

Aus der
Universitätsklinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin

**The Uncoordinated – 5 Homolog B Receptor Affects
Hepatic Ischemia Reperfusion Injury**

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

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

**vorgelegt von
Kröhnert, geb. Rutow, Georg Friedemann**

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Rosenberger

2. Berichterstatter: Professorin Dr. M. Avci-Adali

Tag der Disputation: 14.12.2020

*Meiner Familie
gewidmet*

1 Inhaltsverzeichnis

1	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	4
2	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	6
3	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	9
4	<i>Kurzübersicht</i>	10
5	<i>Grundlagen</i>	11
5.1	Die Immunantwort.....	11
5.2	Ischämie und Reperfusion	12
5.3	Die Leber	14
5.4	Neuronale-Guidance-Proteine	15
5.5	UNC5B.....	16
5.6	Die Struktur von UNC5B	17
5.7	Die Verwendung muriner Modelle.....	18
5.8	Die Rolle von UNC5B im Rahmen des hepatischen Ischämie- und Reperfusionsschadens	18
5.9	Wissenschaftliche Hypothese und Ziel der Arbeit.....	21
6	<i>Material und Methoden</i>	22
6.1	Mäuse.....	22
6.2	Leberischämiemodell.....	22
6.3	Operationsmaterial.....	23
6.4	Verwendete Antikörper	25
6.5	Real time PCR	25
6.6	Messung von Zytokinen	26
6.7	Immunhistochemische Färbung von neutrophilen Granulozyten im Mausgewebe.....	26

6.8	Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Analysen.....	27
6.9	Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Färbungen.....	27
6.10	Datenauswertung.....	28
7	<i>Ergebnisse</i>	29
7.1	Aktivitätsmuster von UNC5B.....	29
7.1.1	UNC5B wird bei Mäusen auch außerhalb des ZNS exprimiert	29
7.1.2	Expression von UNC5B in Zellen des Immunsystems	29
7.2	Der hepatische Ischämie-Reperfusionsschaden fällt bei UNC5B-Knock-out Mäusen geringer aus.....	31
7.3	Die funktionelle Hemmung von UNC5B hat während eines Ischämie-Reperfusionsschadens der Leber einen schützenden Effekt.....	35
8	<i>Diskussion</i>	39
9	<i>Zusammenfassung</i>	44
10	<i>Literaturverzeichnis</i>	46
11	<i>Appendix</i>	52
11.1	Erklärungen zum Eigenanteil	52
11.2	Veröffentlichungen	53
12	<i>Danksagung</i>	54

2 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ALT	Alaninaminotransferase
APR	Akute-Phase-Reaktion
AS	Aminosäure
AST	Aspartataminotransferase
A2BAR	A2B Adenosin Rezeptor
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DSO	Deutsche Stiftung Organspende
DSS	Dextran Sulfat Natrium
DD	Death Domain
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
fMLP	Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin
GP IIb/IIIa	Glykoprotein IIb/IIIa Rezeptor = Integrin $\alpha_{IIb} \beta_3$ Rezeptor = CD41/CD61 = Fibrinogen Rezeptor
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
ICAM-2	Intercellular adhesion molecule-2
I-FABP	intestinal fatty acid binding protein
IL-1 β	Interleukin 1 β
IL-6	Interleukin 6
IL-10	Interleukin 10

IPM	intermittent Pringle maneuver
IR	Ischämie Reperfusion
IRI	Ischemia-Reperfusion-Injury
HSP-70	Hitzeschockprotein-70
LDH	Laktatdehydrogenase
MARS®	Molecular Adsorbents Recirculation System
µg	Mikrogramm
MOV	Multiorganversagen
MODS	Multiorgandysfunktion
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MPO	Myeloperoxidase
Neo1	Neogenin
NGP	Neuronal-Guidance-Protein
NK-Zellen	Natural-Killer-Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMN	polymorphnuclear leucocytes (Granulozyten)
SD	Standardabweichung
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
SPAD®	Single Pass Albumin Dialysis
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TPG	Transplantationsgesetz

TTC	Triphenyl Tetrazolium Chloride
U	Unit
UNC5B	Uncoordinated-5 Homolog B Receptor
UPA	Urokinase-type plasminogen activator
VILI	Ventilator-Induced-Lung-Injury
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem

3 **Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1	17
Abbildung 2	24
Abbildung 3	25
Abbildung 4	29
Abbildung 5	30
Abbildung 6	31
Abbildung 7	32
Abbildung 8	33
Abbildung 9	33
Abbildung 10	34
Abbildung 11	35
Abbildung 12	36
Abbildung 13	36
Abbildung 14	37
Abbildung 15	38
Abbildung 16	38

4 Kurzübersicht

Aktuelle Forschungen konnten weitere Funktionen für den Rezeptor des neuronalen Wachstumsproteins (NGP) UNC5B auch außerhalb des Nervensystems zeigen. Da Ischämie-Reperfusionsschäden (IRI) eine häufige Ursache für Leberfunktionseinschränkungen und -versagen sind und UNC5B zu einer Beeinflussung der akuten inflammatorischen Antwort führt, untersuchten wir die Auswirkungen, welche UNC5B auf einen IRI der Leber hat. Wir konnten darstellen, dass UNC5B^{+/-} Mäuse einen geringeren IRI und eine verminderte Infiltration von neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu Wildtyp (WT)-Tieren zeigten.

Diese Ergebnisse korrelierten mit den Serum-Werten von Laktatdehydrogenase (LDH), Aspartataminotransferase (AST) und Alaninaminotransferase (ALT), sowie der Einwanderung von Granulozyten in ischämische Leberareale und den Serumwerten inflammatorischer Zytokine. Darüber hinaus ließ sich durch die Injektion eines anti-UNC5B-Antikörpers eine signifikante Reduktion des hepatischen IRI zeigen. Dementsprechend zeigen unsere Untersuchungen eine bedeutende Rolle von UNC5B im Rahmen eines IRI der Leber und weisen in UNC5B auf einen möglichen Angriffsort zur Vermeidung oder Verminderung eines IRI der Leber hin.

