

Aus der  
Universitätsklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

**Die Rolle des Neuronalen Guidance Proteins  
Semaphorin 4D und dessen Rezeptor Plexin B1 im  
akuten mesenterialen Ischämie-Reperfusionsschaden**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Günther, Sven Özde

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Rosenberger
2. Berichterstatter: Professor Dr. U. Ziemann

Tag der Disputation: 02.08.2024

## Inhaltsverzeichnis

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildungsverzeichnis .....                                                 | 3  |
| Abkürzungsverzeichnis .....                                                 | 4  |
| 1 Einleitung.....                                                           | 6  |
| 1.1 Grundlagen des akuten mesenterialen Ischämie-Reperfusionsschadens ..... | 6  |
| 1.1.1 Einteilung und Begriffsdefinition .....                               | 6  |
| 1.1.2 Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie .....                      | 7  |
| 1.1.3 Diagnostik.....                                                       | 12 |
| 1.1.4 Anamnese, Klinik und Symptomatik.....                                 | 12 |
| 1.1.5 Labor .....                                                           | 12 |
| 1.1.6 Bildgebung .....                                                      | 13 |
| 1.1.7 Therapie .....                                                        | 13 |
| 1.2 Familie der Semaphorine .....                                           | 14 |
| 1.2.1 Struktur von Semaphorin 4D .....                                      | 15 |
| 1.2.2 Bekannte Funktionen von Semaphorin 4D.....                            | 16 |
| 1.2.3 Rezeptoren von Semaphorin 4D .....                                    | 16 |
| 1.3 Familie der Plexine .....                                               | 17 |
| 1.3.1 Struktur von Plexin B1 .....                                          | 17 |
| 1.3.2 Bekannte Funktionen von PlexinB1 .....                                | 18 |
| 1.4 Wissenschaftliche Fragestellung .....                                   | 19 |
| 2 Material und Methoden.....                                                | 20 |
| 2.1 Material.....                                                           | 20 |
| 2.1.1 Allgemeine Materialien / Verbrauchsgegenstände.....                   | 20 |
| 2.1.2 In-vitro: Humane Zellkultur .....                                     | 22 |
| 2.1.3 In-vivo: Tierversuch .....                                            | 25 |
| 2.1.4 RNA-Isolation und RT-PCR.....                                         | 27 |
| 2.1.5 Proteinisolation und Western-Blot der Zelllinie Caco-2 .....          | 29 |
| 2.1.6 Immunfluoreszenz-Färbung und Mean Gray Value .....                    | 36 |
| 2.1.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....                                        | 38 |
| 2.1.8 Immunhistochemische Färbung der PMN .....                             | 38 |

|         |                                                                        |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.9   | Enzyme linked Immunosorbant Assay (ELISA).....                         | 39 |
| 2.1.10  | AST- und ALT-Messungen.....                                            | 40 |
| 2.1.11  | Software und statistische Auswertung .....                             | 40 |
| 2.2     | Methoden.....                                                          | 41 |
| 2.2.1   | In-vitro: Humane Zellkultur .....                                      | 41 |
| 2.2.1.1 | Kryokonservierung und Auftauen der Zellen.....                         | 41 |
| 2.2.1.2 | Kultivierung, Passage, Medienwechsel.....                              | 42 |
| 2.2.1.3 | Aussaat und Stimulation durch Hypoxie .....                            | 42 |
| 2.2.2   | In-vivo: Tierversuch .....                                             | 43 |
| 2.2.2.1 | Murines Modell des intestinalen Ischämie-Reperfusionsschadens.....     | 44 |
| 2.2.2.2 | Entnahme Serumproben .....                                             | 45 |
| 2.2.2.3 | Organentnahme für qRT-PCR .....                                        | 46 |
| 2.2.2.4 | Herstellung der Paraffinschnitte für Histologie .....                  | 46 |
| 2.2.3   | RNA-Isolation und RT-PCR.....                                          | 47 |
| 2.2.4   | Proteinisolation und Western-Blot der Zelllinie Caco-2 .....           | 53 |
| 2.2.4.1 | Proteinisolation.....                                                  | 53 |
| 2.2.4.2 | Western-Blot .....                                                     | 54 |
| 2.2.5   | Immunfluoreszenz-Färbung und Mean Gray Value .....                     | 56 |
| 2.2.5.1 | Vorbereitung der Paraffinschnitte für die Immunfluoreszenzfärbung..... | 56 |
| 2.2.5.2 | Vorbereitung der Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung ..             | 57 |
| 2.2.5.3 | Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung.....                          | 57 |
| 2.2.6   | Hämatoxylin – Eosin – Färbung .....                                    | 59 |
| 2.2.7   | Immunhistochemische Färbung der PMN .....                              | 60 |
| 2.2.8   | Enzyme linked Immunosorbant Assay (ELISA).....                         | 62 |
| 2.2.9   | AST- und ALT – Messungen .....                                         | 62 |
| 3       | Ergebnisse .....                                                       | 63 |
| 3.1     | Expression von Sema4D und PlxnB1 während Hypoxie in-vitro .....        | 63 |

|     |                                                                                                                              |     |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.2 | Expression von Sema4D und PlxnB1 nach intestinaler I/R in-vivo ....                                                          | 66  |
| 3.3 | Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Inflamationsreaktion nach intestinaler I/R.....                                       | 67  |
| 3.4 | Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die leukozytäre Infiltration ins Intestinum nach I/R.....                                 | 70  |
| 3.5 | Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf den intestinalen Schaden nach I/R .....                                                   | 76  |
| 3.6 | Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Darmbarriere während I/R                                                              | 84  |
| 3.7 | Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die intestinale, antimikrobielle Abwehr nach I/R .....                                    | 89  |
| 4   | Diskussion .....                                                                                                             | 92  |
| 4.1 | Expression von Sema4D und PlxnB1 in Hypoxie in vitro und I/R in-vivo.....                                                    | 92  |
| 4.2 | Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Inflamationsreaktion nach mesenterialer Ischämie-Reperfusion.....                     | 93  |
| 4.3 | Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die leukozytäre Infiltration ins Intestinum nach mesenterialer Ischämie-Reperfusion ..... | 95  |
| 4.4 | Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf den intestinalen Schaden nach intestinaler I/R.....                                       | 96  |
| 4.5 | Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Darmbarriere während I/R                                                              | 97  |
| 4.6 | Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die intestinale, antimikrobielle Abwehr nach I/R .....                                    | 98  |
| 5   | Zusammenfassung.....                                                                                                         | 99  |
| 6   | Literaturverzeichnis: .....                                                                                                  | 101 |
| 7   | Erklärung zum Eigenanteil .....                                                                                              | 110 |
| 8   | Veröffentlichungen und Kongressbeiträge .....                                                                                | 111 |
| 9   | Danksagung .....                                                                                                             | 112 |

## Abbildungsverzeichnis

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1: Expression von Sema4D und PlxnB1 in Caco-2-Zellen in Normoxie und Hypoxie.....                       | 64 |
| Abbildung 2: Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Zellen und Mean Gray Value-Analyse.....                           | 65 |
| Abbildung 3: Immunfluoreszenzfärbung und mRNA-Expression von Sema4D und PlxnB1 bei intestinaler I/R in-vivo ..... | 67 |
| Abbildung 4: Zytokine im Blut und im Darm von WT- und KO-Mäusen .....                                             | 70 |
| Abbildung 5: mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in WT- und KO-Mäusen. ....                                     | 72 |
| Abbildung 6: IHC-Färbung des Dünndarms.....                                                                       | 74 |
| Abbildung 7: Anzahl der PMN im Jejunum .....                                                                      | 75 |
| Abbildung 8: Hämatoxylin-Eosin Färbung von WT (BALB/c) Darmschnitten....                                          | 77 |
| Abbildung 9: Hämatoxylin-Eosin Färbung von Sema4d <sup>-/-</sup> Darmschnitten .....                              | 78 |
| Abbildung 10: Hämatxylin-Eosin Färbung von Sema4d <sup>-/-</sup> /Plxnb1 <sup>-/-</sup> Darmschnitten.....        | 79 |
| Abbildung 11: Hämatoxylin-Eosin Färbung von WT (C57BL/6) Darmschnitten                                            | 80 |
| Abbildung 12: Hämatoxylin-Eosin Färbung von Plxnb1 <sup>-/-</sup> Darmschnitten .....                             | 81 |
| Abbildung 13: Chiu/Park Scale der HE-Färbungen des Dünndarms .....                                                | 82 |
| Abbildung 14: ALT und AST im Serum von WT und KO-Mäusen .....                                                     | 84 |
| Abbildung 15: mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen der Darmbarriere in WT- und KO-Mäusen .....                  | 86 |
| Abbildung 16: mRNA-Expression von Tight Junction Molekülen der Darmbarriere in WT- und KO-Mäusen .....            | 88 |
| Abbildung 17: mRNA-Expression von Defensinen im Darm von WT- und KO-Mäusen .....                                  | 92 |

## Abkürzungsverzeichnis

|             |                                             |
|-------------|---------------------------------------------|
| A. dest.    | Aqua destilata                              |
| AK          | Antikörper                                  |
| ALT         | Alanin-Aminotransferase                     |
| ASA         | American Society of Anesthesiologists       |
| AST         | Aspartat-Aminotransferase                   |
| BSA         | Albumin from bovine serum                   |
| Caco-2      | Colorectal Adenocarcinoma Cells             |
| Cldn        | Claudin                                     |
| CRP         | C-Reactive Protein                          |
| DAPI        | Diamidino-Phenylindol                       |
| DEFA / DEFB | $\alpha$ -/ $\beta$ - Defensine             |
| EAE         | Experimental Autoimmune<br>Encephalitis     |
| FSGO        | Gelatin from cold water fish skin           |
| GAP         | GTPase Activating Protein                   |
| GEF         | Guanosine triphosphate Exchange<br>Factor   |
| HE          | Hämatoxylin-Eosin                           |
| HIF-1       | Hypoxia Inducible Factor – 1                |
| HUVEC       | Human Umbilical Venous Endothelial<br>Cells |
| I/R         | Ischämie-Reperfusion                        |
| ICAM-1      | Intercellular Adhesion Molecule – 1         |
| IL          | Interleukin                                 |
| iNOS        | Inducible Nitric Oxide Synthase             |
| JAM         | Junction Adhesion Molecule                  |
| kDA         | Kilo Dalton                                 |
| KG          | Körpergewicht                               |
| KO          | Knock-Out                                   |
| mRNA        | Messenger Ribonucleic Acid                  |

|              |                                                           |
|--------------|-----------------------------------------------------------|
| NaCl         | Natriumchlorid                                            |
| NADPH        | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat                      |
| NET          | Neutrophil Extracellular Traps                            |
| NfW          | Nuklease-freies Wasser                                    |
| NGP          | Neuronal Guidance Protein                                 |
| NOMI         | Non-Occlusive Mesenteric Ischemia                         |
| Ocln         | Occludin                                                  |
| PAE          | Porcine Aortic Endothelial Cells                          |
| PAMP         | Pathogen Associated Molecular Patterns                    |
| PBS          | Phosphate Buffered Saline                                 |
| PDZ          | PDZ-Domäne,<br>Proteininteraktionsdomäne                  |
| PMN          | Polymorph Nuclear Leukocyte                               |
| PVDF         | Polyvinylidenfluorid                                      |
| qRT-PCR      | Quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction          |
| ROS          | Reactive Oxygen Species                                   |
| SDS          | Sodium dodecyl sulfate                                    |
| SEM          | Standard Error of Mean                                    |
| SMA          | Superior Mesenteric Artery = Arteria Mesenterica Superior |
| TBST         | Tris-buffered saline with Tween 20                        |
| TGS          | Tris-glycine-Sodium dedecyl sulfate                       |
| TJ           | Tight Junction                                            |
| TNF $\alpha$ | Tumor Necrosis Factor $\alpha$                            |
| UpM          | Umdrehungen pro Minute                                    |
| VCAM-1       | Vascular Cell Adhesion Molecule – 1                       |
| VEGF         | Vascular Endothelial Growth Factor                        |
| WT           | Wildtyp                                                   |
| ZO           | Zonula Occludens                                          |

# 1 Einleitung

## 1.1 Grundlagen des akuten mesenterialen Ischämie-Reperfusionsschadens

### 1.1.1 Einteilung und Begriffsdefinition

Die mesenteriale Ischämie lässt sich anhand verschiedener Kriterien und Kategorien einteilen. Es werden drei Entitäten unterschieden: die akute mesenteriale Ischämie (1), die chronische mesenteriale Ischämie (2) und die ischämische Kolitis (3) [1]. Der akute mesenteriale Gefäßverschluss verursacht eine signifikante Reduktion des Blutflusses mit der rapiden Entwicklung eines Infarktareals im Darm [2]. Daher liegt das Augenmerk in dieser Arbeit auf der akuten mesenterialen Ischämie. Diese wird klinisch, pathologisch und histologisch unterteilt in [3]:

- 1.) Akuter mesenterialer Embolus
- 2.) Akuter mesenterialer Thrombus
- 3.) Nonokklusive mesenteriale Ischämie (NOMI)
- 4.) Venöse mesenteriale Thrombose

Embolische Verschlüsse sind mit 50% die häufigste Ursache der akuten mesenterialen Ischämie, gefolgt von arteriellen Thrombosen (25%), NOMI (20%), und venösen Thrombosen mit weniger als 10% [4]. In seltenen Fällen (ca. 2%) kann eine akute mesenteriale Ischämie aus einer Dissektion der Arteria Mesenterica Superior (SMA), sowie verschiedenen Vaskulitiden (Lupus erythematodes, Thrombangiitis obliterans, Takayasu arteriitis), embolisierenden Aneurysmen, oder durch Volvulus und Invagination des Darms, Ileus oder externer Kompression durch Tumoren oder Aneurysmen entstehen [3]. Einem generell erhöhten Risiko für eine NOMI sind Patienten ausgesetzt, die an einer oder mehrerer der folgenden Erkrankungen leiden: Herzinsuffizienz, kardiale Arrhythmien, Atherosklerose, Hypovolämie und Hypotension, Sepsis, tiefe Beinvenenthrombose oder Patienten, die vor kurzem einer Operation ausgesetzt waren [1, 5]. Des weiteren führen kardiovaskuläre Operationen wie zum Beispiel die thorakoabdominale Aortenaneurysma-Reparatur oder kardiopulmonale

Bypass-Operationen gelegentlich zu ischämischen Schäden im Darm [6, 7]. Auch bei einer Transplantation des Dünndarms unterliegt dieser unumgänglich einem Ischämie-Reperfusionszustand [8]. Somit spielt die Pathologie der NOMI vor allem für Patienten auf chirurgischen bzw. anästhesiologischen Intensivstationen eine übergeordnete Rolle [9].

Das erste Mal zeigten Parks und Granger im Jahre 1986, dass der Schaden im betroffenen Gewebe durch Reperfusion deutlich stärker sein kann als durch alleinige Ischämie. In ihrer Untersuchung stellten sie fest, dass der Dünndarm nach drei Stunden Ischämie und einer Stunde Reperfusion deutlich mehr Schaden aufweist, als nach vier Stunden alleiniger Ischämie [10]. In der Vergangenheit haben eine große Anzahl an Experimenten und Untersuchungen gezeigt, dass die Reoxygenierung des Gewebes die Entstehung von zytotoxischen Oxidantien aus molekularem Sauerstoff unterstützt, welche wiederum Leukozyten aktivieren und deren Adhäsion am Endothel von Venolen und damit deren Migration fördern [11-13]. Dadurch kommt es nach der eigentlichen Hypoxie/Ischämie im Gewebe zu einem sekundären Schaden. Man spricht somit vom Ischämie-Reperfusionsschaden (I/R).

Die akute mesenteriale Ischämie ist ein dringlicher, lebensbedrohlicher Zustand mit einer hohen Sterblichkeitsrate von bis zu 70% [14-16]. Die Inzidenz ist in den letzten Jahren gestiegen [5, 17]. Kommen bei Patienten mit fortgeschrittener Ischämie den Krankheitsverlauf erschwerende Begleiterscheinungen wie Peritonitis, septischer Schock und schwere metabolische Azidose hinzu, steigt die Mortalitätsrate auf bis zu 90% an [3].

### **1.1.2 Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie**

Der gesamte Darm erhält ca. 20% des Herzzeitvolumens in Ruhe und 35% im postprandialen Zustand und ist somit eines der meistdurchbluteten Organe im menschlichen Körper [18, 19]. Dabei gehen ca. 70% des mesenterialen Blutflusses an die Mukosa und Submukosa, die restlichen 30% sind ausreichend zur Durchblutung der Muskularis und Serosa.

Das Duodenum wird hauptsächlich über die A. pancreaticoduodenalis aus dem Truncus coeliacus, und das Jejunum und Ileum werden über ein Dutzend Äste

der SMA versorgt. Das proximale Colon, bestehend aus Colon ascendens und transversum, wird auch über drei Äste der SMA durchblutet, wohingegen der distale Teil, bestehend aus Colon descendens und sigmoideum, von der A. mesenterica inferior versorgt wird [20].

In 85% der Fälle von mesenterialer Ischämie ist die SMA betroffen [3], darunter am häufigsten der Abgang von der Aorta abdominalis [20, 21]. All dies zusammengenommen betont die herausragende Stellung der SMA als wichtigstes viszerale Gefäß [3, 22]. Embolien der A. mesenterica inferior sind hingegen selten, da das Gefäß einen geringeren Diameter aufweist als die SMA oder der Truncus coeliacus [23].

Die Durchblutung des Darmgewebes erfolgt über arterielle Gefäße, die die Serosa an der Grenze des Mesenteriums penetrieren. In der Darmwand gehen von diesen Gefäßen wiederum Arterien ab, die die Muscularis externa durchbrechen, um in der Submukosa einen Gefäßplexus zu bilden. Von diesem bilden abgehende Arteriolen ein Kapillarnetz und durchbluten die Krypten in der Mukosa. Weitere abgehende Arteriolen ziehen zu den Spitzen der Villi, wo sie einen netzartigen kapillären Plexus bilden, der von ein bis zwei Venolen pro Villi drainiert wird. Die parallele Anordnung der Arteriolen und Venolen in den Villi erzeugt einen Gegenstrom im Blutfluss, bedingt dadurch, dass die zentrale Arteriole und die abfließenden Venolen gerade einmal 15-20 µm voneinander entfernt sind. Dieser Gegenstrom sorgt für einen komplexen Shuntmechanismus, da ein gewisser Anteil des arteriellen Sauerstoffs in das sauerstoffärmere venöse Blut an der Basis der Zotte diffundiert, ohne die Spitze der Villi zu erreichen. Vor allem bei Hypotension beziehungsweise reduzierter intestinaler Durchblutung nimmt die Blutflussgeschwindigkeit in der Arteriole ab, was eine verlängerte Shuntzeit und eine stärkere Sauerstoffarmut in der Spitze der Darmzotte hervorruft [24, 25]. Somit trägt der Gegenstrom in den Villi zur Aggravation der mesenterialen Ischämie bei. Außerdem sind die Zellen an der Spitze der Villi anfälliger für Schaden, da sie deutlich stärker mechanischen Kräften ausgesetzt sind als die Zellen an der Basis der Villi beziehungsweise in den Krypten (sog. „Tear and Wear“) [26].

Mittels in-vivo Mikroskopie konnte gezeigt werden, dass sich nach kurzer Ischämiedauer die NADPH-Konzentration und der intrazelluläre pH in den Zellen der Zottenspitze schnell wieder normalisieren, wohingegen nach längerer Ischämiedauer gerade einmal 33% der Epithelzellen lebensfähig bleiben. Die restlichen Zellen verlieren ihre Membranintegrität und präsentieren Apoptosezeichen, wie die Blasenbildung der Zellmembran [26]. Diese Effekte werden durch ein längeres Reperfusionsintervall sogar noch verstärkt. Sie zeigen also höhere Werte für NADPH und pH auf, die Blasenbildung ist noch intensiver ausgeprägt, und letztendlich werden die Zellen von den Zottenspitzen abgetragen. Somit trägt der Verlust der Erholungsfähigkeit der normalen Zellstruktur zu einer erhöhten intestinalen Permeabilität bei, wobei sowohl Epithelzellen als auch Endothelzellen betroffen sind. Die endotheliale Dysfunktion führt zur Extravasation von Molekülen mit hohem spezifischem Gewicht, was zu interstitiellen Ödemen führt [27, 28].

Die Situation wird durch Mediatoren und Metabolite die im ischämischen Gewebe entstehen und während der Reperfusion in andere Organsysteme, wie Leber und Lunge, transportiert werden und dort zusätzlichen Schaden verursachen, noch verstärkt [29]. Als Marker für den durch mesenteriale I/R entstandenen Leberschaden können zum Beispiel die Aminotransferasen ALT und AST gemessen werden [30].

Neben dem Schaden der Zellen an den Zottenspitzen entsteht durch I/R im Dünndarm zusätzlich ein Apoptosesignal für die Zellen der Krypten, im Speziellen der Paneth-Zellen [31]. Diese sind unverzichtbar für die Verteidigung des Darms gegen mikrobielle Eindringlinge, da sie mehrere antimikrobielle Peptide sezernieren [32]. Zu diesen zählt die Gruppe der Defensine, die durch nicht-enzymatische Mechanismen die Zellwände von Bakterien angreifen und zu einer osmotischen Lyse der Zellen führen [33]. Somit ist die Apoptose von Paneth-Zellen mit einer erhöhten bakteriellen Translokation und intestinaler Entzündung assoziiert [31, 34]. Darüber hinaus scheint deren Abwesenheit auch Reparaturfunktionen des Gewebes negativ zu beeinflussen, da keine Faktoren für das Überleben der Stammzellen in den Krypten mehr gebildet werden können [35].

Das Versagen der kapillären Perfusion ist unvermeidlich assoziiert mit Gewebshypoxie. Die Aktivierung des hypoxia-inducible factors 1 (HIF-1), der Schlüsselspieler in der Regulation der pathophysiologischen Antwort auf Hypoxie, spielt eine frühe und wichtige Rolle bei der Entstehung des I/R-Schadens. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des HIF-1 $\alpha$  Gens in Mäusen zu einer verringerten intestinalen Permeabilität, Translokation der Bakterien in den Blutstrom und Caspase-3-Aktivierung führt. Außerdem reduziert der Verlust von HIF-1 $\alpha$  die Konzentration der proinflammatorischen Zytokine TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  in der Mukosa des Ileums [36].

Der mesenteriale I/R-Schaden wird neben dem Verlust einer durchgängigen Perfusion auch durch die Rekrutierung und Wirkung von Leukozyten, die in einem mehrstufigen Prozess abläuft, verursacht. Der Ablauf der Leukozyten-Rekrutierung wird initiiert durch ein adhärentes Rollen, gefolgt von einer inflammatorischen Aktivierung und festen Adhäsion der Leukozyten am Endothel der postkapillären Venolen [24]. Außerdem wird die Inflammation und Aktivierung des Immunsystems durch weitere Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie zum Beispiel TNF $\alpha$ , IL-1 und IL-6, aufrechterhalten [37-41]. Die Neutrophilen Granulozyten (PMNs) gehören zu den am frühesten zum Ort der Infektion und/oder Inflammation rekrutierten Zellen. Sie sind ausschlaggebend für die Entstehung des I/R-Schadens. Die Aktivierung und Rekrutierung von PMNs stellt nach I/R einen Verteidigungsmechanismus gegen intestinale Pathogene dar. Zirkulierende Neutrophile infiltrieren dabei schnell das geschädigte Gewebe in unmittelbarer Umgebung des verletzten Epithels [42], und phagozytieren Pathogene und entstandene Zelltrümmer im Ischämiebereich. Zusätzlich produzieren sie weitere freie Radikale, was die Infektion kontrollieren und das geschädigte Gewebe steril halten soll [43]. Somit können PMNs auch auf verschiedene Arten dazu beitragen das Gewebe zu schädigen, beispielsweise über die Sekretion proteolytischer Enzyme aus zytoplasmatischer Granula, die Bildung von Neutrophile Extracellular Traps (NETs) und durch die Störung der Mikrozirkulation [44-48].

Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1), ein Mitglied der Immunoglobulin-Familie, vermittelt eine kräftige Adhäsion und Emigration aktivierter Leukozyten in postkapillären Venolen [49]. ICAM-1 wird auf Leukozyten, Fibroblasten, Epithel- und Endothelzellen in den meisten Kapillarregionen exprimiert [50]. Sun et al. konnten im Jahr 2001 zeigen, dass eine Behandlung mit einem monoklonalen Antikörper (mAb) gegen ICAM-1 die Serum Level der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und IL-6 reduzieren, die Integrität der Darmbarriere stärken, sowie die Rekrutierung von Leukozyten ins ischämische Gewebe verringern kann [51]. Auch Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) spielt eine wichtige Rolle bei der Leukozyten-Endothel-Adhäsion und Emigration, vor allem bei Ischämie-Reperfusion [52, 53]. ICAM-1 und VCAM-1 sind somit von zentraler Bedeutung bei der Adhäsion von Neutrophilen Granulozyten an das Endothel [54].

Ein weiteres wichtiges Zytokin ist IL-3, welches von mehreren Zelltypen, wie zum Beispiel aktivierten T-Zellen und Mastzellen produziert wird [55-58]. IL-3 wirkt als Verstärker der Antigenpräsentation für T-Zell-abhängige Immunantworten, erweitert die Toxizität und Adhäsion von Makrophagen und fördert die Funktion von Basophilen und Eosinophilen Granulozyten und Mastzellen [59-63]. Somit spielt es auch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Inflammation nach Ischämie.

Verschiedene Studien an Tieren und Menschen haben zeigen können, dass prolongierte Ischämie, gefolgt von Reperfusion im Darm, die parazelluläre Barriere zerstört und somit die Translokation bakterieller Produkte, zum Beispiel pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), sowie inflammatorischer Moleküle und Endotoxine, ins Gewebe und Blut fördert [42, 64]. Einen Hauptfaktor der physikalischen intestinalen Barriere bildet die Gruppe der Tight Junctions (TJs). TJs werden aus dem Zusammenschluss mehrerer Proteine gebildet, die in Epithelzellen apikal an der lateralen Membran lokalisiert sind. Dazu zählen Claudin [65], Occludin [66], Junctional Adhesion Molecule (JAM) [67] und Zonula Occludens (ZO) Proteine [68]. Die Interaktionen der extrazellulären Anteile dieser Transmembranproteine, zwischen jeweils zwei

benachbarten Epithelzellen gelegen, regulieren die parazelluläre Passage von Zellen und Molekülen und somit auch die Barrierefunktion.

### **1.1.3 Diagnostik**

Die intestinale Ischämie bleibt auch heutzutage eine diagnostische Herausforderung für Ärzte, da die präsentierten Symptome zu Beginn nicht charakteristisch sind und eine genaue Diagnosestellung vor Auftreten nekrotischer Areale weiterhin schwierig ist [69]. Eine erfolgreiche, schonende und daher für den Arzt und Patienten befriedigende Therapie ist nur in den frühen Phasen (0-12h) der Ischämie möglich. Es ist daher wichtig, unter Einbezug der Anamnese und des vollständigen klinischen Bildes, schon bei erstem Verdacht auf akute mesenteriale Ischämie die Diagnostik dahingehend einzuleiten [3].

### **1.1.4 Anamnese, Klinik und Symptomatik**

Klinisch nimmt der ischämische Zustand einen triphasischen Verlauf mit typischen, jedoch unspezifischen Symptomen [3]:

- 1.) Initiale Phase (0-6h): intensiver, akuter Bauchschmerz, begleitend Durchfälle und Schock
- 2.) Stille Phase (7-12h): stumpfer Bauchschmerz, paralytischer Ileus, rapide Verschlechterung des Allgemeinzustands
- 3.) Finale Phase (12-24h): manifester Ileus, bakterielle Peritonitis mit Sepsis, Beginn des Multiorganversagens

### **1.1.5 Labor**

Es existieren bis dato keine spezifischen Laborparameter, die auf intestinale Ischämie hindeuten. Jedoch sind eine Erhöhung des Laktats, des CRP und der Leukozyten, sowie eine metabolische Azidose in der Blutgasanalyse wegweisend [3]. Die D-Dimere sind die sensitivsten frühen Marker die auf eine intestinale Ischämie hinweisen, allerdings sind auch sie nicht hochspezifisch [70]. Somit ist bisher kein Plasmamarker genau genug, um in der akuten Phase als eine diagnostische Hilfe zu fungieren.

### **1.1.6 Bildgebung**

In 20-60% der Fälle zeigt eine abdominale Röntgen-Übersichtsaufnahme keine spezifischen Befunde. Sie ist jedoch gerechtfertigt, um intraabdominelle freie Luft und somit eine Perforation nachzuweisen [3]. Deutlich sensitiver und spezifischer ist die kontrastmittelgestützte hochauflösende CT-Angiographie [71, 72]. Sie bildet somit den Goldstandard in der Diagnostik, da mögliche Spätfolgen der akuten mesenterialen Ischämie wie intestinale Lufteinlagerungen, sowie Luft in der Pfortader und Ödeme der Darmwand und Nekrosen, sowie ein eindeutiger Gefäßverschluss der darmversorgenden Gefäße definitiv dargestellt werden können [73].

Die intraarterielle Angiographie mit digitaler Subtraktionsangiographie ist heutzutage kaum noch relevant, jedoch ermöglicht sie bei Durchführung sowohl die Bestätigung der Diagnose als auch einen möglichen therapeutischen Zugang mittels intraarterieller Medikamentenzufuhr (z.B. Prostaglandine zur Gefäßerweiterung vor allem im Rahmen des NOMI, oder thrombolytische Medikamente) [3].

Die Duplex-Sonographie besitzt in den Händen eines erfahrenen Sonographen in Bezug auf die Betrachtung der proximalen Gefäßsegmente auch eine hohe Spezifität zur Detektion einer akuten embolischen oder thrombotisch mesenterialen Ischämie, ist jedoch im Vergleich zur Angiographie oder dem CT weniger sensitiv [74]. Außerdem ist die Duplexsonographie nicht geeignet zur Diagnose eines NOMI, was sie zum Diagnostikum der zweiten Wahl macht [3].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nur das Zusammenspiel aus Anamnese, klinischer Symptomatik, Bildgebung und Laborparameter eine sichere Diagnose erlaubt. Aufgrund des zeitlichen Aufwands der Datenerhebung und schlechten Outcomes der akuten mesenterialen Ischämie ist das Zeitfenster für eine optimale Behandlung dabei sehr eng.

### **1.1.7 Therapie**

Die umgehende Wiederherstellung des Blutflusses ist von höchster Priorität. Eine Heparinisierung sollte aufgrund des fibrinolytischen Effekts sofort gestartet werden. Auch die Volumengabe mit kristalloiden Infusionslösungen über einen

zentralvenösen Katheter ist aufgrund des intravasalen Flüssigkeitsverlustes mit Volumenverschiebung in das Darmgewebe von höchster Priorität. Gleichzeitig sollte schon beim geäußerten Verdacht auf eine akute mesenteriale Ischämie eine kalkulierte antibiotische Therapie mit einem Cephalosporin der 3. Generation und Metronidazol begonnen werden, um der erwarteten bakteriellen Translokation mit gramnegativen und grampositiven Erregern aus dem Darm in den Blutkreislauf entgegenzuwirken. Außerdem sind die Patienten suffizient analgetisch abzudecken und bis auf weiteres sollte die Behandlung auf einer Intensivstation fortgeführt werden [75].

Endovaskuläre Therapieoptionen bestehen insbesondere in früher Krankheitsphase, da offenchirurgische Eingriffe mit einem größeren Trauma für den Organismus verbunden sind. Dies gilt vor allem für bereits vorerkrankte Patienten mit vorherigen Operationen im Bauchraum, vermehrten Komorbiditäten (ASA>3) oder NOMI als Verdacht [3]. Bei einem Embolus/Thrombus kann katheterunterstützt eine Lyse-Therapie gefahren werden [76] und bei Spasmen der mesenterialen Gefäße können kontrolliert und explizit in diese Gefäße vasodilatatorisch-wirkende Prostaglandine verabreicht werden [77, 78]. Auch eine intraarterielle Papaverin-Injektion über 24h bis zu fünf Tagen ist möglich [79]. Zusätzlich zu einer lokalen thrombolytischen Therapie kann auch eine Angioplastie beziehungsweise eine Stent-Implantation ins stenosierte Gefäß durchgeführt werden [80, 81]. Selbst bei erfolgreicher Rekanalisierung des Gefäßes ist eine regelmäßige Evaluierung des Patienten unabdingbar, da eine spätere abdominelle laparotomische Exploration mit Entfernung nekrotischer Darmanteile notwendig sein kann [3]. Eine direkte Laparotomie und Exploration ist nur angezeigt bei Präsentation von peritonitischen Symptomen [82].

Es besteht bis dato keine medikamentöse Therapie, um den Ischämie-Reperfusionsschaden schon in der Frühphase vor endgültiger Reetablierung eines Blutflusses zu mildern beziehungsweise aufzuheben.

## **1.2 Familie der Semaphorine**

Die Semaphorine werden der Gruppe der Neuronalen Guidance Proteine (NGP) zugeordnet. Ursprünglich wurden diese erstmalig im Jahre 1993 durch Kolodkin

et al. in ihrer Rolle in der embryonalen Entwicklung des Nervensystems beschrieben, vor allem in Bezug auf die Richtungsweisung des Axonwachstums [83]. Jedoch bewiesen Hall et al. im Jahre 1996 erstmalig, dass Sema4D auch im Immunsystem als Transmembranprotein auf B- und T-Lymphozyten exprimiert wird [84, 85]. Dadurch konnten Wu et al. im Jahre 2001 zeigen, dass NGPs generell neben ihrer Rolle im Nervensystem auch immunomodulatorische Funktionen ausüben können [86].

Mehr als zwanzig verschiedene Proteine werden inzwischen der Semaphorin-Familie zugeordnet, die in verschiedenen Spezies von Viren bis zum Menschen entdeckt wurden. Sie werden in acht verschiedene Untergruppen eingeteilt. Das Vorkommen der Semaphorine der Klassen 1 und 2 ist ausschließlich auf die Wirbellosen beschränkt während die Klassen 3-7 in Vertebraten zu finden sind. Die letzte Klasse wird von einigen DNA-Viren kodiert [87]. Allen ist die Präsenz einer spezifischen, ungefähr 500 Aminosäuren enthaltenden „Sema-Domäne“ am N-terminalen Ende des Proteins gemein [88].

Sema4D wird sowohl in hämatopoetischen als auch nicht-hämatopoetischen Geweben exprimiert. Eine starke Expression konnte im Skelettmuskel, in der Milz und im Thymus, sowie in Lymphozyten des peripheren Blutes festgestellt werden. In moderaten Mengen wurde es in Gehirn, Nieren, Dünndarm, Prostata, Herz, Pankreas, Lunge und Plazenta gefunden. Nicht nachgewiesen wurde es im Kolon und in der Leber [84, 89].

### **1.2.1 Struktur von Semaphorin 4D**

Sema4D gehört zur Proteinfamilie der Semaphorine und ist ein 150 kDa schweres Transmembranprotein der Klasse 4 [89, 90]. Es enthält eine N-terminale Signalsequenz, gefolgt von der „Sema-Domäne“, sowie einer IgG-ähnlichen Domäne, einem Lysin-reichen Abschnitt, einer hydrophobischen Transmembranregion und einem zytoplasmatischen Schwanz [84, 91]. Sowohl humanes als auch murines Sema4D kann proteolytisch von der Membran als 120 kDa große lösliche Form abgespalten werden [92].

