgetretenen Herzinsuffizienz im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbate et al., 2020). Gegen Netrin-4 selbst gibt es bereits viele Antikörper, welche unter anderem in dieser Arbeit für histologische Färbungen verwendet wurden, aber keine therapeutische Wirkung haben. Antikörper gegen Netrin-4, die eine therapeutische Wirkung haben und die Effekte von Netrin-4 im Menschen hemmen, gibt es derzeit nicht. Die Nachteile bei einer Therapie mit Antikörpern sind ebenfalls die hohen Kosten; allerdings sind Antikörper deutlich günstiger in

der Herstellung als zum Beispiel miRNA. Hier wäre zu erwägen, spezifische Antikörper, die an Netrin-4 binden und somit eine Bindung von Netrin-4 an seine Rezeptoren kompetitiv verhindern, für ischämische Krankheitsbilder wie den Myokardinfarkt zu entwickeln. Um die Effekte von Netrin-4 – insbesondere auf PMNs – gezielter zu hemmen, müssen allerdings die zugrunde liegenden Mechanismen wie die Bindungspartner von Netrin-4 besser entschlüsselt werden. Eine Entschlüsselung der Signalwege von Netrin-4 und seiner Wirkmechanismen auf PMNs würde noch weitere mögliche Angriffspunkte für eine Antikörpertherapie liefern. Ein Ansatz wären hier unter anderem die Integrine $\alpha 6$ und $\beta 1$ sowie der Neogenin-Rezeptor, der auch in dieser Arbeit als ein Effekte-vermittelnder-Rezeptor von Netrin-4 identifiziert wurde. Für alle pharmakologischen Ansätze wären aber bis zur Herstellung eines kommerziell erhältlichen Medikamentes nach weiterer Grundlagenforschung noch pharmakologische Zulassungsstudien notwendig, was beides mit einem hohen wirtschaftlichen Entwicklungsaufwand und damit sehr hohen Kosten verbunden ist (Wouters et al., 2020).

Eine weitere interessante Anwendungsmöglichkeit ist die Biomarker-Funktion von Netrin-4. Es gibt bereits Erkrankungen, bei denen Netrin-4 Funktionen eines Biomarkers einnehmen kann. In 37,5% der Fälle ist bei einer Brustkrebserkrankung eine Netrin-4-Expressionserhöhung zu verzeichnen, wobei diese Erhöhung protektiv ist und mit einem verlängerten Gesamtüberleben korreliert (Esseghir et al., 2007, zitiert nach Lejmi et al., 2014). Außerdem kommt es bei inflammatorischen Prozessen in humanen Retinae im Rahmen einer diabetischen Retinopathie zu einer Erhöhung der Netrin-4-Expression. Daraus wurde geschlossen, man könne Netrin-4 als Biomarker für die Progression dieser Krankheit verwenden (Crespo-Garcia et al., 2021). Auch bei der in Kapitel 4.2 thematisierten PAH kann – wie bei einer sehr kleinen Fallzahl signifikant gezeigt wurde – eine Erhöhung der Netrin-4-Konzentration als eine Art prognostischer Faktor gesehen werden. Die Netrin-4-Plasmaspiegel steigen bei noch nicht manifest an PAH-Erkrankten vor dem Beginn der PAH bereits an und können so die zukünftige Manifestation einer PAH aufzeigen (Harbaum et al., 2022). Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist auch im Myokardinfarkt die

Serumkonzentration von Netrin-4 im Vergleich zu der Konzentration bei einer Kontrolle signifikant erhöht. Aktuell ist aber das kardiale Troponin I der Biomarker erster Wahl beim Myokardinfarkt (Maynard et al., 2000, McDonough et al., 1999, beide zitiert nach Kemp et al., 2004). Von Interesse könnte es jedoch sein, Netrin-4 als generellen Biomarker für Gewebehypoxie zu untersuchen, da Netrin-4 unter Hypoxie von allen Endothelzellen sezerniert wird. Hierfür wären allerdings noch klinische Studien notwendig.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit klar gezeigt werden, dass eine Inhibition von Netrin-4 im Tierexperiment signifikante und relevante Effekte auf Infarktschäden hat. Durch eine Hemmung der verstärkten Adhäsion und Transmigration und insbesondere der verlangsamten Rollgeschwindigkeit käme es zu geringeren Gewebeschäden, zum Beispiel bei einem Myokardinfarkt. Bis zu einer therapeutischen Nutzung dieser Erkenntnisse sind allerdings noch weitere Studien durchzuführen.

4.4 Limitationen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere komplexe und voraussetzungsreiche Versuche zum Einfluss von Netrin-4 auf die Interaktion von PMNs mit dem Endothel adaptiert und entwickelt. Die Anwendung dieser Verfahren brachte einige Limitationen mit sich, die im Folgenden dargestellt werden sollen.

Limitierte Untersuchungsobjekte, -materialien und -instrumente, wie lebende Tiere sowie finanziell aufwendige Verfahren, schlossen aus ethischen und finanziellen Gesichtspunkten ausführliche Einarbeitungs- und Testphasen aus. Auch konnten Messungenauigkeiten von Geräten auftreten, welche nicht detektiert wurden. Die notwendige hohe Präzision in zahlreichen Teilschritten stellte hohe Anforderungen an die Versuchsdurchführung, wobei Ungenauigkeiten nicht auszuschließen sind. Wiederholte Überprüfungen und Validierungen sollten dem entgegenwirken. Einige Versuche hatten aber zusätzlich zu allgemeinen Limitationen noch spezifischere, den einzelnen Versuch betreffende Limitationen, die im folgenden Kapitel thematisiert werden sollen.

Bei den Versuchen mit HMEC-Zellen konnten die Inkubationszeiten der HMEC-Zellen aus der Hypoxie nicht alle exakt gleichzeitig beendet werden. Die Abnahme des Überstandes und die Bedeckung mit RNA-Lyse-Puffer erfolgte Well für Well nacheinander, sodass einige Zellen kurzzeitig nochmals in Normoxie waren, was die Ergebnisse minimal, aber in einer vermutlich nicht relevanten Weise, verfälscht haben könnte.

Eine weitere Limitation bei den Versuchen mit HMEC-Zellen, in diesem Falle nur die HMEC-Zellen mit Hif-1 α -Knockout betreffend, war die Detektionsschwelle des Netrin-4-ELISAs. Die Detektionsschwelle liegt laut Angaben des Herstellers bei 7,8pg/ml, einer Konzentration, die in keinem Überstand der HMEC-Zellen mit Hif-1 α -Knockout erreicht wurde. Bei zukünftigen Versuchen sollte idealerweise mit einem spezifisch angefertigten ELISA-Kit mit niedrigerer Detektionsschwelle gearbeitet werden.

Bei den Flusskammern konnte die Durchflussgeschwindigkeit des Blutes durch die Kapillare nur optisch kontrolliert und durch Heben und Senken des Schlauches verändert werden. Dementsprechend konnte keine kontinuierliche identische Flussgeschwindigkeit garantiert werden, was eventuell die Rollgeschwindigkeit der PMNs beeinflusst haben könnte. Bei einer erneuten Durchführung wäre eine mögliche Verbesserung die Installation einer Pumpe, die einen kontinuierlichen gleichmäßigen Blutfluss gewährleistet.

Es fehlte außerdem an einigen passenden Antikörpern für die Inhibitionsversuche der Flusskammern. Ein Antikörper gegen ESL-1 war kommerziell nicht erhältlich und der Antikörper gegen PSGL-1 inhibiert nur die Domäne gegen P-Selektin zuverlässig, sodass eine Interaktion von PSGL-1 mit E-Selektin weiterhin eingeschränkt möglich war. Ein entsprechender Antikörper gegen die Domäne von E-Selektin ist derzeit ebenfalls nicht kommerziell erhältlich. Ein dritter wichtiger Bindungspartner von E-Selektin, CD44, wurde ebenfalls mit Antikörper-Inhibitionsversuchen untersucht. Allerdings kam es hier sofort zu einer Verklumpung der Erythrozyten – selbst nach mehrmaliger Heruntertitration der Antikörperkonzentration –, sodass dieser Versuch leider nicht unter den gleichen Bedingungen wie die anderen Antikörperinhibitionsversuche durchzuführen war.