5 Grundlagen

5.1 Die Immunantwort

Die grundlegende Funktion des Immunsystems ist die Abwehr von Infektionen welche den Organismus bedrohen, verursacht durch das Eindringen eines Antigens durch die äußeren Schutzmechanismen des Körpers oder durch die Aktivierung auf Grund von Zelltod im Rahmen eines Systemic-Inflammatory-Response-Syndroms (SIRS) [1], weshalb in beiden Fällen auch generell von Inflammation gesprochen werden kann. Diese Inflammation kann sowohl lokal als auch systemisch stattfinden, sie kann als akutes Ereignis auftreten oder im Rahmen eines chronischen Prozesses [2]. Die Folgen für den Organismus sind von einer Vielzahl an Faktoren abhängig und können in ihrer Ausprägung von irrelevant bis hin zum Tod reichen.

Um diese Aufgabe zu bewältigen, bedient sich das Immunsystem zweier grundsätzlich verschiedener Systeme. Zum einen der angeborenen oder auch unspezifisch genannten Immunabwehr, und zum anderen der adaptiven oder auch als spezifisch bezeichneten Immunabwehr [3], wobei letzterer im Rahmen der Fragestellungen dieser Arbeit eine untergeordnete Rolle zukommt.

Die angeborene Immunantwort, welche sich unter anderem einer großen Anzahl an Zytokinen und anderer zellulärer Botenstoffe, wie „Akute-Phase“ Proteinen und dem Komplement-System einerseits, sowie Phagozyten (Neutrophile, Monozyten und Makrophagen), Mediatoren sezernierender Zellen (Basophile, Mastzellen und Eosinophile) und NK-Zellen andererseits bedient [3], stellt die essentielle Grundlage zum Verständnis der in dieser Arbeit untersuchten Vorgänge dar.

Die Aktivierung und daraufhin folgende Migration von Makrophagen in entzündete Gewebe um dort Antigene, Zelltrümmer und anderes, als körperfremd identifiziertes Material zu phagozytieren und gegebenenfalls als Antigene zu präsentieren, stellt einen wichtigen Anteil der unspezifischen Immunantwort dar.

Eine weitere Säule des angeborenen Immunsystems bildet das von Paul Ehrlich [4] und Jules Bordet beschriebene Komplementsystem, welches mit bis heute über dreißig bekannten verschiedenen Faktoren unter anderem für die Opsonisierung sorgt, also einer Art chemotaktischer Markierung von Pathogenen, dass diese von Makrophagen als solche erkannt und eliminiert werden können [5].

Das dritte wichtige Standbein der humoralen Immunantwort bildet die große Gruppe der Zytokine, aus der hier exemplarisch auf das in dieser Arbeit ebenfalls als Parameter für Inflammation verwendete Interleukin-6 (IL-6) eingegangen werden soll. IL-6 wird schon lange als Aktivator der Akute-Phase-Reaktion (APR) und Stimulator von Lymphozyten betrachtet. In den letzten Jahren konnte allerdings gezeigt werden, dass IL-6 über ein komplexes Zusammenspiel mit anderen Zytokinen nicht nur im Rahmen der angeborenen Immunantwort an zentraler Stelle steht, sondern darüber hinaus auch noch als Verbindungsglied zwischen humoraler und spezifischer Immunantwort fungiert. Aus diesem Grund konnten zahlreiche Studien zeigen, dass sich IL-6 als wertvoller Parameter zum Monitoring von Inflammationsgeschehen verwenden lässt [6].

5.2 Ischämie und Reperfusion

Die Forschungen zum Verständnis auf dem Gebiet der Ischämie-Reperfusionsschäden haben in den letzten 15 Jahren einen anhaltend hohen Stellenwert in der Grundlagenforschung erreicht. Bereits im Jahr 2007 hat sich die Zahl der Veröffentlichungen zu diesem Themenbereich beinahe verdreifacht [7]. Kommt es zur kritischen Verminderung oder kompletten Unterbrechung des Blutflusses und dem damit verbundenen Ausbleiben von Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr ins Gewebe, setzt eine Kaskade zahlreicher pathophysiologischer Vorgänge ein, welche bei einer Wiederherstellung des Blutflusses und der damit einsetzenden Reperfusion noch einmal an Dynamik gewinnt [8].

Die Ursachen für Gewebischämien sind vielschichtig und reichen vom naheliegenden akuten Gefäßverschluss über die Kalt-Ischämie-Zeit des Transplantorgans einer postmortalen Spende, bis hin zu den hochkomplexen Krankheitsbildern des Schocks und des Multiorganversagens [9].

Für den Bereich der Leber-Ischämie konnten im Besonderen folgende pathophysiologische Vorgänge gezeigt werden, welche zu einer vermehrten Gewebeschädigung führen: Störungen im Calciumhaushalt, die Entstehung von reaktiven Sauerstoff-Radikalen und Stickstoffmonoxid (NO)-Derivaten, Veränderungen in der Mikrozirkulation, die Aktivierung von Kupffer-Zellen der Leber, sowie eine Komplementaktivierung [10]. Ackermann et al. gelang es im Rahmen ihrer Forschungen zum induzierten hämorrhagischen Schock der Leber bei Ratten, einen deutlichen Anstieg des Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Levels für Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Interleukin 10 (IL 10) und Hitzeschockprotein-70 (HSP-70) nachzuweisen. Ein besonders hoher Anstieg zeigte sich hier direkt im Anschluss an die Resuspension und damit auch Reperfusion der Tiere nach der in der Versuchsreihe induzierten dreistündigen Schockphase [11].