### **1.2.2 Bekannte Funktionen von Semaphorin 4D**

Neben der bereits genannten Rolle der Semaphorine in der Entwicklung des Nervensystems besitzt Sema4D auch einige bereits erforschte Funktionen im Immunsystem. So spielt Sema4D eine wichtige Rolle in der Aktivierung von T-Zellen durch dendritische Zellen. Auch die T-Zell-Differenzierung hin zu Effektorzellen scheint Sema4D-abhängig zu sein [93]. Außerdem trägt die Interaktion von Sema4D und seinem Rezeptor CD72 auf B-Zellen zur verstärkten Stimulation dieser und somit zur humoralen und antikörperbedingten Immunantwort bei [94-96]. Des Weiteren ist abgespaltenes Sema4D in der Lage, PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) zur TNF $\alpha$  und IL-6 Produktion anzuregen [97]. Für lösliches Sema4D konnte auch gezeigt werden, dass es als chemotaktischer Botenstoff fungiert, indem es die Migration von Endothelzellen regulieren und die Migration von Monozyten und unreifen dendritischen Zellen inhibieren kann [98-101]. Die Bindung von Sema4D an PlxnB1 und PlxnB2 vermittelt außerdem die Adhärenz von Monozyten auf Endothelzellen [102]. Insgesamt ist dabei die ausgeübte Funktion von Sema4D abhängig vom biologischen Kontext und den verschiedenen beteiligten Zelltypen. Darüber hinaus sind Sema4D-defiziente Mäuse vor der Entwicklung einer Glomerulonephritis geschützt [103]. Bei einer Nephritis aktiviert Sema4D die Rekrutierung von Makrophagen und anderen inflammatorischen Zellen durch den PlxnB1 Rezeptor [104]. Das unterstreicht die außerordentliche Rolle des Proteins in der Immunpathologie.

### **1.2.3 Rezeptoren von Semaphorin 4D**

Sema4D agiert über verschiedene Arten von Rezeptoren: den klassischen, hoch-affinen Rezeptoren der Plexin-Familie, wie PlxnB1 oder PlxnB2 und dem niedrig-affinen Rezeptor CD72 [101, 105]. Die Plexin-abhängige Aktivität von Sema4D wird generell mit einer Reorganisation des Zytoskeletts, Zellmigration und der Regulation des gerichteten Axonwachstums assoziiert [106-108]. Dagegen steht die Aktivität über CD72 im Zusammenhang mit Aktivierung von B-Lymphozyten, Reifung von Dendritischen Zellen und Priming von T-Lymphozyten [93, 94]. Zudem muss festgehalten werden, dass die Präsenz von Plexin-Rezeptoren auch innerhalb des Immunsystems gezeigt werden konnte [101, 109].

Die Funktionen von Sema4D sind allerdings nicht allein auf seine Rezeptoren beschränkt. Eine zunehmende Anzahl an Indizien weist darauf hin, dass Sema4D selbst als Zelloberflächenrezeptor Signale von außerhalb in die Zelle vermitteln kann. Im Jahre 2012 zeigten Witherden et al., dass Sema4D auf der Zellmembran von T-Lymphozyten über die Aktivierung von PlxnB2 auf Keratinozyten die Aktivierung der T-Lymphozyten im Sinne von morphologischen Veränderungen des Zytoskeletts initiieren kann [110].

### **1.3 Familie der Plexine**

Plexine sind eine Familie großer transmembranärer Glykoproteine (ca. 200kDa) und für Semaphorine die Hauptrezeptoren auf der Zelloberfläche. Wie auch die Semaphorine können sie löslich oder membrangebunden vorliegen [105]. Bei den Wirbeltieren sind 9 verschiedene Plexine bekannt, die in die Gruppen A-D eingeteilt werden [105]. Der bisher einzig bekannte Ligand von PlxnB1 ist Sema4D.

#### **1.3.1 Struktur von Plexin B1**

Der extrazelluläre Abschnitt enthält eine Sema-Domäne, gefolgt von drei Plexin-Semaphorin-Integrin (PSI) -Domänen und drei Immunglobulin, Plexin und Transkriptionsfaktor (IPT) -Domänen [111-113]. Die Sema-Domäne im Plexin hat neben seiner Funktion als Ligandenbindungsstelle eine autoinhibitorische Funktion um Aktivierungen einzuschränken [114]. Somit wird die Sema-Domäne als regulatorisches Element der Plexin- und Semaphorinproteine verstanden und trägt zu einer geregelten und gezielten Aktivierung bei. Speziell PlxnB1 und PlxnB2 enthalten eine sogenannte Convertase-Cleavage Stelle [105, 111, 115], können abgespalten und in die Extrazellularregion abgegeben werden. Außerdem kann die Abtrennung und eine nachfolgende Verbindung dieser Moleküle miteinander zur Bildung von heterodimeren Molekülen mit einer verstärkten Aktivität führen [116]. Auch die Rezeptortyrosinkinasen ErbB2, Met und Ron sind extrazelluläre Interaktionspartner der Typ-B Plexine [117-119].

Das simultane Binden von zwei Plexinmolekülen durch einen Semaphorindimer ist der erste essenzielle Schritt in der Aktivierung von Plexinen. Dabei wird die Bindung über die beiden gemeinsamen N-terminalen Sema-Domänen vermittelt

[120-122]. Dadurch wird eine Konformationsveränderung des juxtamembranären Segments des Plexinmoleküls ausgelöst, was zur Aktivierung der GAP-Aktivität führt [123].

Die intrazelluläre GAP (GTPase-activating protein) Domäne hat eine essentielle Rolle in der Plexinfunktion inne [124]. Die Signalkaskade über Plexin ist abhängig von der Inaktivierung des G-Proteins R-Ras. Die GAP-Aktivität von PlxnB1 ist abhängig von der Bindung von Semaphorin und der RhoGTPase RND1 [125].

Über 20 verschiedene Proteine sind bereits bekannt, die mit der zytoplasmatischen Region der Plexine interagieren und so zu einer Signalübermittlung beitragen. Plexine der Klasse B interagieren über ein am C-terminalen Ende gelegenes PDZ-Interaktionsmotiv [106] mit zwei verwandten Guanine-nucleotide-exchange-factors (GEFs), PDZ-RhoGEF und LARG (leukemia-associated RhoGEF) Faktoren. Diese werden nach Aktivierung von Plexin rekrutiert, aktivieren dadurch ihrerseits RhoA und vermitteln somit einen wichtigen Teil des Signalwegs [106, 124, 126, 127].

### **1.3.2 Bekannte Funktionen von PlexinB1**

Signale über die Semaphorin-Plexin-Achse spielen eine essentielle Rolle in der Entwicklung des Nervensystems, vor allem bei der Richtungsfindung des Axonwachstums, der Verästelung von Nerven, sowie der Synapsenbildung [128].

In vitro konnte gezeigt werden, dass der Signalweg von Sema4D über PlxnB1 zu einer verstärkten Angiogenese führt, indem es zu einer Induktion der Migration und Tubenbildung bei PAE (Porcine Aortic Endothelial Cells) und HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) kommt [99, 129, 130].

Im Immunsystem ist PlxnB1 auf unreifen dendritischen Zellen aus dem Knochenmark, aber nicht auf reifen dendritischen Zellen oder Monozyten exprimiert [101]. Außerdem lässt sich PlxnB1 auf Mikroglia und dendritischen Zellen der Lunge finden [131, 132]. Des weiteren wird es auf Stromazellen des Knochenmarks, aktivierten T- und B-Zellen und follikulären dendritischen Zellen exprimiert [133]. Die Interaktion zwischen Sema4D auf B-Zellen und PlxnB1 auf Stromazellen und aktivierten T-Zellen trägt zu einem verlängerten Überleben und

einer vermehrten Proliferation der B-Zellen bei [133]. Eine Bindung von PlxnB1 durch Sema4D auf unreifen dendritischen Zellen verhindert deren Migration [101].

Auch in der Karzinogenese spielt PlxnB1 eine wichtige Rolle. Zusammen mit Sema4D und der Rezeptoryrosinkinase Met stimuliert das Protein das invasive Zellwachstum [134]. Auch in verschiedenen Tumoren ist die Expression von Sema4D und PlxnB1 aufgehoben [135, 136]. Außerdem trägt PlxnB1 zum Streuen von Ovarialtumoren bei [137].

In der Niere konnte gezeigt werden, dass die PlxnB1 Expression auf den Glomeruli die Rekrutierung von Makrophagen über Sema4D erleichtert [104]. Außerdem aktiviert Sema4D auf T-Zellen, über PlxnB1 auf Mikrogliazellen, im Modell der experimentellen Autoimmun-Enzephalitis (EAE) die Produktion von iNOS (inducible nitric oxide synthase), einem Effektormolekül der Neuroinflammation [138].

#### **1.4 Wissenschaftliche Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss der Proteine Sema4D und PlxnB1 beziehungsweise deren Interaktion im mesenterialen I/R-Schaden untersucht werden. Die Behandlung einer intestinalen Ischämie beschränkt sich bisher überwiegend auf eine chirurgische, beziehungsweise interventionelle Beseitigung der Ursache der Durchblutungsstörung, sowie der symptomatischen Behandlung (Fibrinolyse, iv. Antibiose, Flüssigkeitszufuhr, Antispasmodische Therapie) (s. Einleitung) der Folgen. Eine medikamentöse Therapie zur Reduktion des I/R-Schadens existiert bis dato nicht. Wie bereits erwähnt, ist die Mortalität der intestinalen Ischämie jedoch weiterhin sehr hoch. Mehrere Studien konnten einen Zusammenhang zwischen dem Sema4D-PlexinB1-Signalweg und immunmodulatorischen Funktionen sowie deren Bedeutung im Inflammationsgeschehen zeigen, jedoch wurde nie die Funktion in der mesenterialen I/R untersucht. Sollten sich protektive Effekte durch den Knockout der Expressionen beider Proteine zeigen, könnten sie dazu beitragen, neue therapeutische Möglichkeiten zu finden, um vor chirurgischer und/oder interventioneller Reetablierung der Perfusion eine Abschwächung beziehungsweise eine

Hemmung des I/R-Schadens zu ermöglichen und somit Komplikationen zu minimieren. Ziel dieser Untersuchung ist es somit, die Funktion von Sema4D und PlxnB1 in Bezug auf eine durch intestinale Ischämie ausgelöste Inflamationsreaktion und die Auswirkungen auf den entstehenden I/R Schaden zu ermitteln. Dabei soll die Expressionsänderung von Sema4D und PlxnB1 in vitro und in vivo ermittelt, sowie deren Expressionsmuster verdeutlicht werden. Zur in vitro Untersuchung wird hierbei eine Darmepithel-Zelllinie (Caco-2), verwendet. Außerdem soll der Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Ausbildung einer akuten Inflammation in vivo anhand der Zytokinspiegel und der Leukozytenmigration untersucht werden. Des weiteren wird der Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Integrität der Darmbarriere untersucht, sowie auf den intestinalen Schaden. Zuletzt soll der Einfluss von Sema4D und PlexinB1 auf die natürliche mikrobielle Abwehr durch die Expression von Defensinen untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Allgemeine Materialien / Verbrauchsgegenstände

| <u>Produktbezeichnung</u>  | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                                |
|----------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|
| 96 WellMicroplate F-Bottom | 655101               | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Combitips advanced, 2,5ml  | 0030089.448          | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland               |
| Combitips advanced, 5ml    | 0030089.456          | Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland               |
| CryoTube™ Vials            | 368632               | Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA  |
| Cell Culture Tube 12ml     | 163 160              | Greiner Bio-One GmbH,                            |

|                                                                                    |                                                                                        |                                                          |
|------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|                                                                                    |                                                                                        | Frickenhausen,<br>Deutschland                            |
| Falcon Tubes 15ml                                                                  | 352096                                                                                 | Falcon,<br>Heidelberg,<br>Deutschland                    |
| Falcon Tubes 15ml                                                                  | 352070                                                                                 | Falcon,<br>Heidelberg,<br>Deutschland                    |
| Filterspitzen steril<br>10µl kurz<br>10µl lang<br>20µl<br>100µl<br>200µl<br>1000µl | 07-602-8300<br>07-613-8300<br>07-622-8300<br>07-642-8300<br>07-662-8300<br>07-693-8300 | Nerbe plus,<br>Winsen, Deutschland                       |
| Multi® SafeSeal®<br>Tubes<br>1,5ml<br>2ml                                          | 7080.1<br>7083.1                                                                       | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe, Deutschland                |
| Multiplate® PCR<br>Plates™ 96Well clear                                            | MLL9601                                                                                | Bio-Rad Laboratories<br>GmbH,<br>München, Deutschland    |
| Nunc-Immuno™<br>MicroWell™ 96 well<br>solid plate                                  | 442404                                                                                 | Thermo Fischer<br>Scientific Inc.,<br>Massachusetts, USA |
| Pipette Eppendorf<br>research<br>0,5-10µl<br>2-20µl<br>10-100µl<br>100-1000µl      | 3120000020<br>3120000038<br>3120000046<br>3120000062                                   | Eppendorf AG,<br>Hamburg, Deutschland                    |

|                                         |                                      |                                                        |
|-----------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| Reaction Tube<br>1,5ml<br>2ml           | 616201<br>623201                     | Greiner Bio-One GmbH,<br>Frickenhausen,<br>Deutschland |
| Schraubbecher 100ml                     | 75.563                               | Sarstedt,<br>Nümbrecht,<br>Deutschland                 |
| Stripette<br>1ml<br>5ml<br>10ml<br>25ml | 356521<br>356543<br>356551<br>356525 | Falcon,<br>Heidelberg,<br>Deutschland                  |
| Zellschaber                             | 3008                                 | Coming Incorporated,<br>New York, USA                  |

### **2.1.2 In-vitro: Humane Zellkultur**

| <u>Produktbezeichnung</u>                                  | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                                                                                      |
|------------------------------------------------------------|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Brutschrank Binder                                         | 9040-0108            | Lab Unlimited,<br>Dublin, Irland                                                                       |
| Hypoxiekammer                                              | Invivo2 400          | Ruskin Technology,<br>Bridgend, UK                                                                     |
| Hypoxiekammergas                                           | Gas Mixer Q          | Ruskin Technology,<br>Bridgend, UK                                                                     |
| epitheliale kolorektale<br>Adenokarzinomzellen<br>(Caco-2) | ATCC HTB-37          | American Type Culture<br>Collection ATCC in<br>partnership with LGC<br>Standards,<br>Manassas, VA, USA |
| ATCC-formulated<br>Eagle's Minimum<br>Essential Medium     | M4655                | Sigma-Aldrich Chemie<br>GmbH,<br>Taufkirchen,<br>Deutschland                                           |

|                                                   |             |                                                           |
|---------------------------------------------------|-------------|-----------------------------------------------------------|
| Natrium-Pyruvat                                   | S-8636      | Sigma-Aldrich Chemie GmbH,<br>Taufkirchen,<br>Deutschland |
| Fetal Bovine Serum (FBS)                          | A15-751     | PAA Laboratories GmbH,<br>Pasching, Österreich            |
| Antibiotic/Antimycotic Solution (100x) Stabilized | A-5955      | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA                |
| Accutase                                          | L11-007     | PAA Laboratories GmbH,<br>Pasching, Österreich            |
| MEM Nicht essentielle Aminosäuren-Lösung (100x)   | M7145-100ML | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA                |
| Dimethyl sulfoxide (DMSO) ≥99.5% (GC)             | D4540       | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA                |
| DPBS <sup>-</sup> , no calcium, no magnesium      | 14190       | Invitrogen Corp. – Gibco<br>Carlsbad, CA, USA             |
| Mr. Frosty™ Freezing Container                    | 5100-001    | Thermo Fisher Scientific Inc.,<br>Waltham, MA, USA        |
| Zellkulturflaschen 75                             | 90076       | TPP Techno Plastic Products AG,<br>Trasadingen, Schweiz   |
| Tissue Culture Flask                              | 353017      | Becton Dickson,<br>Franklin Lakes, NJ, USA                |
| Cell Culture Dishes, PS, 60×15mm                  | 628160      | Greiner Bio-One GmbH,                                     |

|                                                             |             |                                                                     |
|-------------------------------------------------------------|-------------|---------------------------------------------------------------------|
|                                                             |             | Frickenhausen,<br>Deutschland                                       |
| μ-Slide 4 Well Glass<br>Bottom                              | 89427       | Ibidi GmbH,<br>Gräfeling, Deutschland                               |
| Thermo Scientific Nunc<br>CryoTube, selfstanding,<br>1.8 mL | 368632      | Thermo Fisher Scientific<br>Inc.,<br>Waltham, MA, USA               |
| Heraeus™ Multifuge™<br>X1 Universalzentrifuge               | 75004250    | Thermo Fisher Scientific<br>Inc.,<br>Waltham, MA, USA               |
| Cytoperm 2                                                  | 51011660    | Thermo Fisher Scientific<br>Inc.,<br>Waltham, MA, USA               |
| LaminAir HB 2472 S GS                                       | 50033854    | Heraeus Instruments<br>GmbH,<br>Hanau, Deutschland                  |
| Leica DMIL Inverted<br>Phase Microscope                     | 520802      | Leica Microsystems<br>GmbH,<br>Wetzlar, Deutschland                 |
| Membran Vakuum-<br>Pumpe Diaphragma<br>FKF 56 x-4           | F159410 035 | ABM Greiffenberger<br>Antriebstechnik GmbH,<br>Wetzlar, Deutschland |

#### MEDIUM

#### INHALTSSTOFFE

#### **KOMPLETTES NÄHRMEDIUM CACO-2**

77% ATCC-formulated Eagle's  
Minimum Essential Medium  
20% Fetales Bovines Serum (FBS)  
1% Natrium-Pyruvat  
1% MEM Nicht essentielle  
Aminosäurenlösung  
1% Antibiotic-Antimycotic-Solution

**GEFRIERMEDIUM**  
**CACO-2**

95% Komplettes Nährmedium  
5% Dimethylsulfoxid (DMSO)

**2.1.3 In-vivo: Tierversuch**

| <u>Produktbezeichnung</u>                  | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                                   |
|--------------------------------------------|----------------------|-----------------------------------------------------|
| Dulbecco`s Phosphate Buffered Saline (PBS) | D8537                | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA          |
| isotonische Kochsalzlösung (0,9% NaCl)     |                      | Fresenius Kabi<br>Deutschland GmbH,<br>Bad Homburg  |
| Gewebeinfiltrationsautomat                 | TP1020               | Leica Microsystems<br>GmbH,<br>Wetzlar, Deutschland |
| Kühlplatte für das modulare Einbettssystem | EG 1150 C            | Leica Microsystems<br>GmbH,<br>Wetzlar, Deutschland |
| Paraffinaufgiesstation                     | EG 1150 H            | Leica Microsystems<br>GmbH,<br>Wetzlar, Deutschland |
| Paraffinstrecktisch                        | HI1220               | Leica Microsystems<br>GmbH,<br>Wetzlar, Deutschland |
| Paraffin-Wasserbad                         | HI1210               | Leica Microsystems<br>GmbH,<br>Wetzlar, Deutschland |
| Rotationsmicrotom                          | RM2235               | Leica Microsystems<br>GmbH,<br>Wetzlar, Deutschland |
| TECAN multiplatereader                     | Infinite M200 pro    | Tecan Group Ltd.,<br>Männedorf, Schweiz             |

|                                             |                  |                                                           |
|---------------------------------------------|------------------|-----------------------------------------------------------|
| Rotilabo-Einbettkassetten                   | K114.1           | Carl Roth,<br>Karlsruhe,<br>Deutschland                   |
| Formaldehyd Solution 37%                    | F1268            | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA                |
| SuperFrost Plus<br>Objektträger geschnitten | 03-0060          | R. Langenbrinck,<br>Emmendingen,<br>Deutschland           |
| Wattestäbchen, steril                       | 825120           | MSP Schmeiser,<br>Horb a. N.,<br>Deutschland              |
| Kanüle BD Microlance™                       | 302200<br>304000 | Beckton Dickinson,<br>Drogheda, Irland                    |
| Spritze BD Plastipak™ 1ml                   | 300013           | Beckton Dickinson,<br>Drogheda, Irland                    |
| Spritze Injekt®-F 1ml                       | 9166017V         | B. Braun,<br>Melsungen,<br>Deutschland                    |
| Paraffinöl dickflüssig                      | 8904.1           | Carl Roth,<br>Karlsruhe,<br>Deutschland                   |
| Acland Micro Vessel<br>Clamp 8mm            | AF-052-08        | Surtext Instruments<br>Limited,<br>New Malden, UK         |
| Zellstofftupfer                             | 61639            | B. Braun,<br>Melsungen,<br>Deutschland                    |
| Nahtmaterial Vicryl 5,0                     | V303H            | CLS Medizintechnik,<br>Krebeck-Renshausen,<br>Deutschland |

|                                     |                |                                                                |
|-------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------|
| Xylene, mixture of isomers          | 1317691612     | AppliChem,<br>Darmstadt,<br>Deutschland                        |
| Ethanol 99% vollständig<br>vergällt | ETO-10000-99-1 | SAV Liquid<br>Production,<br>Flintsbach am Inn,<br>Deutschland |

#### **2.1.4 RNA-Isolation und RT-PCR**

| <u>Produktbezeichnung</u>                  | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                                       |
|--------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------------|
| peqGOLDTriFast™                            | 30-2020              | PEQLAB Biotechnologie<br>GmbH,<br>Erlangen, Deutschland |
| Chloroform                                 | C2432                | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA              |
| 2-Propanol                                 | I9516                | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA              |
| Ethanol absolut                            | A3678                | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt, Deutschland               |
| Water Molecular biology<br>grade           | A7398                | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt, Deutschland               |
| iScript™ cDNA<br>Synthesis Kit             | 170-8891             | Bio-Rad Laboratories<br>Inc.,<br>Hercules, CA, USA      |
| Primer                                     | -                    | Biomers.net GmbH,<br>Ulm, Deutschland                   |
| iTaq Universal SYBR<br>Green Supermix, 5ml | 172-5124             | Bio-Rad Laboratories<br>Inc.,<br>Hercules, CA, USA      |
| SafeSeal Tips Premium<br>10µl, steril      | 692139               | Biozym Scientific<br>GmbH,                              |

|                                          |              |                                                                  |
|------------------------------------------|--------------|------------------------------------------------------------------|
|                                          |              | Hessisch Oldendorf,<br>Deutschland                               |
| SafeSeal Tips Premium<br>100µl, steril   | 692066       | Biozym Scientific<br>GmbH,<br>Hessisch Oldendorf,<br>Deutschland |
| SafeSeal Tips Premium<br>1000µl, steril  | 692078       | Biozym Scientific<br>GmbH,<br>Hessisch Oldendorf,<br>Deutschland |
| Micro packaging vial<br>closure          | 91-PCS-TC    | PEQLAB Biotechnologie<br>GmbH,<br>Erlangen, Deutschland          |
| Precellys Ceramic<br>Beads 1.4mm         | 91-PCS-CK14P | PEQLAB Biotechnologie<br>GmbH,<br>Erlangen, Deutschland          |
| Micro packaging vials,<br>2ml            | P1-PCS-TV    | PEQLAB Biotechnologie<br>GmbH,<br>Erlangen, Deutschland          |
| Multi-Safe Seal Tubes<br>farblos         | 7080.1       | Carl Roth GmbH & Co.<br>KG,<br>Karlsruhe, Deutschland            |
| PCR Tubes 0,2ml (Flat<br>Cap)            | 82-0620      | PEQLAB Biotechnologie<br>GmbH,<br>Erlangen, Deutschland          |
| RNase AWAY                               | 7002         | Thermo Fischer<br>Scientific Inc.,<br>Waltham, MA, USA           |
| Multiplate™ PCR Plates<br>96-well, clear | MLL9601      | Bio-Rad Laboratories<br>Inc.,<br>Hercules, CA, USA               |

|                                                           |            |                                                         |
|-----------------------------------------------------------|------------|---------------------------------------------------------|
| Microseal B seal                                          | MSB1001    | Bio-Rad Laboratories<br>Inc.,<br>Hercules, CA, USA      |
| Precellys 24                                              | 91-PCS24   | PEQLAB Biotechnologie<br>GmbH,<br>Erlangen, Deutschland |
| eppendorf Centrifuge<br>5417R                             | 022621807  | Eppendorf AG,<br>Hamburg, Deutschland                   |
| Thermo Scientific<br>Nanodrop 2000 UV-Vis<br>Spectrometer | 91-ND-2000 | Thermo Fischer<br>Scientific Inc.,<br>Waltham, MA, USA  |
| MyCycler Thermocycler                                     | 580BR1260  | Bio-Rad Laboratories<br>Inc.,<br>Hercules, CA, USA      |
| Perfect SpinP                                             | 91-PSPIN-P | PEQLAB Biotechnologie<br>GmbH,<br>Erlangen, Deutschland |
| CFX96™ Real-Time<br>System C1000™<br>Thermocycler         | 785BR05467 | Bio-Rad Laboratories<br>Inc.,<br>Hercules, CA, USA      |

### **2.1.5 Proteinisolation und Western-Blot der Zelllinie Caco-2**

| <u>Produktbezeichnung</u>                   | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                                     |
|---------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
| Halt™ Protease und<br>Phosphatase Inhibitor | 78443                | Thermo Fisher<br>Scientific Inc.,<br>Waltham, MA, USA |
| Pierce™ BCA Protein<br>Assay Kit            | 23225                | Thermo Fisher<br>Scientific Inc.,<br>Waltham, MA, USA |

|                                            |                   |                                                       |
|--------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------|
| Immun-Blot PVDF<br>Membran                 | 162-0177          | Bio-Rad Laboratories<br>Inc.,<br>Hercules, CA, USA    |
| PowerPac                                   | Pac1000           | Bio-Rad Laboratories<br>Inc.,<br>Hercules, CA, USA    |
| Thermoschüttler                            | AK 82             | Infors AG,<br>Bottmingen, Schweiz                     |
| Magermilchpulver                           | A0830             | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland          |
| MagicMark™ XP<br>western standard          | LC5603            | Thermo Fisher<br>Scientific Inc.,<br>Waltham, MA, USA |
| Protein Marker VI                          | A8889             | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland          |
| Roti-Free Stripping Puffer<br>2.2 plus     | 3373.1            | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe, Deutschland             |
| Rotiphorese Gel 30<br>(Acrylamid)          | 3029.2            | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe, Deutschland             |
| Temed                                      | 2367.3            | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe, Deutschland             |
| Western Blotting Luminol<br>Reagent        | sc-2048           | Santa Cruz<br>Biotechnology Inv.,<br>Dallas, USA      |
| zellulose chromatography<br>Papier 3MM Chr | Whatman™ 3030-917 | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA            |
| ABTS                                       | A1888-2G          | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA            |

|                                                |              |                                                         |
|------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------|
| Ammoniumchlorid                                | A3661        | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland            |
| Ammoniumpersulfat                              | A1142        | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland            |
| Zitronensäure                                  | 8.18707.1000 | Merck KGaA,<br>Darmstadt,<br>Deutschland                |
| Methanol                                       | 20847.307    | VWR International<br>GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland |
| Natriumchlorid AnalaR<br>NORMAPUR®             | 27810.262    | VWR International<br>GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland |
| Natriumcitrat                                  | 3580.1       | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe, Deutschland               |
| Natriumhydrogencarbonat                        | A1940        | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland            |
| SDS (Sodium dodecyl<br>sulfate)                | 71725        | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA              |
| Tris Glycine 10X                               | 161-0771     | Bio-Rad Laboratories<br>GmbH,<br>München, Deutschland   |
| Tris Glycine SDS 10X<br>Electrophoresis Buffer | 161-0772     | Bio-Rad Laboratories<br>GmbH,<br>München, Deutschland   |

|                                  |              |                                               |
|----------------------------------|--------------|-----------------------------------------------|
| Tris Base                        | A2264        | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland  |
| Triton® X-100                    | A4975        | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland  |
| Tween20                          | 9005-64-5    | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland  |
| Wasserstoffperoxid 30%           | 1.08597.1000 | Merck Millipore,<br>Darmstadt,<br>Deutschland |
| EDTA-Lösung 0,5M                 | A3145        | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland  |
| IGEPAL® CA-630<br>(Nonidet P-40) | I8896        | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA    |
| Tris-HCL                         | A3452        | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland  |
| Glycerol                         | G5516        | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA    |
| Bromphenolblau                   | A3640        | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland  |
| Mercaptoethanol                  | M7522        | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA    |
| HCL 32%                          | 100319       | Merck Millipore,<br>Darmstadt,<br>Deutschland |

|                                          |           |                                                  |
|------------------------------------------|-----------|--------------------------------------------------|
| NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris-Gel, 1mm, 12 well | NP0322PK2 | Invitrogen Corp. –<br>Gibco<br>Carlsbad, CA, USA |
| NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4x)           | NP0007    | Invitrogen Corp. –<br>Gibco<br>Carlsbad, CA, USA |
| NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10x)      | NP0004    | Invitrogen Corp. –<br>Gibco<br>Carlsbad, CA, USA |
| NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer (20%)    | NP0001    | Invitrogen Corp. –<br>Gibco<br>Carlsbad, CA, USA |
| NuPAGE™ Antioxidant                      | NP0005    | Invitrogen Corp. –<br>Gibco<br>Carlsbad, CA, USA |
| BCIP                                     | A1117     | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland     |
| NBT                                      | A1243     | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland     |
| DMF                                      | 131785    | AppliChem GmbH,<br>Darmstadt,<br>Deutschland     |

#### PUFFER

#### INHALTSSTOFFE

|                                            |                                                                                                |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>RIPA-PUFFER<br/>(PH 7,4 EINSTELLEN)</b> | 790mg Tris Base<br>75ml A. dest.<br>900mg NaCl<br>mit HCL 32% auf gewünschten pH<br>einstellen |
|--------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|

|                                                                    |                                                                                               |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                    | 10ml IGEPAL® CA-630<br>0,2ml EDTA<br>A. Dest. ad 1L                                           |
| <b>PROTEIN-LYSEPUFFER</b>                                          | 2400µl RIPA-Puffer<br>240µl Protease-Phosphatase-Inhibitor                                    |
| <b>TRITON X 10%</b>                                                | 5ml Triton X-100<br>45ml A. dest.                                                             |
| <b>LOADING-BUFFER (4X)<br/>REDUZIEREND<br/>(PH 6,8 EINSTELLEN)</b> | 2,5ml Tris HCL<br>4ml Glycerol<br>0,8g SDS<br>10mg Bromphenolblau<br>1ml Mercaptoethanol      |
| <b>LOADING-BUFFER (5X)<br/>REDUZIEREND<br/>(PH 6,8 EINSTELLEN)</b> | 3,2mg Tris HCL<br>3,5ml Glycerol<br>1,5g SDS<br>100mg Bromphenolblau<br>2,5ml Mercaptoethanol |
| <b>LOWER-BUFFER<br/>(PH 8,8 EINSTELLEN)</b>                        | 90,85g Tris Base<br>2g SDS<br>500ml A. dest.                                                  |
| <b>UPPER-BUFFER<br/>(PH 6,8 EINSTELLEN)</b>                        | 30,3g Tris Base<br>2g SDS<br>500ml A. dest.                                                   |
| <b>LAUFPUFFER</b>                                                  | 100ml Tris-Glycine-SDS<br>900ml A. dest.                                                      |
| <b>TRANSFERPUFFER</b>                                              | 400ml Methanol<br>200ml Tris-Glycine-SDS<br>1400ml A. dest.                                   |
| <b>DETEKTIONSPUFFER</b>                                            | 44ml A. dest.<br>1ml Natriumchlorid 5M<br>5ml Tris-HCL                                        |

|                                                                   |                                                                                         |
|-------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                   | 38µl BCIP-Lösung (50mg/ml BCIP in 70% DMF)<br>50µl NBT-Lösung (100mg/ml NBT in 70% DMF) |
| <b>TBS (TRIS-BUFFER)<br/>(PH 7,6 EINSTELLEN)</b>                  | 1L A. dest.<br>24,2g Tris Base<br>80g NaCl<br>Mit HCL 32% auf gewünschten pH einstellen |
| <b>0,05% TBST (TRIS-BUFFER MIT TWEEN)<br/>(PH 7,6 EINSTELLEN)</b> | 2,42g Tris Base<br>8g NaCl<br>500µl Tween<br>A. dest ad 1L                              |
| <b>CITRATPUFFER<br/>(PH AUF 4,2 EINSTELLEN)</b>                   | 26,3g Zitronensäure<br>36,8g Natriumcitrat<br>250ml A. dest.                            |
| <b>ABTS-LÖSUNG</b>                                                | 5ml Citratpuffer<br>28mg ABTS<br>10µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>45ml A. dest.    |
| <b>BLOCKING-SOLUTION</b>                                          | 5% Magermilchpulver in 0,05% TBST                                                       |

| <u>Primärantikörper</u>             | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                    |
|-------------------------------------|----------------------|--------------------------------------|
| Purified Mouse Anti-CD100 (Sema 4D) | BD 610670            | BD Biosciences,<br>San Jose, CA, USA |
| Anti-Plexin B1 Antibody             | ab90087              | Abcam,<br>Cambridge, MA, USA         |

|                           |          |                                                      |
|---------------------------|----------|------------------------------------------------------|
| Anti-VEGF Antibody        | Sc-507   | Santa Cruz<br>Biotechnology Inc.,<br>Dallas, TX, USA |
| $\beta$ -Actin Antikörper | sc-81178 | Santa Cruz<br>Biotechnology Inc.,<br>Dallas, TX, USA |

| <u>Sekundärantikörper</u>                                                                                    | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------|
| Goat anti-Rabbit IgG<br>(heavy chain) antibody<br>(Alkaline phosphatase<br>(AP))<br>→ <i>PLXNB1 und VEGF</i> | ABIN 375699          | Antibodies-online<br>GmbH,<br>Aachen, Deutschland    |
| Goat anti-Mouse IgG-<br>HRP<br>→ <i>SEMA4D</i>                                                               | sc-2005              | Santa Cruz<br>Biotechnology Inc.,<br>Dallas, TX, USA |

### 2.1.6 Immunfluoreszenz-Färbung und Mean Gray Value

| <u>Produktbezeichnung</u>                  | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                                 |
|--------------------------------------------|----------------------|---------------------------------------------------|
| Pap Pen<br>Immunostaining Pen              | MKP-1                | Kisker Biotech,<br>Steinfurt, Deutschland         |
| Eukitt® quick-hardening<br>mounting medium | 03989                | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA        |
| Roti®-Mount FluorCare<br>DAPI              | HP20.1               | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe, Deutschland         |
| Albumin from bovine<br>serum (BSA)         | A7960-100G           | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA        |
| PBS tablets                                | 18912-014            | Invitrogen Corp. –<br>Gibco,<br>Carlsbad, CA, USA |

|                                 |           |                                                     |
|---------------------------------|-----------|-----------------------------------------------------|
| Aceton                          | 24201     | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA          |
| Methanol AnalaR<br>NORMAPUR     | 20847.307 | VWR International,<br>Radnor, PA, USA               |
| Fluoreszenzmikroskop            | Axiophot  | Carl Zeiss Microscopy<br>GmbH,<br>Jena, Deutschland |
| Antigen-<br>Demaskierungspuffer | H-3300    | Vector Laboratories,<br>Burlingame,                 |

| <u>Primärantikörper</u>       | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                                    |
|-------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------|
| Cytokeratin-12 antibody       | sc-17101             | Santa Cruz<br>Biotechnology Inc.,<br>Dallas, TX, USA |
| Semaphorin4d antibody         | bs-6965R             | Bioss Antibodies Inc.,<br>Woburn, MA, USA            |
| $\beta$ -Actin Antikörper     | sc-81178             | Santa Cruz<br>Biotechnology Inc.,<br>Dallas, TX, USA |
| Anti-Plexin B1 antibody       | Ab90087              | Abcam,<br>Cambridge, MA, USA                         |
| Normal mouse IgG              | Sc-2025              | Santa Cruz<br>Biotechnology Inc.,<br>Dallas, TX, USA |
| Rabbit IgG isotype<br>control | 31235                | Invitrogen Corp.,<br>Carlsbad, CA, USA               |
| Goat igG isotype control      | 31245                | Invitrogen Corp.,<br>Carlsbad, CA, USA               |

| <u>Sekundärantikörper</u>                                 | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                                    |
|-----------------------------------------------------------|----------------------|------------------------------------------------------|
| Alexa Fluor 488 Goat<br>Anti-Rabbit IgG (H+L)<br>Antibody | A-11008              | Life Technologies<br>GmbH,<br>Darmstadt, Deutschland |
| Alexa Fluor® 594 Goat<br>Anti-Mouse IgG (H+L)<br>Antibody | A-11005              | Life Technologies<br>GmbH,<br>Darmstadt, Deutschland |
| Alexa Fluor 594 Donkey<br>Anti-Goat IgG (H+L)<br>Antibody | A-11058              | Life Technologies<br>GmbH,<br>Darmstadt, Deutschland |