Auffällig war bei der Durchführung und Auswertung der Integrin-Inhibitionsversuche eine starke Dezimierung der durchschnittlichen Anzahl der rollenden PMNs in einem Videoausschnitt im Vergleich zu den Konditionen ohne Antikörper oder zu den Inhibitionsversuchen gegen PSGL-1 oder L-Selektin. Beide Integrine sind relevant für das sogenannte langsame Rollen (siehe Kapitel 1.2.2), weswegen eine Inhibition dieser Integrine tendenziell für eine niedrigere Anzahl der rollenden PMNs sorgt. Die deutlich niedrigere Anzahl an quantifizierten PMNs pro Video könnte nun dazu führen, dass ein Vergleich zwischen den beiden Konditionen von eingeschränkter Aussagekraft ist, da die eventuell geringen Effekte von Netrin-4 durch die viel größeren Effekte der Integrin-Inhibition verschleiert werden könnten. Die Inhibition könnte solch schwerwiegende Folgen für die PMNs und deren Interaktion mit dem Endothel haben, dass ein eventuell messbarer Unterschied der Rollgeschwindigkeit mit Netrin-4-Stimulation gegenüber der BSA-Kontrolle keine Rolle mehr spielt. Diese Überlegung erschwert die Vermutungen bezüglich der Integrin-Abhängigkeit oder -Unabhängigkeit der Netrin-4-vermittelte Reduktion der Rollgeschwindigkeit.

Bei den murinen Versuchen wurden männliche Mäuse im Alter von 10 bis 14 Wochen verwendet. Hieraus leiten sich zwei mögliche Limitationen ab. Die erste Limitation ist ein unterschiedliches Alter der Versuchstiere um bis zu vier Wochen. Die zweite Limitation bezieht sich ebenfalls auf den Faktor des Alters. Mäuse in diesem Alter entsprechen Menschen im Alter von 7 Jahren. Ein Myokardinfarkt tritt im Menschen aber meistens erst ab einem Alter von ungefähr 50 Jahren auf. Die verwendeten Mäuse waren jedoch in relativer Betrachtung deutlich jünger, gesund und hatten keine Co-Morbiditäten. Eine Vergleichbarkeit und Übertragung dieser Ergebnisse auf den Menschen muss deswegen unter äußerster Vorsicht erfolgen; die Mäuse müssten für eine Übertragbarkeit in Bezug auf das Alter mindestens 21 Monate alt sein (Hausenloy et al., 2010).

Die allgemeine Frage der Generalisierbarkeit von in Tiermodell und in In-vitro-Versuchen gewonnenen Erkenntnissen ist noch nicht abschließend geklärt. Dennoch lohnt sich weiterhin eine Grundlagenforschung, so können aus durchgeführten Experimenten oftmals auch Erkenntnisse für andere

Krankheitsbilder als das Untersuchte gewonnen werden. Eine Weiterführung der Experimente erscheint sinnvoll (siehe Kapitel 4.5).

4.5 Schlussfolgerung und Perspektive

In dieser Arbeit wurden Effekte von Netrin-4 auf PMNs und deren Interaktionsverhalten mit dem Endothel nachgewiesen. Eine verstärkte Netrin-4-Sekretion von Endothelzellen unter hypoxischen Bedingungen und ein Zusammenhang dieser Netrin-4-Sekretion mit Hif-1 α ließen sich belegen. Netrin-4 hat Effekte auf die Adhäsionsmoleküle der PMNs und sorgt für eine verstärkte Aktivierung der PMNs. Vermutlich deswegen reduziert Netrin-4 die Rollgeschwindigkeit von PMNs sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Exogen appliziertes Netrin-4 erhöht im murinen M. cremaster-Modell zusätzlich noch die Anzahl an adhären und transmigrierten PMNs. Im Gegensatz dazu zeigen sich bei den Mäusen mit einem Ganzkörper-Knockout von Netrin-4 keine signifikanten Effekte im Vergleich zu den WT-Mäusen. In den Flusskammerversuchen konnte ein Vermitteln einiger Netrin-4-Effekte über den Neogenin-Rezeptor gezeigt werden. Die molekularen Mechanismen und Signalwege dahinter wurden hingegen nicht untersucht; diese Arbeit liefert aber weitere Ansätze für zukünftige Forschung hierzu. Auch Netrin-4 selbst ist noch nicht umfassend erforscht, notwendig erscheinen mehr Daten zur genauen molekularen Charakterisierung der Interaktion von Netrin-4 und den zugehörigen Rezeptoren. Ebenfalls nicht hinreichend geklärt ist immer noch die unterschiedliche Bedeutung von Netrin-4 in verschiedenen Organen und Systemen. Über die Relevanz von Netrin-4 sowie dessen Auswirkungen und Funktionen ist bezüglich einiger Organe, zum Beispiel dem Auge, schon viel bekannt, hinsichtlich anderer Organe ist hingegen von einem Desiderat zu sprechen. Mithilfe des LAD-Okklusionsmodells konnte gezeigt werden, dass ein Netrin-4-Knockout protektiv auf einen myokardialen Infarktschaden wirkt und eine exogene Applikation von Netrin-4 den Infarktschaden erhöht. Es benötigt dennoch deutlich mehr Grundlagenforschung, um eine Übertragung von Erkenntnissen aus humanen *In-vitro*- und murinen *In-vivo*-Versuchen auf humane *In-vivo*-Versuche wagen zu können.

Ein interessantes Protein im Zusammenhang mit der Forschung von Netrin-4 und seinen Effekten auf PMNs unter Scherbeanspruchung ist das Quaking-Protein. Ein Zusammenhang zwischen dem Quaking-Protein und der Netrin-4-mRNA wurde erstmals 2021 publiziert (Zhang et al., 2021). Diese Interaktion bietet viele zukünftige Forschungsansätze. Ein möglicher neuer Untersuchungsansatz, der sowohl mit als auch ohne das Quaking-Protein verfolgt werden kann, ist die Wirkung von Scherbeanspruchung auf PMNs und auf die Netrin-4-vermittelten Effekte. Die meisten der Netrin-4-vermittelten Effekte auf PMNs, wie eine Reduktion der Rollgeschwindigkeit und eine verstärkte Transmigration, traten bei Versuchen auf, bei denen ein Blutfluss vorhanden war.

In dieser Arbeit konnten mehrere signifikante und relevante Effekte von Netrin-4 auf PMNs und deren Interaktion mit Endothelzellen festgestellt werden. Ein großer therapeutischer Erfolg durch eine Inhibition erscheint jedoch eher unwahrscheinlich, weil es sich um geringe Effekte handelt. Dennoch bedarf es weiterer Forschung zur Entschlüsselung zugrundeliegender molekularer Mechanismen, da diese dazu beitragen könnten, die akute Immunantwort im Rahmen ischämischer Krankheitsbilder zu modulieren und somit den Gewebeschaden zu verringern.

5 Zusammenfassung

Netrin-4 ist ein Neuronales Guidance Protein, das ursprünglich als Axon-leitendes Protein in der Embryogenese entdeckt wurde. Die Rolle von Netrin-4 im Zusammenhang mit Hypoxie und Gewebeinfarkt sowie dem Immunsystem ist derzeit nicht ausreichend verstanden. Daher wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit zunächst untersucht, ob und durch welche Zellen Netrin-4 unter hypoxischen Bedingungen freigesetzt wird. Das Hauptaugenmerk der durchgeführten Untersuchungen wurde auf die Modulation der Interaktion zwischen PMNs und Endothel durch Netrin-4 im Rahmen einer akuten hypoxisch-inflammatorischen Antwort gelegt.

Für primäre In-vitro-Studien wurden zwei verschiedene Zelllinien verwendet: herkömmliche HMEC-Zellen und HMEC-Zellen mit einem stabilen Knockout von Hif-1 α . Je länger die normalen HMEC-Zellen in Hypoxie waren, desto höher waren die sezernierten Netrin-4-Konzentrationen im Überstand. Die durchgeführten qPCRs sowie Immunfluoreszenzfärbungen der HMEC-Zellen bestätigten dieses Ergebnis. Die Hif-1 α -KO-HMEC-Zellen hingegen sezernierten kein Netrin-4 und in den qPCRs ergaben sich keine Veränderungen der Netrin-4-Expression. Demzufolge scheint die Sezernierung von Netrin-4 Hif-1 α -abhängig zu sein.

Humane neutrophile Granulozyten wurden mittels der Percoll-Methode isoliert und mit Netrin-4 stimuliert. Dann wurde mittels durchflusszytometrischer Untersuchung der Integrine festgestellt, dass insbesondere unter Netrin-4 und fMLP-Stimulation die Expression der Integrine und deren Aktivierung anstieg.