Des Weiteren konnten Chen et al. in ihren Versuchen mit Ratten einen deutlichen Anstieg des IRI bei Lebertransplantationen von hirntoten Spendertieren zeigen [12]. Diese erstaunliche Entdeckung stellt für die klinische Transplantationsmedizin einen bedeutenden Gesichtspunkt dar. Der Blick in den Jahresbericht der Deutschen Stiftung Organspende (DSO) verrät, dass es sich bei 820 der 877 im Jahr 2018 in Deutschland transplantierten humanen Leberspenden um postmortale Spenden handelte [13]. Gemäß den Richtlinien, welche in Deutschland durch das Transplantationsgesetz (TPG) geregelt sind, muss vor einer postmortalen Spende der Hirntod des Spenders durch die nach Protokoll durchgeführte Hirntoddiagnostik durch entsprechend qualifizierte Fachärztinnen und -ärzte bestätigt werden.

5.3 Die Leber

Die Leber stellt eines der komplexesten und für die Aufrechterhaltung der Homöostase wichtigsten Organe unseres Körpers dar. Durch die vielfältigen Funktionen der Leber in der Proteinsynthese, im Stoffwechsel, beim Abbau von toxischen Substanzen, ihrem Anteil an der Regulation des Zucker-, Wärme-, sowie des Säure-Basen-Haushalts stellen Leberfunktionsstörungen eine essentielle Lebensbedrohung für kritisch kranke Patienten dar.

Im klinischen Alltag stellen Leberfunktionsstörungen häufige und oftmals schwerwiegende bis lebensbedrohliche Komplikationen für kritisch kranke Patienten dar. So konnten Kobashi et al. für Patienten in der Sepsis zeigen, dass der Anteil der Patienten mit einer schlechten Prognose signifikant höher war bei den Patienten, welche eine Leberfunktionsstörung zeigten. In der Subgruppen Analyse zur Ätiologie der Leberdysfunktion zeigte sich hier die Schock-Leber mit einem Anteil von 62,8% als besonders relevanter Auslöser für ein Leberversagen [14].

Störungen der Leberfunktion können zu einer Vielzahl an Komplikationen führen, wie zum Beispiel einem Hepato-Renalen Syndrom, Störungen der Blutgerinnung, einer insuffizienten Immunantwort, einem hepatischen Koma, hämodynamischer Instabilität sowie ein Verlust der Thermogenese, um nur einige Beispiele zu nennen [15].

Auch verschiedene Ansätze eines artifiziellen Leberersatzverfahrens, wie das um die Jahrtausendwende eingeführte Molecular Adsorbents Recirculation System (MARS®), sowie die darauf aufbauenden Folgesysteme Single Pass Albumin Dialysis (SPAD®) oder Prometheus® konnten die anfänglich in sie gesetzten Hoffnungen nicht vollständig erfüllen, beziehungsweise sich im klinischen Alltag bisher nicht auf ein breites Anwendungsfeld durchsetzen.

Die Gründe hierfür sind vielschichtig, teils der komplexen Methodik, der begrenzten Effektivität sowie dem enormen Verbrauch an materiellen und personellen Ressourcen geschuldet, wie Garcia et al. in ihrer Übersichtsarbeit zeigen konnten [16].

Zwar ist bereits seit der Antike die erstaunliche Fähigkeit des Lebergewebes zur Regeneration bekannt. Darüber hinaus konnten auch aktuelle Untersuchungen sogar für bereits fibrotisch verändertes Gewebe nach IRI eine schnellere Regeneration mit einem höheren Grad an funktionellem Lebergewebe im Vergleich zu nicht fibrotisch vorgeschädigtem Gewebe zeigen [17]. Doch lässt sich schließlich feststellen, dass eine Möglichkeit einen IRI der Leber zu verhindern oder zumindest in seinem Ausmaß zu mindern, sicherlich sowohl aus wissenschaftlicher Sicht, als auch im Interesse des Patienten-Benefits das anzustrebende Ziel darstellen sollte.

5.4 Neuronale-Guidance-Proteine

Kolodkin , Serafini und Kennedy gehörten zu den ersten Autoren, welche von Neuronalen-Guidance-Proteinen und ihrem Einfluss auf das Wachstum von Axonen berichteten [18-20]. Alle drei konnten in ihren Untersuchungen Mitte der 1990'er Jahre zeigen, dass die NGP Semaphorin, sowie Netrin-1 und -2 als membranständige Proteine mittels chemotaktischer Reize in der Lage sind Wachstum und Wachstumsrichtung von Axonen bei der komplexen Ausbildung des neuronalen Netzwerkes zu beeinflussen. In den darauffolgenden Jahren wurden weitere NGP entdeckt und es mehrten sich die Hinweise, dass sie nicht nur während der Embryonal- und Entwicklungsphase an der Ausgestaltung neuronaler Netzwerke mitwirkten. Die Expression in zahlreichen anderen Geweben und die ebenfalls nachgewiesene Mitwirkung bei der Migration und Adhäsion von Zellen brachten die NGP in den weiteren Fokus der Grundlagenforschung [21].

Für die Familie der Netrine wurden die folgenden zwei Rezeptor Familien beschrieben: der DCC (Deleted in Colorectal Cancer) Rezeptor mit seinen Unterklassen Dcc und Neogenin (Neo1), sowie die Gruppe der UNC5 Rezeptoren.

5.5 UNC5B

Eine der ersten Beschreibungen von UNC5B stammt von Tanikawa et al. aus dem Jahr 2003, in deren Arbeit UNC5B auch noch unter der Bezeichnung p53RDL1 geführt wird. Bereits hier beschreiben die Autoren eine mögliche Rolle von UNC5B und seines Liganden Netrin bei der p53 induzierten Apoptose [22].