### **2.1.7 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

| <u>Produktbezeichnung</u>           | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                               |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------|
| Deckgläser 24x60mm                  | 01-2460/x            | R. Langenbrinck,<br>Emmendingen,<br>Deutschland |
| Mayer's hemalum<br>solution         | 1092490500           | Merck Millipore,<br>Darmstadt, Deutschland      |
| Eosin G-Lösung 0,5%<br>wässrig      | X883.2               | Carl Roth GmbH,<br>Karlsruhe, Deutschland       |
| AnalaR Normapur<br>Acetic acid 100% | 20.104.298           | VWR Chemicals,<br>Radnor, PA, USA               |
| Eukitt Quick-Hardening              | 03989                | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA      |

### **2.1.8 Immunhistochemische Färbung der PMN**

| <u>Produktbezeichnung</u>       | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>            |
|---------------------------------|----------------------|------------------------------|
| Anti-Ly6g antibody<br>[RB6-8C5] | ab25377              | Abcam,<br>Cambridge, MA, USA |

|                                                        |         |                                                      |
|--------------------------------------------------------|---------|------------------------------------------------------|
| Rabbit Anti-Rat IgG<br>Antibody (H+L),<br>Biotinylated | BA-4000 | Vector Laboratories<br>Burlingame, CA, USA           |
| Normal Rabbit Serum<br>Blocking Solution               | S-5000  | Vector Laboratories<br>Burlingame, CA, USA           |
| normal rat IgG                                         | sc-2026 | Santa Cruz<br>Biotechnology Inc.,<br>Dallas, TX, USA |
| Antigen Unmasking<br>Solution                          | H-3300  | Vector Laboratories<br>Burlingame, CA, USA           |
| Avidin/Biotin Blocking<br>Kit                          | SP-2001 | Vector Laboratories<br>Burlingame, CA, USA           |
| VECTASTAIN® ABC-<br>HRP Kit, Peroxidase<br>(Standard)  | PK-4000 | Vector Laboratories<br>Burlingame, CA, USA           |
| HistoGreen, HRP-<br>Substrate-Kit                      | E-109   | Linaris,<br>Dossenheim,<br>Deutschland               |
| Nuclear Fast Red<br>Counterstain                       | H-3403  | Vector Laboratories<br>Burlingame, CA, USA           |
| Gelatin from cold water<br>fish skin (FSGO)            | G7765   | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA           |

### **2.1.9 Enzyme linked Immunosorbant Assay (ELISA)**

| <u>Produktbezeichnung</u>  | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                |
|----------------------------|----------------------|----------------------------------|
| Mouse IL-6 DuoSet<br>ELISA | DY 406               | R&D Systems,<br>Minneapolis, USA |
| Color Reagent A            | 895000               | R&D Systems,<br>Minneapolis, USA |
| Color Reagent B            | 895001               | R&D Systems,<br>Minneapolis, USA |

|                                |        |                                  |
|--------------------------------|--------|----------------------------------|
| Reagent Diluent<br>Concentrate | 841380 | R&D Systems,<br>Minneapolis, USA |
| Stop Solution                  | 895926 | R&D Systems,<br>Minneapolis, USA |
| Streptavidin-HRP               | 890803 | R&D Systems,<br>Minneapolis, USA |

#### **2.1.10 AST- und ALT-Messungen**

| <u>Produktbezeichnung</u>                               | <u>Produktnummer</u> | <u>Hersteller</u>                                     |
|---------------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------------------------------|
| Alanine<br>Aminotransferase (ALT)<br>Activity Assay Kit | MAK052               | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA            |
| Aspartate<br>Aminotransferase (AST)<br>Activity Assay   | MAK055               | Sigma-Aldrich, Inc.,<br>St. Louis, MO, USA            |
| 96 WellMicroplate F-<br>Bottom                          | 442404               | Thermo Fisher Scientific<br>Inc.,<br>Waltham, MA, USA |

#### **2.1.11 Software und statistische Auswertung**

Verwendete Software: AxioVision Rel. 4.8.; Image J 1.49; Bio-Rad CFX Manager3.1; EndNoteX7; Office 2016; Magellan 7.2

Für die statistische Auswertung wurde die Software GraphPad Prism 7.03 verwendet. Für die Signifikanztests wurden je nach Fragestellung ein *unpaired two tailed t-test* oder ein *one-way ANOVA test* durchgeführt. Dabei wurde  $p > 0,05$  als nicht signifikant definiert und die Signifikanzwerte  $p \leq 0,05 = *$ ;  $p \leq 0,01 = **$ ;  $p \leq 0,001 = ***$  mit den jeweiligen Sternen in den Gruppen gekennzeichnet.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 *In-vitro: Humane Zellkultur*

Für die in-vitro-Experimente wurden humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen (Caco-2) verwendet. Alle Schritte fanden unter sterilen Bedingungen statt.

#### 2.2.1.1 Kryokonservierung und Auftauen der Zellen

Die Zelllinie wurde im geeigneten Gefriermedium bis zum Auftauen kryokonserviert. Dafür wurden die adhärenenten Zellen mit PBS<sup>-</sup> gespült und anschließend mit 4ml Accutase bei 37°C für 5-10 Minuten inkubiert, um eine Ablösung der Zellen vom Flaschenboden zu erreichen. Die Zellsuspension wurde daraufhin in ein 50ml Falcon-Tube überführt und es wurden mittels Pipette 20ml frisches Nährmedium hinzugegeben. Das Falcon-Tube wurde danach bei 900 UpM für zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das verbleibende Zellpellet in ca. 5ml kaltem Gefriermedium, welches zuvor auf Eis gekühlt wurde, resuspendiert. Anschließend wurden jeweils 1,5ml der neuen Zellsuspension auf vorgekühlte Kryotubes verteilt. Im nächsten Schritt wurden die aliquotierten Zellen in einer Isopropyl-Alkohol-Box verwahrt, um ein gleichmäßiges und schnelles Einfrieren (ca. -1°C pro Minute bei -80°C) gewährleisten zu können. Nach Lagerung der Zellen für 4h bei -80°C erfolgte die Konservierung der Zellen bis zur weiteren Verarbeitung in Flüssigstickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurden die in Stickstoff gelagerten Kryotubes mit dem enthaltenen Zellpellet kurz entlüftet und im Wasserbad bei 37°C angewärmt, bis diese fast vollständig aufgetaut waren. Anschließend erfolgte der Transfer der Zellsuspension in ein 50ml Falcon-Tube mit 15ml Nährmedium. In den nächsten Schritten wurde die Zellsuspension 8 Minuten mit 1000 UpM zentrifugiert, der flüssige Überstand verworfen, das am Boden des Falcontube entstandene Zellpellet in 15ml vorgewärmten Nährmedium suspendiert und nachfolgend in eine T75-Kulturflasche pipettiert. Diese wurde umgehend im Brutschrank zur Kultivierung aufbewahrt.

#### 2.2.1.2 Kultivierung, Passage, Medienwechsel

Die Kultivierung der Caco-2-Zelllinie erfolgte im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 90% relativer Luftfeuchtigkeit. Während der Kultivierung der Zellen erfolgte in regelmäßigen Abständen (alle 2-3 Tage) eine Untersuchung auf mögliche Infektionen durch Bakterien und Pilze, sowie die Ermittlung der Zellteilungsrate mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops. In der Regel bildete sich nach 2-3 Tagen ein konfluenter Zellrasen, sodass entweder die Passage zur weiteren Kultivierung oder die Aussaat der Zellen zu Versuchszwecken in entsprechende Reaktionsgefäße durchgeführt werden konnte.

Zur Passage der Zellen wurde das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS<sup>-</sup> gespült. Durch Inkubation des Zellmonolayers mit 4ml Accutase bei 37°C für fünf bis zehn Minuten wurde die Ablösung der Zellen vom Flaschengrund erreicht. Die Zellsuspension wurde anschließend mit 12ml frischem Nährmedium aufgefüllt und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren wurde eine homogene Mischung der Suspension erzeugt. Im darauffolgenden Schritt wurde jeweils ein Drittel (4ml) dieser Zellsuspension in eine neue Kulturflasche transferiert und mit 16ml frischen Nährmedium aufgefüllt, sodass pro Kulturflasche eine Zellsuspension von ca. 20ml enthalten waren.

Der Medienwechsel fand zwei Mal wöchentlich statt. Das alte Medium wurde dafür abgesaugt, der Zellmonolayer mit PBS<sup>-</sup> gespült und anschließend mit 20ml frischem Nährmedium bedeckt.

#### 2.2.1.3 Aussaat und Stimulation durch Hypoxie

Für die Aussaat wurden die Zellen entsprechend dem in 2.2.1.1. beschriebenen Vorgehen vom Flaschengrund gelöst. Anschließend wurden für die Hypoxie-Stimulationsversuche 56ml (1:3 Verdünnung) Nährmedium zur Accutase-Lösung hinzugegeben. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren konnte eine homogen durchmischte Zellsuspension hergestellt werden. Daraufhin wurden die sich in Lösung befindlichen Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 6cm ausgesät, indem 6ml der Suspension in ihnen verteilt wurde. Die Aussaat der Zellen zur späteren Färbung mit Hilfe der Immunfluoreszenz erfolgte durch Zugabe von 3ml der oben genannten 1:3 verdünnten Zellsuspension auf

Chamber Slides. Das Wachstum der Zellen in den Reaktionsgefäßen wurde mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops beobachtet. In der Regel bildeten diese nach 2-3 Tagen einen zu ca. 80% konfluenten Zellrasen aus, sodass ab diesem Zeitpunkt die Stimulation begonnen werden konnte.

Zur Stimulation durch Hypoxie wurden die Chamber Slides und Petrischalen in die Hypoxiekammer geschleust. 24 Stunden vor Beginn der Stimulation wurde das entsprechende Nährmedium in einem Falcontube in der Hypoxiekammer bereits der hypoxischen Bedingungen ausgesetzt. Nach dem Einschleusen der Reaktionsgefäße in die Hypoxiekammer wurde das alte Nährmedium abgesaugt und die entsprechende Menge des hypoxischen Nährmediums zum Zellrasen hinzu pipettiert. Anschließend wurden die Zellen für 2, 4, 8 und 24h (Zeitreihe für RNA-Isolation und qRT-PCR in den Petrischalen) beziehungsweise 24h (Chamber Slides für Immunofluoreszenzfärbungen) bei 37°C, 2% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 93% N<sub>2</sub> inkubiert.

### **2.2.2 In-vivo: Tierversuch**

Die in-vivo Versuche wurden nach den deutschen Richtlinien für Tierversuche durchgeführt. Die Auflagen des Regierungspräsidiums Tübingen wurden eingehalten und die Tierversuche durch dieses genehmigt (A02/21G). Die Zuordnung der Versuchs- und Kontrolltiere erfolgte entsprechend ihrem Gewicht, Geschlecht und Alter. Folgende Mauslinien wurden in dieser Arbeit verwendet:

|                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Wildtyp C57BL/6       | <i>PlxnB1-Kontrollen</i>                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Wildtyp BALB/c        | <i>Sema4D-Kontrollen</i>                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| Sema4d <sup>-/-</sup> | <i>Semaphorin 4D knock out Mäuse</i><br>Internationale Bezeichnung:<br>C.129P2-Sema4d <sup>tm1Kik</sup><br>Hierbei handelt es sich um eine<br>BALB/c Maus mit einer homozygoten<br>„targeted mutation“ des Semaphorin<br>4D genes auf Chromosom 13. Die<br>Maus exprimiert kein Semaphorin 4D. |

|                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Plxnb1 <sup>-/-</sup>                        | <p><i>Plexin B1 knock out Mäuse</i></p> <p>Internationale Bezeichnung:<br/>B6.129/Sv-Plxnb1<sup>tm1Ltam</sup></p> <p>Hierbei handelt es sich um eine C57BL/6 J Maus mit einer homozygoten „targeted mutation“ des Plexin B1 genes auf Chromosom 9. Die Maus exprimiert kein Plexin B1. Die Tiere haben einen unauffälligen Phänotyp entwickelt und vermehren sich normal.</p>                                    |
| Sema4d <sup>-/-</sup> /Plxnb1 <sup>-/-</sup> | <p><i>Semaphorin 4d/Plexin B1 Doppel knock out Mäuse)</i></p> <p>Internationale Bezeichnung:<br/>C.129P2-Sema4d<sup>tm1Kik</sup> Plxnb1<sup>tm1Ltam</sup></p> <p>Hierbei handelt es sich um eine Kreuzung der oben beschriebenen Mäuse mit den targeted mutations“ des Semaphorin 4D genes auf Chromosom 13 und des Plexin B1 genes auf Chromosom 9. Die Maus exprimiert weder Semaphorin 4D noch Plexin B1.</p> |

#### 2.2.2.1 Murines Modell des intestinalen Ischämie-Reperfusionsschadens

Zur Anästhesie wurde den Versuchstieren gewichtsadaptiert (80 mg/kg KG) Pentobarbital intraperitoneal injiziert. Nach ausreichender Narkosetiefe konnte das Versuchstier durch Fäden an den Extremitäten und am Oberkiefer auf dem auf 37°C vorgeheizten OP-Tisch in Rückenlage fixiert werden, durch ein leichtes Überstrecken des Kopfes der Versuchstiere wurde ein Offenhalten der Atemwege gewährleistet. Über eine Längsinzision mit einer Präparierschere wurde zunächst die Haut über dem Peritoneum und anschließend das

Peritoneum selbst an der gefäßfreien Linea alba entlang eröffnet, um die intraperitonealen Organe freizulegen. Mittels in NaCl angefeuchteter steriler Wattestäbchen wurde das Darmpaket zur linken Seite aus dem intraperitonealen Raum heraus luxiert, um die arteriellen Gefäße am Mesenterium sichtbar zu machen. Nach Auffinden der SMA wurde diese mit Hilfe einer Acland Clamp unter mikroskopischer Aufsicht für 15 Minuten verschlossen. In dieser Zeit wurde der intraperitoneale Raum mit 2-3ml NaCl feucht gehalten und mit einem feuchten Wattetupfer bedeckt, um die Evaporation der intraabdominellen Flüssigkeit so gering wie möglich zu halten. Nach Ablauf der 15-minütigen Ischämiezeit wurde die Clamp entfernt, das Darmpaket mit den Wattestäbchen wieder in den Bauchraum befördert und der eröffnete Rumpf mit 5,0 Vicryl unter mikroskopischer Aufsicht wieder zugenäht. Ab Entnahme der Clamp lief die Reperusionszeit von drei Stunden. Zur Aufrechterhaltung der Betäubung wurde Pentobarbital stündlich mit einem Viertel der Ausgangsdosierung intraperitoneal nachgegeben.

#### 2.2.2.2 Entnahme Serumproben

Fünf Minuten vor Ablauf der Reperusionszeit wurde die Naht mit der Präparierschere eröffnet und entfernt. Anschließend wurde bei den I/R-Versuchstieren nach exakt 3 Stunden die Clamp entfernt. Das Darmpaket wurde erneut mit zwei Wattestäbchen luxiert um die Vena portae freizulegen. Zur Entnahme der Serumproben wurde die Vena portae mit einer dafür vorbereiteten Spritze punktiert und ca. 0,5 – 1ml Vollblut entnommen. Die Blutprobe wurde in ein 1,5ml Eppendorfcup mit einem einliegenden Holzstäbchen überführt und bei Raumtemperatur für ca. zwei Stunden gelagert, bis die Probe vollständig geronnen war. Anschließend wurden die Holzstäbchen mit den anhaftenden, geronnenen, korpuskulären Blutbestandteilen verworfen, der Rest der Proben für zehn Minuten bei 12G und 4°C zentrifugiert und das überstehende Serum mittels Pipette abpipettiert und in ein frisches Eppendorfcup überführt. Die Serumproben wurden danach bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

### 2.2.2.3 Organentnahme für qRT-PCR

Nach Entnahme der Serumproben wurde das vaskuläre System mit 10ml 0,9% NaCl über eine Punktion der beiden Herzkammern und eine Erweiterung des Punktionslochs der Vena portae zum Blutabfluss gespült. Anschließend wurde der Dickdarm Richtung oral knapp unterhalb des Zäkums und Richtung anal so tief wie möglich durchtrennt und das Mesocolon mit einer Pinzette abgezogen. Der Dickdarm wurde längs aufgeschnitten, mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und daraufhin ein sogenanntes Mucosal Scraping durchgeführt, d.h. die Mucosa mit einem Spatel von den übrigen Dickdarmschichten abgeschabt und in ein Kryotube überführt. Die Lagerung der Gewebeproben zur Untersuchung des Organschadens und der -entzündung mit Hilfe der qRT-PCR erfolgte bis zur Verarbeitung bei -80°C.

### 2.2.2.4 Herstellung der Paraffinschnitte für Histologie

Zur histologischen Aufarbeitung und Färbung des Darms wurden sogenannte Swiss Rolls hergestellt. Dafür wurden von speziell für die Histologie vorgesehenen Mäusen nach dem Model in 2.2.2.1 der Dickdarm sowie der Dünndarm in drei gleich langen Teilen – respektive Duodenum, Jejunum und Ileum – vom Mesenterium getrennt, das Zökum entfernt und die verschiedenen Anteile des Darms anhand der Ansatzlinie des Mesenteriums der Länge nach aufgeschnitten, in PBS<sup>-</sup> gewaschen und anschließend mit einem Zahnstocher so aufgerollt, dass die endoluminale Seite in Richtung Zahnstocher wies. Daraufhin wurden die Swiss Rolls mit einer Pinzette vom Zahnstocher abgestreift und in eine Gewebekassette überführt. Die Proben lagerten über Nacht bei Raumtemperatur in 4% Formalinlösung. Anschließend wurden die Kassetten in 70% Alkohol gewaschen und in einen Gewebeeinfiltrationsautomaten zur kompletten Dehydrierung und Infiltration des Gewebes mit Paraffin überführt, welcher mit den Gewebekassetten folgendes Programm durchlief:

| <u>Station</u> | <u>Chemikalie</u> | <u>Zeit in Stunden</u> |
|----------------|-------------------|------------------------|
| 1              | 70% Ethanol       | 1:30                   |
| 2              | 70% Ethanol       | 1:30                   |
| 3              | 96% Ethanol       | 1:30                   |

|    |               |      |
|----|---------------|------|
| 4  | 96% Ethanol   | 1:00 |
| 5  | 100% Ethanol  | 1:30 |
| 6  | 100% Ethanol  | 1:00 |
| 7  | 100% Ethanol  | 1:00 |
| 8  | Xylol         | 1:30 |
| 9  | Xylol         | 1:30 |
| 10 | Xylol         | 1:00 |
| 11 | Paraffinwachs | 1:30 |
| 12 | Paraffinwachs | 1:30 |
| 13 | Paraffinwachs | 1:30 |

Im Anschluss erfolgte die Entnahme der Proben aus den Kassetten, die Überführung in flüssiges, erhitztes Paraffin, die Fixation mittels Histoembedder in Paraffinblöcken und schließlich die Aushärtung auf einer Kälteplatte bei ca. 0°C. Nachdem die Paraffinblöcke abgekühlt und erstarrt waren, wurden diese im Kryotom eingespannt und drei Mikrometer dicke Schnitte hergestellt. Diese wurden zunächst für ca. fünf Minuten in Eiswasser und direkt danach in ein Wärmebecken bei ca. 37°C gegeben, um eine faltenfreie Ausdehnung der Paraffinschnitte zu ermöglichen. Im letzten Schritt wurden die Schnitte auf einen Objektträger gelegt und über eine Nacht bei 42°C auf eine Wärmeplatte positioniert, um die restliche Flüssigkeit verdampfen zu lassen und eine gute Fixation auf dem Objektträger zu ermöglichen. Anschließend wurden die Objektträger bis zur weiteren Verarbeitung bei Raumtemperatur in Dunkelheit gelagert

### **2.2.3 RNA-Isolation und RT-PCR**

Für die in-vitro Versuche wurden die Zellen, wie in 2.2.1.3. beschrieben, ausgesät und stimuliert. Zur Beendigung der Stimulation wurde das Medium in der Hypoxiekammer mittels Pipette abgesaugt und die adhärennten Zellen unmittelbar danach mit 1ml peqGOLD TriFast bedeckt, um die RNA-Isolation zu starten. Die RNA-Isolation aus dem Mucosal Scraping des Dickdarms der Versuchstiere erfolgte ebenfalls mit peqGOLD TriFast. Um eine bessere Lyse des

Darmmaterials zu erreichen, wurde das Gewebe zusammen mit TriFast und Keramikkügelchen (0,65g) in Tubes gefüllt und anschließend mittels eines Homogenisators bei 5500 UpM 2 x 20sec zentrifugiert. Die weiteren Schritte erfolgten entsprechend den Herstellerangaben (peqGOLD TriFast).

Die isolierte mRNA wurde in 25-40µl Nuclease freiem Wasser (NFW) resuspendiert und bei -80°C über einen Zeitraum von zwölf Stunden tiefgefroren. Anschließend konnte mit Hilfe eines UV-Spectrophotometers (Thermo Scientific Nanodrop 2000 UV-Vis Spectrometer) die Konzentration an mRNA bestimmt und mittels Verdünnung mit NFW auf eine gewünschte Konzentration von 500ng/µl eingestellt werden. In einem weiteren Schritt erfolgte der Umschrieb der mRNA zu cDNA nach Protokoll des BIO-RAD iScript™ cDNA Synthesis Kit. Für den Umschrieb wurde exakt 1µg mRNA-Probe zum Reaktionsansatz, bestehend aus 4µl 5×iScript reaction mix und 1µl iScript reverse, gegeben. Aus der spectrophotometrisch bestimmten Konzentration (ng/µl) der mRNA konnte errechnet werden, wie viel µl NFW zum Ansatz addiert werden mussten, um ein Gesamtvolumen von 20µl des Reaktionsansatzes zu erreichen. Die Durchführung des Umschriebes erfolgte im Thermocycler. Die auf diese Weise gewonnene cDNA wurde mit 140µl NFW verdünnt, um die gewünschte Konzentration von 6,25ng/µl zur Durchführung der PCR zu erhalten.

Zur Implementierung der RT-PCR wurden nachfolgende Reaktionsansätze verwendet:

Primer Mix:

- 160µl NFW
- 20µl Forward Primer (100pmol/µl)
- 20µl Reverse Primer (100pmol/µl)

Der Ansatz pro Kavität (96-Wellplatte) bestand aus:

- 12,5µl iQ™ SYBR Green Sypermix (Bio-Rad Laboratories Inc.)
- 7,5µl NFW
- 1µl Primer Mix
- 4µl cDNA (25ng)

Bei jedem PCR-Lauf wurden zur Detektion von Verunreinigungen des Primer-Mixes für jeden Primer-Mix Negativkontrollen erstellt. Diese Negativkontrollen enthielten pro Kavität statt der 4µl cDNA-Probe 4µl NFW. Als Standard (Housekeeping-Gen) wurde für murines Probenmaterial 18S, und für die humanen Proben  $\beta$ -Aktin und 18S verwendet. Die Implementierung der RT-PCR wurde mit Hilfe des iCyclers Bio-Rad anhand des folgenden Reaktionsprotokolls durchgeführt:

1. Schritt: Initiales Schmelzen: 95°C für 3min
2. Schritt: Schmelzen: 95°C für 15sec
3. Schritt: Primerannealing: entsprechend der optimalen Annealing-Temperatur des Primers (siehe unten) für 30sec
4. Schritt: Amplifikation: 72°C für 30sec
5. Schritt: Ende der Amplifikation: 95°C für 10sec
6. Schritt: Ermittlung der Schmelzkurven bei 50°C für 0,5sec und 95°C für 5sec

Ein RT-PCR-Zyklus umfasst die Schritte zwei bis vier. Bei der Durchführung der PCR wird dieser Zyklus 39-mal wiederholt. Nach jedem Zyklus wird nach Schritt vier die Fluoreszenz gemessen. Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur des Primers wurden vorher Temperaturgradienten durchgeführt, bei denen die Schmelzkurve, die Schmelztemperatur, sowie der Cq-Wert (cycle of quantification) als Beurteilungsgrundlage dienten.

Folgende Primer wurden mit der ermittelten optimalen Annealing-Temperatur verwendet:

Zellversuche:

Humanes Sema4D (60,5°C)

for: ACT CAG CGC CAC TTC CCT T

rev: CCT TTG CCA TCT TCA TTT TTC C

Humanes PlexinB1 (63,8°C)

for: GCA CGG GAC ATT CCC CGG TAC

rev: CTA TAG ATC TGT GAC CTT GTT TTC

Humanes VEGF (59,0°C)

for: TTG CCT TGC TCT ACC TC

rev: AGC TGC GCT GAT AGA CAT CC

Tierversuche:

Sema4D (60,0°C)

for: ACC ACC TGA ACT TGA CAT CTT T

rev: ACC ATG ACT GAT GTG TAG CTG TG

PlexinB1 (62,0°C)

for: CTT CTC CTT GGG TCA TGT GCA GTA C

rev: TCT TAT AGT CCC TCA GGG CCT GCT

TNF $\alpha$  (65,5°C)

for: CGT CGT AGC AAA CCA CCA AG

rev: GAA CCT GGG AGT AGA CAA GG

IL-1 $\beta$  (65,5°C)

for: CAT TGT GGC TGT GGA GAA GCT G

rev: GGG AAC GTC ACA CAC CAG CAG G

IL-3 (64,0°C)

for: TGC GCT GCC AGG GGT CTT

rev: ATT CCA CGG TTC CAC GGT TAG G

IL-6 (65,5°C)

for: GAG GAT ACC ACT CCC AAC AG

rev: AAC GCA CTA GGT TTG CCG AG

ICAM-1 (59,1°C)

for: CAA TTT CTC ATG CCG CAC AG

rev: AGC TGG AAG ATC GAA AGT CCG

VCAM-1 (65,5°C)

for: TGA CAA GTC CCC ATC GTT GA

rev: ACC TCG CGA CGG CAT AAT T

JAM-A (66,0°C)

for: GGT CAG CAT CCA CCT CAC T

rev: GGT CAG CAC TGC CCT GTT C

JAM-B (63,0°C)

for: CAT CAT AGC AAC GGT TGT GG

rev: TTA GAT GCA GGA CTG CCC TT

JAM-C (60,0°C)

for: GAT TAC GAT GGG CAT CTG CT

rev: GAA GTC ACC CTC CTC ACT CG

Occludin (66,0°C)

for: ACT GGG TCA GGG AAT ATC CA

rev: TCA GCA GCA GCC ATG TAC TC

ZO-2 (63,0°C)

for: GTT TGG CCC CAT AGC AGA TA

rev: TCC GGG TTG AAG AAA ATC AC

ZO-1 (65,0°C)

for: GCC AGA GAA AAG TTG GCA AG

rev: TTG GAT ACC ACT GCG CAT AA

Claudin-2 (66,0°C)

for: TTA GCC CTG ACC GAG AAA GA

rev: AAA GGA CCT CTC TGG TGC TG

Claudin-3 (66,0°C)

for: CCA ACT GCG TAC AAG ACG AG

rev: TCT TGG TGG GTG CAT ACT TG

Claudin-4 (65,5°C)

for: AGC AAA CGT CCA CTG TCC TT

rev: AAT CCA CCT CCA CCC TTC TT

DEFA-1 (65,5°C)

for: TCC TAC TCT TTG CCC TTG TCC TG

rev: CTC TTC TCC TGG CTG CTC CTC

DEFA-3 (66,0°C)

for: AGA GCC TTC TGG GTC TCC A

rev: GTC CAG GCT GAT CCT ATC CA

DEFA-5 (65,5°C)

for: TGG CCT CCA AAG GAG ATA GA

rev: CCC AGG CTG ATC CTA TCC AC

DEFB-1 (65,5°C)

for: CTT TTC TCC CAG ATG GAG CCA

rev: GGG CTT ATC TGG TTT ACA GGT TC

DEFB-2 (65,0°C)

for: CCA CTC CAG CTG TTG GAA GTT TA

rev: GGC TCT GAC ACA GTA CCC TC

DEFB-3 (65,0°C)

for: GCA TTG GCA ACA CTC GTC AGA

rev: CGG GAT CTT GGT CTT CTC TA

Die quantitative Auswertung der Genexpression erfolgte mit Hilfe der Bio-Rad CFX Manager Software 3.0 (Bio-Rad Laboratories Inc.). Die Effizienz der Primer wurde durch das Programm errechnet, in dem bei jeder PCR eine Standardkurve für die Primer aus einer 1:2 verdünnten Konzentrationsreihe erstellt wurde. Als

Grundlage weiterführender statistischer Auswertung diene die relative normalisierte Expression ( $\Delta\Delta C_q$ ).

#### **2.2.4 Proteinisolation und Western-Blot der Zelllinie Caco-2**

##### **2.2.4.1 Proteinisolation**

Die Zellen wurden unter Bedingungen wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben stimuliert. Durch das Abpipettieren des alten Mediums, die Zugabe von 500 $\mu$ l Protein-Lysepuffer auf die Zellen und anschließendem Entfernen aus der Hypoxiekammer, wurde die Stimulation beendet. Im nächsten Schritt wurden die lysierten Zellen mittels Zellschaber vom Plattengrund abgeschabt. Mit einer Pipette wurde die entstandene Zellsuspension in ein 1,5ml Eppendorfcup überführt. Um eine bessere Homogenisierung und Freisetzung der Proteine zu erreichen, wurden diese für 20 Minuten bei 4°C im Überkopfschüttler gemischt. Im letzten Schritt wurden die Eppendorfcups bei 12.000 G für 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein frisches Eppendorfcup überführt und bis zur Weiteren Verwertung bei -20°C eingefroren.

Für die Bestimmung der Gesamtproteinmenge der isolierten Proteinproben mit Hilfe des BCA-Protein Assay Kits wurde zunächst eine Standardreihe erstellt. Hierfür wurde eine Albuminlösung in einer Konzentration von 2mg/ml in sieben Schritten jeweils 1:1 bis zur minimalen Konzentration von 0,03125mg/ml verdünnt.

Anschließend wurde jeweils 25 $\mu$ l des Standards in Form von Duplikaten in eine 96-Wellplatte pipettiert. Als Leerwert dienten 25 $\mu$ l Aqua destillata (A. dest.). Die isolierten Proteinproben wurden in einer 1:5 Verdünnung (5 $\mu$ l Probe und 20 $\mu$ l A. dest.) als Duplikate pipettiert. In einem weiteren Schritt, wurde zu jeder Probe 200 $\mu$ l des kurz zuvor nach Herstellerangaben angesetzten BCA-Proteinreagenz, zugegeben. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Proben unter Lichtschutz für 30 Minuten bei 37°C. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnte die Proteinkonzentration photometrisch anhand der Standardkurve bei einer Wellenlänge von 540nm bestimmt werden.

#### 2.2.4.2 Western-Blot

In einem weiteren Schritt wurden die Proben, indem eine jeweils errechnete Menge (in  $\mu\text{l}$ ) dieser Proben in ein 1,5ml Tube überführt und durch Addition von A. dest. (in  $\mu\text{l}$ ) hinsichtlich der Proteinkonzentration normiert wurden, vorbereitet. Als nächstes erfolgte die Zugabe einer errechneten Menge von 4×Lämmli oder 5×Lämmli in einem reduzierenden Ansatz, sowie von RIPA-Puffer, sodass am Ende in 40 $\mu\text{l}$  Lösung, 80 $\mu\text{g}$  Protein und 10 $\mu\text{l}$  Lämmli-Puffer enthalten waren. Die Differenz wurde mit RIPA aufgefüllt. Die Denaturierung der Proteine durch Aufspalten der Disulfidbrücken fand im Rüttelinkubator bei 90°C für 5min statt. Durch Lagerung der Proben für 5min auf Eis wurde die Reaktion abgestoppt.

Die Ladung der Proben erfolgte in einem Polyacrylamid Sodium-Dodecyl-Sulfate (SDS)-Gel. Der Anteil an SDS im verwendeten Polyacrylamid-SDS-Gel war dabei abhängig vom Gewicht des zu detektierenden Proteins. Zum Nachweis von humanem Sema4D war der SDS-Anteil 10%, zur Detektion von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) 12%, und für PlxnB1 wurde NuPAGE™ 4-12% verwendet. Für die Bestimmung des Molekulargewichts der Proteinbanden wurden zusätzlich zwei Proteinmarker (ProteinMarker IV und MagicMark™XP) geladen. Das Ladevolumen der Proben war abhängig von der Breite und Anzahl der Geltaschen (Wells) des verwendeten Gels (1mm 12 Well: 20 $\mu\text{l}$  und 1,5mm 15 Well: 25 $\mu\text{l}$ ). Nach dem Laden der Proben im Gel trennte man die Banden im Tris-glycine-SDS (TGS)-Lauf-Puffer bei 110-120 Volt über einen Zeitraum von 90-120 Minuten auf. Im nächsten Schritt wurden die Banden auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran, welche zuvor für drei Minuten in Methanol rehydriert und anschließend im Transferpuffer gewaschen wurde, mittels des Transferpuffers bei 110 Volt über einen Zeitraum bis zu 90 Minuten transferiert. Die bessere Anhaftung der Proteine an die PVDF-Membran erfolgte in einem Zwischenschritt durch vollständige Trocknung der PVDF-Membran bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die PVDF-Membran für drei Minuten in Methanol rehydriert und dann für fünf Minuten im Transferpuffer belassen. In einem weiteren Schritt wurde die PDVDF-Membran zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur auf einer Wippe in Blocking-Puffer inkubiert.

Zur Detektion der spezifischen Proteine wurden die in 2.1.5 genannten Erst-AK verwendet. Zur Überprüfung der Ladebedingungen kam ein AK gegen  $\beta$ -Aktin für die Proben der humanen Zelllinien zum Einsatz. Die Inkubation mit dem Erst-AK und mit dem AK zur Überprüfung der Ladebedingungen, die im Blocking-Buffer in einem Verhältnis von 1:250 gelöst wurden, fand über Nacht bei 8°C auf einer Wippe statt. Anschließend wurden die Blots 3×10min in 0,01% TBST auf einer Wippe gewaschen, um nicht gebundene AK zu entfernen. In einem nächsten Schritt wurde die PVDF-Membran über zwei Stunden bei Raumtemperatur auf einer Wippe mit den Zweitantikörpern (Kapitel 2.1.5) inkubiert, welche im Blocking-Puffer in einem Verhältnis von 1:1000 (Goat anti-Mouse IgG HRP für Sema4D) beziehungsweise 1:3000 (Goat anti-Rabbit IgG AP für VEGF und PlxnB1) gelöst wurden. Darauffolgend wurden überschüssige und nicht gebundene AKs durch dreimaliges Waschen für jeweils zehn Minuten mit TBST entfernt.