Weiterhin wurden die Auswirkungen von Netrin-4 auf die Rollgeschwindigkeit von PMNs mit Adhäsions-Flusskammern untersucht. Netrin-4 erniedrigte hierbei die Rollgeschwindigkeit der PMNs. Aus den Flusskammerversuchen konnte abgeleitet werden, dass Netrin-4 seine Wirkung sehr schnell entfaltet, es nur über E-Selektin-Liganden wirken kann und die Wirkung abhängig von Neogenin ist. Mit einem Transwell-Migration-Assay wurden zudem die Auswirkungen von Netrin-4 auf die Transmigration von PMNs in vitro untersucht. Hierbei ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Kondition mit Netrin-4 oder der Kontrollkondition. Eine Intravitalmikroskopie am murinen M. cremaster wurde an

verschiedenen Mäusen (Wildtyp, Netrin-4-KO sowie Wildtyp mit zusätzlicher exogener Applikation von Netrin-4) durchgeführt, um den Einfluss von Netrin-4 auf die Rollgeschwindigkeit, die Adhäsion und die Transmigration von PMNs in vivo zu untersuchen. Exogen appliziertes Netrin-4 erniedrigte hierbei die Rollgeschwindigkeit und führte im Gewebe zu verstärkter Adhäsion und Transmigration, wohingegen eine genetische Depletion von Netrin-4 in diesem Modell keinen signifikanten Effekt hatte.

Ein weiteres verwendetes Modell war das murine myokardiale Ischämie-Reperusionsmodell durch eine temporäre LAD-Okklusion. Es zeigte sich, dass eine exogene Netrin-4-Applikation den Ischämie-Reperfusionsschaden erhöht und ein Ganzkörper-Knockout von Netrin-4 sich protektiv auf die Größe des infarzierten Bereichs auswirkt. Einer der vermittelnden Rezeptoren von Netrin-4 scheint Neogenin zu sein, da Neogenin-KO-Mäuse nach Netrin-4-Applikation keine Zunahme des Ischämie-Reperfusionsschadens zeigten. Mit Hilfe von gewebespezifischen Netrin-4-Knockouts wurde in murinen Herzen untersucht, welcher Gewebetyp Netrin-4 während myokardialer Ischämie-Reperfusion sezerniert. Während ein selektiver Netrin-4-KO in Kardiomyozyten, Thrombozyten, Erythrozyten und myeloiden Zellen keinen Einfluss auf den Infarktschaden vermittelte, war eine Netrin-4-Depletion in Endothelzellen hoch protektiv. Auch mittels Immunfluoreszenz konnten linksventrikuläre mikrovaskuläre Endothelzellen als Netrin-4-Produzenten während myokardialer Ischämie-Reperfusion identifiziert werden.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Reaktion von Endothelzellen auf hypoxische Stimuli zu einer erhöhten Freisetzung von Netrin-4 führt und PMNs die Expression ihrer Adhäsionsmoleküle durch Netrin-4 verändern. Diese Veränderung beinhaltet eine Überexpression der Integrine und führt zu einer verstärkten Adhäsion und Transmigration sowie zu einer Reduktion der Rollgeschwindigkeit der PMNs. Im Rahmen von myokardialen Ischämie-Reperfusionsschäden hat die Hemmung der Netrin-4-Achse protektive Effekte auf den Gewebeschaden.

6 Literaturverzeichnis

- ABBATE, A., TRANKLE, C. R., BUCKLEY, L. F., LIPINSKI, M. J., APPLETON, D., KADARIYA, D., CANADA, J. M., CARBONE, S., ROBERTS, C. S., ABOUZAKI, N., MELCHIOR, R., CHRISTOPHER, S., TURLINGTON, J., MUELLER, G., GARNETT, J., THOMAS, C., MARKLEY, R., WOHLFORD, G. F., PUCKETT, L., MEDINA DE CHAZAL, H., CHIABRANDO, J. G., BRESSI, E., DEL BUONO, M. G., SCHATZ, A., VO, C., DIXON, D. L., BIONDI-ZOCCAI, G. G., KONTOS, M. C. & VAN TASSELL, B. W. 2020. Interleukin-1 Blockade Inhibits the Acute Inflammatory Response in Patients With ST-Segment-Elevation Myocardial Infarction. *J Am Heart Assoc*, 9, e014941.
- ADES, E. W., CANDAL, F. J., SWERLICK, R. A., GEORGE, V. G., SUMMERS, S., BOSSE, D. C. & LAWLEY, T. J. 1992. HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. *J Invest Dermatol*, 99, 683-90.
- BADIMON, L. & VILAHUR, G. 2014. Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*, 276, 618-32.
- BALDWIN, A. S., JR. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol*, 14, 649-83.
- BÁNYAI, L. & PATTHY, L. 1999. The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins, and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci*, 8, 1636-42.
- BARALLOBRE, M. J., PASCUAL, M., DEL RÍO, J. A. & SORIANO, E. 2005. The Netrin family of guidance factors: emphasis on Netrin-1 signalling. *Brain Res Brain Res Rev*, 49, 22-47.
- BEESELEY, J. E., PEARSON, J. D., HUTCHINGS, A., CARLETON, J. S. & GORDON, J. L. 1979. Granulocyte migration through endothelium in culture. *J Cell Sci*, 38, 237-48.
- BEVILACQUA, M. P., STENGELIN, S., GIMBRONE, M. A., JR. & SEED, B. 1989. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, 243, 1160-5.
- BLANKESTEIJN, W. M., CREEMERS, E., LUTGENS, E., CLEUTJENS, J. P., DAEMEN, M. J. & SMITS, J. F. 2001. Dynamics of cardiac wound healing following myocardial infarction: observations in genetically altered mice. *Acta Physiol Scand*, 173, 75-82.
- BROCH, K., ANSTENSRUD, A. K., WOXHOLT, S., SHARMA, K., TØLLEFSEN, I. M., BENDZ, B., AAKHUS, S., UELAND, T., AMUNDSEN, B. H., DAMÅS, J. K., BERG, E. S., BJØRKELUND, E., BENDZ, C., HOPP, E., KLEVELAND, O., STENSÆTH, K. H., OPDAHL, A., KLØW, N. E., SELJEFLØT, I., ANDERSEN, G., WISETH, R., AUKRUST, P. & GULLESTAD, L. 2021. Randomized Trial of Interleukin-6 Receptor Inhibition in Patients With Acute ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol*, 77, 1845-1855.
- BRUEHL, R. E., MOORE, K. L., LORANT, D. E., BORREGAARD, N., ZIMMERMAN, G. A., MCEVER, R. P. & BAINTON, D. F. 1997. Leukocyte activation induces surface redistribution of P-selectin glycoprotein ligand-1. *J Leukoc Biol*, 61, 489-99.
- BUTCHER, E. C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67, 1033-6.
- CAO, B., MENG, X., FU, Y., LIU, P., LUN, Y. & WANG, Y. 2017. Neuron-derived netrin-1 and netrin-4 proteins are additional effective targets in diabetic retinopathy beyond VEGF. *Int J Clin Exp Pathol*, 10, 8174-8186.