Auch UNC5B gehört zur Gruppe der Neuronalen-Guidance-Proteine (NGP), welche erstmalig im Zentralen Nervensystem (ZNS) nachgewiesen wurden. Dort besteht die Funktion der NGP in der Steuerung des Wachstums und der Positionierung von Neuronen und Axonen mittels einer Kombination aus sowohl chemoattraktiven als auch chemorepulsiven Signalen, um die komplexe Verschaltung des neuronalen Netzwerkes zu bilden [23, 24]. Jüngste Daten zeigen, dass der NGP Rezeptor UNC5B noch über weitere Funktionen außerhalb des ZNS verfügt, im Speziellen auch über Fähigkeiten der Beeinflussung und Modulation des Immunsystems [25-29].

UNC5B kodiert ein Gen aus der Familie der Netrin-Rezeptoren und umfasst bei Mäusen die Subklassen UNC5A, UNC5B, UNC5C und UNC5D, sowie den UNC5H1-4 Rezeptor beim Menschen. Bei UNC5 handelt es sich um in der Zellwand beheimatete Rezeptoren, welche eine Rolle bei der Induktion der Apoptose übernehmen [30]. Außerhalb des ZNS wird UNC5B in Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten sowie in zahlreichen anderen Geweben exprimiert [31], wobei UNC5B möglicherweise an der Migration dieser Zellen beteiligt ist. Der Effekt einer Netrin-1 vermittelten Hemmung dieser Zellen lässt sich nach Blockade des UNC5B Rezeptors nicht mehr nachweisen.

Die Bedeutung der Gruppe der UNC5-Rezeptoren wurde erstmalig von Hedgecock et al beschrieben [32]. Hierbei zeigten sich in Versuchen mit *Caenorhabditis elegans* bei Organismen mit Mutationen von UNC5 sowohl Störungen im neuronalen Wachstum, als auch Veränderungen in den für Migration und Adhäsion verantwortlichen Bereichen von meso-und ektodermalen Zellen.

Bei Vertebraten konnten Hong et al. 1999 für UNC5B eine Beeinflussung der chemotaktischen (abstoßenden) Bereiche von Netrin-1 während der Entwicklung des ZNS nachweisen [33].

5.6 Die Struktur von UNC5B

UNC5B wird aus 945 Aminosäuren gebildet und hat eine Molekularmasse von 103638 Dalton. Es besteht aus zwei Immunglobulin Domänen, zwei Thrombospondin Typ I Domänen, welche extrazellulär liegen, einer ZU5 Domäne, UPA und einer C-terminalen Domäne mit Death-Domain (DD) [34]

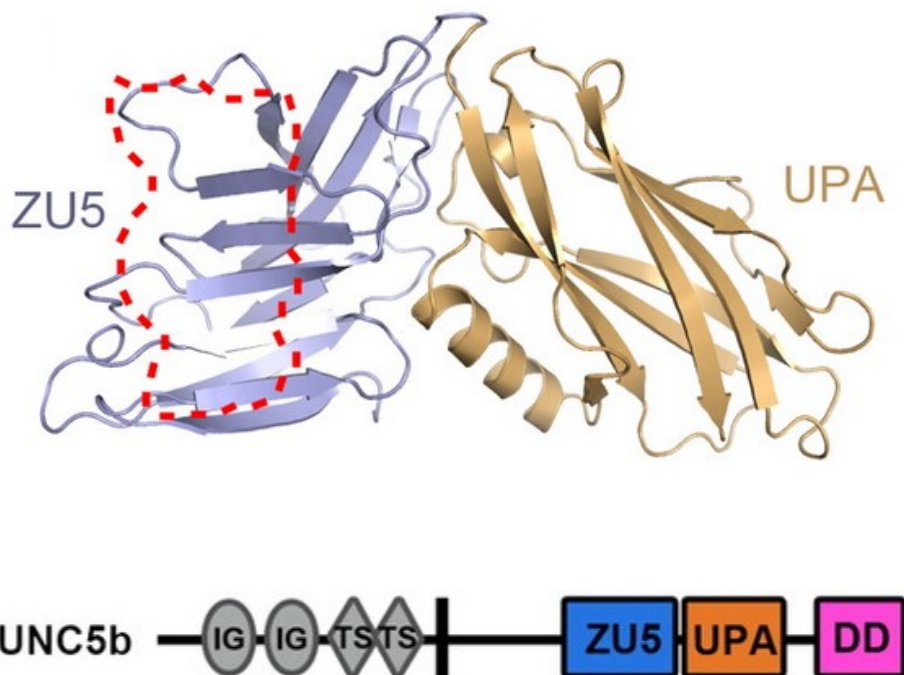


Abbildung 1

Struktur von UNC5B, modifiziert nach Chao et al. (2012) Structure of the ZU5-ZU5-UPA-DD tandem of ankyrin-B reveals interaction surfaces necessary for ankyrin function. PNAS March 27, 2012 109 (13) 4822-4827

5.7 Die Verwendung muriner Modelle

Die Verwendung muriner Modelle ist in der wissenschaftlichen Forschung weit verbreitet. Obwohl es viele Gründe gibt bei experimentellen Forschungsarbeiten auf niedrigere Spezies wie Hefen oder Fruchtfliegen zurückzugreifen, wie zum Beispiel Aspekte des Tierschutzes, aber auch logistische und wirtschaftliche Betrachtungen, ist es bei spezifischen Fragestellungen auch heute noch oft unumgänglich ein Modell mit hoher Artverwandschaft zu wählen. Für den Bereich der Säugetiere hat sich die Maus (*Mus musculus*) in zahlreichen Modellen sowohl für die Grundlagenforschung, als auch für konkrete Fragestellungen zu bestimmten Erkrankungen und Pathophysiologien bereits vielfach bewährt. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit im Aufbau der Organe, sowie bei der Entwicklung von Krankheiten und pathophysiologischen Zuständen eignet sich die Maus als Modell hervorragend [35].