Der Nachweis der Banden erfolgte entweder durch Chemilumineszenz (Sema4D) oder einer Farbreaktion mit alkalischer Phosphatase (PlxnB1 und VEGF). Diese wird erzeugt durch die Reaktion von mit alkalischer Phosphatase (AP)-konjugierter Zweitantikörper mit einer Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)/ 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP) Lösung.

Zum Nachweis mittels Chemilumineszenz wurden die SEMA4D-Blots mit Luminol Reagent detektiert. Die Detektion der Banden erfolgte durch Aufnahme der Chemilumineszenz mit einer CCD-Kamera DIANA (Software Diana dev. 1.054, raytest GmbH) und einer Belichtungszeit von 10-20 Minuten. Zur Durchführung des Nachweises der Proteinbanden mittels Farbreaktion AP-konjugierter AK in der NBT/BCIP-Lösung wurden die PlxnB1 und VEGF-Membranen nach Behandlung mit dem sekundären AK für zehn Minuten in einem Detektionspuffer belassen. Im darauffolgenden Schritt inkubierte man die PVDF-Membran unter Lichtschutz im Detektionspuffer so lange bei Raumtemperatur, bis die entsprechenden Banden durch die alkalische Phosphatase-Reaktion zu detektieren waren. Durch mehrmaliges Spülen mit Aqua dest. wurde die Reaktion abgestoppt. Es folgte die Trocknung der PVDF-Membranen, welche anschließend mit Hilfe der hp Precision Pro 3.1 Software eingescannt wurden.

Zur Implementation statistischer Analysen der Western Blots wurden diese mit Hilfe der Software Image J 1.44p densitometrisch vermessen, in dem die Intensität der Bande des gesuchten Proteins in Relation zur Intensität der Bande der Ladekontrolle gesetzt wurde.

## **2.2.5 Immunfluoreszenz-Färbung und Mean Gray Value**

### **2.2.5.1 Vorbereitung der Paraffinschnitte für die Immunfluoreszenzfärbung**

Zur Darstellung der veränderten Sema4D- und PlxnB1-Expression nach der akuten Mesenterialischämie wurden die hergestellten 3µm breiten Paraffinschnitte der Swiss Rolls (Beschreibung der Schnittherstellung siehe Kapitel 2.2.2.4.) zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Dafür wurden mehrere Objektträger in ein Färbegestell eingespannt und für unterschiedliche Zeitspannen in folgende Alkoholreihe eingetaucht:

|            |                            |
|------------|----------------------------|
| Schritt 1: | Xylol für 5min             |
| Schritt 2: | Xylol für 3min             |
| Schritt 3: | Xylol für 3min             |
| Schritt 4: | 100% Ethanol für 3min      |
| Schritt 5: | 100% Ethanol für 3min      |
| Schritt 6: | 96% Ethanol für 3min       |
| Schritt 7: | 70% Ethanol für 3min       |
| Schritt 8: | PBS <sup>-</sup> für 30min |

Anschließend erfolgte die Demaskierung der Antigene durch Erhitzung im Antigen-Demaskierungspuffer für sieben Minuten in der Mikrowelle bei 700 Watt. Nach 20 Minuten, in denen die Schnitte abkühlen konnten, wurde mit einem Fettstift ein Kreis um die Gewebeschnitte gezogen, um anschließend ein Auslaufen der Inkubationstropfen zu verhindern. Pro Gewebeschnitt erfolgte die Inkubation mit 100µl einer Blocking-Lösung (5% bovines Serum Albumin (BSA) in PBS<sup>-</sup>) bei Raumtemperatur für eine Stunde, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

#### 2.2.5.2 Vorbereitung der Zellen für die Immunfluoreszenzfärbung

Zur visuellen Darstellung der veränderten Sema4D- und PlxnB1-Expression nach Stimulation durch Hypoxie, wurden Caco-2-Zellen auf Chamber Slides, wie in Kapitel 2.2.1.3. beschrieben, ausgesät. Anschließend erfolgte die Stimulation über 24 Stunden in der Hypoxiekammer. Die Kontrollgruppe generierte man dadurch, dass die Zellen über 24 Stunden mit Nährmedium im Brutschrank bei Raumluft inkubiert wurden. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal für jeweils fünf Minuten mit 1ml PBS<sup>-</sup> gewaschen und die Kammertrennwände entfernt. Darauf folgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen für zehn Minuten mit 1ml eiskalter Methanol-Aceton-Lösung (Verhältnis 1:1) pro Kammer. Anschließend wurde ein Waschschrift mit PBS<sup>-</sup> für fünf Minuten durchgeführt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, erfolgte in einem weiteren Schritt die Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur mit 1ml einer 5%igen BSA-Blockierungslösung für eine Stunde. Die Inkubationszeiten erfolgten in einer feuchten Kammer, um die Zellen vor Austrocknung zu schützen.

#### 2.2.5.3 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte die Inkubation mit dem primären AK. Hierfür wurden die Proben mit 100µl beziehungsweise 1000µl einer 1%-igen BSA-PBS-Lösung, mit den in Kapitel 2.1.6. genannten primären AKs, über Nacht bei 4°C inkubiert. In einem weiterführenden Schritt wurden die Darmschnitte mit 100µl und die Zellpräparate mit 1000 µl PBS<sup>-</sup> jeweils dreimal für fünf Minuten gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Nachfolgend schloss sich die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 100µl beziehungsweise 1000µl einer 1%-igen BSA-PBS-Lösung an, in welcher die sekundären AK gelöst waren.

Nach Inkubation mit dem sekundären AK wurden die Proben drei Mal für fünf Minuten mit 100µl beziehungsweise 1000µl PBS<sup>-</sup> gewaschen. In einem weiterführenden Schritt wurde dann mit 100µl einer 1%-igen BSA-PBS-Lösung des zweiten Primärantikörpers unter oben genannten Bedingungen inkubiert.

Nach Inkubation der Präparate mit dem zweiten Primärantikörper erfolgten drei weitere Waschschrte mit jeweils 100µl beziehungsweise 1000µl PBS<sup>-</sup> für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Danach wurden die Proben für eine Stunde bei Raumtemperatur mit 100µl 1%-iger BSA-PBS-Lösung des zweiten Sekundärantikörpers inkubiert. Es folgten erneut drei Waschschrte für jeweils fünf Minuten mit 100µl beziehungsweise 1000µl PBS<sup>-</sup>. Anschließend wurden die Präparate durch Zugabe 100µl Roti®-Mount FluorCare DAPI eingebettet. Hierbei wurden die Zellkerne mit Hilfe von DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) gleichzeitig gegengefärbt. Durch Aufsetzen des Deckglases auf den Objektträger konnte das Präparat über Nacht durchhärten. Die bildliche Darstellung erfolgte unter Nutzung der Axio Vision 4.8 software des Axiophot Zeiss Mikroskops mit 40- (Darmschnitte) beziehungsweise 100-facher (Zellen) Vergrößerung.

Folgende Verdünnungen wurden zur Immunfluoreszenzfärbung verwendet:

Immunfluoreszenzfärbung von humanem Sema4D/ $\beta$ -Aktin in Caco-2-Zellen:

1. Primär-AK: Anti-Sema4D (1:100 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
1. Sekundär-AK: Alexa 488 anti-rabbit (1:500 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
2. Primär-AK: Anti- $\beta$ -Aktin (1:200 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
2. Sekundär-AK: Alexa 594 anti-mouse (1:500 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)

Immunfluoreszenzfärbung von humanem PlxnB1/ $\beta$ -Aktin in Caco-2-Zellen:

1. Primär-AK: Anti-PlxnB1 (1:100 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
1. Sekundär-AK: Alexa 488 anti-rabbit (1:500 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
2. Primär-AK: Anti- $\beta$ -Aktin (1:200 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
2. Sekundär-AK: Alexa 594 anti-mouse (1:500 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)

Immunfluoreszenzfärbung von murinem Sema4D/Cytokeratin in Darmschnitten:

1. Primär-AK: Anti-Sema4D (1:100 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
1. Sekundär-AK: Alexa 488 anti-rabbit (1:500 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
2. Primär-AK: Anti-Cytokeratin-12 (1:200 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
2. Sekundär-AK: Alexa 594 anti-goat (1:500 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)

Immunfluoreszenzfärbung von murinem PlxnB1/Cytokeratin in Darmschnitten:

1. Primär-AK: Anti-PlxnB1 (1:100 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
1. Sekundär-AK: Alexa 488 anti-rabbit (1:500 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
2. Primär-AK: Anti-Cytokeratin-12 (1:200 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)
2. Sekundär-AK: Alexa 594 anti-goat (1:500 in 1% BSA in PBS<sup>-</sup>)

Die Herstellung der Negativkontrolle erfolgte unter Bedingungen wie in Kapitel 2.2.5.3. beschrieben. Dabei wurden die Zellen beziehungsweise das Gewebe lediglich mit den Zweit-AKs behandelt. Zusätzlich wurde eine Isotyp-Kontrolle durchgeführt, in dem die Proben mit dem jeweiligen IgG-Serum in derselben Konzentration wie der zu vergleichende Primärantikörper behandelt wurden.

### **2.2.6 Hämatoxylin – Eosin – Färbung**

Für die Färbereihe nach Hämatoxylin-Eosin zur Darstellung des Ischämie-Reperfusionsschaden auf das Darmgewebe wurden die Objektträger mit den enthaltenen Schnitten wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben hergestellt und in einen Färbetrog gestellt. Anschließend durchliefen die Schnitte zur Entparaffinierung, Färbung und Dehydrierung folgende Schritte:

|             |                                                       |
|-------------|-------------------------------------------------------|
| Schritt 1:  | Xylol für 7min                                        |
| Schritt 2:  | Xylol für 7min                                        |
| Schritt 3:  | Xylol für 7min                                        |
| Schritt 4:  | 100% Ethanol für 5min                                 |
| Schritt 5:  | 100% Ethanol für 5min                                 |
| Schritt 6:  | 96% Ethanol für 5min                                  |
| Schritt 7:  | 70% Ethanol für 5min                                  |
| Schritt 8:  | Hämalaun (1:5 in A. dest.) für 10min                  |
| Schritt 9:  | H <sub>2</sub> O für 15min                            |
| Schritt 10: | Eosin (1% in A. dest. mit 1 Tropf. Eisessig) für 1min |
| Schritt 11: | A. dest. für 10sek                                    |
| Schritt 12: | 70% Ethanol für 10 sek                                |
| Schritt 13: | 96% Ethanol für 10sek                                 |

|             |                       |
|-------------|-----------------------|
| Schritt 14: | 100% Ethanol für 5min |
| Schritt 15: | 100% Ethanol für 5min |
| Schritt 16: | Xylol für 3min        |
| Schritt 17: | Xylol für 3min        |
| Schritt 18: | Xylol für 3min        |
| Schritt 19: | Eindeckeln mit Eukitt |

Die bildliche Darstellung erfolgte unter Nutzung der Axio Vision 4.8 software des Axiophot Zeiss Mikroskops mit 20-facher Vergrößerung. Die histologische Bewertung erfolgte anhand des Chiu-Park Scores, der erstmalig im Jahre 1970, beschrieben wurde [139].

### **2.2.7 Immunhistochemische Färbung der PMN**

Um die in Kapitel 2.2.2.4 beschriebenen hergestellten Gewebeschnitte der Därme einer immunhistochemischen Färbung der PMNs zugänglich zu machen, wurden diese zunächst in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Für diesen Vorgang wurden mehrere Objektträger in einen Färbetrog gestellt und dieser für unterschiedliche Zeiten in folgender Reihenfolge in die unten genannten Lösungen eingetaucht.

|            |                        |
|------------|------------------------|
| 1. Schritt | Xylol für 7 min        |
| 2. Schritt | Xylol für 7 min        |
| 3. Schritt | Xylol für 7 min        |
| 4. Schritt | 100% Alkohol für 5 min |
| 5. Schritt | 100% Alkohol für 5 min |
| 6. Schritt | 96% Alkohol für 5 min  |
| 7. Schritt | 70% Alkohol für 5 min  |

Anschließend wurden die Objektträger zweimal für jeweils fünf Minuten in A. dest. getaucht und die Gewebeschnitte auf diese Weise rehydriert. An die Entparaffinierung schloss sich in einem weiteren Schritt das Blocken der endogenen Peroxidase an. Hierfür wurden die Schnitte für 30 Minuten bei

Raumtemperatur in einer Lösung bestehend aus 75ml Methanol und 600 $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschriff, indem die Gewebeschnitte für fünf Minuten in A. dest. eingetaucht wurden.

Im nächsten Arbeitsschritt erfolgte die Demaskierung der Antigene. Zur Durchführung wurden die Gewebeschnitte in einen Glasbehälter gestellt, welcher mit dem Demarkierungspuffer (150ml A. dest. und 1,4ml Antigen-Demarkierungspuffer (Vektor)) aufgefüllt war. Anschließend wurde dieser Glasbehälter in der Mikrowelle 20 Minuten bei 750 Watt erhitzt. Hierbei wurde der Puffer regelmäßig nachgefüllt.

In einem weiteren Schritt erfolgte das Abkühlen der Schnitte für 20 Minuten im Demarkierungspuffer bei Raumtemperatur. Die Präparate auf den Objektträgern wurden in einer Färbeküvette in PBS<sup>-</sup> für fünf Minuten gewaschen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Objektträger nacheinander der Färbeküvette entnommen, mit Hilfe eines Fettstiftes die einzelnen Präparate eingekreist und umgehend pro Schnitt mit 100 $\mu$ l PBS<sup>-</sup> bedeckt. In einem darauffolgenden Schritt wurden unspezifische Bindungen durch Zugabe von 100 $\mu$ l einer Avidin-Blocklösung (1ml PBS<sup>-</sup> / 0,5% FSGO (Fish Skino Gelatin Oil) + 100 $\mu$ l Normal-Serum Rabbit + 4 Tropfen Avidin Blocking-solution) pro Gewebeschnitt und Inkubation über eine Stunde in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurde die Avidin-Blocklösung abgesaugt und die Schnitte durch dreimaliges Hinzugeben und Absaugen von jeweils 150 $\mu$ l PBS<sup>-</sup> gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 100 $\mu$ l eines monoklonalen Ratten Ly-6G Antikörpers in Biotin Blocking-Solution (AK 1:500 in 1ml PBS<sup>-</sup> / 0,5% FSGO + 100 $\mu$ l Normal-Serum Rabbit + 4 Tropfen Biotin-Blocking-Solution) oder 100 $\mu$ l eines Ratten IgG-AK in einer Konzentration von jeweils 1:400 gelöst in Biotin-Blocklösung pro Schnitt. Für die Negativkontrolle wurden die Gewebeschnitte mit 100 $\mu$ l Biotin-Blocklösung ohne gelösten AK behandelt. Anschließend folgte die Inkubation über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer. In einem nächsten Schritt wurden die Präparate dreimalig mit jeweils 150 $\mu$ l 0,5% FSGO / PBS<sup>-</sup> für fünf Minuten gewaschen. Auf den Waschschriff folgte die Zugabe von 100 $\mu$ l des mit Biotin konjugierten Kaninchen Anti-Ratten IgG Antikörpers, mit welchem die Schnitte

für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Feuchtkammer inkubiert wurden. Dieser war in einer Konzentration von 1:100 in einer Inkubationslösung, bestehend aus 1ml 0,5%FSGO / PBS<sup>-</sup> und 100µl Kaninchenserum (1:10), gelöst. Der Zweitantikörper wurde abgesaugt und die Gewebeschnitte mit 150µl 0,5% FSGO / PBS<sup>-</sup> für fünf Minuten gewaschen. Die ABC-Solution wurde nach Protokoll des Herstellers für VECTASTAIN ABC Kit vorbereitet. Nach Entfernung der Waschlösung wurden jeweils 100µl ABC-Solution zu den Gewebeschnitten hinzugegeben und für 30 Minuten in einer mit Alufolie abgedunkelten Feuchtkammer inkubiert. Daran schloss sich ein weiterer Waschschrift mit jeweils 150µl PBS<sup>-</sup> drei Mal für ca. fünf Minuten an. Jedem Gewebeschnitt wurde 100µl der entsprechend der Herstellerangaben angesetzten Histogreen-Lösung zugefügt und diese für ein bis zwei Minuten inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift mit jeweils 150µl PBS<sup>-</sup> für fünf Minuten. Nachfolgend wurde die Kernkontrastierung durch Inkubation mit jeweils 100µl Fast Nuclear Red für ca. fünf bis zehn Minuten unter Sicht durchgeführt. Zur Entwässerung wurden die Präparate kurz dreimal durch 100%-igen Alkohol und zweimal durch Xylol hindurchgezogen. In einem finalen Schritt wurden die Gewebeschnitte dann mit einem Tropfen Eukitt und durch das Auflegen des Deckglases verschlossen.

Nach Trocknung der Präparate konnten die Bildaufnahmen sowie deren Analysen mit Hilfe des Leitz DM IRB Mikroskops und der Software AxioVision v4.8.2 durchgeführt werden.

### **2.2.8 Enzyme linked Immunosorbant Assay (ELISA)**

Die Serumproben wurden, wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, entnommen. Die Verarbeitung und Messung der Proben erfolgte nach Angaben des Herstellers in Duplikaten unter 1:10 Verdünnung mit PBS<sup>-</sup>.

### **2.2.9 AST- und ALT – Messungen**

Zur Messung der ALT-/AST-Konzentration im Serum der Versuchstiere wurden Activity Assay Kits der Firma Sigma-Aldrich verwendet (ALT: MAK052, AST: MAK055). Das Serum wurde, wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben, entnommen. Das weitere Prozedere ist dem Technical Bulletin des Herstellers zu entnehmen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression von Sema4D und PlxnB1 während Hypoxie in-vitro

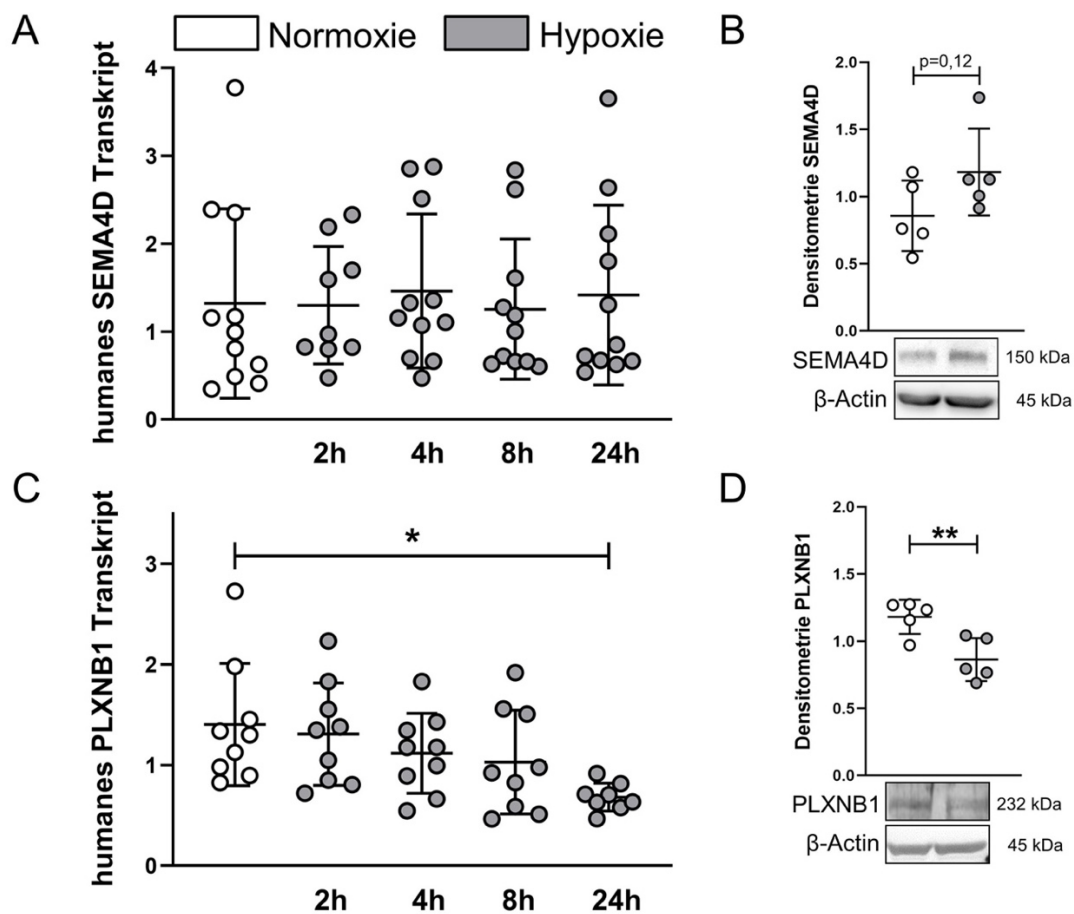
Um zu untersuchen, ob sich die Expression von Sema4D und PlxnB1 im Darmepithel in Hypoxie ändert, wurde zunächst in-vitro in der Darmepithelzelllinie Caco-2 die mRNA- und Proteinexpression mittels qRT-PCR und Western-Blot, sowie anschließender densitometrischer Vermessung der Proteinbanden, gemessen. Jeder Punkt in den Graphen, stellt eine unabhängige Zellpopulation dar (Abb. 1).

Für die Messung der mRNA-Expression wurden vier verschiedene Zeitpunkte (Hypoxie für 2, 4, 8 und 24 Stunden) gewählt und mit der Expression in Normoxie verglichen. Hierbei zeigte sich für die mRNA-Expression von Sema4D in Normoxie ( $1,42 \pm \text{SEM } 0,31$ ) über zwei Stunden Hypoxie ( $1,32 \pm \text{SEM } 0,32$ ) und über vier Stunden Hypoxie ( $1,30 \pm \text{SEM } 0,22$ ) zunächst ein geringer Abfall, nach acht Stunden Hypoxie wiederum ein Anstieg auf  $1,46 (\pm \text{SEM } 0,26)$  und nach 24 Stunden ein erneuter Abfall auf den geringsten Wert ( $1,26 \pm \text{SEM } 0,24$ ). Insgesamt zeigte sich im Vergleich zur Normoxie mit dem durchgeführten *One-way-Anova* Test zu keinem gemessenen Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied. Die mRNA-Expression von PlxnB1 nahm jedoch über 24 Stunden kontinuierlich von Normoxie ( $1,40 \pm \text{SEM } 0,20$ ) über zwei Stunden ( $1,31 \pm \text{SEM } 0,17$ ), vier Stunden ( $1,12 \pm \text{SEM } 0,13$ ), acht Stunden ( $1,03 \pm \text{SEM } 1,17$ ) und 24 Stunden Hypoxie ( $0,68 \pm \text{SEM } 0,05$ ) ab und zeigte schließlich nach 24 Stunden Hypoxie in dem durchgeführten *One-way-Anova* Test einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) zur Normoxie. (Abb. 1A+C).

Für die Messung auf Proteinebene mittels Western Blot wurden Caco-2 Zellen in Normoxie mit Caco-2 Zellen nach 24 Stunden Hypoxie verglichen (Abb. 1B+D). Für die Messungen wurden jeweils fünf voneinander unabhängige Caco-2 Zellpopulationen verwendet. Die Expression von Sema4D stieg nach 24 Stunden Hypoxie ( $1,18 \pm \text{SEM } 0,14$ ) im Vergleich zur Normoxie ( $0,86 \pm \text{SEM } 0,12$ ) leicht an, der Unterschied war im durchgeführten *unpaired t-test* jedoch nicht signifikant. Die Expression von PlxnB1 in Normoxie ( $1,18 \pm \text{SEM } 0,06$ ) nahm

nach 24 Stunden Hypoxie im durchgeführten *unpaired t-test* ( $p < 0,01$ ) signifikant ab auf  $0,86 (\pm \text{SEM } 0,07)$ .

Damit zeigte sich *in vitro* in Caco-2 Darmepithelzellen sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene eine Abnahme der PlxnB1-Expression, für Sema4D konnte hingegen eine leichte, jedoch nicht signifikante, Zunahme der Proteinexpression auf einen hypoxischen Reiz gezeigt werden.



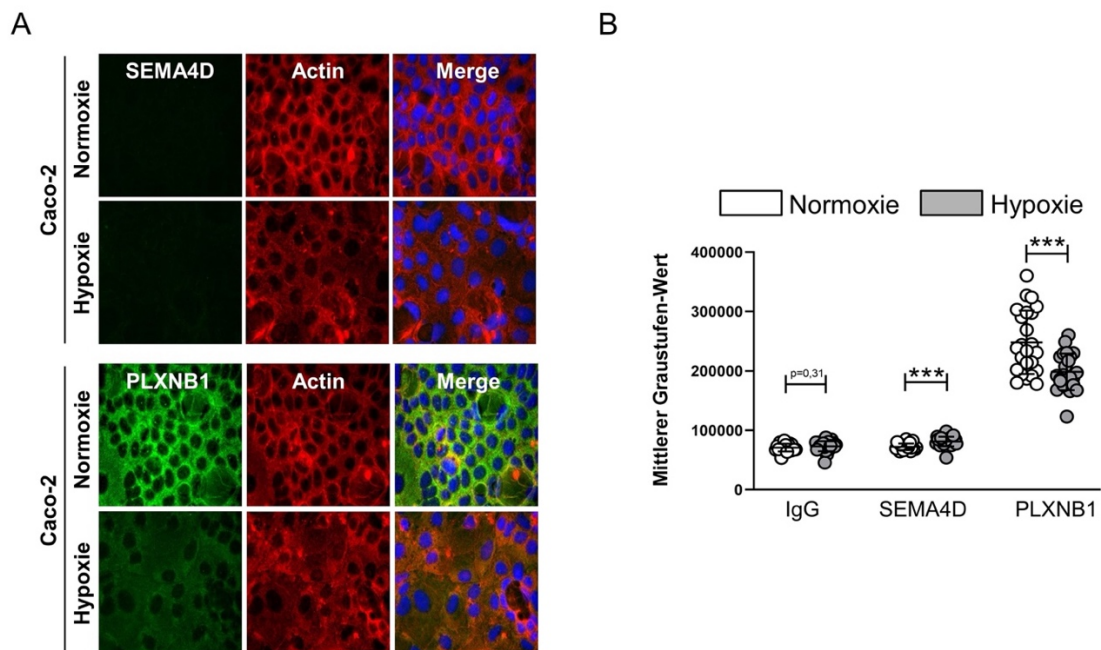
**Abbildung 1: Expression von Sema4D und PlxnB1 in Caco-2-Zellen in Normoxie und Hypoxie.** Dargestellt ist die Expression von Sema4D und PlxnB1 in Caco-2-Zellen während Normoxie und Hypoxie über Zeit. A+C: relative mRNA-Expression, detektiert mittels qRT-PCR. B+D: Relative Proteinmenge ermittelt durch die densitometrische Vermessung der Proteinbanden in Western Blots.

Die Caco-2 Zellen wurden daraufhin mittels Antikörper auf Sema4D und PlxnB1 und fluoreszierenden Sekundärantikörpern gefärbt, um die Position der Proteine, und den Unterschied der Expression zwischen Normoxie und Hypoxie visuell darzustellen (Abb. 2A). Es zeigte sich für PlxnB1 eine deutliche Reduktion der

Expression im Sinne einer verminderten Färbung der Zellen. Sema4D hingegen war kaum auf den Zellen anzufärben.

Es wurden zur besseren Objektivierbarkeit mittels Mean Gray Value Messungen die Intensitäten der Fluoreszenz und damit korrelierend die Menge der Antikörperbindung auf den Zellen pro Bildausschnitt auf dem Zellrasen gemessen und in Abbildung 2B dargestellt. Es zeigte sich für die Kontrollfärbung mittels IgG-Antikörper kein signifikanter Unterschied der Intensität zwischen Normoxie ( $70922 \pm \text{SEM } 1335$ ) und Hypoxie ( $73168 \pm \text{SEM } 1748$ ). Für Sema4D hingegen zeigte sich im *unpaired t-test* ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,001$ ) der Expression in Normoxie ( $72247 \pm \text{SEM } 1129$ ) zu Hypoxie ( $81147 \pm \text{SEM } 1664$ ). Jedoch ist anzumerken, dass sich die Intensität nicht signifikant von der Intensität der IgG-Kontrolle unterscheidet, sondern eine ähnliche Intensität zeigt. Die Expression von PlxnB1 reduziert sich im *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,001$ ) von Normoxie ( $248123 \pm \text{SEM } 10920$ ) im Vergleich zu Hypoxie ( $198238 \pm \text{SEM } 6276$ ).

Somit zeigte sich auch in den Immunfluoreszenzfärbungen eine Abnahme der PlxnB1 Expression auf den Caco-2 Darmepithelzellen, Sema4D war hingegen nicht stärker als die Kontrollfärbung mit IgG anzufärben.



**Abbildung 2: Immunfluoreszenzfärbung von Caco-2-Zellen und Mean Gray Value-Analyse.** A: repräsentative Bildauswahl. Kernfärbung mit DAPI (blau), Zytoskelett Aktin (rot), Zielproteine Sema4D und

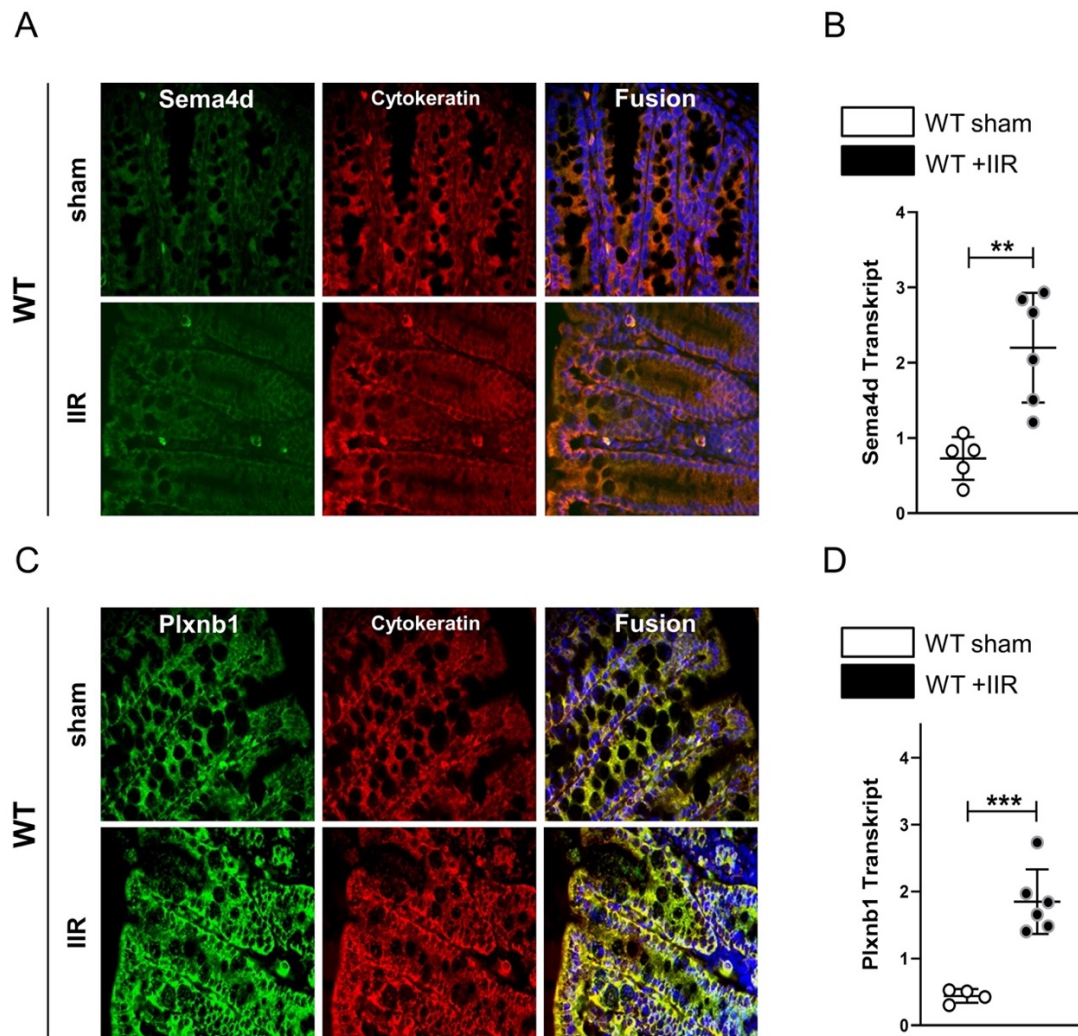
PlxnB1 (grün) in Hypoxie nach 24 Stunden und Normoxie. B: Mean Gray Value Messung pro Bildausschnitt, n=12 bei 3 verschiedenen Färbungen.

### **3.2 Expression von Sema4D und PlxnB1 nach intestinaler I/R in-vivo**

Anschließend wurden die in-vivo Experimente durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die oben gezeigten Hypoxie-Ergebnisse der Caco-2 Zellen auch im mesenterialen I/R-Modell der Maus bestätigen. Die I/R Gruppe erhielt wie bereits oben beschrieben die Operation mit 15-minütigem Verschluss der SMA mit anschließender 180-minütiger Reperfusion. Die Sham Gruppe wurde bis auf die Okklusion der SMA identisch behandelt.

Im Gegensatz zu den Zellversuchen stieg die mRNA-Expression von Sema4D im Dickdarm auf mRNA-Ebene in der I/R Gruppe ( $2,2 \pm \text{SEM } 0,30$ ) im Gegensatz zur Sham Gruppe ( $0,73 \pm \text{SEM } 0,13$ ) im *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,01$ ) an (Abb. 3B). Auch die mRNA-Expression von PlxnB1 nahm von der Sham Gruppe ( $0,44 \pm \text{SEM } 0,05$ ) zur I/R Gruppe ( $1,85 \pm \text{SEM } 0,20$ ) im *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,001$ ) zu (Abb. 3D).

Zusätzlich wurden aus drei Dickdärmen pro Gruppe Immunfluoreszenzfärbungen erstellt (Abb. 3A+C). Auch hier ist eine erhöhte Expression sowohl von Sema4D als auch PlxnB1 zu erkennen. PlxnB1 zeigt dabei eine Überlagerung mit der Cytokeratin Gewebefärbung und ist daher in den fusionierten Bildern als Gelbton zu erkennen, wohingegen Sema4D verstärkt auf Zellen innerhalb des Darmgewebes exprimiert zu sein scheint. Dieses Phänomen ist vor allem im Dickdarm nach I/R zu beobachten.



**Abbildung 3: Immunfluoreszenzfärbung und mRNA-Expression von Sema4D und PlxnB1 bei intestinaler I/R in-vivo.** A+C: Immunfluoreszenzfärbung des Dickdarms von WT (C57BL/6) Mäusen, repräsentative Bildauswahl, n=3. Kernfärbung mit DAPI (blau), Zytoskelett Cytokeratin (rot), Zielproteine Sema4D und PlxnB1 (grün) nach Ischämie-Reperfusion (15/180min). Aufnahmen mit 20facher Vergrößerung. B+D: relative mRNA-Expression im Mucosal Scraping des Dickdarms, detektiert mittels qRT-PCR.

### 3.3 Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Inflamationsreaktion nach intestinaler I/R

Um den Einfluss von Sema4D und PlxnB1 beziehungsweise deren Knockouts in den Versuchstieren auf die Inflamationsreaktion in-vivo zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt mittels ELISA im Blut und qRT-PCR aus den Mucosal Scrapings des Dickdarms verschiedene Zytokine gemessen. Das Versuchsmodell ist in Kapitel 2.2.2.1. beschrieben.