- CHEN, G. Y. & NUÑEZ, G. 2010. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*, 10, 826-37.
- CIRULLI, V. & YEBRA, M. 2007. Netrins: beyond the brain. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 296-306.
- COLLET, J. P., THIELE, H., BARBATO, E., BARTHÉLÉMY, O., BAUERSACHS, J., BHATT, D. L., DENDALE, P., DOROBANTU, M., EDVARDBSEN, T., FOLLIGUET, T., GALE, C. P., GILARD, M., JOBS, A., JÜNI, P., LAMBRINOU, E., LEWIS, B. S., MEHILLI, J., MELIGA, E., MERKELY, B., MUELLER, C., ROFFI, M., RUTTEN, F. H., SIBBING, D. & SIONTIS, G. C. M. 2021. 2020 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *Eur Heart J*, 42, 1289-1367.
- COLLINS, R. G., JUNG, U., RAMIREZ, M., BULLARD, D. C., HICKS, M. J., SMITH, C. W., LEY, K. & BEAUDET, A. L. 2001. Dermal and pulmonary inflammatory disease in E-selectin and P-selectin double-null mice is reduced in triple-selectin-null mice. *Blood*, 98, 727-35.
- CRESPO-GARCIA, S., REICHHART, N., KOCIOK, N., SKOSYRSKI, S. & JOUSSEN, A. M. 2021. Anti-Inflammatory Role of Netrin-4 in Diabetic Retinopathy. *Int J Mol Sci*, 22.
- CRESPO-GARCIA, S., REICHHART, N., WIGDAHL, J., SKOSYRSKI, S., KOCIOK, N., STRAUß, O. & JOUSSEN, A. M. 2019. Lack of netrin-4 alters vascular remodeling in the retina. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 257, 2179-2184.
- CULOTTI, J. G. & KOLODKIN, A. L. 1996. Functions of netrins and semaphorins in axon guidance. *Curr Opin Neurobiol*, 6, 81-8.
- DAKOUANE-GIUDICELLI, M., BROUILLET, S., TRABOULSI, W., TORRE, A., VALLAT, G., SI NACER, S., VALLÉE, M., FEIGE, J. J., ALFAIDY, N. & DE MAZANCOURT, P. 2015. Inhibition of human placental endothelial cell proliferation and angiogenesis by netrin-4. *Placenta*, 36, 1260-5.
- DIRKSEN, M. T., LAARMAN, G. J., SIMOONS, M. L. & DUNCKER, D. J. 2007. Reperfusion injury in humans: a review of clinical trials on reperfusion injury inhibitory strategies. *Cardiovasc Res*, 74, 343-55.
- DUNNE, J. L., BALLANTYNE, C. M., BEAUDET, A. L. & LEY, K. 2002. Control of leukocyte rolling velocity in TNF-alpha-induced inflammation by LFA-1 and Mac-1. *Blood*, 99, 336-41.
- DUSTIN, M. L., ROTHLEIN, R., BHAN, A. K., DINARELLO, C. A. & SPRINGER, T. A. 1986. Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol*, 137, 245-54.
- ELTZSCHIG, H. K. & CARMELIET, P. 2011. Hypoxia and inflammation. *N Engl J Med*, 364, 656-65.
- ELTZSCHIG, H. K. & ECKLE, T. 2011. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*, 17, 1391-401.
- EVENO, C., BROQUERES-YOU, D., FERON, J. G., RAMPANOU, A., TIJERAS-RABALLAND, A., ROPERT, S., LECONTE, L., LEVY, B. I. & POCARD, M. 2011. Netrin-4 delays colorectal cancer carcinomatosis by inhibiting tumor angiogenesis. *Am J Pathol*, 178, 1861-9.
- EVENO, C., CONTRERES, J. O., HAINAUD, P., NEMETH, J., DUPUY, E. & POCARD, M. 2013. Netrin-4 overexpression suppresses primary and metastatic colorectal tumor progression. *Oncol Rep*, 29, 73-8.

- FENG, D., NAGY, J. A., PYNE, K., DVORAK, H. F. & DVORAK, A. M. 1998. Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP. *J Exp Med*, 187, 903-15.
- FERRERO-MILIANI, L., NIELSEN, O. H., ANDERSEN, P. S. & GIRARDIN, S. E. 2007. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. *Clin Exp Immunol*, 147, 227-35.
- FREIFELD, A. G., SCHUSTER, E. H. & BULKLEY, B. H. 1983. Nontransmural versus transmural myocardial infarction. A morphologic study. *Am J Med*, 75, 423-32.
- FU, Y., MOORE, X. L., LEE, M. K., FERNÁNDEZ-ROJO, M. A., PARAT, M. O., PARTON, R. G., MEIKLE, P. J., SVIRIDOV, D. & CHIN-DUSTING, J. P. 2012. Caveolin-1 plays a critical role in the differentiation of monocytes into macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32, e117-25.
- FUKUDA, S. & SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. 2002. Centrifugation attenuates the fluid shear response of circulating leukocytes. *J Leukoc Biol*, 72, 133-9.
- FUKUDA, S. & SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. 2003. Regulation of CD18 expression on neutrophils in response to fluid shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13152-7.
- GASSLER, J. P. & TOPOL, E. J. 1999. Reperfusion revisited: beyond TIMI 3 flow. *Clin Cardiol*, 22, 1v20-9.
- GIBBONS, R. J., VALETI, U. S., ARAOZ, P. A. & JAFFE, A. S. 2004. The quantification of infarct size. *J Am Coll Cardiol*, 44, 1533-42.
- GINKS, W. R., SYBERS, H. D., MAROKO, P. R., COVELL, J. W., SOBEL, B. E. & ROSS, J., JR. 1972. Coronary artery reperfusion. II. Reduction of myocardial infarct size at 1 week after the coronary occlusion. *J Clin Invest*, 51, 2717-23.
- GROWN, W. 1958. Atherosclerosis and Myocardial Infarction. *Can Med Assoc J*, 79, 1007-8.
- HAN, Y., SHAO, Y., LIU, T., QU, Y. L., LI, W. & LIU, Z. 2015a. Therapeutic effects of topical netrin-4 inhibits corneal neovascularization in alkali-burn rats. *PLoS One*, 10, e0122951.
- HAN, Y., SHAO, Y., LIU, T. T., LI, S. M., LI, W. & LIU, Z. G. 2015b. Therapeutic effects of topical netrin-4 in a corneal acute inflammatory model. *Int J Ophthalmol*, 8, 228-33.
- HARBAUM, L., RHODES, C. J., WHARTON, J., LAWRIE, A., KARNES, J. H., DESAI, A. A., NICHOLS, W. C., HUMBERT, M., MONTANI, D., GIRERD, B., SITBON, O., BOEHM, M., NOVOYATLEVA, T., SCHERMULY, R. T., GHOFrani, H. A., TOSHNER, M., KIELY, D. G., HOWARD, L. S., SWIETLIK, E. M., GRÄF, S., PIETZNER, M., MORRELL, N. W. & WILKINS, M. R. 2022. Mining the Plasma Proteome for Insights into the Molecular Pathology of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, 205, 1449-1460.
- HAUSENLOY, D. J., BAXTER, G., BELL, R., BØTKER, H. E., DAVIDSON, S. M., DOWNEY, J., HEUSCH, G., KITAKAZE, M., LECOUR, S., MENTZER, R., MOCANU, M. M., OVIZE, M., SCHULZ, R., SHANNON, R., WALKER, M., WALKINSHAW, G. & YELLON, D. M. 2010. Translating novel strategies for cardioprotection: the Hatter Workshop Recommendations. *Basic Res Cardiol*, 105, 677-86.
- HAYANO, Y., SASAKI, K., OHMURA, N., TAKEMOTO, M., MAEDA, Y., YAMASHITA, T., HATA, Y., KITADA, K. & YAMAMOTO, N. 2014. Netrin-4 regulates

- thalamocortical axon branching in an activity-dependent fashion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 15226-31.
- HAYANO, Y., TAKASU, K., KOYAMA, Y., YAMADA, M., OGAWA, K., MINAMI, K., ASAKI, T., KITADA, K., KUWABARA, S. & YAMASHITA, T. 2016. Dorsal horn interneuron-derived Netrin-4 contributes to spinal sensitization in chronic pain via Unc5B. *J Exp Med*, 213, 2949-2966.
- HE, L. & HANNON, G. J. 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5, 522-31.
- HEARSE, D. J., HUMPHREY, S. M. & CHAIN, E. B. 1973. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol*, 5, 395-407.
- HEDGECOCK, E. M., CULOTTI, J. G. & HALL, D. H. 1990. The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in *C. elegans*. *Neuron*, 4, 61-85.
- HEYMANS, S., LUTTUN, A., NUYENS, D., THEILMEIER, G., CREEMERS, E., MOONS, L., DYSPERSIN, G. D., CLEUTJENS, J. P., SHIPLEY, M., ANGELLILO, A., LEVI, M., NÜBE, O., BAKER, A., KESHET, E., LUPU, F., HERBERT, J. M., SMITS, J. F., SHAPIRO, S. D., BAES, M., BORGERS, M., COLLEN, D., DAEMEN, M. J. & CARMELIET, P. 1999. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*, 5, 1135-42.
- HIDALGO, A., PEIRED, A. J., WILD, M., VESTWEBER, D. & FRENETTE, P. S. 2007. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity*, 26, 477-489.
- HOANG, S., LIAUW, J., CHOI, M., CHOI, M., GUZMAN, R. G. & STEINBERG, G. K. 2009. Netrin-4 enhances angiogenesis and neurologic outcome after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29, 385-97.
- HOLMES, J. W., BORG, T. K. & COVELL, J. W. 2005. Structure and mechanics of healing myocardial infarcts. *Annu Rev Biomed Eng*, 7, 223-53.
- HU, Y., YLIVINKKA, I., CHEN, P., LI, L., HAUTANIEMI, S., NYMAN, T. A., KESKI-OJA, J. & HYYTIÄINEN, M. 2012. Netrin-4 promotes glioblastoma cell proliferation through integrin $\beta 4$ signaling. *Neoplasia*, 14, 219-27.
- HUANG, L. E., ARANY, Z., LIVINGSTON, D. M. & BUNN, H. F. 1996. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*, 271, 32253-9.
- HYNES, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110, 673-87.
- IDZERDA, R. L., CARTER, W. G., NOTTENBURG, C., WAYNER, E. A., GALLATIN, W. M. & ST JOHN, T. 1989. Isolation and DNA sequence of a cDNA clone encoding a lymphocyte adhesion receptor for high endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 4659-63.
- INOUE, T., SOHMA, R., MIYAZAKI, T., IWASAKI, Y., YAGUCHI, I. & MOROOKA, S. 2000. Comparison of activation process of platelets and neutrophils after coronary stent implantation versus balloon angioplasty for stable angina pectoris. *Am J Cardiol*, 86, 1057-62.
- IVETIC, A. 2018. A head-to-tail view of L-selectin and its impact on neutrophil behaviour. *Cell Tissue Res*, 371, 437-453.