Das in dieser Arbeit zum Einsatz gekommene "hanging-weight system" zur Erzeugung einer passageren Teilischämie der Leber wurde 2008 von Hart et al. [36] beschrieben und seitdem zu verschiedenen Fragestellungen im Forschungsbereich der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, sowie assoziierten Zentren standardisiert eingesetzt [37, 38].

5.8 Die Rolle von UNC5B im Rahmen des hepatischen Ischämie- und Reperfusionsschadens

Im klinischen Alltag treten eine Reihe von Situationen auf, in welchen es zu Ischämie- und Reperfusionssphänomenen kommen kann. Dies betrifft sowohl die Transplantationschirurgie als auch die Leber- [39] und Kardiochirurgie im Allgemeinen. Darüber hinaus kann jegliche Form von Schockzustand einen IR-Schaden mit der möglichen Folge eines Multiorganversagens hervorrufen [40]. Einer der Gründe, die Kaltischämiezeit bei der Lebertransplantation möglichst kurz zu halten ist die im Rahmen der Wiedererwärmung und des „Flushens“

des Transplantats auftretende Entzündungsreaktion so gering wie möglich zu halten. In der klinischen Praxis zeigen sich bereits sofort nach Freigabe der Gefäßversorgung des Transplantats einige Effekte der akuten Reperfusion wie hämodynamische Instabilität, Verschiebung des pH mit konsekutivem Verbrauch von Puffersubstanzen und Verschiebungen des Base-Excess. Darüber hinaus gibt es aber auch allgemein in der Leberchirurgie Situationen, in welchen die Leberperfusion im Ganzen (beim so genannten Pringle-Manöver) oder in Teilen zeitweise unterbrochen werden muss, um verbesserte Sichtbedingungen im Operationsfeld zu erreichen und einen für den Patienten relevanten Blutverlust zu verhindern, bzw. zu verringern.

Dello et al. konnten in ihrer Arbeit bei Patienten mit einem vollständigen Ausklemmen der Arteria hepatica acht Stunden nach dem Eingriff einen signifikanten Anstieg von Intestinal Fatty Acid Binding Protein (I-FABP) im Serum zeigen. Dies wurde von den Autoren als Hinweis für eine Ischämiereaktion des Intestinalen Epithels gewertet [41]. Andere bereits untersuchte Reaktionen des Gewebes auf einen IRI sind zum Beispiel Gewebnekrosen, die Bildung von freien Sauerstoff-Radikalen [42], die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, sowie die Allokation und Aktivierung von Zellen der Immunabwehr [43-45]. Weitere auf eine IRI einsetzende pathophysiologische Veränderungen und Mechanismen folgen im Wesentlichen den gleichen Prinzipien wie denen der Transplantationschirurgie [39].

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung und Migration von Leukozyten einer Regelung durch das System der Chemokine unterliegt [46]. Allerdings konnten neuere Arbeiten zeigen, dass die NGP und ihre Rezeptoren einen alternativen Weg der Steuerung im Immunsystem darstellen, welcher in besonderem Maße die Aktivierung und Migration von Leukozyten beeinflusst [47, 48]

Für das NGP Netrin-1, ein Ligand von UNC5B, konnte bereits in mehreren Tierversuchsreihen zu Hypoxie, Ventilator-assoziierten Lungenschäden (VILI), Peritonitis, sowie Ischämie der Nieren eine anti-inflammatorische Wirkung gezeigt werden. Tadagavadi et al. konnten in ihrer Arbeit zeigen, dass die Verabreichung von Netrin-1 eine Reduktion von IRI-Schäden der Nieren

erzeugte. Dieser positive Effekt ließ sich durch die vorherige Gabe eines UNC5B Antikörpers aufheben, was den Schluss nahelegt, dass er durch eine Interaktion mit UNC5B vermittelt wird [49].

5.9 Wissenschaftliche Hypothese und Ziel der Arbeit

Leberschäden auf Grund von Ischämie-Reperfusionseffekten stellen sowohl im Bereich der Transplantationschirurgie, als auch bei kritisch kranken Patienten eine Ursache für schwerwiegende Komplikationen bis hin zu tödlichen Verläufen dar.

Ausgehend von den in der Einleitung dargelegten Erkenntnissen und der daraus abgeleiteten Hypothese, dass das Neuronale Guidance Protein UNC5B in der Lage ist durch seine Liganden einen Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber im Sinne einer antiinflammatorischen Wirkung mit Reduktion des entstehenden Zellschadens am Zielorgan Leber zu beeinflussen, erstellten wir die folgenden Kernfragen um diese Zusammenhänge genauer zu untersuchen.

- 1.) Lässt sich UNC5B bei C57Bl/6 Mäusen auch außerhalb des Zentralnervensystems nachweisen und wenn ja, lässt sich daraus eine Rolle bei systemischen Entzündungsreaktionen ableiten?
- 2.) Hat der Knock-out von UNC5B Folgen für das Ausmaß des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens?
- 3.) Falls dies der Fall ist, korreliert dies mit einer verminderten Gewebsinfiltration der post-ischämischen Lebersegmente durch Granulozyten (PMN)?
- 4.) Lässt sich der hepatische Ischämie-Reperfusionsschaden durch kurzfristige Gabe eines UNC5B Antikörpers vor Beginn der Reperfusion therapeutisch beeinflussen?