Für IL-6, gemessen mittels ELISA im Blut der Versuchstiere (Abb. 4A), zeigte sich für WT (BALB/c) im durchgeführten *unpaired t-test* ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) der Werte von der Sham Gruppe ( $344,9 \pm \text{SEM } 89,6$ ) zur I/R Gruppe ( $1335 \pm \text{SEM } 256,3$ ). Dieser signifikante Anstieg blieb bei den Vergleichsgruppen Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> aus. Hier zeigte sich für Sema4d<sup>-/-</sup> - Mäuse nur ein geringer Anstieg von Sham ( $411,7 \pm \text{SEM } 64,7$ ) zu I/R ( $429,5 \pm \text{SEM } 72,19$ ). Auch bei den Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> - Versuchstieren kam es zwischen der Sham Gruppe ( $176,4 \pm \text{SEM } 78,5$ ) und der I/R Gruppe ( $297,6 \pm \text{SEM } 105,8$ ) zu keinem signifikanten Anstieg. Die Werte von IL-6 lagen hier im Schnitt deutlich niedriger als bei den anderen Vergleichsgruppen. Beim Vergleich der Inflammationsreaktionen zeigt sich in den durchgeführten *unpaired t-tests* jeweils ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,01$ ) von der WT (BALB/c) I/R Gruppe zu den IR Gruppen von Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup>. Somit war das gemessene IL-6 im Blut in der WT (BALB/c) Gruppe nach I/R für diese Vergleichsgruppe am höchsten.

Für die andere Vergleichsgruppe zwischen WT (C57BL/6) und Plxnb1<sup>-/-</sup> konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den I/R Gruppen, jedoch eine geringere Menge in den Plxnb1<sup>-/-</sup> Versuchstieren gezeigt werden. Die IL-6 Menge im Blut betrug in der WT (C57BL/6) Sham Gruppe  $274 (\pm \text{SEM } 70,5)$  und stieg nach I/R im durchgeführten *unpaired t-test* nicht signifikant auf  $481,6 (\pm \text{SEM } 132,7)$  an. Für die Plxnb1<sup>-/-</sup> Mäuse konnte von der Sham Gruppe ( $112,3 \pm \text{SEM } 3,9$ ) im Vergleich zur I/R Gruppe ( $300,2 \pm \text{SEM } 30,8$ ) im *unpaired t-test* ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,001$ ) gezeigt werden.

Für die IL-6 Expression auf mRNA-Ebene im Dickdarm (Abb. 4B) konnten ähnliche Tendenzen wie bei der Messung mittels ELISA im Blut gezeigt werden, jedoch bis auf den Anstieg der IL-6 Expression in der Sema4d<sup>-/-</sup> I/R Gruppe im Vergleich zur Sham Gruppe ohne weitere Signifikanzen aufzuweisen ( $p < 0,5$ ).

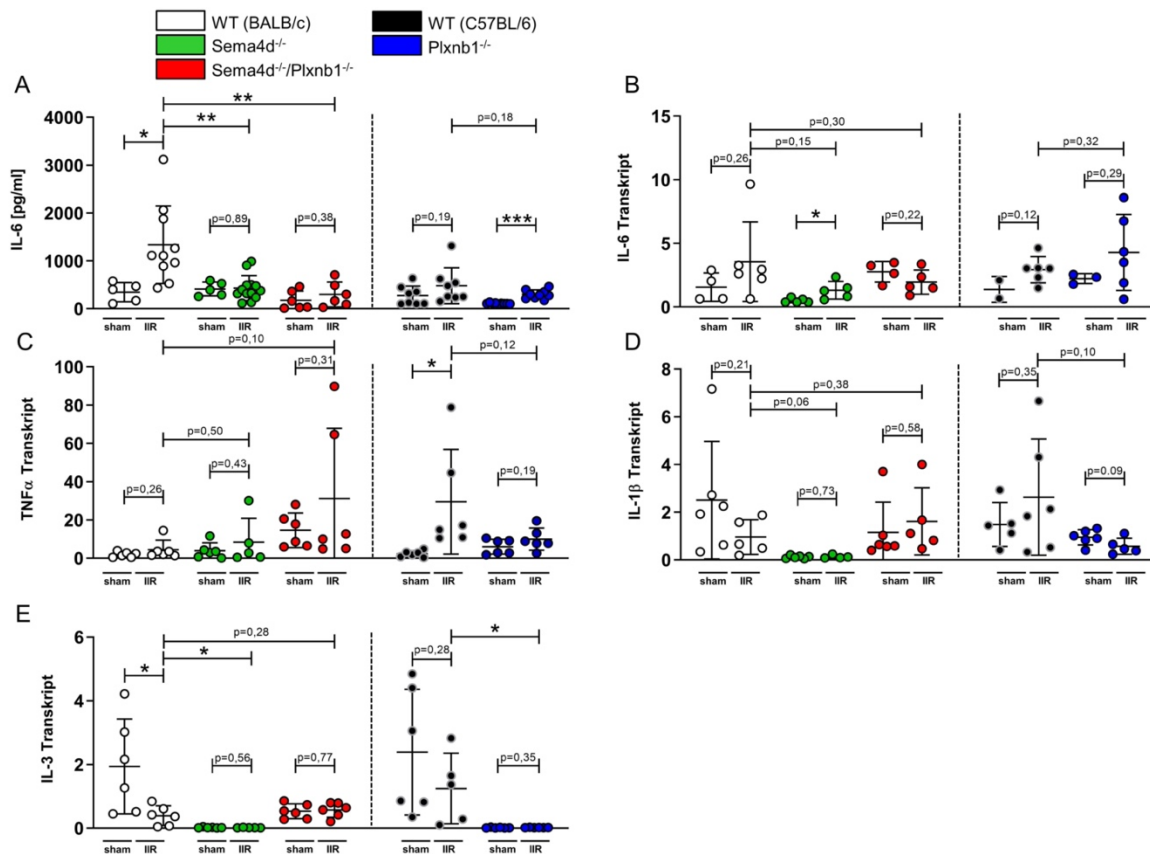
Für die TNF $\alpha$  Expression (Abb. 4C) zeigten sich in der Vergleichsgruppe um WT (BALB/c) keine signifikanten Unterschiede. In der Gruppe WT (C57BL/6) zeigte sich im durchgeführten *unpaired t-test* jedoch ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) der TNF $\alpha$  Expression auf mRNA-Ebene im Dickdarm von Sham ( $2,27 \pm \text{SEM}$

0,68) zu I/R ( $29,46 \pm \text{SEM } 11,15$ ). Dieser Anstieg konnte in der  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  Gruppe nicht gezeigt werden. Der Vergleich beider I/R Gruppen zeigte im durchgeführten *unpaired t-test* eine nicht signifikant ( $p=0,12$ ) unterschiedliche, niedrigere  $\text{TNF}\alpha$  Expression von  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  I/R ( $9,94 \pm \text{SEM } 2,35$ ) im Gegensatz zu WT (C57BL/6) I/R (siehe oben).

Auch bei der Messung der IL-1 $\beta$  Expression auf mRNA-Ebene im Dickdarm (Abb. 4D) zeigten sich nach I/R nicht signifikant verminderte Expressionen in den Knockout Versuchstieren  $\text{Sema4d}^{-/-}$  im Vergleich zu WT (BALB/c) ( $p=0,06$ ) oder  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  zu WT (C57BL/6) ( $p=0,10$ ).

Für die IL-3 Expression auf mRNA-Ebene im Dickdarm (Abb. 4E) zeigte sich im durchgeführten *unpaired t-test* eine signifikante Reduktion ( $p<0,05$ ) der Expression von WT (BALB/c) Sham ( $1,94 \pm \text{SEM } 0,61$ ) zu I/R ( $0,39 \pm \text{SEM } 0,13$ ). Diese konnte weder in der  $\text{Sema4d}^{-/-}$  noch in der  $\text{Sema4d}^{-/-}/\text{Plxnb1}^{-/-}$  Gruppe gezeigt werden. Im Vergleich der I/R Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ( $p<0,05$ ) in der Expression zwischen WT (BALB/c) I/R (siehe oben) zu  $\text{Sema4d}^{-/-}$  I/R ( $0,02 \pm \text{SEM } 0,003$ ). Ähnliche Tendenzen konnten auch in der Vergleichsgruppe um WT (C57BL/6) gezeigt werden; hier war der Unterschied zwischen Sham ( $2,39 \pm \text{SEM } 0,14$ ) und I/R ( $1,24 \pm \text{SEM } 0,49$ ) zwar nicht signifikant, jedoch zeigte sich im Vergleich von WT (C57BL/6) I/R zu  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  I/R ( $0,02 \pm \text{SEM } 0,002$ ) eine signifikant niedrigere ( $p<0,05$ ) IL-3 Expression in der  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  I/R Gruppe.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Expressionen der Zytokine IL-6, IL-1 $\beta$  und IL-3 auf mRNA-Ebene in den  $\text{Sema4d}^{-/-}$  Versuchstieren nach I/R geringer ist als beim entsprechenden Wildtyp BALB/c. Für  $\text{TNF}\alpha$  gilt diese Beobachtung auch zwischen  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  und C57BL/6.



**Abbildung 4: Zytokine im Blut und im Darm von WT- und KO-Mäusen.** Dargestellt sind A: die durch ELISA gemessene Menge an IL-6 im Blut und durch qRT-PCR gemessene mRNA-Expression von B: IL-6, C: TNF $\alpha$ , D: IL-1 $\beta$ , E: IL-3 im Mucosal Scraping des Dickdarms der WT- und KO-Mäuse, jeweils normalisiert auf die jeweilige Kontrollgruppe.

### 3.4 Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die leukozytäre Infiltration ins Intestinum nach I/R

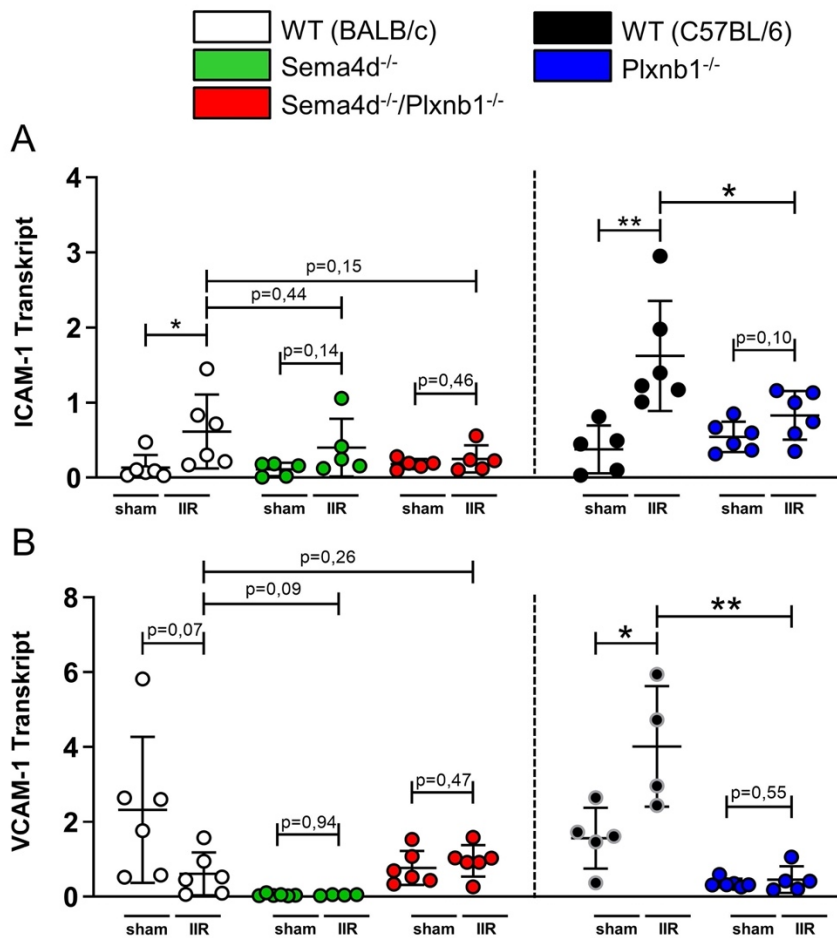
Nachdem eine veränderte Inflamationsreaktion in den Knockout-Versuchstieren festgestellt wurde, wurden sowohl die Expressionen der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf mRNA-Ebene im Dickdarm gemessen, als auch eine semiquantitative Zählung der in den Dünndarm transmigrierten PMNs durchgeführt, um das Verhalten der Neutrophilen auf den Darm nach I/R zeigen und untereinander vergleichen zu können.

Für die Expression von ICAM-1 (Abb. 5A) auf mRNA-Ebene im Dickdarm zeigte sich im durchgeführten *unpaired t-test* ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) von der WT (BALB/c) Sham Gruppe ( $0,13 \pm \text{SEM } 0,07$ ) zur I/R Gruppe ( $0,61 \pm \text{SEM } 0,20$ ). Dieser konnte in den Vergleichsgruppen Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup>

zwischen Sham und I/R jedoch nicht gezeigt werden. Die Expressions-Werte nach I/R blieben bei Sema4d<sup>-/-</sup> ( $0,40 \pm \text{SEM } 0,17$ ) und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> ( $0,25 \pm \text{SEM } 0,08$ ) jeweils niedriger als bei der Vergleichsgruppe WT (BALB/c) I/R (siehe oben), waren jedoch nicht signifikant. Für WT (C57BL/6) konnte im *unpaired t-test* ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,01$ ) von der Sham Gruppe ( $0,38 \pm \text{SEM } 0,14$ ) im Vergleich zur I/R Gruppe ( $1,62 \pm \text{SEM } 0,30$ ) gezeigt werden. Dieser signifikante Unterschied blieb in der Vergleichsgruppe Plxnb1<sup>-/-</sup> zwischen Sham und I/R aus. Hier zeigte sich im *unpaired t-test* ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) in der ICAM-1 Expression zwischen den I/R Gruppen von WT (C57BL/6) (siehe oben) und Plxnb1<sup>-/-</sup> ( $0,83 \pm \text{SEM } 0,13$ ), mit einer deutlich niedrigeren Expression bei Plxnb1<sup>-/-</sup> I/R.

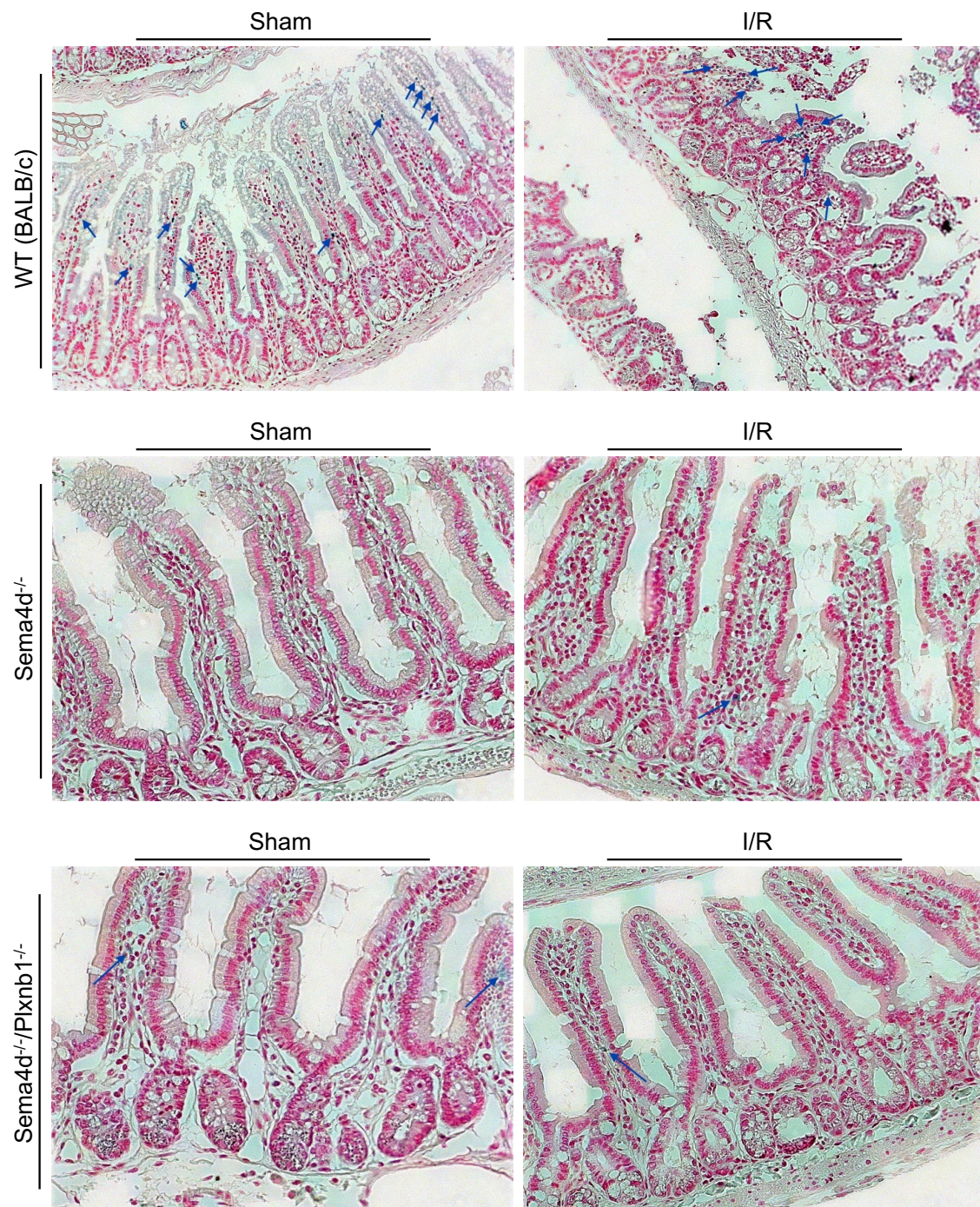
Für die Expression von VCAM-1 (Abb. 5B) auf mRNA-Ebene im Dickdarm zeigte sich eine deutliche, wenn auch nicht signifikant ( $p = 0,07$ ) erniedrigte Expression im Vergleich von WT (BALB/c) Sham ( $2,32 \pm \text{SEM } 0,80$ ) zu I/R ( $0,61 \pm \text{SEM } 0,23$ ). Auch hier konnten sich keine deutlichen Unterschiede zwischen Sham und I/R in den Vergleichsgruppen Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> finden. Im Vergleich von WT (BALB/c) I/R (siehe oben) zu Sema4d<sup>-/-</sup> I/R ( $0,96 \pm \text{SEM } 0,29$ ) zeigte sich eine deutlich geringere, wenn auch nicht signifikante ( $p = 0,09$ ) Expression bei Sema4d<sup>-/-</sup> I/R. Im Vergleich dazu kam es bei WT (C57BL/6) zu einer signifikant ( $p < 0,01$ ) höheren Expression von VCAM-1 in der I/R Gruppe ( $4,01 \pm \text{SEM } 0,81$ ) im Vergleich zur Sham Gruppe ( $1,56 \pm \text{SEM } 0,36$ ). Dieser signifikante Unterschied konnte in der Vergleichsgruppe Plxnb1<sup>-/-</sup> zwischen Sham und I/R nicht gezeigt werden. Insgesamt war die VCAM-1 Expression in der WT (C57BL/6) I/R Gruppe (siehe oben) im *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in der Plxnb1<sup>-/-</sup> I/R Gruppe ( $0,45 \pm \text{SEM } 0,16$ ).

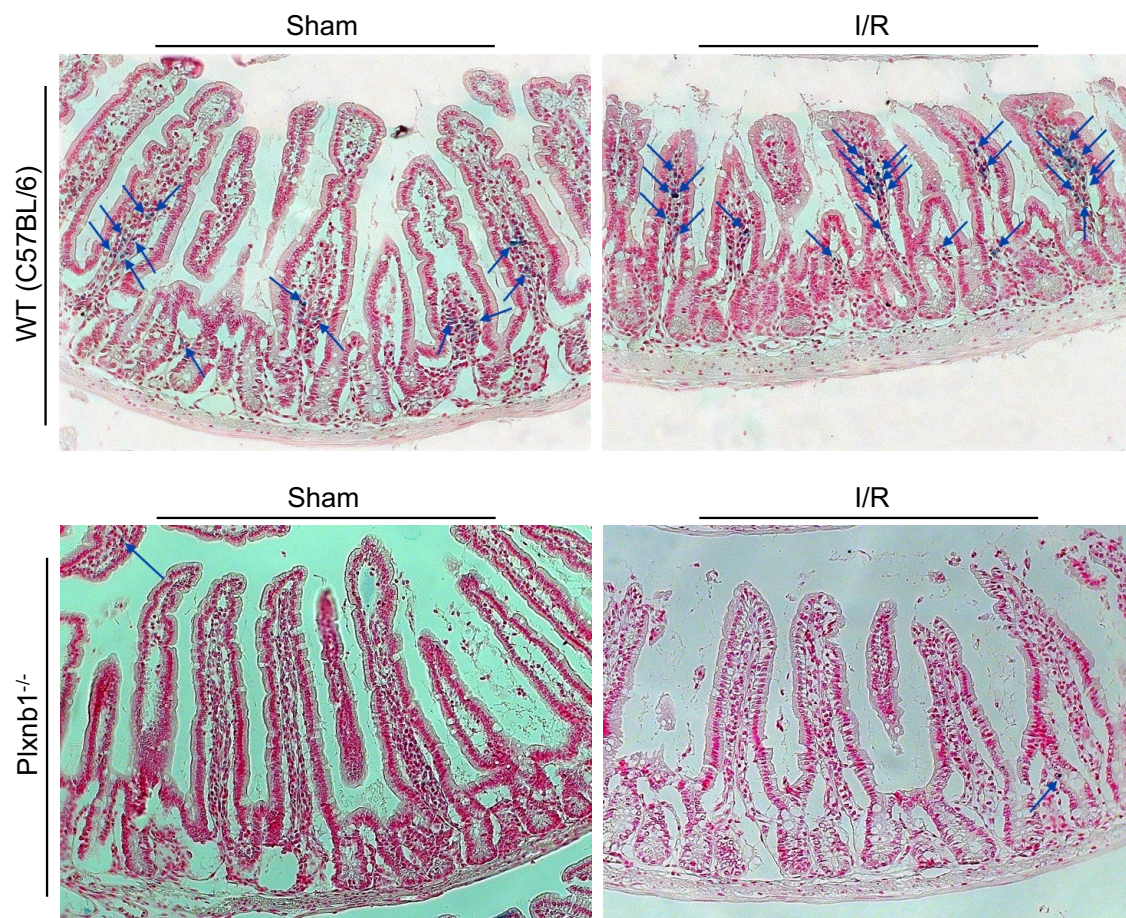
Zusammenfassend war die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 auf mRNA-Ebene im Dickdarmepithel in den Knockout-Versuchstieren Sema4d<sup>-/-</sup> und Plxnb1<sup>-/-</sup> nach I/R geringer als bei ihren jeweiligen Wildtypen.



**Abbildung 5: mRNA-Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in WT- und KO-Mäusen.** Dargestellt sind die durch qRT-PCR gemessenen mRNA-Expressionen in Mucosal Scrapings des Dickdarms der WT- und KO-Mäuse von A: ICAM-1 und B: VCAM-1, jeweils normalisiert auf die Kontrollgruppe.

Für die semiquantitative Darstellung der Anzahl der PMNs pro Bildausschnitt im Jejunum der Versuchstiere wurde, wie in Kapitel 2.2.7. beschrieben, eine Färbung der PMNs mittels Ly6G-AK hergestellt. Die Gegenfärbung des Gewebes erfolgte mittels Fast Nuclear Red. Die dunkelblau gefärbten PMNs wurden mit blauen Pfeilen zur besseren Übersicht markiert.





**Abbildung 6: IHC-Färbung des Dünndarms.** PMNs sind blau angefärbt und mit blauen Pfeilen markiert. Repräsentative Bildauswahl, n=3. PMN-Färbung mittels Ly6G-AK und Histo-Green (blau), Gewebe mittels Fast Nuclear Red (rot). Aufnahmen mit 20facher Vergrößerung.

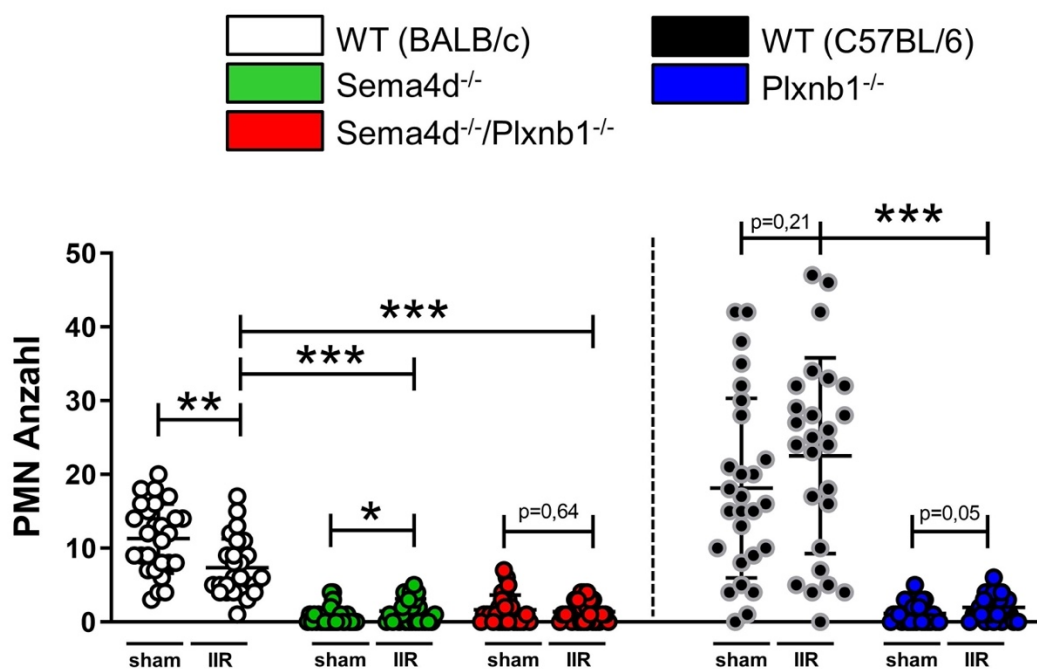
Für jede Gruppe wurden drei Versuchstiere verwendet. Aus jedem Darm der Versuchstiere wurden drei Schnitte erstellt und gefärbt. In jedem Schnitt wurden drei unabhängige Bilder erstellt und in den Bildausschnitten die PMNs gezählt (Abb. 7).

Für WT (BALB/c) zeigte sich eine nicht signifikante Abnahme der PMNs zwischen Sham ( $10,81 \pm \text{SEM } 0,76$ ) und I/R ( $8,82 \pm \text{SEM } 0,80$ ). Für Sema4d<sup>-/-</sup> zeigte sich im durchgeführten *unpaired t-test* eine signifikante ( $p < 0,01$ ) Zunahme der PMN zwischen Sham ( $0,04 \pm \text{SEM } 0,04$ ) und I/R ( $0,96 \pm \text{SEM } 0,29$ ).

Für die Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> Gruppe zeigte sich im Vergleich von Sham ( $1,74 \pm \text{SEM } 0,50$ ) zu I/R ( $0,52 \pm \text{SEM } 0,18$ ) im *unpaired t-test* eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Abnahme der PMN im Jejunum der Versuchstiere. Jedoch blieb im Vergleich der

I/R Gruppen der Knockouts  $\text{Sema4d}^{-/-}$  und  $\text{Sema4d}^{-/-}/\text{Plxnb1}^{-/-}$  zu WT (BALB/c) I/R die Anzahl der PMNs in den Knockouts im *unpaired t-test* jeweils signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger. Für die WT (C57BL/6) Gruppe hingegen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der PMN zwischen Sham ( $14,7 \pm \text{SEM } 2,07$ ) und I/R ( $22,78 \pm \text{SEM } 2,92$ ). In der  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  Vergleichsgruppe kam es hingegen zu einem leichten, nicht signifikanten Abfall der Anzahl der PMNs von Sham zu I/R. Auch hier zeigte der Vergleich beider I/R Gruppen im *unpaired t-test* eine signifikant ( $p < 0,001$ ) niedrigere Anzahl von PMN im Jejunum der  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  Versuchstiere ( $0,78 \pm \text{SEM } 0,26$ ) zum WT (C57BL/6).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sowohl in den Sham Gruppen der Knockout-Versuchstiere als auch nach I/R deutlich weniger PMNs im Jejunum zu finden waren, als bei den WT Vergleichsgruppen.



**Abbildung 7: Anzahl der PMN im Jejunum.** Dargestellt ist die Anzahl der PMN pro Gesichtsfeld, n=3, 3 Schnitte pro Versuchstier, pro Schnitt 3 Bilder.

### **3.5 Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf den intestinalen Schaden nach I/R**

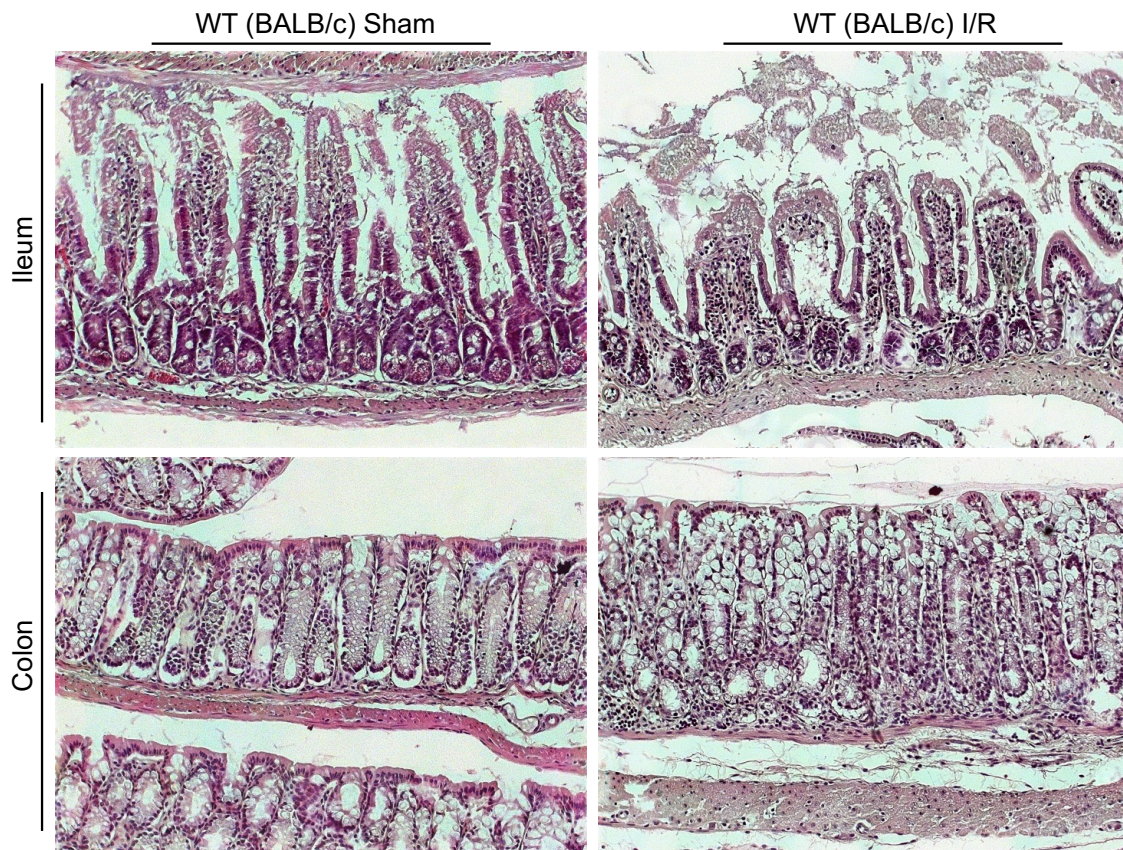
Um nach dem veränderten Inflammationsgeschehen den Schaden der I/R auf den Darm zwischen den verschiedenen Gruppen zu untersuchen, wurden HE-Färbungen hergestellt, um den Schaden auf das Darmgewebe histologisch darzustellen. Außerdem wurden die Enzyme ALT und AST als sekundäre Schadensmarker im Blut der Versuchstiere gemessen.

In den HE-Färbungen der Sham Versuchstiere fällt auf, dass die Mukosa in den meisten Aufnahmen der Submukosa direkt aufliegt und kein subepithelialer Raum vorhanden ist. Lediglich in den Gruppe WT (BALB/c) Sham (Abb. 8) und Sema4d<sup>-/-</sup> Sham (Abb. 9) sind im Jejunum unter den Villispitzen kleine subepitheliale Räume zu finden. Diese erstrecken sich jedoch in den meisten Fällen nicht an den Seiten der Villi entlang bis zur Muscularis, sondern sind auf den Raum unter den Zottenspitzen beschränkt. Auch finden sich in der Gruppe WT (BALB/c) Sham im Jejunum an den Spitzen der Villi schwächer angefärbte Enterozyten, welche jedoch noch deutlich voneinander zu unterscheiden sind. In den Gruppen Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> Sham (Abb. 10), WT (C57BL/6) Sham (Abb. 11) und Plxnb1<sup>-/-</sup> Sham (Abb. 12) liegt im Jejunum in jeder Gruppe die Mukosa fest der Submukosa an, es finden sich hier keine subepithelialen Räume beziehungsweise von der Submukosa abgehobene Mukosa und es besteht auch eine durchgehend intakte Mukosa über dem darunterliegenden Bindegewebe der Submukosa.

In den HE-Färbungen des Dickdarms aller Sham Gruppen findet sich eine durchgehend intakte Mukosa ohne Verlust der Zellintegrität, keine Abhebungen der darunterliegenden Submukosa, keine Einblutungen oder andere Zeichen einer histologisch nachweisbaren Schädigung des Darmgewebes.