- JEONG, H. J., CHUNG, H. S., LEE, B. R., KIM, S. J., YOO, S. J., HONG, S. H. & KIM, H. M. 2003. Expression of proinflammatory cytokines via HIF-1 α and NF- κ B activation on desferrioxamine-stimulated HMC-1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 306, 805-11.
- JORDAN, J. E., ZHAO, Z. Q. & VINTEN-JOHANSEN, J. 1999. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 43, 860-78.
- KALLIO, P. J., PONGRATZ, I., GRADIN, K., MCGUIRE, J. & POELLINGER, L. 1997. Activation of hypoxia-inducible factor 1 α : posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 5667-72.
- KALOGERIS, T., BAINES, C. P., KRENZ, M. & KORTHUIS, R. J. 2016. Ischemia/Reperfusion. *Compr Physiol*, 7, 113-170.
- KAMPS, J. A. & KRENNING, G. 2016. Micromanaging cardiac regeneration: Targeted delivery of microRNAs for cardiac repair and regeneration. *World J Cardiol*, 8, 163-79.
- KANSAS, G. S. 1996. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*, 88, 3259-87.
- KASTRATI, A., DIBRA, A., SPAULDING, C., LAARMAN, G. J., MENICHELLI, M., VALGIMIGLI, M., DI LORENZO, E., KAISER, C., TIERALA, I., MEHILLI, J., SEYFARTH, M., VARENNE, O., DIRKSEN, M. T., PERCOCO, G., VARRICCHIO, A., PITTL, U., SYVÄNNE, M., SUTTORP, M. J., VIOLINI, R. & SCHÖMIG, A. 2007. Meta-analysis of randomized trials on drug-eluting stents vs. bare-metal stents in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J*, 28, 2706-13.
- KATAYAMA, Y., HIDALGO, A., CHANG, J., PEIRED, A. & FRENETTE, P. S. 2005. CD44 is a physiological E-selectin ligand on neutrophils. *J Exp Med*, 201, 1183-9.
- KE, Q. & COSTA, M. 2006. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, 70, 1469-80.
- KEELEY, E. C., BOURA, J. A. & GRINES, C. L. 2003. Primary angioplasty versus intravenous thrombolytic therapy for acute myocardial infarction: a quantitative review of 23 randomised trials. *Lancet*, 361, 13-20.
- KELLER, M., MIRAKAJ, V., KOEPPEN, M. & ROSENBERGER, P. 2021. Neuronal guidance proteins in cardiovascular inflammation. *Basic Research in Cardiology*, 116, 6.
- KEMP, M., DONOVAN, J., HIGHAM, H. & HOOPER, J. 2004. Biochemical markers of myocardial injury. *Br J Anaesth*, 93, 63-73.
- KISHIMOTO, T. K., JUTILA, M. A., BERG, E. L. & BUTCHER, E. C. 1989. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. *Science*, 245, 1238-41.
- KOCH, M., MURRELL, J. R., HUNTER, D. D., OLSON, P. F., JIN, W., KEENE, D. R., BRUNKEN, W. J. & BURGESSON, R. E. 2000. A novel member of the netrin family, beta-netrin, shares homology with the beta chain of laminin: identification, expression, and functional characterization. *J Cell Biol*, 151, 221-34.
- KOLACZKOWSKA, E. & KUBES, P. 2013. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*, 13, 159-75.
- KÖNIG, K., GATIDOU, D., GRANJA, T., MEIER, J., ROSENBERGER, P. & MIRAKAJ, V. 2012. The axonal guidance receptor neogenin promotes acute inflammation. *PLoS One*, 7, e32145.

- KOONG, A. C., CHEN, E. Y. & GIACCIA, A. J. 1994. Hypoxia causes the activation of nuclear factor kappa B through the phosphorylation of I kappa B alpha on tyrosine residues. *Cancer Res*, 54, 1425-30.
- KOTOVUORI, P., TONTTI, E., PIGOTT, R., SHEPHERD, M., KISO, M., HASEGAWA, A., RENKONEN, R., NORTAMO, P., ALTIERI, D. C. & GAHMBERG, C. G. 1993. The vascular E-selectin binds to the leukocyte integrins CD11/CD18. *Glycobiology*, 3, 131-6.
- KRÜGER, B., KRICK, S., DHILLON, N., LERNER, S. M., AMES, S., BROMBERG, J. S., LIN, M., WALSH, L., VELLA, J., FISCHEREDER, M., KRÄMER, B. K., COLVIN, R. B., HEEGER, P. S., MURPHY, B. T. & SCHRÖPPEL, B. 2009. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 3390-5.
- KUWANO, Y., SPELTEN, O., ZHANG, H., LEY, K. & ZARBOCK, A. 2010. Rolling on E- or P-selectin induces the extended but not high-affinity conformation of LFA-1 in neutrophils. *Blood*, 116, 617-24.
- LAMBERT, E., COISSIEUX, M. M., LAUDET, V. & MEHLEN, P. 2012. Netrin-4 acts as a pro-angiogenic factor during zebrafish development. *J Biol Chem*, 287, 3987-99.
- LARRIEU-LAHARGUE, F., THOMAS, K. R. & LI, D. Y. 2012. Netrin ligands and receptors: lessons from neurons to the endothelium. *Trends Cardiovasc Med*, 22, 44-7.
- LARRIEU-LAHARGUE, F., WELM, A. L., THOMAS, K. R. & LI, D. Y. 2010. Netrin-4 induces lymphangiogenesis in vivo. *Blood*, 115, 5418-26.
- LARRIEU-LAHARGUE, F., WELM, A. L., THOMAS, K. R. & LI, D. Y. 2011. Netrin-4 activates endothelial integrin $\alpha_5\beta_1$. *Circ Res*, 109, 770-4.
- LEDEBUR, H. C. & PARKS, T. P. 1995. Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem*, 270, 933-43.
- LEE, N. G., JEUNG, I. C., HEO, S. C., SONG, J., KIM, W., HWANG, B., KWON, M. G., KIM, Y. G., LEE, J., PARK, J. G., SHIN, M. G., CHO, Y. L., SON, M. Y., BAE, K. H., LEE, S. H., KIM, J. H. & MIN, J. K. 2020. Ischemia-induced Netrin-4 promotes neovascularization through endothelial progenitor cell activation via Unc-5 Netrin receptor B. *Faseb j*, 34, 1231-1246.
- LEFORT, C. T. & LEY, K. 2012. Neutrophil arrest by LFA-1 activation. *Front Immunol*, 3, 157.
- LEFORT, C. T., ROSSAINT, J., MOSER, M., PETRICH, B. G., ZARBOCK, A., MONKLEY, S. J., CRITCHLEY, D. R., GINSBERG, M. H., FÄSSLER, R. & LEY, K. 2012. Distinct roles for talin-1 and kindlin-3 in LFA-1 extension and affinity regulation. *Blood*, 119, 4275-82.
- LEJMI, E., BOURAS, I., CAMELO, S., ROUMIEUX, M., MINET, N., LERÉ-DÉAN, C., MERKULOVA-RAINON, T., AUTRET, G., VAYSSETTES, C., CLEMENT, O., PLOUËT, J. & LECONTE, L. 2014. Netrin-4 promotes mural cell adhesion and recruitment to endothelial cells. *Vasc Cell*, 6, 1.
- LEJMI, E., LECONTE, L., PÉDRON-MAZOYER, S., ROPERT, S., RAOUL, W., LAVALETTE, S., BOURAS, I., FERON, J. G., MAITRE-BOUBE, M., ASSAYAG, F., FEUMI, C., ALEMANY, M., JIE, T. X., MERKULOVA, T., POUPON, M. F., RUCHOUX, M. M., TOBELEM, G., SENNLAUB, F. & PLOUËT, J. 2008. Netrin-4

- inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of Unc5B. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 12491-6.
- LEWIS, H., KASZUBSKA, W., DELAMARTER, J. F. & WHELAN, J. 1994. Cooperativity between two NF-kappa B complexes, mediated by high-mobility-group protein I(Y), is essential for cytokine-induced expression of the E-selectin promoter. *Mol Cell Biol*, 14, 5701-9.
- LEY, K., LAUDANNA, C., CYBULSKY, M. I. & NOURSHARGH, S. 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*, 7, 678-89.
- LI, N., YANG, H., WANG, M., LÜ, S., ZHANG, Y. & LONG, M. 2018. Ligand-specific binding forces of LFA-1 and Mac-1 in neutrophil adhesion and crawling. *Mol Biol Cell*, 29, 408-418.
- LI, Y. N., PINZÓN-DUARTE, G., DATTILO, M., CLAUDEPIERRE, T., KOCH, M. & BRUNKEN, W. J. 2012. The expression and function of netrin-4 in murine ocular tissues. *Exp Eye Res*, 96, 24-35.
- LITT, M. R., JEREMY, R. W., WEISMAN, H. F., WINKELSTEIN, J. A. & BECKER, L. C. 1989. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. Evidence for neutrophil-mediated reperfusion injury. *Circulation*, 80, 1816-27.
- LIU, Y., O'CONNOR, M. B., MANDELL, K. J., ZEN, K., ULLRICH, A., BÜHRING, H. J. & PARKOS, C. A. 2004. Peptide-mediated inhibition of neutrophil transmigration by blocking CD47 interactions with signal regulatory protein alpha. *J Immunol*, 172, 2578-85.
- LIU, Z., MINER, J. J., YAGO, T., YAO, L., LUPU, F., XIA, L. & MCEVER, R. P. 2010. Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo. *J Exp Med*, 207, 2975-87.
- LUO, Y., TENG, X., ZHANG, L., CHEN, J., LIU, Z., CHEN, X., ZHAO, S., YANG, S., FENG, J. & YAN, X. 2019. CD146-HIF-1 α hypoxic reprogramming drives vascular remodeling and pulmonary arterial hypertension. *Nat Commun*, 10, 3551.
- LV, B., SONG, C., WU, L., ZHANG, Q., HOU, D., CHEN, P., YU, S., WANG, Z., CHU, Y., ZHANG, J., YANG, D. & LIU, J. 2015. Netrin-4 as a biomarker promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer. *Oncotarget*, 6, 9794-806.
- MA, Y., YABLUCHANSKIY, A. & LINDSEY, M. L. 2013. Neutrophil roles in left ventricular remodeling following myocardial infarction. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, 6, 11.
- MAEKAWA, Y., ANZAI, T., YOSHIKAWA, T., ASAKURA, Y., TAKAHASHI, T., ISHIKAWA, S., MITAMURA, H. & OGAWA, S. 2002. Prognostic significance of peripheral monocytosis after reperfused acute myocardial infarction: a possible role for left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 39, 241-6.
- MANNING, A. S. & HEARSE, D. J. 1984. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol*, 16, 497-518.
- MARCHESI, V. T. & FLOREY, H. W. 1960. Electron micrographic observations on the emigration of leucocytes. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci*, 45, 343-8.
- MCEVER, R. & CUMMINGS, R. 1997. Role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *The Journal of clinical investigation*, 100 11 Suppl, S97-103.
- MCEVER, R. P. 1994. Selectins. *Curr Opin Immunol*, 6, 75-84.
- MCEVER, R. P. 2015. Selectins: initiators of leukocyte adhesion and signalling at the vascular wall. *Cardiovasc Res*, 107, 331-9.

- MCEVER, R. P., MOORE, K. L. & CUMMINGS, R. D. 1995. Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. *J Biol Chem*, 270, 11025-8.
- MITSIS, A. & GRAGNANO, F. 2021. Myocardial Infarction with and without ST-segment Elevation: a Contemporary Reappraisal of Similarities and Differences. *Curr Cardiol Rev*, 17, e230421189013.
- MOORE, K. L. 1998. Structure and function of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Leuk Lymphoma*, 29, 1-15.
- MOORE, K. L., STULTS, N. L., DIAZ, S., SMITH, D. F., CUMMINGS, R. D., VARKI, A. & MCEVER, R. P. 1992. Identification of a specific glycoprotein ligand for P-selectin (CD62) on myeloid cells. *J Cell Biol*, 118, 445-56.
- MORIKIS, V. A. & SIMON, S. I. 2018. Neutrophil Mechanosignaling Promotes Integrin Engagement With Endothelial Cells and Motility Within Inflamed Vessels. *Front Immunol*, 9, 2774.
- MOSER, B., WOLF, M., WALZ, A. & LOETSCHER, P. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*, 25, 75-84.
- NAHRENDORF, M., SWIRSKI, F. K., AIKAWA, E., STANGENBERG, L., WURDINGER, T., FIGUEIREDO, J. L., LIBBY, P., WEISSLEDER, R. & PITTET, M. J. 2007. The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions. *J Exp Med*, 204, 3037-47.
- NAKASHIBA, T., IKEDA, T., NISHIMURA, S., TASHIRO, K., HONJO, T., CULOTTI, J. G. & ITOHARA, S. 2000. Netrin-G1: a novel glycosyl phosphatidylinositol-linked mammalian netrin that is functionally divergent from classical netrins. *J Neurosci*, 20, 6540-50.
- NAKASHIBA, T., NISHIMURA, S., IKEDA, T. & ITOHARA, S. 2002. Complementary expression and neurite outgrowth activity of netrin-G subfamily members. *Mech Dev*, 111, 47-60.
- NAOR, D., NEDVETZKI, S., GOLAN, I., MELNIK, L. & FAITELSON, Y. 2002. CD44 in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 39, 527-79.
- NISHIDA, N., XIE, C., SHIMAOKA, M., CHENG, Y., WALZ, T. & SPRINGER, T. A. 2006. Activation of leukocyte beta2 integrins by conversion from bent to extended conformations. *Immunity*, 25, 583-94.
- OSMANCIK, P. P., STROS, P. & HERMAN, D. 2008. In-hospital arrhythmias in patients with acute myocardial infarction - the relation to the reperfusion strategy and their prognostic impact. *Acute Card Care*, 10, 15-25.
- PAULSEN, G., EGNER, I., RAASTAD, T., REINHOLT, F., OWE, S., LAURITZEN, F., BRORSON, S. H. & KOSKINEN, S. 2013. Inflammatory markers CD11b, CD16, CD66b, CD68, myeloperoxidase and neutrophil elastase in eccentric exercised human skeletal muscles. *Histochem Cell Biol*, 139, 691-715.
- PHILLIPSON, M., HEIT, B., COLARUSSO, P., LIU, L., BALLANTYNE, C. M. & KUBES, P. 2006. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*, 203, 2569-75.
- PICK, R., BRECHTEFELD, D. & WALZOG, B. 2013. Intraluminal crawling versus interstitial neutrophil migration during inflammation. *Mol Immunol*, 55, 70-5.
- PICKER, L. J., WARNOCK, R. A., BURNS, A. R., DOERSCHUK, C. M., BERG, E. L. & BUTCHER, E. C. 1991. The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP-140. *Cell*, 66, 921-33.