6 Material und Methoden

6.1 Mäuse

Die Tierversuche wurden gemäß den deutschen Richtlinien für Tierversuche und den Richtlinien der Ethikkommission der Eberhard-Karls-Universität Tübingen durchgeführt. Alle Auflagen des Regierungspräsidiums Tübingen wurden eingehalten. Die heterozygoten *UNC5B* Mäuse stammten von Dr. Tessier-Lavigne und wurden gezüchtet und genetisch überprüft wie bei Henes et al. und Rosenberger et al. bereits zuvor beschrieben [50, 51]. Die *UNC5B* – Mäuse und die WT-Tiere der Kontrollgruppe wurden nach gleichem Alter (6-8 Wochen) und Gewicht (20-25 g) ausgesucht, sowie per Zufall nach Geschlecht zugeordnet. Die Haltung der Tiere erfolgte in Kleingruppen bis zu vier Tieren in Makrolon Typ II long Käfigen. Lediglich bei Territorialverhalten oder Rankämpfen fand eine kurzzeitige Einzelhaltung männlicher Tiere statt. Diese Tiere befanden sich trotzdem jederzeit in hör-, sicht-, und riechweite von Artgenossen. Die Raumtemperatur war konstant bei 20-23° Celsius geregelt, sowie die Luftfeuchtigkeit welche 50 bis maximal 60 % gehalten wurde. Die Beleuchtung des Haltungsraumes war auf einen Tag-Nacht-Rhythmus von 12-Stunden eingestellt und den Tieren stand Wasser, Futter, sowie Nistmaterial ad libitum zur Verfügung. Als Einstreu kam autoklaviertes, staubarmes Weichholzgranulat zum Einsatz.

6.2 Leberischämiemodell

Die Mäuse erhielten eine gewichtsadaptierte Intraperitoneal Anästhesie mittels Pentobarbital (70 mg/kg Körpergewicht). Anschließend wurden die Tiere auf einem beheizten Präparier Tisch gelagert. Die Körpertemperatur wurde konstant mittels rektaler Temperatursonde erfasst und bei 37°C gehalten.

Daraufhin erfolgte eine mediane Längslaparotomie mit einer Inzision entlang der Linea alba. Anschließend wurden der Magen und das Duodenum mit Hilfe eines feuchten Tupfers atraumatisch nach kaudal mobilisiert. Der weitere Eingriff erfolgte unter dem Auflichtmikroskop unter 10-facher Vergrößerung. Danach wurde vorsichtig die nun freiliegende Leber exploriert und ebenfalls atraumatisch das Periportalfeld dargestellt. Anschließend nach sicherer Identifikation des Ligamentum hepatoduodenale erfolgte eine reversible Ligatur desselben für die Dauer von 30 Minuten mittels eines atraumatischen monofilen 7-0 Nylonfadens, welcher nach vorsichtiger Unterstechung des Ligamentum hepatoduodenale einmal über Kreuz genommen und anschließend beidseits mit einem Gewicht von 2 Gramm beschwert wurde. Nach Unterbrechung der Arteria propria, Vena portae und des Gallengangs zeigten sich nur noch der Lobus caudatus sowie der Lobus dexter der Leber perfundiert [36]. Dies wurde durch ein sofortiges verblassen der nicht mehr perfundierten Leberanteile visuell kontrolliert. Des Weiteren wurde sorgfältig nach eventuellen akzidentiellen Läsionen im Operationsfeld gesucht, was zu einem Ausschluss des Tieres geführt hätte. Nach der dreistündigen Reperfusion wurden die Tiere getötet und ihnen die Leber sowie Blut entnommen. Venöse Serumanalysen der Parameter Laktatdehydrogenase (photometrische Bestimmung) (Randox, Crumlin, United Kingdom), Aspartataminotransferase und Alaninaminotransferase (colorimetrische Bestimmung) (Teco Diagnostics, Anaheim, USA) erlaubten eine Quantifizierung des entstandenen Gewebeschadens.

6.3 Operationsmaterial

Auflichtmikroskop SZX7	Olympus, Hamburg, D
Präparierschere 145 mm	Fehling Instruments, Karlstein, D
Pinzette atraumatisch 160 mm	Fehling Instruments, Karlstein, D
Mikronadelhalter Plano 2,0	Fehling Instruments, Karlstein, D
Ethilon II monofil 7-0 mit Nadel FS-2	Ethicon, Sommerville, US

Ethilon Prolene monofil 3-0

Kanüle 22 Ga

Kanüle 24 Ga

Kompressen 5x5 cm, steril

NaCl 0,9% 10 ml

Ethicon, Sommerville, US

B. Braun, Melsungen, D

B. Braun Melsungen, D

Nobamed, Wetter, D

B. Braun Melsungen, D



Abbildung 2

Situs vor Leberischämie mit Blick auf die Leber und das periportale Gefäßbündel



Abbildung 3

Situs während Leberischämie mit Ligatur des Ligamentums hepatoduodenale

6.4 Verwendete Antikörper

Die funktionelle Hemmung von UNC5B fand durch die intravenöse (i.v.) Gabe von anti UNC5B Antikörpern [49] 15 Minuten vor dem chirurgischen Eingriff statt, die verwendete Dosis betrug 5 µg/Maus, (RD Systems, AF1006).

Als Kontrolle wurde ein entsprechendes IgG genutzt.

6.5 Real time PCR

Es wurde eine Real time Polymerasekettenreaktion (PCR) mittels eines StepOnePlus™ Real time PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt um UNC5B, TNF- α , IL-6, CXCL1 und CXCL2 mRNA Serumspiegel zu bestimmen.