Der größte histologische Schaden ist in der Gruppe WT(BALB/c) I/R (Abb. 8) im Jejunum zu sehen. Hier sind die Villi verkürzt, die Mukosa ist deutlich von der Submukosa abgehoben, der Spalt erstreckt sich bis in die Krypten und zur Muscularis hinab, und die Enterozyten an den Spitzen der Darmzotten sind nicht mehr deutlich gefärbt beziehungsweise voneinander abzugrenzen. In vielen

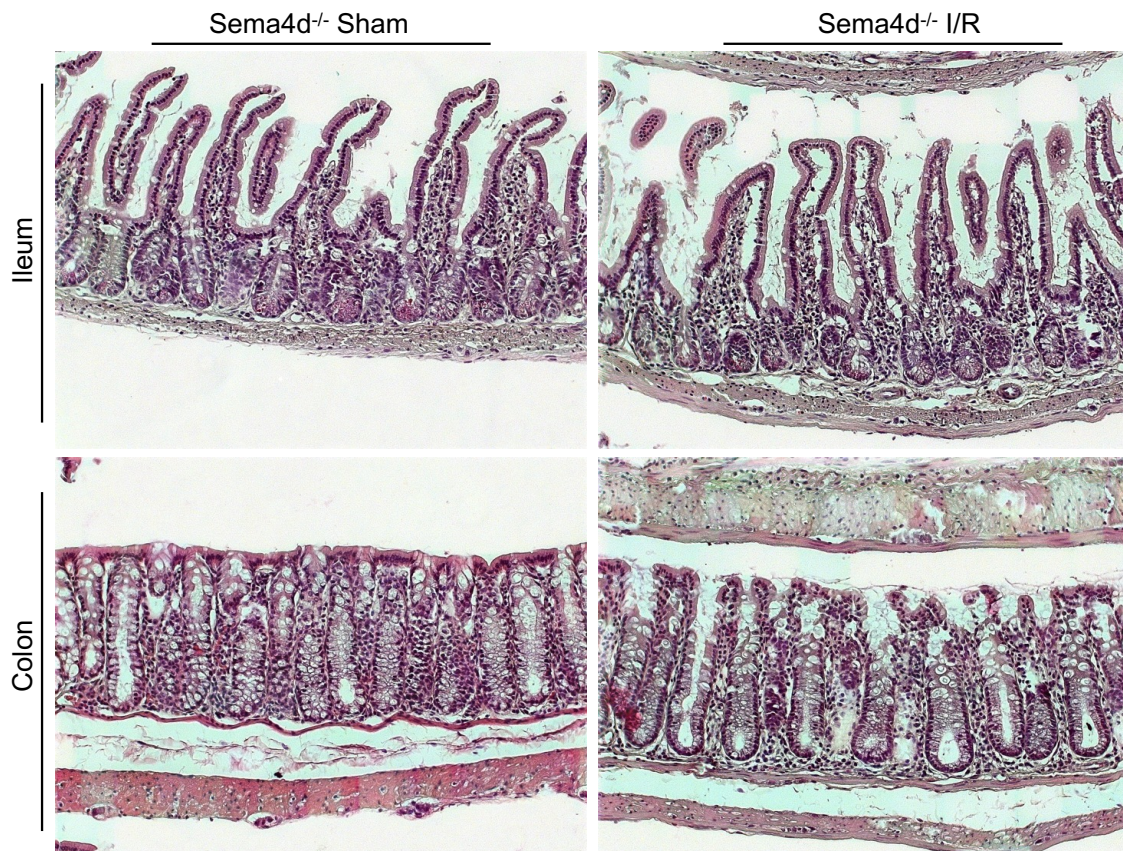
Fällen liegen Darmzotten frei von Mukosa dar, die ins Darmlumen abgeschilfert wurde. Der Dickdarm hingegen zeigt an der Mukosa nur geringe Veränderungen, an manchen Stellen zeigt die Mukosa eine Verletzung im Sinne einer Ablösung von der Submukosa, es sind aber keine subepithelialen Räume zu erkennen. Generell zeigt sich hier vor allem die Submukosa nach I/R zellreicher als beim Sham Dickdarm.



**Abbildung 8: Hämatoxylin-Eosin Färbung von WT (BALB/c) Darmschnitten.** Dargestellt sind das Colon und Ileum von WT (BALB/c) Mäusen nach Sham und I/R. Repräsentative Bildauswahl, n=3. Aufnahmen in 20facher Vergrößerung.

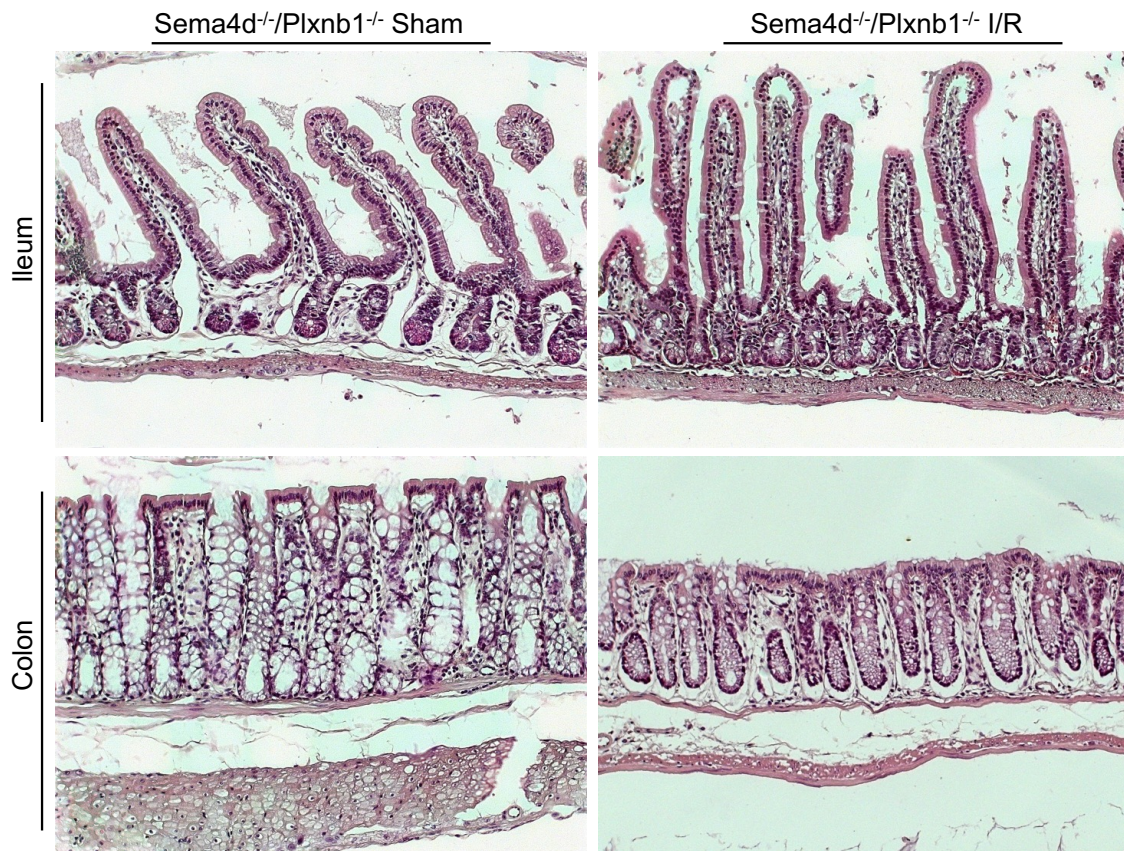
In der Gruppe um Sema4d<sup>-/-</sup> I/R (Abb. 9) zeigen sich im Jejunum die subepithelialen Räume etwas deutlicher ausgeprägt und reichen auch an den Villi weiter in Richtung Muscularis, jedoch sind weniger Zottenspitzen denudiert. Auch hier zeigt sich im Dickdarm histologisch nur wenig Veränderung im Vergleich zum Sham Dickdarm der Sema4d<sup>-/-</sup> Versuchstiere, an einigen wenigen Stellen zeigen

sich aufgerissene Stellen in der Mukosa des Dickdarms, jedoch ohne subepitheliale Spaltbildung, Ulzerationen oder Schäden in den tiefen Krypten.



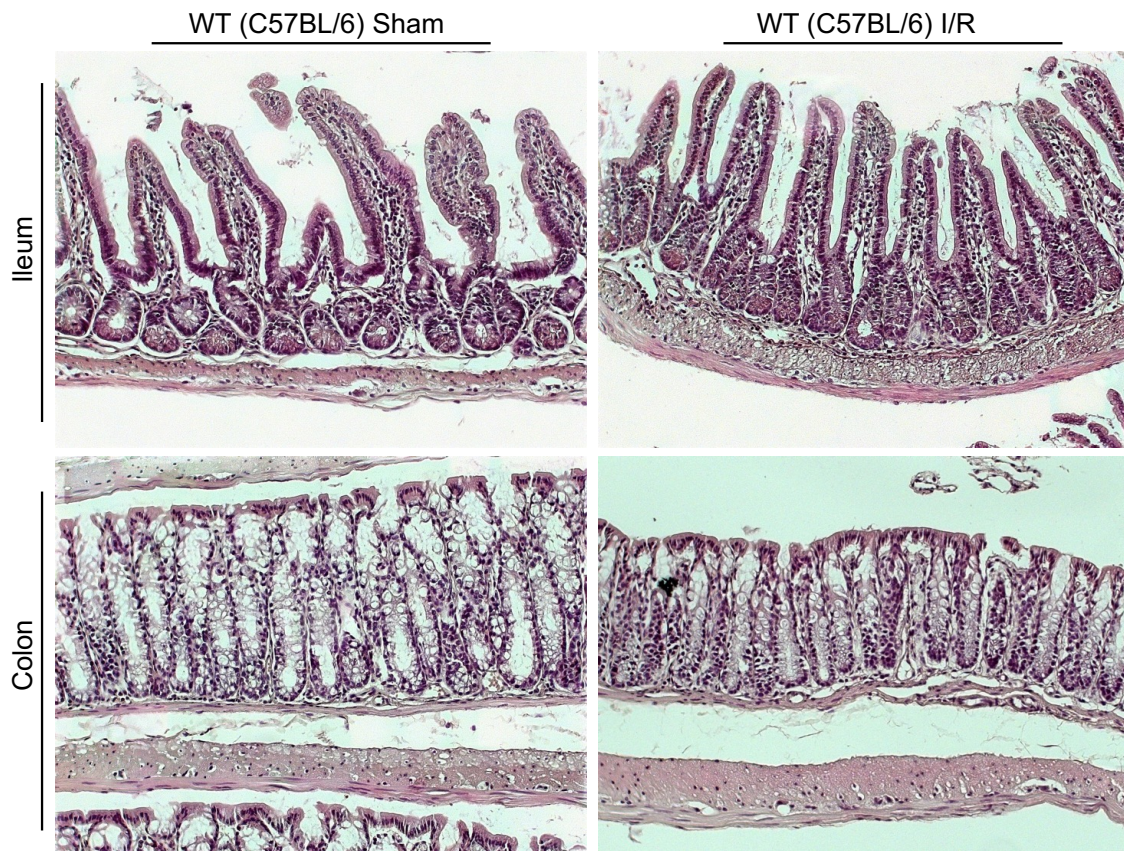
**Abbildung 9: Hämatoxylin-Eosin Färbung von Sema4d<sup>-/-</sup> Darmschnitten.** Dargestellt sind das Colon und Ileum von Sema4d<sup>-/-</sup> Mäusen nach Sham und I/R. Repräsentative Bildauswahl, n=3. Aufnahmen in 20facher Vergrößerung.

In der Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> Gruppe (Abb. 10) zeigen sich im Jejunum nach I/R im Vergleich zu Sham lediglich kleine subepitheliale Räume unter den Zottenspitzen. Auch der I/R Dickdarm zeigt im Vergleich zum Sham Dickdarm keine histologisch sichtbaren Verletzungen.



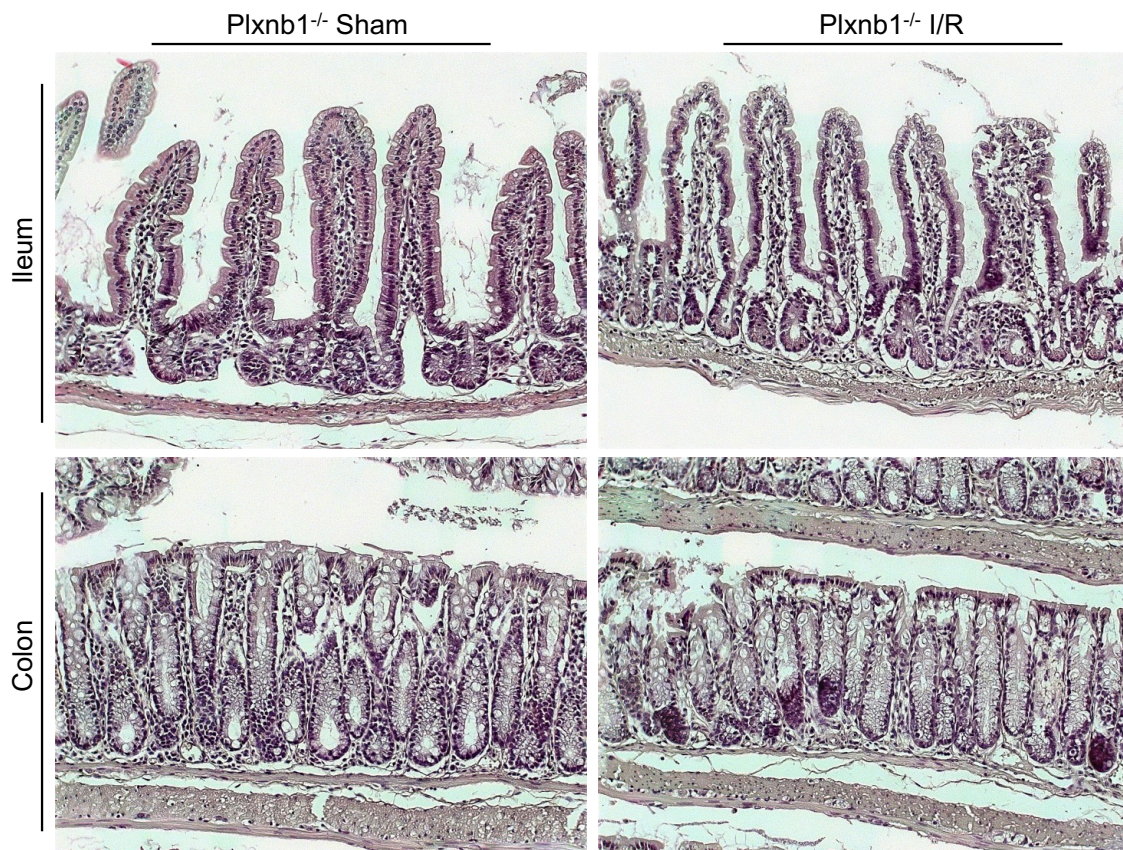
**Abbildung 10: Hämatoxylin-Eosin Färbung von *Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup>* Darmschnitten.** Dargestellt sind das Colon und Ileum von *Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup>* Mäusen nach Sham und I/R. Repräsentative Bildauswahl, n=3. Aufnahmen in 20facher Vergrößerung.

Im WT (C57BL/6) zeigen sich im Dünndarm nach I/R (Abb. 11) neben einzelnen denudierten Villi vor allem subepitheliale Räume mit leicht angehobener Mukosa, die sich aber meistens auf die Zottenspitzen beschränken. Im Dickdarm zeigt sich histologisch keine Veränderung im Vergleich zum Sham Dickdarm.



**Abbildung 11: Hämatoxylin-Eosin Färbung von WT (C57BL/6) Darmschnitten.** Dargestellt sind das Colon und Ileum von WT(C57BL/6) Mäusen nach Sham und I/R. Repräsentative Bildauswahl, n=3. Aufnahmen in 20facher Vergrößerung.

Auch an den Villi im Jejunum der  $Plxnb1^{-/-}$  (Abb. 12) zeigt sich gelegentlich eine Abhebung der Mukosa und der damit entstehende subepitheliale Raum erstreckt sich oft über die Seiten der Zotten bis in die Krypten in Richtung Muscularis. Es zeigen sich ab und an denudierte Zottenspitzen, d.h. hier liegt die Lamina propria mucosae frei und ist nicht mehr von Enterozyten bedeckt. Im Dickdarm der  $Plxnb1^{-/-}$  Versuchstiere zeigen sich gelegentlich Risse in der Mukosa mit Abschilferung, jedoch ohne erkennbaren Schaden in den Krypten.

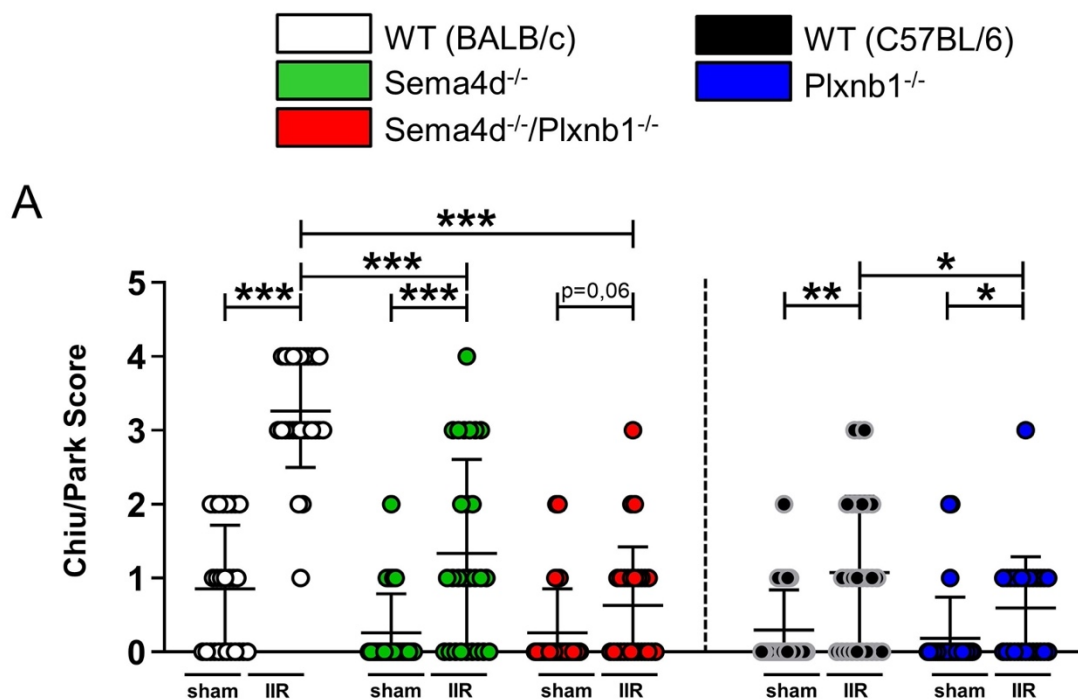


**Abbildung 12: Hämatoxylin-Eosin Färbung von Plxnb1<sup>-/-</sup> Darmschnitten.** Dargestellt sind das Colon und Ileum von Plxnb1<sup>-/-</sup> Mäusen nach Sham und I/R. Repräsentative Bildauswahl, n=3. Aufnahmen in 20facher Vergrößerung.

Um eine objektive Darstellung und Vergleichbarkeit des intestinalen Schadens im Dünndarm der unterschiedlichen Gruppen zu ermöglichen, wurden HE-Bilder mit dem Chiu-Park-Score [139] bewertet (Abb. 13). Für die WT (BALB/c) Sham Gruppe zeigte sich ein mittlerer Score von 0,85 ( $\pm$  SEM 0,17), in der I/R Gruppe hingegen ein mittlerer Score von 3,26 ( $\pm$  SEM 0,15). Der Unterschied ist im durchgeführten *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,001$ ). Auch für die Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup> zeigte sich im Vergleich von Sham (0,26  $\pm$  SEM 0,10) zu I/R (1,33  $\pm$  SEM 0,24) im durchgeführten *unpaired t-test* ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,001$ ) des Scores. Der Score der Sema4d<sup>-/-</sup> I/R Gruppe war allerdings signifikant ( $p < 0,001$ ) niedriger als im Wildtyp BALB/c I/R. In der Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> zeigte sich ein geringer, nicht signifikanter Anstieg des Scores von Sham (0,26  $\pm$  SEM 0,11) zu I/R (0,63  $\pm$  SEM 0,15). Ebenso war hier der Vergleich zwischen BALB/c I/R und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> I/R im durchgeführten *unpaired t-test*

signifikant ( $p < 0,001$ ) unterschiedlich. In der Gruppe WT (C57BL/6) zeigte sich ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,01$ ) des Chiu-Park Scores im Vergleich von Sham ( $0,30 \pm \text{SEM } 0,10$ ) zu I/R ( $1,07 \pm \text{SEM } 0,20$ ). In der Vergleichsgruppe um  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  zeigte sich ebenso ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,5$ ) von Sham ( $0,19 \pm \text{SEM } 0,10$ ) zu I/R ( $0,59 \pm \text{SEM } 0,13$ ). Jedoch war der Score in der  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  I/R Gruppe signifikant geringer ( $p < 0,05$ ) als in der WT (C57BL/6) I/R Gruppe.

Zusammenfassend zeigte sich nach IR in allen Gruppen ein Anstieg des Scores im Vergleich zur Sham Operation, jedoch war der Score in den Knockout-Versuchstieren deutlich geringer als in den dazugehörigen WT Vergleichsgruppen.



**Abbildung 13: Chiu/Park Score der HE-Färbungen des Dünndarms.** Dargestellt ist der Schweregrad der intestinalen Schädigung im Dünndarm anhand des Chiu-Park-Scores,  $n=3$ , 3 Schnitte pro Versuchstier, 3 Bilder pro Schnitt.

Um den Schaden indirekt über sekundäre Schadensmarker im Serum zu messen und darzustellen, wurden im Blut der Versuchstiere die Aktivität der Enzyme ALT (Abb. 14A) und AST (Abb. 14B) bestimmt.

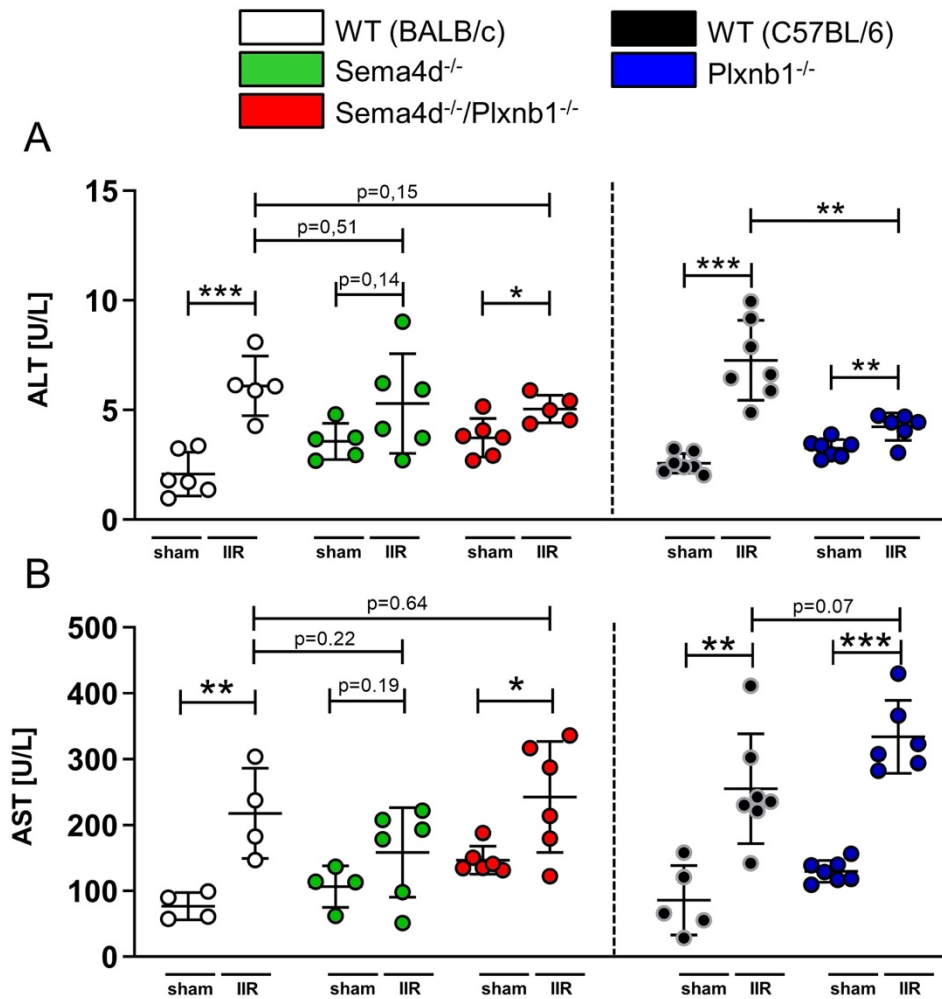
Es zeigte sich für alle Vergleichsgruppen nach I/R ein Anstieg der Enzymaktivitäten sowohl für ALT als auch für AST.

In der Gruppe WT (BALB/c) war der Anstieg der Aktivität von ALT (Abb. 14A) im Serum von Sham ( $2,08 \pm \text{SEM } 0,41$ ) zu I/R ( $6,09 \pm \text{SEM } 0,61$ ) im durchgeführten *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,001$ ), genauso wie in der Gruppe  $\text{Sema4d}^{-/-}/\text{Plxnb1}^{-/-}$  von Sham ( $3,73 \pm \text{SEM } 0,36$ ) zu I/R ( $5,04 \pm \text{SEM } 0,28$ ) ( $p < 0,05$ ). In der Gruppe  $\text{Sema4d}^{-/-}$  zeigte sich von den Sham Versuchstieren ( $3,57 \pm \text{SEM } 0,37$ ) zu den I/R ( $5,29 \pm \text{SEM } 0,93$ ) ein nicht signifikanter Anstieg der ALT Aktivität. Im Vergleich der I/R Gruppen in dieser Vergleichsgruppe waren die ALT Werte der Knockout-Versuchstiere geringer als beim Wildtyp, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

In der Vergleichsgruppe um WT (C57BL/6) zeigte sich im durchgeführten *unpaired t-test* ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) der ALT-Aktivität im Serum zwischen Sham ( $2,57 \pm \text{SEM } 0,17$ ) und I/R ( $7,26 \pm \text{SEM } 0,69$ ). Auch in den  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  Mäusen gab es im durchgeführten *unpaired t-test* einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$ ) zwischen Sham ( $3,25 \pm \text{SEM } 0,15$ ) und I/R ( $4,23 \pm \text{SEM } 0,26$ ). Jedoch war die ALT Aktivität in der  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  I/R Gruppe im Vergleich zu WT (C57BL/6) I/R signifikant ( $p < 0,01$ ) niedriger.

Bei der Untersuchung der AST-Aktivität im Serum zeigte sich für die Vergleichsgruppe WT (BALB/c) im durchgeführten *unpaired t-test* eine signifikant höhere Aktivität bei I/R ( $217,4 \pm \text{SEM } 34,25$ ) im Vergleich zu Sham ( $76,66 \pm \text{SEM } 10,37$ ) (Abb. 14B). Bei den Gruppen  $\text{Sema4d}^{-/-}$  und  $\text{Sema4d}^{-/-}/\text{Plxnb1}^{-/-}$  zeigte sich auch eine jeweils höhere Aktivität in den I/R Gruppen, in den  $\text{Sema4d}^{-/-}/\text{Plxnb1}^{-/-}$  Versuchstieren sogar signifikant ( $p < 0,05$ ). Die Untersuchung der I/R-Gruppen untereinander erbrachte dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Die AST Aktivität im Serum zeigte sowohl in der Gruppe WT (C57BL/6) als auch in der Gruppe  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  in den durchgeführten *unpaired t-tests* signifikant höhere Werte bei I/R als bei Sham, jedoch war hier der Unterschied zwischen  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  I/R zu WT (C57BL/6) I/R nicht signifikant.



**Abbildung 14: ALT und AST im Serum von WT und KO-Mäusen.** Dargestellt sind A: die gemessene Menge an ALT im Serum und B: die gemessene Menge an AST im Serum der WT- und KO-Mäuse.

### 3.6 Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Darmbarriere während I/R

Um den Einfluss von Sema4D und PlxnB1 beziehungsweise deren Knockouts in den Versuchstieren auf die Darmbarriere und deren Integrität in-vivo zu untersuchen, wurden zunächst die Expressionen von verschiedenen Adhäsionsmolekülen im Darmepithel auf mRNA-Ebene untersucht.

Die Expression von JAM-A (Abb. 15A) ist in beiden WT Gruppen signifikant höher nach I/R als in den Sham Gruppen. Sowohl in der Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup> als auch Plxnb1<sup>-/-</sup> kommt es nach I/R zu einem Anstieg der Expression, dieser ist aber in beiden Fällen nicht signifikant. Beim Vergleich der Gruppen Sema4d<sup>-/-</sup> I/R und

Plxnb1<sup>-/-</sup> I/R zu ihren jeweiligen Wildtypen nach IR zeigten sich nicht signifikant geringere Expressionswerte für JAM-A.

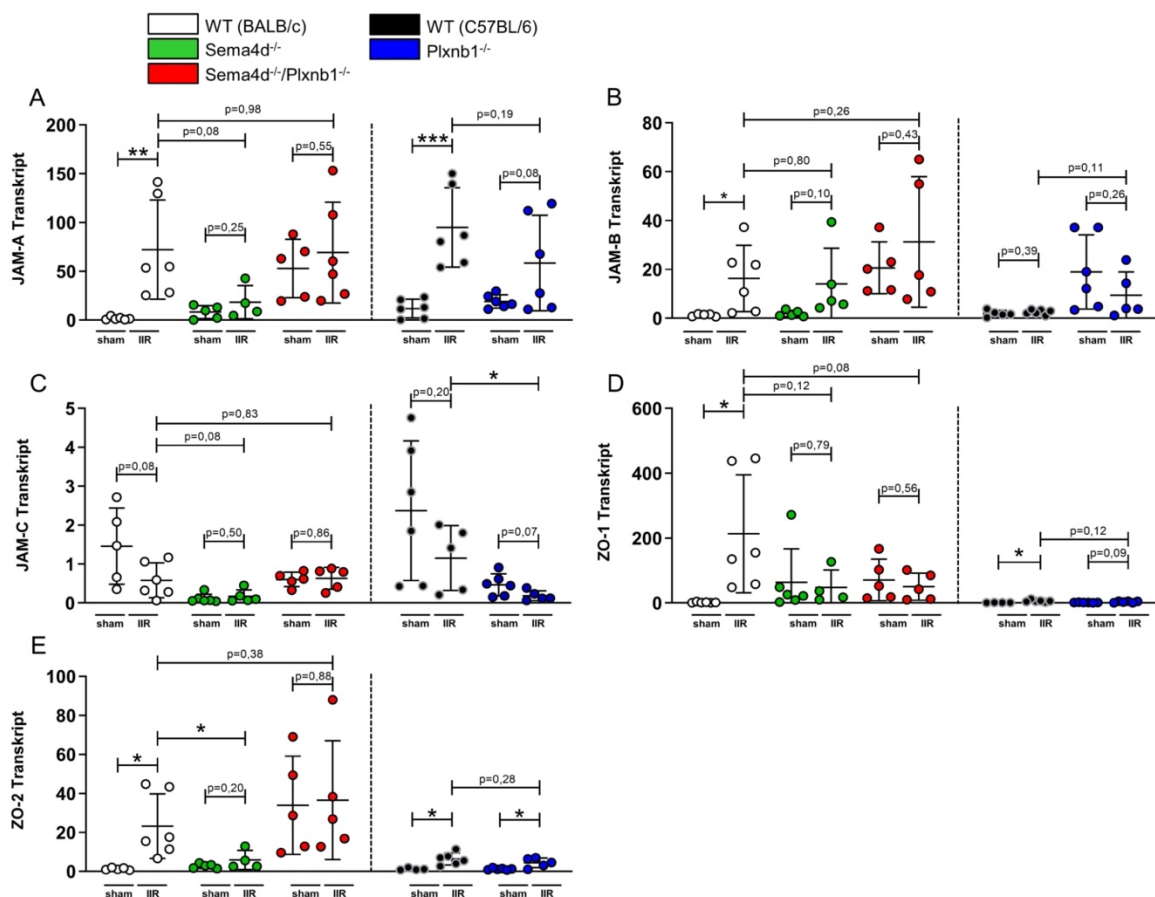
Die Expression von JAM-B (Abb. 15B) ist nach I/R in der Gruppe WT (BALB/c) ( $16,27 \pm \text{SEM } 5,55$ ) im durchgeführten *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in der Sham Gruppe ( $1,21 \pm \text{SEM } 0,23$ ). Bei den Vergleichsgruppen Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> ist nach I/R jeweils ein Anstieg der Expression zu verzeichnen, diese waren jedoch nicht signifikant. In der Vergleichsgruppe um WT (C57BL/6) zeigte sich eine nicht signifikant höhere Expression nach I/R ( $2,49 \pm \text{SEM } 0,41$ ) als bei Sham ( $1,87 \pm \text{SEM } 0,58$ ). In der Plxnb1<sup>-/-</sup> Gruppe war die Expression von JAM-B nach IR ( $9,4 \pm \text{SEM } 4,26$ ) nicht signifikant niedriger als Sham ( $18,93 \pm \text{SEM } 6,20$ ).

Die Expression von JAM-C (Abb. 15C) auf mRNA-Ebene im Darmepithel nahm in der Gruppe WT(BALB/c) I/R ( $0,58 \pm \text{SEM } 0,18$ ) im durchgeführten *unpaired t-test* im Vergleich zu Sham ( $1,46 \pm \text{SEM } 0,44$ ) nicht signifikant ( $p = 0,08$ ) ab. In den Knockout-Versuchstieren Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Sham und I/R. Auch in der Vergleichsgruppe um WT (C57BL/6) wurde eine nicht signifikant verminderte Expression von JAM-C nach I/R ( $1,15 \pm \text{SEM } 0,37$ ) im Vergleich zu Sham ( $2,37 \pm \text{SEM } 0,73$ ) festgestellt. Eine Abnahme konnte auch in der Gruppe Plxnb1<sup>-/-</sup> von Sham ( $0,47 \pm \text{SEM } 0,12$ ) zu I/R ( $0,18 \pm \text{SEM } 0,06$ ) gezeigt werden. Die Expression in der WT (C57BL/6) I/R Gruppe war somit im durchgeführten *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in Plxnb1<sup>-/-</sup> I/R.

In der Untersuchung der Expression von ZO-1 (Abb. 15D) zeigten sich in beiden Wildtypgruppen WT (BALB/c) und WT (C57BL/6) jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Werte nach I/R im Vergleich zu Sham. In den Knockout-Vergleichsgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen I/R und Sham gezeigt werden. Die Expression von ZO-1 war in der Gruppe WT (BALB/c) I/R deutlich, jedoch nicht signifikant, höher als in den Vergleichsgruppen Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup>. Auch beim Vergleich von WT (C57BL/6) I/R ( $5,96 \pm \text{SEM } 1,39$ ) zu Plxnb1<sup>-/-</sup> I/R ( $3,16 \pm \text{SEM } 0,85$ ) konnte eine höhere, jedoch

nicht signifikante ( $p=0,12$ ), Expression von ZO-1 beim Wildtyp nach I/R festgestellt werden.

In der Gruppe um WT (BALB/c) zeigte sich im *unpaired t-test* ein signifikanter Anstieg ( $p<0,05$ ) der Expression von ZO-2 nach I/R ( $23,19 \pm \text{SEM } 6,77$ ) im Vergleich zu Sham ( $1,22 \pm \text{SEM } 0,27$ ) (Abb. 15E). Ein signifikanter Anstieg konnte für die Vergleichsgruppen Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> nicht gezeigt werden. Die Expression von ZO-2 in der Gruppe WT (BALB/c) I/R war signifikant höher ( $p<0,05$ ) als in der Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup> I/R ( $5,86 \pm \text{SEM } 2,44$ ). In den Gruppen WT (C57BL/6) und Plxnb1<sup>-/-</sup> zeigten sich jeweils signifikant höhere ( $p<0,05$ ) Expressionen von ZO-2 nach I/R als in den jeweiligen Sham, jedoch bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nach I/R selbst.



**Abbildung 15: mRNA-Expression von Adhäsionsmolekülen der Darmbarriere in WT- und KO-Mäusen.** Dargestellt sind die durch qRT-PCR gemessenen mRNA-Expressionen von A: JAM-A, B: JAM-B, C: JAM-C, D: ZO-1, E: ZO-2 im Mucosal Scraping des Dickdarms von WT- und KO-Mäusen, jeweils normiert auf die jeweilige Kontrollgruppe.