- PINTO, D. S., KIRTANE, A. J., NALLAMOTHU, B. K., MURPHY, S. A., COHEN, D. J., LAHAM, R. J., CUTLIP, D. E., BATES, E. R., FREDERICK, P. D., MILLER, D. P., CARROZZA, J. P., JR., ANTMAN, E. M., CANNON, C. P. & GIBSON, C. M. 2006. Hospital delays in reperfusion for ST-elevation myocardial infarction: implications when selecting a reperfusion strategy. *Circulation*, 114, 2019-25.
- PLOW, E. F., HAAS, T. A., ZHANG, L., LOFTUS, J. & SMITH, J. W. 2000. Ligand binding to integrins. *J Biol Chem*, 275, 21785-8.
- QIN, S., YU, L., GAO, Y., ZHOU, R. & ZHANG, C. 2007. Characterization of the receptors for axon guidance factor netrin-4 and identification of the binding domains. *Mol Cell Neurosci*, 34, 243-50.
- RAJASEKHARAN, S. & KENNEDY, T. E. 2009. The netrin protein family. *Genome Biol*, 10, 239.
- REED, G. W., ROSSI, J. E. & CANNON, C. P. 2017. Acute myocardial infarction. *Lancet*, 389, 197-210.
- REUTEN, R., PATEL, T. R., MCDUGALL, M., RAMA, N., NIKODEMUS, D., GIBERT, B., DELCROS, J. G., PREIN, C., MEIER, M., METZGER, S., ZHOU, Z., KALTENBERG, J., MCKEE, K. K., BALD, T., TÜTING, T., ZIGRINO, P., DJONOV, V., BLOCH, W., CLAUSEN-SCHAUMANN, H., POSCHL, E., YURCHENCO, P. D., EHRBAR, M., MEHLEN, P., STETEFELD, J. & KOCH, M. 2016. Structural decoding of netrin-4 reveals a regulatory function towards mature basement membranes. *Nat Commun*, 7, 13515.
- RIDKER, P. M., EVERETT, B. M., THUREN, T., MACFADYEN, J. G., CHANG, W. H., BALLANTYNE, C., FONSECA, F., NICOLAU, J., KOENIG, W., ANKER, S. D., KASTELEIN, J. J. P., CORNEL, J. H., PAIS, P., PELLA, D., GENEST, J., CIFKOVA, R., LORENZATTI, A., FORSTER, T., KOBALAVA, Z., VIDA-SIMITI, L., FLATHER, M., SHIMOKAWA, H., OGAWA, H., DELLBORG, M., ROSSI, P. R. F., TROQUAY, R. P. T., LIBBY, P. & GLYNN, R. J. 2017. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease. *N Engl J Med*, 377, 1119-1131.
- ROMSON, J. L., HOOK, B. G., KUNKEL, S. L., ABRAMS, G. D., SCHORK, M. A. & LUCCHESI, B. R. 1983. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation*, 67, 1016-23.
- SABATINE, M. S., GIUGLIANO, R. P., KEECH, A. C., HONARPOUR, N., WIVIOTT, S. D., MURPHY, S. A., KUDER, J. F., WANG, H., LIU, T., WASSERMAN, S. M., SEVER, P. S. & PEDERSEN, T. R. 2017. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease. *N Engl J Med*, 376, 1713-1722.
- SAKO, D., CHANG, X. J., BARONE, K. M., VACHINO, G., WHITE, H. M., SHAW, G., VELDMAN, G. M., BEAN, K. M., AHERN, T. J., FURIE, B. & ET AL. 1993. Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell*, 75, 1179-86.
- SALCEDA, S. & CARO, J. 1997. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem*, 272, 22642-7.
- SCHAFF, U., MATTILA, P. E., SIMON, S. I. & WALCHECK, B. 2008. Neutrophil adhesion to E-selectin under shear promotes the redistribution and co-clustering of ADAM17 and its proteolytic substrate L-selectin. *J Leukoc Biol*, 83, 99-105.
- SCHNEIDERS, F. I., MAERTENS, B., BÖSE, K., LI, Y., BRUNKEN, W. J., PAULSSON, M., SMYTH, N. & KOCH, M. 2007. Binding of netrin-4 to laminin short arms regulates basement membrane assembly. *J Biol Chem*, 282, 23750-8.

- SCHWARTZ, G. G., STEG, P. G., SZAREK, M., BHATT, D. L., BITTNER, V. A., DIAZ, R., EDELBERG, J. M., GOODMAN, S. G., HANOTIN, C., HARRINGTON, R. A., JUKEMA, J. W., LECORPS, G., MAHAFFEY, K. W., MORYUSEF, A., PORDY, R., QUINTERO, K., ROE, M. T., SASIELA, W. J., TAMBY, J. F., TRICOCI, P., WHITE, H. D. & ZEIHAR, A. M. 2018. Alirocumab and Cardiovascular Outcomes after Acute Coronary Syndrome. *N Engl J Med*, 379, 2097-2107.
- SEMENZA, G. L. 1998. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 588-94.
- SENGELØV, H., KJELDSEN, L., DIAMOND, M. S., SPRINGER, T. A. & BORREGAARD, N. 1993. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (alpha m beta 2) in human neutrophils. *J Clin Invest*, 92, 1467-76.
- SERAFINI, T., KENNEDY, T. E., GALKO, M. J., MIRZAYAN, C., JESSELL, T. M. & TESSIER-LAVIGNE, M. 1994. The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. *Cell*, 78, 409-24.
- SHAW, S. K., BAMBA, P. S., PERKINS, B. N. & LUSCINSKAS, F. W. 2001. Real-time imaging of vascular endothelial-cadherin during leukocyte transmigration across endothelium. *J Immunol*, 167, 2323-30.
- SIMON, S. I. & GREEN, C. E. 2005. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng*, 7, 151-85.
- SONG, Y., ZHANG, C., ZHANG, J., JIAO, Z., DONG, N., WANG, G., WANG, Z. & WANG, L. 2019. Localized injection of miRNA-21-enriched extracellular vesicles effectively restores cardiac function after myocardial infarction. *Theranostics*, 9, 2346-2360.
- SPRINGER, T. A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346, 425-34.
- SPRINGER, T. A. 1994. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 76, 301-14.
- STADTMANN, A., GERMENA, G., BLOCK, H., BORAS, M., ROSSAINT, J., SUNDD, P., LEFORT, C., FISHER, C. I., BUSCHER, K., GELSCEFARTH, B., URZAINQUI, A., GERKE, V., LEY, K. & ZARBOCK, A. 2013. The PSGL-1-L-selectin signaling complex regulates neutrophil adhesion under flow. *J Exp Med*, 210, 2171-80.
- STADTMANN, A. & ZARBOCK, A. 2012. CXCR2: From Bench to Bedside. *Front Immunol*, 3, 263.
- STAUNTON, D. E., MARLIN, S. D., STRATOWA, C., DUSTIN, M. L. & SPRINGER, T. A. 1988. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*, 52, 925-33.
- STONE, K. D., PRUSSIN, C. & METCALFE, D. D. 2010. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 125, S73-80.
- SULLIVAN, D. P. & MULLER, W. A. 2014. Neutrophil and monocyte recruitment by PECAM, CD99, and other molecules via the LBRC. *Seminars in Immunopathology*, 36, 193-209.
- TAKEMOTO, M., HATTORI, Y., ZHAO, H., SATO, H., TAMADA, A., SASAKI, S., NAKAJIMA, K. & YAMAMOTO, N. 2011. Laminar and areal expression of unc5d and its role in cortical cell survival. *Cereb Cortex*, 21, 1925-34.
- THIELE, H., DESCH, S. & DE WAHA, S. 2017. [Acute myocardial infarction in patients with ST-segment elevation myocardial infarction : ESC guidelines 2017]. *Herz*, 42, 728-738.

- VESTWEBER, D. 2000. Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol*, 190, 281-91.
- VILLANUEVA, A. A., FALCÓN, P., ESPINOZA, N., R, L. S., MILLA, L. A., HERNANDEZ-SANMIGUEL, E., TORRES, V. A., SANCHEZ-GOMEZ, P. & PALMA, V. 2017. The Netrin-4/ Neogenin-1 axis promotes neuroblastoma cell survival and migration. *Oncotarget*, 8, 9767-9782.
- VILLANUEVA, A. A., PUVOGEL, S., LOIS, P., MUÑOZ-PALMA, E., RAMÍREZ ORELLANA, M., LUBIENIECKI, F., CASCO CLARO, F., GALLEGOS, I., GARCÍA-CASTRO, J., SANCHEZ-GOMEZ, P., TORRES, V. A. & PALMA, V. 2019. The Netrin-4/Laminin γ 1/Neogenin-1 complex mediates migration in SK-N-SH neuroblastoma cells. *Cell Adh Migr*, 13, 33-40.
- VIRANI, S. S., ALONSO, A., BENJAMIN, E. J., BITTENCOURT, M. S., CALLAWAY, C. W., CARSON, A. P., CHAMBERLAIN, A. M., CHANG, A. R., CHENG, S., DELLING, F. N., DJOUSSE, L., ELKIND, M. S. V., FERGUSON, J. F., FORNAGE, M., KHAN, S. S., KISSELA, B. M., KNUTSON, K. L., KWAN, T. W., LACKLAND, D. T., LEWIS, T. T., LICHTMAN, J. H., LONGENECKER, C. T., LOOP, M. S., LUTSEY, P. L., MARTIN, S. S., MATSUSHITA, K., MORAN, A. E., MUSSOLINO, M. E., PERAK, A. M., ROSAMOND, W. D., ROTH, G. A., SAMPSON, U. K. A., SATOU, G. M., SCHROEDER, E. B., SHAH, S. H., SHAY, C. M., SPARTANO, N. L., STOKES, A., TIRSCHWELL, D. L., VANWAGNER, L. B. & TSAO, C. W. 2020. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 141, e139-e596.
- VON SCHEIDT, M., ZHAO, Y., KURT, Z., PAN, C., ZENG, L., YANG, X., SCHUNKERT, H. & LUSIS, A. J. 2017. Applications and Limitations of Mouse Models for Understanding Human Atherosclerosis. *Cell Metab*, 25, 248-261.
- WANG, G. L., JIANG, B. H., RUE, E. A. & SEMENZA, G. L. 1995. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5510-4.
- WANG, H., COPELAND, N. G., GILBERT, D. J., JENKINS, N. A. & TESSIER-LAVIGNE, M. 1999. Netrin-3, a mouse homolog of human NTN2L, is highly expressed in sensory ganglia and shows differential binding to netrin receptors. *J Neurosci*, 19, 4938-47.
- WANG, J. H., SEXTON, D. M., REDMOND, H. P., WATSON, R. W., CROKE, D. T. & BOUCHIER-HAYES, D. 1997. Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is expressed on human neutrophils and is essential for neutrophil adherence and aggregation. *Shock*, 8, 357-61.
- WHITE, H. D. & CHEW, D. P. 2008. Acute myocardial infarction. *Lancet*, 372, 570-84.
- WHITE, H. D., NORRIS, R. M., BROWN, M. A., BRANDT, P. W., WHITLOCK, R. M. & WILD, C. J. 1987. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*, 76, 44-51.
- WHITLEY, M. Z., THANOS, D., READ, M. A., MANIATIS, T. & COLLINS, T. 1994. A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. *Mol Cell Biol*, 14, 6464-75.
- WILLIAMSON, J. R. & GRISHAM, J. W. 1960. Leucocytic emigration from inflamed capillaries. *Nature*, 188, 1203.
- WILSON, B. D., II, M., PARK, K. W., SULI, A., SORENSEN, L. K., LARRIEU-LAHARGUE, F., URNESS, L. D., SUH, W., ASAI, J., KOCK, G. A., THORNE, T., SILVER, M., THOMAS, K. R., CHIEN, C. B., LOSORDO, D. W. & LI, D. Y. 2006.

- Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis. *Science*, 313, 640-4.
- WOUTERS, O. J., MCKEE, M. & LUYTEN, J. 2020. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *Jama*, 323, 844-853.
- XIAO, Y., ZHAO, J., TUAZON, J. P., BORLONGAN, C. V. & YU, G. 2019. MicroRNA-133a and Myocardial Infarction. *Cell Transplant*, 28, 831-838.
- YAGO, T., ZHANG, N., ZHAO, L., ABRAMS, C. S. & MCEVER, R. P. 2018. Selectins and chemokines use shared and distinct signals to activate $\beta 2$ integrins in neutrophils. *Blood Adv*, 2, 731-744.
- YEBRA, M., DIAFERIA, G. R., MONTGOMERY, A. M., KAIDO, T., BRUNKEN, W. J., KOCH, M., HARDIMAN, G., CRISA, L. & CIRULLI, V. 2011. Endothelium-derived Netrin-4 supports pancreatic epithelial cell adhesion and differentiation through integrins $\alpha 2\beta 1$ and $\alpha 3\beta 1$. *PLoS One*, 6, e22750.
- YELLON, D. M. & HAUSENLOY, D. J. 2007. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 357, 1121-35.
- YIN, Y., SANES, J. R. & MINER, J. H. 2000. Identification and expression of mouse netrin-4. *Mech Dev*, 96, 115-9.
- YURCHENCO, P. D. & WADSWORTH, W. G. 2004. Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins. *Curr Opin Cell Biol*, 16, 572-9.
- ZARBOCK, A. & LEY, K. 2009. Neutrophil adhesion and activation under flow. *Microcirculation*, 16, 31-42.
- ZARBOCK, A., LEY, K., MCEVER, R. P. & HIDALGO, A. 2011. Leukocyte ligands for endothelial selectins: specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. *Blood*, 118, 6743-51.
- ZHANG, H., VREEKEN, D., LEUNING, D. G., BRUIKMAN, C. S., JUNAID, A., STAM, W., DE BRUIN, R. G., SOL, W., RABELINK, T. J., VAN DEN BERG, B. M., VAN ZONNEVELD, A. J. & VAN GILS, J. M. 2021. Netrin-4 expression by human endothelial cells inhibits endothelial inflammation and senescence. *Int J Biochem Cell Biol*, 134, 105960.
- ZHOU, F., ZHANG, F., ZARNITSYNA, V. I., DOUDY, L., YUAN, Z., LI, K., MCEVER, R. P., LU, H. & ZHU, C. 2021. The kinetics of E-selectin- and P-selectin-induced intermediate activation of integrin $\alpha L\beta 2$ on neutrophils. *J Cell Sci*, 134.
- ZHU, M. M., FEIT, A., CHADOW, H., ALAM, M., KWAN, T. & CLARK, L. T. 2001. Primary stent implantation compared with primary balloon angioplasty for acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Am J Cardiol*, 88, 297-301.
- ZÖLLNER, O., LENTER, M. C., BLANKS, J. E., BORGES, E., STEEGMAIER, M., ZERWES, H. G. & VESTWEBER, D. 1997. L-selectin from human, but not from mouse neutrophils binds directly to E-selectin. *J Cell Biol*, 136, 707-16.

7 Eigenständigkeitserklärung

Die Arbeit wurde im Forschungslabor des Universitätsklinikums für Anästhesiologie und Intensivmedizin in Tübingen unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. med. Peter Rosenberger durchgeführt.

Die Konzeption erfolgte durch Herrn Professor Dr. med. Peter Rosenberger und die Supervision im Forschungslabor erfolgte durch Herrn Dr. med. Marius Keller.

Sämtliche Versuche wurden nach Einarbeitung durch Herrn Dr. med. Marius Keller oder Frau Michaela Hoch-Gutbrod von mir eigenständig und in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. med. Marius Keller durchgeführt. Die Operationen der Mäuse sowie die Intravitalmikroskopie erfolgte durch Herrn Dr. med. Marius Keller, wobei ich assistierte. Herr Dr. med. Marius Keller stellte mir die Daten und Bilder für die Abbildungen 10, 11, 13, 14, 17, 19, 20 und 21 zur Verfügung.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie eigenständig durch mich.

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

Tübingen, den 20.02.2023

[Tobias Kohler]

8 Veröffentlichungen

Teile dieser Promotion wurden 2021 auf dem digitalen Kongress der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI) in Hamburg als ePoster vorgestellt: *Netrin-4 moduliert die Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und dem Endothel während hypoxischer Inflammation* (Tobias Kohler, Marius Keller, Michaela Hoch-Gutbrot, Michael Koeppen, Peter Rosenberger).

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen sehr herzlich danken, die auf vielfältige Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Peter Rosenberger für die Möglichkeit der experimentellen Forschung und die Überlassung des interessanten Themas dieser Arbeit sowie seine Betreuung und Begutachtung.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. med. Marius Keller, meinem Betreuer vor Ort, für die vertrauensvolle Zusammenarbeit und das Einführen in experimentelle Methoden sowie seine fortwährende Zuverlässigkeit und Erreichbarkeit. Mit seinem fundierten Wissen und seiner Freude am Erklären eröffnete er mir einen Zugang zur medizinischen Forschung. An die gemeinsame Arbeit mit ihm sowie seine Unterstützung und Begleitung werde ich mich immer gerne erinnern.

Weiterhin möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich im Labor unterstützt haben und nicht müde wurden, mir bei Problemen zur Seite zu stehen. Als Leiterin des Labors hatte Frau Professor Dr. med. Valbona Mirakaj stets ein offenes Ohr für meine Anliegen. Danken möchte ich auch den MTAs im Labor für ihre Hilfsbereitschaft und hierbei insbesondere Frau Michaela Hoch-Gutbrot, die mir als ständige Ansprechpartnerin ihre Zeit schenkte, ihr Wissen mit mir teilte und mich bei Versuchen unterstützte. Der Austausch mit und die Unterstützung von Frau Linyan Tang und Herrn Dr. rer. nat. David Köhler waren mir außerdem eine große Freude.

Ganz besonders möchte ich mich bei den anderen Promovierenden für die gemeinsame Zeit bedanken. Die erlebte Atmosphäre der gegenseitigen Wertschätzung und Unterstützung unter den Promovierenden war für mich von großer Bedeutung und trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Zuletzt möchte ich noch von Herzen meinen Freunden und meiner Familie für die ausdauernde Unterstützung in den letzten Jahren danken. Der Austausch mit ihnen über diese Arbeit war für mich eine große Bereicherung. Sie alle waren eine wertvolle Stütze für mich, die mich fortwährend voller Vertrauen in meinem Tun bestärkt haben.