Dafür wurden die folgenden Primer verwendet:

UNC5B sense primer 5'-GGACCTCCT TCAGTGCTACA-3' und 5'-GCTAAGTCCTCATCCT-3' anti sense primer,
TNF- α sense primer 5'-ACTCCAGGCGGTGCCTATGT-3' und 5'-TCCAGCTGCTCCTCCACTTG-3' anti sense primer,
IL-6 sense primer 5'-ACCGCTATGAAGTTCCTCTC-3' und 5'-CTCTCCGGA CTTGTGAAGTA-3' anti sense primer,
CXCL1 sense primer 5'-TAGGAACCCCTCCTCAGCCCA-3' und 5'-AAGTCCGAACTCCCGGTGTGGT-3' anti sense primer,
CXCL2 sense primer 5'-TGGGGAAGGACATCCCAGGGTC-3' und 5'-ACAGAGCCCCGCCCCTAAGC-3' anti sense primer,
Zur Normierung der Proben wurde ein sense 5'-GGTGG CTTTTAGGATGGCAAG-3' und antisense 5'-ACTGGAA CG GTGAAGGTGACAG-3' Primer für β -Aktin verwendet.

6.6 Messung von Zytokinen

Aus den gewonnenen Blutproben wurde der Serumgehalt von IL-1 β , IL-6 und TNF- α bestimmt. Dafür wurde ein multiplex bead immunoassay kit von invitrogen™ in Kombination mit einem Luminex 100 System von Luminex corp., Austin, Texas verwendet.

6.7 Immunhistochemische Färbung von neutrophilen Granulozyten im Mausgewebe

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wie bereits in früheren Arbeiten beschrieben [52] durchgeführt. Als primärer Antikörper wurde ein Ratten anti Maus Ly-6b.2 von Serotec, Düsseldorf, Deutschland verwendet und als sekundärer Antikörper ein biotinylierter Kaninchen anti-Ratten Antikörper von Vector Laboratories,

Burlingame, California. Es wurden isolierte menschliche Granulozyten aus peripherem Blut wie bereits beschrieben [52] angefärbt. Des Weiteren wurden ein Ziegen anti-UNC5B von Santa Cruz Biotechnology und ein Maus anti-Mensch CD45 von Abcam, clone: (0.N.125) als primäre Antikörper, sowie ein Alexa488-konjugierter Esel anti-Ziegen Antikörper und ein CruzFluor™594 konjugierter Esel anti-Maus Antikörper von Santa Cruz Biotechnology als sekundäre Antikörper verwendet.

6.8 Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) Analysen

Das gewonnene Mäuseblut wurde mit Heparin versetzt sowie mit einer Lösung zur Lyse von Erythrozyten und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und mit einem PE markierten UNC5B Antikörper von Abcam, Cambridge, UK, #ab54430, sowie einem APC markierten F4/80 Antikörper von eBioscience, SanDiego, CA, #17480182 und einem PerCp markierten CD45 Antikörper von BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland oder einem isotypen Kontroll-Antikörper lichtgeschützt für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Analyse wurde ein BD FACS Canto™ II Durchflusszytometer mit BD FACS Diva™ Software verwendet.

6.9 Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) Färbungen

Im Anschluss an die Reperfusion wurde der Lobus medianus entfernt, das Resektat mit 0,9%iger Kochsalzlösung gespült und anschließend für 30 Minuten bei -20°C auf Parafilm tiefgefroren. Danach wurde das tiefgefrorene Präparat in Scheiben von 1 mm Dicke geschnitten und, wieder aufgetaut, für die Dauer von 30 Minuten in TTC Lösung gefärbt. Abschließend erfolgte noch eine Fixierung in 10%-igem Formalin.

In der TTC Färbung werden vitale Zellen rot eingefärbt, wohingegen Zellen welche einen Mangel an NADPH aufweisen keinen Farbstoff aufnehmen. Durch diesen Effekt ist sowohl eine makroskopische als auch eine mikroskopische Unterscheidung zwischen intaktem und ischämisch geschädigtem Gewebe möglich [53].

6.10 Datenauswertung

Sämtliche von uns erhobenen Daten werden alle als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von GraphPad 5.0 (GraphPad, SanDiego, CA). Für multiple Vergleiche wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Korrektur durchgeführt und für Einzelvergleiche wurde der Einstichproben t-Test verwendet, wobei ein Wert für $P < 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet wurde.

7 Ergebnisse

7.1 Aktivitätsmuster von UNC5B

7.1.1 UNC5B wird bei Mäusen auch außerhalb des ZNS exprimiert

Um unsere Hypothese zu bestätigen wandten wir uns zuerst der Fragestellung zu, ob UNC5B bei C57Bl/6 Mäusen auch außerhalb des Zentralen Nervensystems in anderen Organen exprimiert wird. Die Real time PCR zeigte, dass UNC5B mRNA in einigen Mausorganen exprimiert wird.

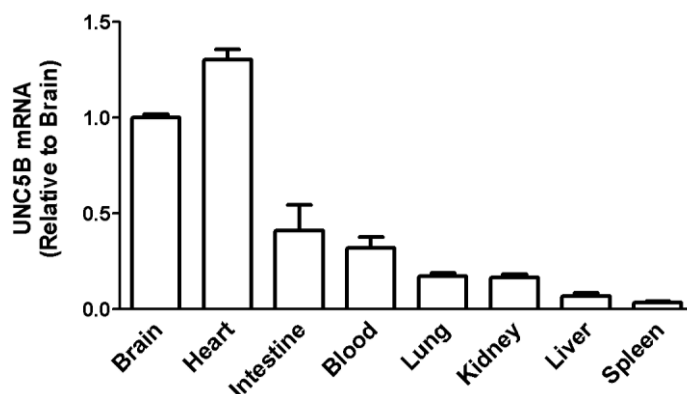


Abbildung 4

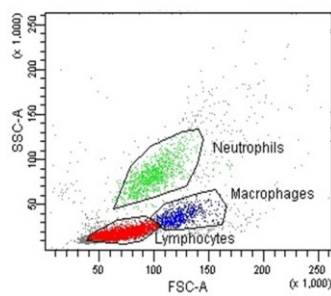
Die relative UNC5B Expression in Gehirn, Herz, Darm, Blut, Lunge, Niere, Leber und Milz bei C57BL/6 Mäusen