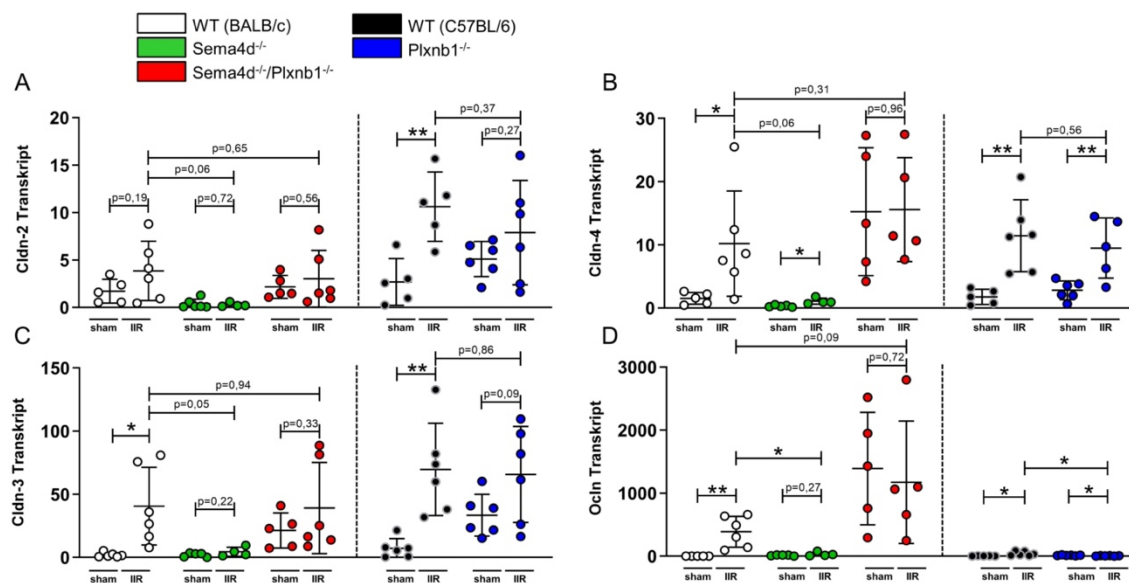
Die Expression von Cldn-2 (Abb. 16A) nahm in der Gruppe WT (BALB/c) von Sham ( $1,71 \pm \text{SEM } 0,56$ ) zu I/R ( $3,85 \pm \text{SEM } 1,28$ ) nicht signifikant ( $p=0,19$ ) zu. In den Vergleichsgruppen Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Sham und I/R gezeigt werden. Die Expression von Cldn-2 war in der Gruppe WT (BALB/c) IR im durchgeführten *unpaired t-test* deutlich, jedoch nicht signifikant ( $p<0,06$ ), höher als bei Sema4d<sup>-/-</sup> I/R ( $0,28 \pm \text{SEM } 0,11$ ). In der Gruppe WT (C57BL/6) war die Expression nach I/R ( $10,61 \pm \text{SEM } 1,64$ ) signifikant ( $p<0,01$ ) höher als in der Sham Gruppe ( $2,68 \pm \text{SEM } 1,10$ ). Ein Anstieg nach I/R im Vergleich zu Sham konnte auch in der Gruppe Plxnb1<sup>-/-</sup> gezeigt werden, jedoch war der Unterschied nicht signifikant.

Auch in der Expression von Cldn-4 (Abb. 16B) zeigte sich im durchgeführten *unpaired t-test* ein signifikanter Unterschied ( $p<0,05$ ) zwischen WT (BALB/c) Sham ( $1,52 \pm \text{SEM } 0,41$ ) und I/R ( $10,19 \pm \text{SEM } 3,40$ ) mit deutlich höheren Werten nach I/R. Auch in der Gruppe um Sema4d<sup>-/-</sup> zeigte sich eine signifikant ( $p<0,05$ ) höhere Expression nach I/R ( $1,09 \pm \text{SEM } 0,24$ ) als bei Sham ( $0,30 \pm \text{SEM } 0,07$ ). Damit lag die Expression in der Wildtypgruppe (BALB/c) nach I/R deutlich, jedoch nicht signifikant ( $p=0,06$ ), höher als in der Knockout-Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup>. Auch in der Vergleichsgruppe um WT (C57BL/6) konnte eine signifikant ( $p<0,01$ ) höhere Expression von Cldn-4 nach I/R gezeigt werden, ebenso für die Gruppe Plxnb1<sup>-/-</sup>. Im durchgeführten *unpaired t-test* war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nach I/R nicht signifikant ( $p=0,56$ ).

In der Untersuchung von Cldn-3 (Abb. 16C) auf mRNA-Ebene zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier war die Expression in der Gruppe WT (BALB/c) nach I/R ( $40,56 \pm \text{SEM } 12,56$ ) signifikant ( $p<0,05$ ) höher als bei den Sham Mäusen ( $1,91 \pm \text{SEM } 0,74$ ). In den Gruppen Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> konnten jeweils leichte Anstiege der Expression nach I/R festgestellt werden, jedoch waren diese nicht signifikant. Die Sema4d<sup>-/-</sup> Versuchstiere zeigten nach I/R eine deutlich niedrigere Expression als beim Wildtyp (BALB/c), der Unterschied war jedoch knapp nicht signifikant ( $p=0,05$ ). In der WT Vergleichsgruppe (C57BL/6) zeigte sich im durchgeführten *unpaired t-test* eine signifikant ( $p<0,01$ ) höhere Expression von Cldn-3 nach I/R ( $69,67 \pm \text{SEM } 14,91$ ) als bei Sham ( $7,16 \pm \text{SEM}$

3,13). Ein Anstieg der Expression nach I/R konnte auch in der Gruppe  $Plxnb1^{-/-}$  gezeigt werden, jedoch war der Unterschied nicht signifikant. Auch der Vergleich zwischen WT (C57BL/6) I/R und  $Plxnb1^{-/-}$  I/R zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Expression von Cldn-3.

Bei der Untersuchung von Ocln (Abb. 16D) auf mRNA-Ebene im Mucosal Scraping des Dickdarms zeigte sich eine signifikant ( $p < 0,01$ ) höhere Expression in der Gruppe WT (BALB/c) IR ( $387,3 \pm \text{SEM } 100,1$ ) im Vergleich zu Sham ( $1,25 \pm \text{SEM } 0,29$ ). In der Gruppe  $Sema4d^{-/-}$  konnte nach I/R ( $31 \pm \text{SEM } 16,18$ ) nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg der Expression im Gegensatz zu Sham ( $13,4 \pm \text{SEM } 3,8$ ) festgestellt werden. Im Vergleich beider I/R Gruppen zwischen WT (BALB/c) und  $Sema4d^{-/-}$  zeigte sich im durchgeführten *unpaired t-test* eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Expression von Ocln im Wildtyp. Auch in der WT Gruppe (C57BL/6) zeigte sich nach I/R ( $39,48 \pm \text{SEM } 14,24$ ) eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Expression als bei Sham ( $3,48 \pm \text{SEM } 1,30$ ). In den Knockout-Versuchstieren  $Plxnb1^{-/-}$  zeigte sich jedoch im Gegensatz zum Wildtyp eine im durchgeführten *unpaired t-test* signifikante ( $p < 0,05$ ) Abnahme der Expression nach I/R ( $5,29 \pm \text{SEM } 1,65$ ) im Vergleich zur Sham Gruppe ( $13,22 \pm \text{SEM } 2,57$ ). Somit zeigte auch der Vergleich beider I/R Gruppen eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Expression von Ocln im WT (C57BL/6) I/R als bei  $Plxnb1^{-/-}$  I/R.



**Abbildung 16: mRNA-Expression von Tight Junction Molekülen der Darmbarriere in WT- und KO-Mäusen.** Dargestellt sind die durch qRT-PCR gemessenen mRNA-Expressionen von A: Cldn-2, B: Cldn-4,

C: Cldn-3, D: Ocln im Mucosal Scraping des Dickdarms von WT- und KO-Mäusen, jeweils normiert auf die jeweilige Kontrollgruppe.

### **3.7 Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die intestinale, antimikrobielle Abwehr nach I/R**

Um den Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die intestinale, antimikrobielle Abwehr nach I/R zu untersuchen, wurde die Expression von verschiedenen Defensinen auf mRNA-Ebene im Dickdarmepithel untersucht.

Dabei zeigte sich für DEFA-1 (Abb. 17A) in der Gruppe WT (BALB/c) eine im durchgeführten *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere Expression nach I/R ( $0,28 \pm \text{SEM } 0,09$ ) als bei Sham ( $2,86 \pm \text{SEM } 0,92$ ). Hingegen zeigte sich in der Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup> nach I/R ( $0,09 \pm \text{SEM } 0,02$ ) eine signifikante Zunahme der Expression im Vergleich zu Sham ( $0,03 \pm \text{SEM } 0,004$ ). Für die Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> konnte von Sham ( $0,10 \pm \text{SEM } 0,02$ ) zu I/R ( $0,13 \pm \text{SEM } 0,03$ ) nur ein geringer, nicht signifikanter Anstieg festgestellt werden. Somit lagen die relativen Expressionswerte für DEFA-1 in den Knockout-Gruppen nach I/R niedriger als beim Wildtyp, jedoch waren die Unterschiede jeweils nicht signifikant. In der Gruppe um WT (C57BL/6) zeigte sich eine Zunahme der Expression nach I/R ( $3,01 \pm \text{SEM } 1,31$ ) gegenüber Sham ( $1,21 \pm \text{SEM } 0,28$ ). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Für die Gruppe Plxnb1<sup>-/-</sup> zeigte sich eine nicht signifikant niedrigere Expression von DEFA-1 nach I/R ( $0,025 \pm \text{SEM } 0,004$ ) im Vergleich zu Sham ( $0,036 \pm \text{SEM } 0,008$ ). Die Expression nach I/R in der Gruppe WT (C57BL/6) war im durchgeführten *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in der Gruppe Plxnb1<sup>-/-</sup>.

In der Untersuchung der Expression von DEFB-1 (Abb. 17B) zeigten sich für die Gruppe WT (BALB/c) signifikant ( $p < 0,01$ ) höhere Werte nach I/R ( $37,03 \pm \text{SEM } 7,57$ ) als bei Sham ( $1,59 \pm \text{SEM } 0,37$ ). Auch für die Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup> konnte von Sham ( $5,5 \pm \text{SEM } 1,6$ ) zu I/R ( $16,79 \pm \text{SEM } 7,18$ ) ein Anstieg der Expression festgestellt werden, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant ( $p = 0,13$ ). In der Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> zeigte sich nach I/R ( $5,02 \pm \text{SEM } 1,16$ ) nur eine gering höhere Expression im Vergleich zu Sham ( $3,76 \pm \text{SEM } 1,43$ ). Somit war die relative Expression von DEFB-1 in der Gruppe WT (BALB/c) I/R am höchsten, im Vergleich mit Sema4d<sup>-/-</sup> I/R knapp nicht signifikant ( $p = 0,10$ ), und mit

Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> signifikant ( $p < 0,01$ ). In der Gruppe WT (C57BL/6) war die Expression nach I/R ( $3,68 \pm \text{SEM } 0,39$ ) signifikant ( $p < 0,001$ ) höher als bei Sham ( $1,05 \pm \text{SEM } 0,11$ ). Auch in der Gruppe Plxnb1<sup>-/-</sup> kam es nach I/R ( $3,60 \pm \text{SEM } 0,46$ ) im Vergleich zu Sham ( $1,55 \pm \text{SEM } 0,29$ ) zu einem signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anstieg der Expression von DEFB-1, jedoch war der Unterschied zwischen Plxnb1<sup>-/-</sup> und WT (C57BL/6) nach I/R nicht signifikant.

Für DEFA-3 (Abb. 17C) zeigte sich in der Gruppe WT (BALB/c) im durchgeführten *unpaired t-test* eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Expression in Sham ( $2,04 \pm \text{SEM } 0,63$ ) als nach I/R ( $0,26 \pm \text{SEM } 0,11$ ). In der Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup>, hingegen nahm die Expression nach I/R ( $0,13 \pm \text{SEM } 0,025$ ) im Vergleich zu Sham ( $0,02 \pm \text{SEM } 0,003$ ) signifikant zu ( $p < 0,01$ ). Auch in der Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> zeigte sich eine leichte Zunahme der Expression nach I/R ( $2,04 \pm \text{SEM } 0,62$ ) gegenüber Sham ( $1,31 \pm \text{SEM } 0,21$ ), wobei der Unterschied nicht signifikant war. Somit zeigte sich die höchste Expression von DEFA-3 im Vergleich der drei Gruppen nach I/R bei Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> und war damit signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in der Gruppe WT (BALB/c) I/R. Für die Gruppe WT (C57BL/6) konnte eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Zunahme der Expression nach I/R ( $21,34 \pm \text{SEM } 6,25$ ) im Vergleich zu Sham ( $5,21 \pm \text{SEM } 1,92$ ) festgestellt werden. In der Untersuchung der Gruppe Plxnb1<sup>-/-</sup> zeigte sich hingegen nur eine sehr geringe, nicht signifikante Zunahme der Expression nach I/R. Im Vergleich der beiden Gruppen nach IR war der Unterschied der relativen Expression im durchgeführten *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,01$ ), mit deutlich höheren Werten für WT (C57BL/6) I/R.

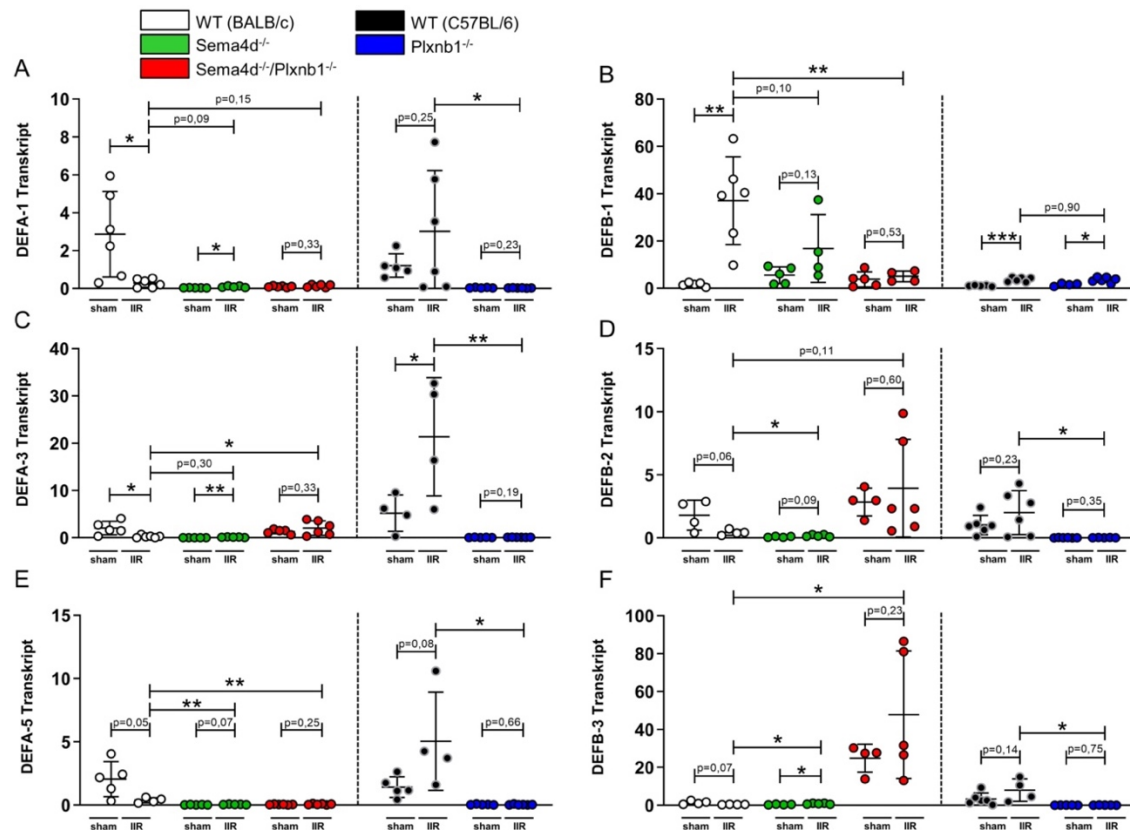
Die Expression von DEFB-2 (Abb. 17D) war in der Gruppe WT (BALB/c) Sham ( $1,80 \pm \text{SEM } 0,59$ ) deutlich höher als nach I/R ( $0,43 \pm \text{SEM } 0,11$ ), im durchgeführten *unpaired t-test* hingegen knapp nicht signifikant ( $p = 0,06$ ). Für die Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup> zeigte sich eine Zunahme der Expression nach I/R ( $0,81 \pm \text{SEM } 0,12$ ) gegenüber Sham ( $0,40 \pm \text{SEM } 0,08$ ), jedoch war der Unterschied auch hier nicht signifikant ( $p = 0,09$ ). Auch in der Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> zeigte sich eine nicht signifikant höhere Expression von DEFB-2 nach I/R. Somit war die Expression von DEFB-2 nach I/R in der Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup> signifikant niedriger als in der Gruppe WT (BALB/c). Für die Gruppe WT (C57BL/6) zeigte sich eine

leichte, nicht signifikante Zunahme der Expression von Sham ( $1,03 \pm \text{SEM } 0,31$ ) zu I/R ( $2,01 \pm \text{SEM } 0,71$ ). Auch in der Gruppe  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  konnte eine nicht signifikant höhere Expression nach I/R ( $0,09 \pm \text{SEM } 0,027$ ) im Gegensatz zu Sham ( $0,08 \pm \text{SEM } 0,016$ ) verzeichnet werden. Die Expression von DEFB-2 nach I/R war in der Gruppe WT (C57BL/6) signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als im Knockout  $\text{Plxnb1}^{-/-}$ .

Auch bei der Untersuchung von DEFA-5 (Abb. 17E) fiel eine Abnahme der Expression in der Gruppe WT (BALB/c) nach I/R ( $0,38 \pm \text{SEM } 0,10$ ) gegenüber Sham ( $2,06 \pm \text{SEM } 0,62$ ) auf. Dieser Unterschied war im durchgeführten *unpaired t-test* knapp nicht signifikant ( $p = 0,05$ ). In der Gruppe  $\text{Sema4d}^{-/-}$  zeigte sich eine Zunahme der Expression von Sham ( $0,025 \pm \text{SEM } 0,007$ ) zu I/R ( $0,049 \pm \text{SEM } 0,009$ ), doch auch hier wurde eine Signifikanz knapp verfehlt ( $p = 0,07$ ). Auch in der Gruppe  $\text{Sema4d}^{-/-}/\text{Plxnb1}^{-/-}$  konnte eine gering höhere Expression nach I/R ( $0,068 \pm \text{SEM } 0,016$ ) gegenüber Sham ( $0,046 \pm \text{SEM } 0,008$ ) festgestellt werden. Die Expression von DEFA-5 war dementsprechend in der Gruppe WT (BALB/c) I/R jeweils signifikant ( $p < 0,01$ ) höher als in den Knockout-Gruppen  $\text{Sema4d}^{-/-}$  I/R und  $\text{Sema4d}^{-/-}/\text{Plxnb1}^{-/-}$  I/R. In der Vergleichsgruppe WT (C57BL/6) zeigte sich eine höhere, nicht signifikante ( $p = 0,08$ ) Expression nach I/R ( $5,04 \pm \text{SEM } 1,94$ ) als bei Sham ( $1,42 \pm \text{SEM } 0,37$ ). In der Gruppe  $\text{Plxnb1}^{-/-}$  zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Sham und I/R. Beim Vergleich beider Gruppen nach I/R zeigte sich eine signifikant höhere Expression von DEFA-5 in der Gruppe WT (C57BL/6) als im Knockout  $\text{Plxnb1}^{-/-}$ .

Für DEFB-3 (Abb. 17F) zeigte sich in der Gruppe WT (BALB/c) eine Abnahme der Expression nach I/R ( $0,43 \pm \text{SEM } 0,04$ ) im Vergleich zu Sham ( $1,44 \pm \text{SEM } 0,46$ ), jedoch war diese knapp nicht signifikant ( $p = 0,07$ ). In der Gruppe  $\text{Sema4d}^{-/-}$  konnte eine signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Expression nach I/R ( $0,81 \pm \text{SEM } 0,12$ ) als bei Sham ( $0,40 \pm \text{SEM } 0,08$ ) festgestellt werden. Auch in der Gruppe  $\text{Sema4d}^{-/-}/\text{Plxnb1}^{-/-}$  kam es zu einer Zunahme der Expression von Sham ( $24,81 \pm \text{SEM } 3,71$ ) zu I/R ( $47,75 \pm \text{SEM } 15,03$ ). Somit war nach I/R die Expression in den Gruppen  $\text{Sema4d}^{-/-}$  und  $\text{Sema4d}^{-/-}/\text{Plxnb1}^{-/-}$  im durchgeführten *unpaired t-test* signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in WT (BALB/c). Für die Vergleichsgruppe WT (C57BL/6) zeigte sich eine Zunahme der Expression nach

I/R ( $7,98 \pm \text{SEM } 2,96$ ) im Vergleich zu Sham ( $3,31 \pm \text{SEM } 1,31$ ). In der Gruppe Plxnb1<sup>-/-</sup> konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Sham und I/R festgestellt werden. Die Expression von DEFB-3 nach I/R war in der Gruppe WT (C57BL/6) signifikant ( $p < 0,05$ ) höher als in Plxnb1<sup>-/-</sup>.



**Abbildung 17: mRNA-Expression von Defensinen im Darm von WT- und KO-Mäusen.** Dargestellt sind die durch qRT-PCR gemessenen mRNA-Expressionen von A: DEFA-1, B: DEFB-1, C: DEFA-3, D: DEFB-2, E: DEFA-5 und F: DEFB-3 im Mucosal Scraping des Dickdarms von WT- und KO-Mäusen, jeweils normiert auf die jeweilige Kontrollgruppe.

## 4 Diskussion

#### 4.1 Expression von Sema4D und PlxnB1 in Hypoxie in vitro und I/R in vivo

Die mesenteriale Ischämie ist immer noch mit einer hohen Mortalität verbunden (siehe Kapitel 1.1). Deshalb ist die Erforschung der zugrundeliegenden pathologischen Prozesse und die Suche nach einer protektiven Substanz von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit konnte der Einfluss von Hypoxie

und Ischämie auf die Expression von Sema4D und PlxnB1 bestätigt werden. 2009 konnten Sun et al. zeigen, dass das Gen für Sema4D ein Hypoxia Response Element (HRE) enthält und durch Hypoxie und HIF-1 induziert wird [140]. Allerdings konnte in dieser Arbeit keine Expressionserhöhung für Sema4D in Caco-2 Zellen gezeigt werden. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass diese kaum bis kein Sema4D exprimieren, was mitunter durch den Vergleich mit der IgG-Kontrollfärbung veranschaulicht wird. Für PlxnB1 hingegen konnte auf mRNA- sowie Proteinebene eine Abnahme der Expression in Caco-2 Zellen gezeigt werden. Bisher ist jedoch nicht klar, wie PlxnB1 durch einen hypoxischen Reiz reguliert wird, und ob es analog zu Sema4D auch HREs im PlxnB1-Gen gibt.

In vivo konnte im Mausmodell des mesenterialen I/R-Schadens ein Anstieg der Expression, sowohl für Sema4D als auch PlxnB1, auf mRNA-Ebene im Dickdarm gezeigt werden. Ob diese Erhöhung auf die Hypoxie/Ischämie, oder auf die anschließende Reperfusion zurückzuführen ist, konnte in diesem Modell nicht gezeigt werden und ist Gegenstand für weitere Forschung. Auch ist nicht klar, ob die Expressionserhöhung von Sema4D auf eine erhöhte Expression auf den Darmepithelzellen oder auf eingewanderte Leukozyten mit erhöhter Sema4D-Expression auf ihrer Zelloberfläche zurückzuführen ist. Die Immunfluoreszenzfärbungen lassen subjektiv darauf schließen, dass mehr Sema4D-exprimierende Leukozyten in das Gewebe nach I/R migrieren, die bei dem Mucosal Scraping jedoch höchstwahrscheinlich größtenteils mit dem Darmepithel abgeschabt werden. Weitere Untersuchungen sollten diese Frage beantworten können.

#### **4.2 Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Inflamationsreaktion nach mesenterialer Ischämie-Reperfusion**

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Zytokine in den Unterschiedlichen Gruppen der Versuchstiere nach mesenterialer Ischämie-Reperfusion verhalten. Dabei konnte eine signifikant niedrigere Menge an IL-6 im Blut der Knockout-Tiere Sema4d<sup>-/-</sup> und Sema4d<sup>-/-</sup>/Plxnb1<sup>-/-</sup> im Vergleich zum Wildtyp BALB/c nach I/R gezeigt werden. Der Unterschied zwischen den Versuchstieren Plxnb1<sup>-/-</sup> und

ihrem Wildtyp C57BL/6 nach I/R war hingegen nicht signifikant. Es muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass ein Vergleich aller Knockout-Gruppen untereinander sich verbietet, da ihre Vergleichsgruppen auf unterschiedlichen genetischen Hintergründen basieren. Es gilt anzumerken, dass zwischen dem Single-Knockout *Sema4d*<sup>-/-</sup> und dem Double-Knockout *Sema4d*<sup>-/-</sup>/*Plxnb1*<sup>-/-</sup> kein Unterschied in der Menge an produziertem IL-6 zu finden ist. Yoshida et al. konnten im Jahre 2015 zeigen, dass lösliches Sema4D in CD14 positiven Monozyten die IL-6 und TNF $\alpha$  Produktion induziert [97]. Auch Huang et al. konnten fünf Jahre später zeigen, dass Sema4D in HCAECs (Human Coronary Artery Endothelial Cells) über *Plxnb1* die Produktion von IL-6 induziert [141]. Sema4D spielt also eine wichtige Rolle in der Produktion von IL-6 und somit in der Entstehung einer Inflammation. Wie jedoch genau die IL-6 Produktion in vivo im Darm über Sema4D und PlexinB1 reguliert ist, muss noch weiter erforscht werden.

Auch die Produktion von TNF $\alpha$  wird womöglich über Sema4D-*Plxnb1* im Darm reguliert. Wie bereits erwähnt kann lösliches Sema4D die Produktion von TNF $\alpha$  induzieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von TNF $\alpha$  auf mRNA-Ebene in den *Plxnb1*<sup>-/-</sup> Versuchstieren im Vergleich zu dem Wildtyp C57BL/6 deutlich, wenn aber auch nicht signifikant, niedriger ist. Das kann daran liegen, dass Sema4D eben nicht allein über *Plxnb1* als Rezeptor agiert, sondern vor allem im Immunsystem in Zell-Zell-Kontakten auch über CD72 agiert.

IL-3 wird vor allem von aktivierten T-Zellen produziert [142]. Außerdem ist es in der Lage, Mastzellen und Basophile Granulozyten zur Degranulation vorzubereiten [143]. In beiden Wildtypen ist die Expression auf mRNA-Ebene nach I/R im Gegensatz zu Sham deutlich vermindert. Es fällt auf, dass die Knockout-Versuchstiere im Gegensatz zu den Wildtypen eine sehr geringe Expression an IL-3 aufweisen. Allerdings benötigt der Prozess von der Schädigung des Gewebes bis hin zur T-Zell-Aktivierung einige Zeit, daher ist auch die Frage nach dem Beobachtungszeitraum zu stellen. Die Rolle von IL-3 im mesenterialen Ischämie-Reperfusionsschaden sowie die Beeinflussung über die Sema4D-*Plxnb1*-Achse bedarf noch einiger weiterer Forschung.

#### **4.3 Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die leukozytäre Infiltration ins Intestinum nach mesenterialer Ischämie-Reperfusion**

Die nächste Frage, die sich stellte, war, inwiefern der unterschiedliche Inflamationsverlauf zur Migration von Leukozyten ins Gewebe nach I/R beitrug. Dafür wurden zunächst die Unterschiede in den Expressionen der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 im Dickdarm der Versuchstiere untersucht. Hier konnte vor allem für den Knockout von PlxnB1 ein signifikanter Unterschied im Sinne einer geringeren Expression auf mRNA-Ebene nach I/R im Gegensatz zum Wildtyp C57BL/6 gezeigt werden. ICAM-1 ist bekannt für seine regulatorische Rolle in der Leukozytenmigration und -rekrutierung zum Inflammationsort [144, 145]. Auch trägt das Binden von PMNs an ICAM-1 zu einer erhöhten Permeabilität von Epithelbarrieren bei [145]. Ob und wenn ja, inwiefern PlxnB1 in der Regulation der Expression von ICAM-1 eine Rolle spielt, ist bisher nicht bekannt. Womöglich sorgt auch eine geringere Konzentration der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  [146] direkt oder indirekt über Sema4D und PlxnB1 für einer geringere Expression von ICAM-1. Dieser Zusammenhang zwischen der Sema4D-PlxnB1-Achse und der Expression von ICAM-1 sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein. Außerdem muss die geringere Expression von ICAM-1 auf Proteinebene zum Beispiel mittels Western-Blot noch bestätigt werden, da auf dem Weg bis zur Zelloberfläche noch viele posttranslationale Mechanismen greifen können.

VCAM-1 wird auch unter dem Einfluss von TNF $\alpha$ , sowie ROS und Toll-Like-Rezeptor-Agonisten vermehrt exprimiert [147]. Auch VCAM-1 ist an der transendothelialen Leukozytenmigration maßgeblich beteiligt, indem die Signaltransduktion über VCAM-1 für eine Spaltenbildung beziehungsweise einer Schwächung der endothelialen Zell-Zell-Kontakte sorgt [148]. Auch in der Betrachtung der Expression von VCAM-1 zeigte sich eine signifikant niedrigere Expression in der Knockout-Gruppe um Plxnb1<sup>-/-</sup> nach I/R im Gegensatz zum Wildtyp C57BL/6. Somit spielt die Sema4D-PlxnB1-Achse eine immense Rolle in der Regulation von Adhäsionsmolekülen zur Leukozytenrekrutierung. Jedoch muss auch hier in Zukunft weiter erforscht werden, ob ein direkter

Zusammenhang besteht, oder ob indirekt noch weitere Mechanismen dafür ursächlich sind.

Des Weiteren wurden histologische Schnitte des Dünndarms der Versuchstiere erstellt und mittels einer Immunhistochemie-Färbung und dem Antikörper gegen Ly-6G gefärbt. Ly-6G ist auf murinen PMNs exprimiert [149]. Daraufhin wurden pro Bildausschnitt die PMNs gezählt. Erstaunlich ist die deutliche und signifikant niedrigere Anzahl an PMNs im Gewebe sowohl in Sham Versuchstieren als auch nach I/R in allen drei Knockout-Gruppen gegenüber ihren jeweiligen Wildtypen. Für den Wildtyp BALB/c wurde nach I/R eine signifikant niedrigere Anzahl an PMNs im Darmgewebe gefunden. Dies könnte jedoch damit zusammenhängen, dass hier der histologische Schaden sehr groß war und viele Zotten abgerissen sind. Während der Dehydrierung der Gewebeschnitte können so viele PMN ausgewaschen worden sein. In der Wildtypgruppe C57BL/6 stieg die Zahl der PMN nach I/R leicht, aber nicht signifikant, an. Nur für die Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup> konnte nach I/R eine signifikante Zunahme der PMN gezeigt werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Rolle von Sema4D und PlxnB1 in der Zell-Zell-Kommunikation und der Leukozytenrekrutierung. Beide Proteine scheinen einen großen Einfluss auf das Migrationsverhalten von Leukozyten und PMNs im speziellen auszuüben. Wie dabei der direkte Mechanismus dahinter aussieht, muss noch weiter erforscht werden.

#### **4.4 Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf den intestinalen Schaden nach intestinaler I/R**

Um den Gewebeschaden nach intestinaler Ischämie-Reperfusion beurteilen zu können, wurden als nächstes die histologischen HE gefärbten Schnitte vermessen, dem Chiu-Park-Score nach eingeteilt und bewertet. Auch hier wird die Rolle von Sema4D und PlxnB1 deutlich. Sowohl der Vergleich von Sema4d<sup>-/-</sup> zu BALB/c Versuchstieren nach I/R, als auch Plxnb1<sup>-/-</sup> zu C57BL/6 zeigt einen reduzierten intestinalen Schaden zu Gunsten der Knockout-Tiere. Somit ist die Sema4D-PlxnB1 Achse maßgeblich an der Entstehung intestinaler Ödeme und dem Zelltod der Enterozyten beteiligt.

Bei der Untersuchung der Aminotransferasen ALT und AST im Blut konnte gezeigt werden, dass signifikant weniger ALT ins Blut der PlxnB1<sup>-/-</sup> Mäuse nach I/R gelang als beim Wildtyp C57BL/6. Dies spricht für einen verminderten organfernen Schaden in der Gruppe um PlxnB1<sup>-/-</sup>, ausgelöst durch die intestinale Inflammation. Es ist bereits bekannt, dass die Expression von PlxnB1 in der Leber hoch ist [150]. Ob der Knockout von PlxnB1 in der Leber nun direkt zur Minderung des Leberschadens führt, oder ob die geringere Inflammation im Intestinum zu geringeren ALT-Leveln im Blut führt, ist noch unklar. Die bisherigen Ergebnisse sowie andere Forschungsarbeiten zu Sema4D deuten darauf hin, dass vor allem die Interaktion von Sema4D, exprimiert auf Immunzellen, sowie Endothel- und Epithelzellen, mit PlxnB1 maßgeblich am Inflammationsgeschehen beteiligt ist. Wie genau im Intestinum bei Ischämie-Reperfusion die Kommunikation zwischen Sema4D und PlxnB1 erfolgt, muss Gegenstand weiterer Arbeiten sein.

#### **4.5 Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Darmbarriere während I/R**

Um den Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die Darmbarriere in vivo zu untersuchen, wurde die Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen in den verschiedenen Gruppen gemessen. Dabei zeigte sich zusammenfassend für die meisten untersuchten Adhäsionsmoleküle auf mRNA-Ebene eine signifikant höhere Expression im Wildtyp BALB/c nach I/R im Gegensatz zu Sham. Für die Gruppe Sema4d<sup>-/-</sup> konnte dieser starke Anstieg der Expression nach I/R oft nicht gezeigt werden. Beim Vergleich zwischen diesen beiden Gruppen nach I/R konnte für die untersuchten Adhäsionsmoleküle eine niedrigere Expression bei den Sema4d<sup>-/-</sup> Versuchstieren gezeigt werden. Ob sich die Expression auch auf Proteinebene verändert, muss noch gezeigt werden. Dennoch scheint Sema4D eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Integrität der Darmbarriere zu spielen. Sowohl Smith et al. (2015) als auch Zhu et al. (2016) konnten den Einfluss von Sema4D auf die Blut-Hirn-Schranke nachweisen. Die Signalübertragung durch Sema4D wirkt hierbei über PlxnB1, was, da die Tight Junctions zwischen den Endothelzellen beeinflusst werden, zu einem Integritätsverlust der Endothelbarriere führt [151, 152]. Die Hochregulation der Adhäsionsmoleküle in den Wildtypen lässt auf eine gestörte Integrität der Darmbarriere, im Speziellen

der Tight Junctions, schließen, die nach I/R vermehrt produziert und hochreguliert werden müssen, um die Funktion der Darmbarriere aufrecht zu erhalten. Die geringere Expression auf mRNA-Ebene in den Sema4d<sup>-/-</sup> könnte dafürsprechen, dass weniger Tight Junctions auf der Zelloberfläche exprimiert werden müssen, um die Homöostase aufrecht zu erhalten. Somit müssen künftige Versuche und Untersuchungen aufzeigen, wie und über welchen Rezeptor Sema4D zur Störung der Darmbarriere in vivo führt.

#### **4.6 Einfluss von Sema4D und PlxnB1 auf die intestinale, antimikrobielle Abwehr nach I/R**

Im letzten Schritt wurde die Expression verschiedener Defensine auf mRNA-Ebene im Darm der Versuchstiere gemessen. Defensine sind antimikrobiell wirksame Peptide [153], die von Leukozyten (z.B. PMNs) und Epithelzellen (z.B. Panethzellen im Darm) in unterschiedlichen Organen produziert werden [154, 155]. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression von allen untersuchten Defensinen, bis auf DEFB-1 im Wildtyp BALB/c, auf mRNA-Ebene im Dickdarm nach I/R abnimmt, wohingegen beim Wildtyp C57BL/6 die Expressionen der untersuchten Defensine ansteigt. Dies unterstreicht das unterschiedliche Verhalten der beiden Wildtypen in ihrer Grundreaktion auf Inflammation. Im Vergleich der Gruppen C57BL/6 und Plxnb1<sup>-/-</sup> wurde gezeigt, dass der Knockout von PlexinB1 in allen untersuchten Defensinen nach I/R zu einer deutlich und signifikant niedrigeren Expression auf mRNA-Ebene im Dickdarm führt. Jedoch muss auch hier wieder festgehalten werden, dass ein Nachweis auf Proteinebene, zum Beispiel über Western-Blot, aussteht. Es kann daher durch diese Messungen keine Aussage darüber getroffen werden, wie viel an antimikrobiellen Peptiden tatsächlich hergestellt und sezerniert worden sind. Kozar et. al konnten 2011 zeigen, dass die Menge an sezernierten Defensinen abhängig vom Ort des Geschehens ist. So wurden in unterschiedlichen Dünndarmarealen unterschiedliche Konzentrationen an Defensinen gemessen [156]. Dennoch könnten die Daten dieser Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Sema4D-PlxnB1-Achse und der Regulation von Defensinen aufzeigen. Es müssen an dieser Stelle weitere Untersuchungen in Zukunft für Klarheit sorgen.

In dieser Arbeit konnte eindeutig gezeigt werden, dass Hypoxie in vitro beziehungsweise Ischämie und Reperfusion in vivo auch auf die Expression von Sema4D und PlxnB1 im Darm einwirken. Die Sema4D-PlxnB1-Achse, beziehungsweise das Fehlen dieser Proteine, hat einen großen Einfluss auf das Inflammationsgeschehen im Sinne einer abgeschwächten Inflammationsreaktion und damit einhergehend auf die Infiltration des Darms mit PMN. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der intestinale histologische Schaden nach mesenterialer I/R deutlich schwächer ausgeprägt ist, sobald die Gene für Sema4D und PlxnB1 ausgeknockt sind. Auch die Integrität der Darmbarriere ist durch das Fehlen von Sema4D geschützt und die Expression von antimikrobiellen Peptiden wird durch das Fehlen von PlxnB1 nach I/R abgeschwächt. Jedoch müssen weitere offene Fragen über den tatsächlichen inter- und intrazellulären Mechanismus noch geklärt werden, denn es ist bisher nicht klar, wie die untersuchten Proteine auf die TJs und die Integrität der Darmbarriere direkt wirken.

## **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Neuronalen Guidance Proteine Sema4D und PlxnB1 in der akuten mesenterialen Ischämie-Reperfusion untersucht. Da die akute mesenteriale Ischämie weiterhin eine hohe Letalität besitzt, und die bisherige Therapie zwar die Revaskularisation ermöglicht, jedoch den Reperfusionsschaden nicht abdeckt, ist die Suche nach weiteren Therapieansätzen, die direkt den Ischämie-Reperfusionsschaden mindern, von großer Bedeutung. Bei den untersuchten Proteinen Sema4D und PlxnB1 konnten bereits anti-inflammatorische Effekte durch die Inhibition deren Interaktion gezeigt werden. Deshalb bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die Rolle der Proteine bei der akuten mesenterialen Ischämie-Reperfusion in vitro und in vivo zu untersuchen, um eventuelle Therapieansätze abzuleiten.

In-vitro wurde die Expression von Sema4D und PlxnB1 in Caco-2 Darmepithelzellen untersucht. In-vivo wurde die Expression von Sema4D und PlxnB1 im Dickdarm nach I/R untersucht. In-vitro konnte auf einen hypoxischen Stimulus hin eine signifikante Abnahme der Expression von PlxnB1 in Caco-2

Zellen gezeigt werden. In-vivo zeigte sich nach I/R sowohl für Sema4D, als auch für PlxnB1 eine signifikante Zunahme der Expression im Dickdarm.

Außerdem konnte in-vivo gezeigt werden, dass eine Defizienz von Sema4D und PlxnB1 zu geringeren pro-inflammatorischen IL-6 Spiegeln im Blut der Versuchstiere führt.

Außerdem konnte in-vivo gezeigt werden, dass das Fehlen von PlxnB1 zu einer verminderten Expression der Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 nach I/R führt. Zusätzlich dazu konnte mittels immunhistochemischer Färbung von PMNs im Darm der Versuchstiere gezeigt werden, dass in den KO-Versuchstieren deutlich weniger PMNs im Jejunum dargestellt werden konnten, als bei den Wildtypen.

Darüber hinaus konnte mittels HE-Färbungen und Anwendung des Chiu-Park-Scores ermittelt werden, dass das Fehlen von Sema4D und PlxnB1 zu einer Protektion des Darms im Sinne eines deutlich schwächer ausgeprägten histologischen Schadens der Versuchstiere führt. Auch mittels sekundärer Schadenmarker, in diesem Fall AST und ALT, konnte gezeigt werden, dass es bei den Versuchstieren mit Defizienz von PlxnB1 zu einer geringeren Konzentration an ALT im Blutstrom kommt, als beim Wildtyp.

Zum Schluss konnte gezeigt werden, dass nach I/R im Wildtyp eine deutliche Hochregulation fast aller untersuchten Adhäsionsmolekülen der Darmbarriere zu verzeichnen ist. Bei Sema4D-defizienten Versuchstieren hingegen ist diese Hochregulation der Darmbarriereproteine deutlich geringer ausgeprägt.

In dieser Arbeit konnte die Hypothese der protektiven Wirkung von Sema4D und seinem Rezeptor PlxnB1 bestätigt werden. Ein therapeutischer Erfolg durch die Inhibition der Interaktion von Sema4D und PlxnB1 im akuten mesenterialen Ischämie-Reperfusionsschaden erscheint möglich. Gleichwohl sollte weitere Forschung zur Wirkung des NGP Sema4D dessen Rezeptor PlxnB1 durchgeführt werden, da hierzu noch keine abschließende Aussage getroffen werden konnte.

## 6 Literaturverzeichnis:

1. Yasuhara, H., *Acute mesenteric ischemia: the challenge of gastroenterology*. Surg Today, 2005. **35**(3): p. 185-95.
2. Kolkman, J.J. and P.B. Mensink, *Non-occlusive mesenteric ischaemia: a common disorder in gastroenterology and intensive care*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2003. **17**(3): p. 457-73.
3. Debus, E.S., et al., *Intestinal ischemia*. Int J Colorectal Dis, 2011. **26**(9): p. 1087-97.
4. Bassiouny, H.S., *Nonocclusive mesenteric ischemia*. Surg Clin North Am, 1997. **77**(2): p. 319-26.
5. Acosta, S., *Epidemiology of mesenteric vascular disease: clinical implications*. Semin Vasc Surg, 2010. **23**(1): p. 4-8.
6. Soong, C.V., et al., *Bowel ischaemia and organ impairment in elective abdominal aortic aneurysm repair*. Br J Surg, 1994. **81**(7): p. 965-8.
7. Gennaro, M., et al., *Acute mesenteric ischemia after cardiopulmonary bypass*. Am J Surg, 1993. **166**(2): p. 231-6.
8. Mangus, R., R. Vianna, and A. Tector, *Intestinal transplantation: an overview*. Minerva Chir, 2009. **64**(1): p. 45-57.
9. Archodovassilis, F., et al., *Nonocclusive mesenteric ischemia: a lethal complication in peritoneal dialysis patients*. Perit Dial Int, 2007. **27**(2): p. 136-41.
10. Parks, D.A. and D.N. Granger, *Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation*. Am J Physiol, 1986. **250**(6 Pt 1): p. G749-53.
11. Schoenberg, M.H. and H.G. Beger, *Reperfusion injury after intestinal ischemia*. Crit Care Med, 1993. **21**(9): p. 1376-86.
12. Menger, M.D. and B. Vollmar, *Role of microcirculation in transplantation*. Microcirculation, 2000. **7**(5): p. 291-306.
13. McCord, J.M., *Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury*. N Engl J Med, 1985. **312**(3): p. 159-63.
14. Czerny, M., et al., *[Acute mesenteric ischemia]*. Zentralbl Chir, 1997. **122**(7): p. 538-44.
15. Edwards, M.S., et al., *Acute occlusive mesenteric ischemia: surgical management and outcomes*. Ann Vasc Surg, 2003. **17**(1): p. 72-9.
16. Klempnauer, J., et al., *Long-term results after surgery for acute mesenteric ischemia*. Surgery, 1997. **121**(3): p. 239-43.
17. Acosta, S., et al., *Epidemiology and prognostic factors in acute superior mesenteric artery occlusion*. J Gastrointest Surg, 2010. **14**(4): p. 628-35.
18. Granger, D.N., et al., *Intestinal blood flow*. Gastroenterology, 1980. **78**(4): p. 837-63.
19. Lanciault, G. and E.D. Jacobson, *The gastrointestinal circulation*. Gastroenterology, 1976. **71**(5): p. 851-73.
20. Geboes, K., K.P. Geboes, and G. Maleux, *Vascular anatomy of the gastrointestinal tract*. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2001. **15**(1): p. 1-14.

21. Acosta, S., et al., *Clinical implications for the management of acute thromboembolic occlusion of the superior mesenteric artery: autopsy findings in 213 patients*. Ann Surg, 2005. **241**(3): p. 516-22.
22. Griffiths, J.D., *Surgical anatomy of the blood supply of the distal colon*. Ann R Coll Surg Engl, 1956. **19**(4): p. 241-56.
23. Rosenblum, J.D., C.M. Boyle, and L.B. Schwartz, *The mesenteric circulation. Anatomy and physiology*. Surg Clin North Am, 1997. **77**(2): p. 289-306.
24. Vollmar, B. and M.D. Menger, *Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences*. Langenbecks Arch Surg, 2011. **396**(1): p. 13-29.
25. Lundgren, O., *Autoregulation of intestinal blood flow: physiology and pathophysiology*. J Hypertens Suppl, 1989. **7**(4): p. S79-84.
26. Guan, Y., et al., *Intestinal ischemia-reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged in vivo*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2009. **297**(1): p. G187-96.
27. Szabo, A., et al., *Gender differences in ischemia-reperfusion-induced microcirculatory and epithelial dysfunctions in the small intestine*. Life Sci, 2006. **78**(26): p. 3058-65.
28. Gayle, J., et al., *Neutrophils increase paracellular permeability of restituted ischemic-injured porcine ileum*. Surgery, 2002. **132**(3): p. 461-70.
29. Kalogeris, T., et al., *Ischemia/Reperfusion*. Compr Physiol, 2016. **7**(1): p. 113-170.
30. Wang, Y., et al., *Sesamin Protects against and Ameliorates Rat Intestinal Ischemia/Reperfusion Injury with Involvement of Activating Nrf2/HO-1/NQO1 Signaling Pathway*. Oxid Med Cell Longev, 2021. **2021**: p. 5147069.
31. Grootjans, J., et al., *Level of activation of the unfolded protein response correlates with Paneth cell apoptosis in human small intestine exposed to ischemia/reperfusion*. Gastroenterology, 2011. **140**(2): p. 529-539 e3.
32. Vaishnav, S., et al., *Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(52): p. 20858-63.
33. Brogden, K.A., *Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria?* Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(3): p. 238-50.
34. Kaser, A. and R.S. Blumberg, *Paneth cells and inflammation dance together in Crohn's disease*. Cell Res, 2008. **18**(12): p. 1160-2.
35. Sato, T., et al., *Paneth cells constitute the niche for Lgr5 stem cells in intestinal crypts*. Nature, 2011. **469**(7330): p. 415-8.
36. Feinman, R., et al., *HIF-1 mediates pathogenic inflammatory responses to intestinal ischemia-reperfusion injury*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. **299**(4): p. G833-43.
37. Nakao, A., et al., *Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury*. Am J Pathol, 2003. **163**(4): p. 1587-98.
38. Scott, J.R., et al., *Heme oxygenase modulates small intestine leukocyte adhesion following hindlimb ischemia/reperfusion by regulating the*

- expression of intercellular adhesion molecule-1*. Crit Care Med, 2005. **33**(11): p. 2563-70.
39. Katada, K., et al., *Carbon monoxide liberated from CO-releasing molecule (CORM-2) attenuates ischemia/reperfusion (I/R)-induced inflammation in the small intestine*. Inflammation, 2010. **33**(2): p. 92-100.
  40. Nakao, A., et al., *Immunomodulatory effects of inhaled carbon monoxide on rat syngeneic small bowel graft motility*. Gut, 2003. **52**(9): p. 1278-85.
  41. Naito, Y., et al., *Rosuvastatin reduces rat intestinal ischemia-reperfusion injury associated with the preservation of endothelial nitric oxide synthase protein*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(13): p. 2024-30.
  42. Grootjans, J., et al., *Human intestinal ischemia-reperfusion-induced inflammation characterized: experiences from a new translational model*. Am J Pathol, 2010. **176**(5): p. 2283-91.
  43. Blikslager, A.T., et al., *Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa*. Physiol Rev, 2007. **87**(2): p. 545-64.
  44. Hernandez, L.A., et al., *Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury*. Am J Physiol, 1987. **253**(3 Pt 2): p. H699-703.
  45. Fleming, S.D., et al., *C5 is required for CD49d expression on neutrophils and VCAM expression on vascular endothelial cells following mesenteric ischemia/reperfusion*. Clin Immunol, 2003. **106**(1): p. 55-64.
  46. Schramm, R. and H. Thorlacius, *Neutrophil recruitment in mast cell-dependent inflammation: inhibitory mechanisms of glucocorticoids*. Inflamm Res, 2004. **53**(12): p. 644-52.
  47. Lu, Y.Z., et al., *Neutrophil priming by hypoxic preconditioning protects against epithelial barrier damage and enteric bacterial translocation in intestinal ischemia/reperfusion*. Lab Invest, 2012. **92**(5): p. 783-96.
  48. Kolaczowska, E. and P. Kubes, *Neutrophil recruitment and function in health and inflammation*. Nat Rev Immunol, 2013. **13**(3): p. 159-75.
  49. Granger, D.N., *Cell adhesion and migration. II. Leukocyte-endothelial cell adhesion in the digestive system*. Am J Physiol, 1997. **273**(5): p. G982-6.
  50. Dustin, M.L., et al., *Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1)*. J Immunol, 1986. **137**(1): p. 245-54.
  51. Sun, Z., et al., *Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion*. Scand J Gastroenterol, 2001. **36**(1): p. 55-65.
  52. Xu, H., et al., *Rabbit sera containing compound danshen dripping pill attenuate leukocytes adhesion to TNF-alpha--activated human umbilical vein endothelial cells by suppressing endothelial ICAM-1 and VCAM-1 expression through NF-kappaB signaling pathway*. J Cardiovasc Pharmacol, 2014. **63**(4): p. 323-32.
  53. Hanusch, C., et al., *Hypothermic preservation of lung allograft inhibits cytokine-induced chemoattractant-1, endothelial leucocyte adhesion molecule, vascular cell adhesion molecule-1 and intracellular adhesion molecule-1 expression*. Clin Exp Immunol, 2007. **149**(2): p. 364-71.

54. Zabot, G.P., et al., *Glutamine prevents oxidative stress in a model of mesenteric ischemia and reperfusion*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(32): p. 11406-14.
55. Arai, K.I., et al., *Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses*. Annu Rev Biochem, 1990. **59**: p. 783-836.
56. Miyajima, A., et al., *Coordinate regulation of immune and inflammatory responses by T cell-derived lymphokines*. FASEB J, 1988. **2**(9): p. 2462-73.
57. Plaut, M., et al., *Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores*. Nature, 1989. **339**(6219): p. 64-7.
58. Svetic, A., et al., *A primary intestinal helminthic infection rapidly induces a gut-associated elevation of Th2-associated cytokines and IL-3*. J Immunol, 1993. **150**(8 Pt 1): p. 3434-41.
59. Cannistra, S.A., et al., *Human granulocyte-monocyte colony-stimulating factor and interleukin 3 stimulate monocyte cytotoxicity through a tumor necrosis factor-dependent mechanism*. Blood, 1988. **71**(3): p. 672-6.
60. Kimoto, M., et al., *Recombinant murine IL-3 fails to stimulate T or B lymphopoiesis in vivo, but enhances immune responses to T cell-dependent antigens*. J Immunol, 1988. **140**(6): p. 1889-94.
61. Madden, K.B., et al., *Antibodies to IL-3 and IL-4 suppress helminth-induced intestinal mastocytosis*. J Immunol, 1991. **147**(4): p. 1387-91.
62. Pulaski, B.A., et al., *Interleukin 3 enhances cytotoxic T lymphocyte development and class I major histocompatibility complex "re-presentation" of exogenous antigen by tumor-infiltrating antigen-presenting cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3669-74.
63. Rothenberg, M.E., et al., *Human eosinophils have prolonged survival, enhanced functional properties, and become hypodense when exposed to human interleukin 3*. J Clin Invest, 1988. **81**(6): p. 1986-92.
64. Suzuki, T., *Regulation of the intestinal barrier by nutrients: The role of tight junctions*. Anim Sci J, 2020. **91**(1): p. e13357.
65. Furuse, M., et al., *Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin*. J Cell Biol, 1998. **141**(7): p. 1539-50.
66. Furuse, M., et al., *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions*. J Cell Biol, 1993. **123**(6 Pt 2): p. 1777-88.
67. Martin-Padura, I., et al., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 117-27.
68. Siliciano, J.D. and D.A. Goodenough, *Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell-cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells*. J Cell Biol, 1988. **107**(6 Pt 1): p. 2389-99.
69. Brandt, L.J. and S.J. Boley, *AGA technical review on intestinal ischemia*. American Gastrointestinal Association. Gastroenterology, 2000. **118**(5): p. 954-68.

70. Acosta, S. and T. Nilsson, *Current status on plasma biomarkers for acute mesenteric ischemia*. J Thromb Thrombolysis, 2012. **33**(4): p. 355-61.
71. Rosow, D.E., et al., *Imaging of acute mesenteric ischemia using multidetector CT and CT angiography in a porcine model*. J Gastrointest Surg, 2005. **9**(9): p. 1262-74; discussion 1274-5.
72. Cudnik, M.T., et al., *The diagnosis of acute mesenteric ischemia: A systematic review and meta-analysis*. Acad Emerg Med, 2013. **20**(11): p. 1087-100.
73. Kumar, S., M.G. Sarr, and P.S. Kamath, *Mesenteric venous thrombosis*. N Engl J Med, 2001. **345**(23): p. 1683-8.
74. Nicoloff, A.D., et al., *Duplex ultrasonography in evaluation of splanchnic artery stenosis*. Surg Clin North Am, 1997. **77**(2): p. 339-55.
75. Leke, M.A., et al., *Technical consideration in the management of chronic mesenteric ischemia*. Am Surg, 2002. **68**(12): p. 1088-92.
76. Yamaguchi, T., et al., *Local thrombolytic therapy for superior mesenteric artery embolism: complications and long-term clinical follow-up*. Radiat Med, 1999. **17**(1): p. 27-33.
77. Lee, R.W., et al., *Long-term outcomes of endoluminal therapy for chronic atherosclerotic occlusive mesenteric disease*. Ann Vasc Surg, 2008. **22**(4): p. 541-6.
78. Schoots, I.G., et al., *Thrombolytic therapy for acute superior mesenteric artery occlusion*. J Vasc Interv Radiol, 2005. **16**(3): p. 317-29.
79. Kozuch, P.L. and L.J. Brandt, *Review article: diagnosis and management of mesenteric ischaemia with an emphasis on pharmacotherapy*. Aliment Pharmacol Ther, 2005. **21**(3): p. 201-15.
80. Schaefer, P.J., et al., *Stent placement with the monorail technique for treatment of mesenteric artery stenosis*. J Vasc Interv Radiol, 2006. **17**(4): p. 637-43.
81. Schaefer, P.J., et al., *Chronic mesenteric ischemia: stenting of mesenteric arteries*. Abdom Imaging, 2007. **32**(3): p. 304-9.
82. Acosta, S., *Mesenteric ischemia*. Curr Opin Crit Care, 2015. **21**(2): p. 171-8.
83. Kolodkin, A.L., D.J. Matthes, and C.S. Goodman, *The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules*. Cell, 1993. **75**(7): p. 1389-99.
84. Hall, K.T., et al., *Human CD100, a novel leukocyte semaphorin that promotes B-cell aggregation and differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(21): p. 11780-5.
85. Bougeret, C., et al., *Increased surface expression of a newly identified 150-kDa dimer early after human T lymphocyte activation*. J Immunol, 1992. **148**(2): p. 318-23.
86. Wu, J.Y., et al., *The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 948-52.
87. Takegahara, N., A. Kumanogoh, and H. Kikutani, *Semaphorins: a new class of immunoregulatory molecules*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005. **360**(1461): p. 1673-80.
88. *Unified nomenclature for the semaphorins/collapsins*. Semaphorin Nomenclature Committee. Cell, 1999. **97**(5): p. 551-2.

89. Delaire, S., et al., *CD100 is a leukocyte semaphorin*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(11): p. 1265-76.
90. Kumanogoh, A. and H. Kikutani, *Immune semaphorins: a new area of semaphorin research*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 17): p. 3463-70.
91. Furuyama, T., et al., *Identification of a novel transmembrane semaphorin expressed on lymphocytes*. J Biol Chem, 1996. **271**(52): p. 33376-81.
92. Herold, C., et al., *Activation signals are delivered through two distinct epitopes of CD100, a unique 150 kDa human lymphocyte surface structure previously defined by BB18 mAb*. Int Immunol, 1995. **7**(1): p. 1-8.
93. Kumanogoh, A., et al., *Requirement for the lymphocyte semaphorin, CD100, in the induction of antigen-specific T cells and the maturation of dendritic cells*. J Immunol, 2002. **169**(3): p. 1175-81.
94. Kumanogoh, A., et al., *Identification of CD72 as a lymphocyte receptor for the class IV semaphorin CD100: a novel mechanism for regulating B cell signaling*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 621-31.
95. Shi, W., et al., *The class IV semaphorin CD100 plays nonredundant roles in the immune system: defective B and T cell activation in CD100-deficient mice*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 633-42.
96. Pan, C., N. Baumgarth, and J.R. Parnes, *CD72-deficient mice reveal nonredundant roles of CD72 in B cell development and activation*. Immunity, 1999. **11**(4): p. 495-506.
97. Yoshida, Y., et al., *Semaphorin 4D Contributes to Rheumatoid Arthritis by Inducing Inflammatory Cytokine Production: Pathogenic and Therapeutic Implications*. Arthritis Rheumatol, 2015. **67**(6): p. 1481-90.
98. Delaire, S., et al., *Biological activity of soluble CD100. II. Soluble CD100, similarly to H-SemaIII, inhibits immune cell migration*. J Immunol, 2001. **166**(7): p. 4348-54.
99. Conrotto, P., et al., *Sema4D induces angiogenesis through Met recruitment by Plexin B1*. Blood, 2005. **105**(11): p. 4321-9.
100. Basile, J.R., et al., *Semaphorin 4D provides a link between axon guidance processes and tumor-induced angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(24): p. 9017-22.
101. Chabbert-de Ponnat, I., et al., *Soluble CD100 functions on human monocytes and immature dendritic cells require plexin C1 and plexin B1, respectively*. Int Immunol, 2005. **17**(4): p. 439-47.
102. Luque, M.C., et al., *CD100 and plexins B2 and B1 mediate monocyte-endothelial cell adhesion and might take part in atherogenesis*. Mol Immunol, 2015. **67**(2 Pt B): p. 559-67.
103. Li, M., et al., *CD100 enhances dendritic cell and CD4+ cell activation leading to pathogenetic humoral responses and immune complex glomerulonephritis*. J Immunol, 2006. **177**(5): p. 3406-12.
104. Li, M., et al., *Endogenous CD100 promotes glomerular injury and macrophage recruitment in experimental crescentic glomerulonephritis*. Immunology, 2009. **128**(1): p. 114-22.
105. Tamagnone, L., et al., *Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates*. Cell, 1999. **99**(1): p. 71-80.

106. Swiercz, J.M., et al., *Plexin-B1 directly interacts with PDZ-RhoGEF/LARG to regulate RhoA and growth cone morphology*. *Neuron*, 2002. **35**(1): p. 51-63.
107. Moreau-Fauvarque, C., et al., *The transmembrane semaphorin Sema4D/CD100, an inhibitor of axonal growth, is expressed on oligodendrocytes and upregulated after CNS lesion*. *J Neurosci*, 2003. **23**(27): p. 9229-39.
108. Giacobini, P., et al., *Semaphorin 4D regulates gonadotropin hormone-releasing hormone-1 neuronal migration through PlexinB1-Met complex*. *J Cell Biol*, 2008. **183**(3): p. 555-66.
109. Kuklina, E.M. and I.V. Nekrasova, *New aspects of the Sema4D-dependent control of lymphocyte activation*. *Dokl Biol Sci*, 2017. **473**(1): p. 84-88.
110. Witherden, D.A., et al., *The CD100 receptor interacts with its plexin B2 ligand to regulate epidermal gammadelta T cell function*. *Immunity*, 2012. **37**(2): p. 314-25.
111. Winberg, M.L., et al., *Plexin A is a neuronal semaphorin receptor that controls axon guidance*. *Cell*, 1998. **95**(7): p. 903-16.
112. Bork, P., et al., *Domains in plexins: links to integrins and transcription factors*. *Trends Biochem Sci*, 1999. **24**(7): p. 261-3.
113. Antipenko, A., et al., *Structure of the semaphorin-3A receptor binding module*. *Neuron*, 2003. **39**(4): p. 589-98.
114. Takahashi, T. and S.M. Strittmatter, *Plexina1 autoinhibition by the plexin sema domain*. *Neuron*, 2001. **29**(2): p. 429-39.
115. Artigiani, S., P.M. Comoglio, and L. Tamagnone, *Plexins, semaphorins, and scatter factor receptors: a common root for cell guidance signals?* *IUBMB Life*, 1999. **48**(5): p. 477-82.
116. Artigiani, S., et al., *Functional regulation of semaphorin receptors by proprotein convertases*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(12): p. 10094-101.
117. Melani, M. and B.M. Weinstein, *Common factors regulating patterning of the nervous and vascular systems*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2010. **26**: p. 639-65.
118. Burgess, A.W., *EGFR family: structure physiology signalling and therapeutic targets*. *Growth Factors*, 2008. **26**(5): p. 263-74.
119. Benvenuti, S. and P.M. Comoglio, *The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis*. *J Cell Physiol*, 2007. **213**(2): p. 316-25.
120. Janssen, B.J., et al., *Structural basis of semaphorin-plexin signalling*. *Nature*, 2010. **467**(7319): p. 1118-22.
121. Liu, H., et al., *Structural basis of semaphorin-plexin recognition and viral mimicry from Sema7A and A39R complexes with PlexinC1*. *Cell*, 2010. **142**(5): p. 749-61.
122. Nogi, T., et al., *Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor*. *Nature*, 2010. **467**(7319): p. 1123-7.
123. Wang, Y., et al., *Structural basis for activation and non-canonical catalysis of the Rap GTPase activating protein domain of plexin*. *Elife*, 2013. **2**: p. e01279.
124. Worzfeld, T., et al., *Genetic dissection of plexin signaling in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014. **111**(6): p. 2194-9.

125. Saito, Y., et al., *Plexin-B1 is a GTPase activating protein for M-Ras, remodelling dendrite morphology*. EMBO Rep, 2009. **10**(6): p. 614-21.
126. Oinuma, I., et al., *Direct interaction of Rnd1 with Plexin-B1 regulates PDZ-RhoGEF-mediated Rho activation by Plexin-B1 and induces cell contraction in COS-7 cells*. J Biol Chem, 2003. **278**(28): p. 25671-7.
127. Worzfeld, T. and S. Offermanns, *Semaphorins and plexins as therapeutic targets*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(8): p. 603-21.
128. Kruger, R.P., J. Aurandt, and K.L. Guan, *Semaphorins command cells to move*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 789-800.
129. Basile, J.R., et al., *Class IV semaphorins promote angiogenesis by stimulating Rho-initiated pathways through plexin-B*. Cancer Res, 2004. **64**(15): p. 5212-24.
130. Binmadi, N.O., et al., *Rho-mediated activation of PI(4)P5K and lipid second messengers is necessary for promotion of angiogenesis by Semaphorin 4D*. Angiogenesis, 2011. **14**(3): p. 309-19.
131. Toguchi, M., et al., *Involvement of Sema4D in the control of microglia activation*. Neurochem Int, 2009. **55**(7): p. 573-80.
132. Smith, E.P., et al., *Expression of neuroimmune semaphorins 4A and 4D and their receptors in the lung is enhanced by allergen and vascular endothelial growth factor*. BMC Immunol, 2011. **12**: p. 30.
133. Granziero, L., et al., *CD100/Plexin-B1 interactions sustain proliferation and survival of normal and leukemic CD5+ B lymphocytes*. Blood, 2003. **101**(5): p. 1962-9.
134. Giordano, S., et al., *The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(9): p. 720-4.
135. Rody, A., et al., *Loss of Plexin B1 is highly prognostic in low proliferating ER positive breast cancers--results of a large scale microarray analysis*. Eur J Cancer, 2009. **45**(3): p. 405-13.
136. Rody, A., et al., *Poor outcome in estrogen receptor-positive breast cancers predicted by loss of plexin B1*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(4): p. 1115-22.
137. Ye, S., et al., *Plexin-B1 silencing inhibits ovarian cancer cell migration and invasion*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 611.
138. Okuno, T., et al., *Roles of Sema4D-plexin-B1 interactions in the central nervous system for pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2010. **184**(3): p. 1499-506.
139. Chiu, C.J., et al., *Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal*. Arch Surg, 1970. **101**(4): p. 478-83.
140. Sun, Q., et al., *Hypoxia-inducible factor-1-mediated regulation of semaphorin 4D affects tumor growth and vascularity*. J Biol Chem, 2009. **284**(46): p. 32066-74.
141. Huang, J., et al., *Neutrophil-Derived Semaphorin 4D Induces Inflammatory Cytokine Production of Endothelial Cells via Different Plexin Receptors in Kawasaki Disease*. Biomed Res Int, 2020. **2020**: p. 6663291.

142. Dougan, M., G. Dranoff, and S.K. Dougan, *GM-CSF, IL-3, and IL-5 Family of Cytokines: Regulators of Inflammation*. Immunity, 2019. **50**(4): p. 796-811.
143. Salter, B.M., et al., *Thymic stromal lymphopoietin activation of basophils in patients with allergic asthma is IL-3 dependent*. J Allergy Clin Immunol, 2015. **136**(6): p. 1636-1644.
144. Oppenheimer-Marks, N., et al., *Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes*. J Immunol, 1991. **147**(9): p. 2913-21.
145. Bui, T.M., H.L. Wiesolek, and R. Sumagin, *ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis*. J Leukoc Biol, 2020. **108**(3): p. 787-799.
146. Sakurada, S., T. Kato, and T. Okamoto, *Induction of cytokines and ICAM-1 by proinflammatory cytokines in primary rheumatoid synovial fibroblasts and inhibition by N-acetyl-L-cysteine and aspirin*. Int Immunol, 1996. **8**(10): p. 1483-93.
147. Cook-Mills, J.M., M.E. Marchese, and H. Abdala-Valencia, *Vascular cell adhesion molecule-1 expression and signaling during disease: regulation by reactive oxygen species and antioxidants*. Antioxid Redox Signal, 2011. **15**(6): p. 1607-38.
148. Wittchen, E.S., *Endothelial signaling in paracellular and transcellular leukocyte transmigration*. Front Biosci (Landmark Ed), 2009. **14**(7): p. 2522-45.
149. Fleming, T.J., M.L. Fleming, and T.R. Malek, *Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family*. J Immunol, 1993. **151**(5): p. 2399-408.
150. Fazzari, P., et al., *Plexin-B1 plays a redundant role during mouse development and in tumour angiogenesis*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 55.
151. Smith, E.S., et al., *SEMA4D compromises blood-brain barrier, activates microglia, and inhibits remyelination in neurodegenerative disease*. Neurobiol Dis, 2015. **73**: p. 254-68.
152. Zhou, Y.F., et al., *Sema4D/PlexinB1 inhibition ameliorates blood-brain barrier damage and improves outcome after stroke in rats*. FASEB J, 2018. **32**(4): p. 2181-2196.
153. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 710-20.
154. Sankaran-Walters, S., R. Hart, and C. Dills, *Guardians of the Gut: Enteric Defensins*. Front Microbiol, 2017. **8**: p. 647.
155. Pazgier, M., et al., *Human beta-defensins*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(11): p. 1294-313.
156. Kozar, R.A., et al., *Alterations in content and localization of defensins in rat ileum and jejunum following ischemia-reperfusion. Specific peptides, in specific places, for specific jobs?* Eplasty, 2011. **11**: p. e8.

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin unter Betreuung von Prof. Dr. med. Peter Rosenberger durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. med. Peter Rosenberger (Doktorvater) und Dr. rer. Nat. David Köhler (Arbeitsgruppenleiter).

Bis auf die Tierversuche wurden sämtliche Versuche nach Einarbeitung durch Dr. rer. nat. David Köhler, Dr. rer. nat. Claudia Eggstein und Michaela Hoch-Gutbrod von mir eigenständig durchgeführt. Unterstützung erhielt ich auch durch Dr. rer. nat. Tiago Granja.

Die Präparation und Behandlung der Mäuse bei den Tierversuchen wurden von Dr. rer. nat. David Köhler und Dr. rer. nat. Claudia Eggstein durchgeführt, wobei ich assistierte.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich nach Beratung und Anleitung durch Dr. rer. nat. David Köhler.

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

Tübingen, den 23.10.2023

[Sven Özde Günther]

## 8 Veröffentlichungen und Kongressbeiträge

**Günther S.**, D. Köhler, T. Granja, C. Eggstein, und P. Rosenberger. Die Semaphorin4D – PlexinB1 Achse beeinflusst die hypoxische Inflammation. Leipzig, Deutschland, 18. Kongress der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI), Dezember 05-07, 2018, Programmheft S. 149, EP/06/01, E-Poster Vortrag

Tang L., T. Granja, D. Köhler, M. Blaha, **S. Günther** and P. Rosenberger. Neuronal Guidance Protein Semaphorin4D influences inflammatory lung injury. Germany, the 21st Congress of the German Interdisciplinary Association for Intensive Care and Emergency Medicine (DIVI 21 VIRTUELL) 01 - 03.12.2021, Online poster presentation

Tang L., T. Granja, D. Köhler, M. Blaha, **S. Günther** and P. Rosenberger. Neuronal Guidance Protein Semaphorin4D influences inflammatory lung injury. Bad Urach, Germany, Ph.D. Retreat of the Medicine Faculty - University Tübingen, 23.06.2022, Poster presentation

## **9 Danksagung**

Ein ganz besonderer Dank geht an Prof. Dr. med. Peter Rosenberger, ohne ihn wäre diese Arbeit überhaupt nicht möglich gewesen. Ich bin zutiefst dankbar über die Lernprozesse und Erfahrungen, die ich in seiner Arbeitsgruppe erleben durfte. Darüber hinaus danke ich Dr. rer. nat. David Köhler, Dr. rer. nat. Tiago Granja, Dr. rer. nat. Claudia Eggstein und Michaela Hoch-Gutbrod, die mich als Team von meinen ersten Tagen an begleitet haben und mir zu jeder Zeit mit Rat und Tat beiseite standen.

Ein kollegialer Dank geht zusätzlich an Dr. med. Kristian Ngamsri, für sowohl die fachlichen als auch nebensächlichen Gespräche, die mich immer bei Laune gehalten haben.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Özlem und Markus Günther die mich mein gesamtes Leben unterstützen, mir die Arbeit an dieser Dissertation und noch so vieles mehr ermöglicht haben.