7.1.2 Expression von UNC5B in Zellen des Immunsystems

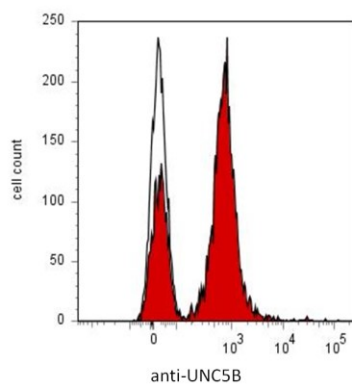
Um die Expression von UNC5B in Zellen des Immunsystems genauer zu untersuchen führten wir eine Durchflusszytometrie durch, bei welcher CD 45 als unspezifischer Marker für Leukozyten und F4/80 zum Markieren von

Makrophagen verwendet wurde. Wir konnten ein gutes Signal für UNC5B bei neutrophilen Granulozyten, Makrophagen sowie Lymphozyten nachweisen. Gestützt wurde dieser Befund durch die Immunfluoreszenzfärbung von Leukozyten.

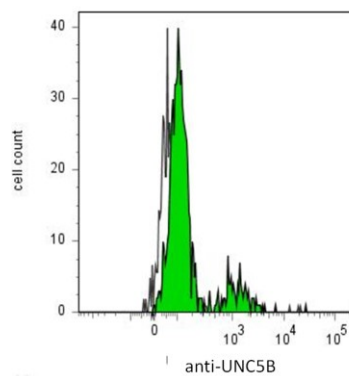
B



C



D



E

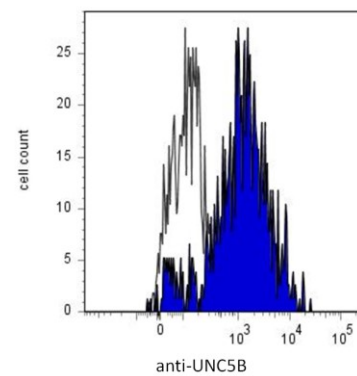


Abbildung 5

B)–E) Durchflusszytometrie von Mäuse Leukozyten, gefärbt und markiert mit dem Leukozyten Marker CD45 (PerCP labeled), dem Makrophagen Marker F4/80 (APC labeled) und UNC5B (PE labeled).

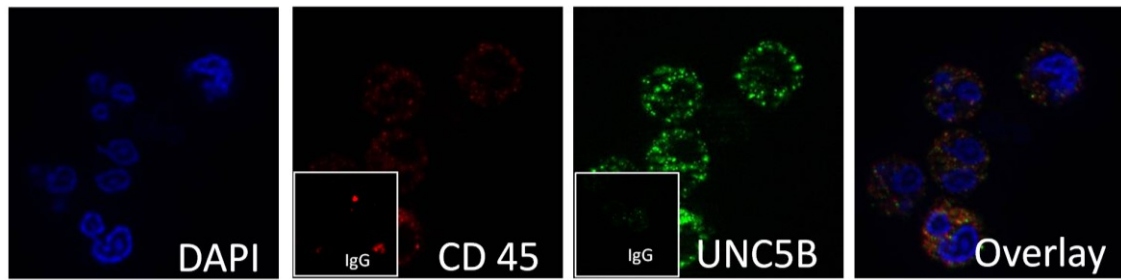


Abbildung 6

Immunfluoreszenzfärbung von menschlichen Entzündungszellen, durchgeführt unter Verwendung von anti-UNC5B und CD45 Antikörpern als primäre und Alexa488-markierten und CruzFluor™ 594-markierten Sekundären Antikörpern, sowie isotyp-matched Kontroll-Antikörpern. (Data are mean \pm SEM, n = 4 per condition).

7.2 Der hepatische Ischämie-Reperfusionsschaden fällt bei UNC5B-Knock-out Mäusen geringer aus

Um den Einfluss von UNC5B im Rahmen des IRI der Leber zu klären verwendeten wir die bereits beschriebenen UNC5B-Knock-out Mäuse sowie C57/BL/6 Wildtyp (WT) Mäuse. In der Folge des hepatischen IR-Schadens zeigten die UNC5B-Knock-out Mäuse im Vergleich zu den C57/BL/6 WT Tieren signifikant niedrigere Serum-Spiegel von LDH, ALT und AST. Darüber hinaus zeigten die TTC Färbungen der postischämischen Leberlappen einen geringer ausgeprägten Reperfusionsschaden.

Zu diesen Ergebnissen passend waren die Serumwerte der Zytokine TNF- α , IL-6, und IL-1- β bei den UNC5B Tieren deutlich niedriger.

Die Expression von mRNA aus geschädigten Leberlappen zeigte, dass die Expression von TNF- α nicht wesentlich beeinträchtigt wurde, wohingegen die Expression von IL-6 im geschädigten Lebergewebe der Wildtyp Tiere induziert wurde, nicht jedoch in den Knock-out Mäusen.

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Expression von CXCL1 und CXCL2 nach IR lediglich bei den Wildtyp Tieren induziert wurde und bei den Knock-out-Tieren keine derartige Reaktion nachweisbar war.

Diese Beobachtungen konnten durch die signifikant geringere Infiltration von neutrophilen Granulozyten in betroffene Leberlappen bei den UNC5B-Knock-out Mäusen gestützt und durch eine ebenfalls geringere Aktivität von Myeloperoxidase (MPO) in den geschädigten Leberarealen bestätigt werden.

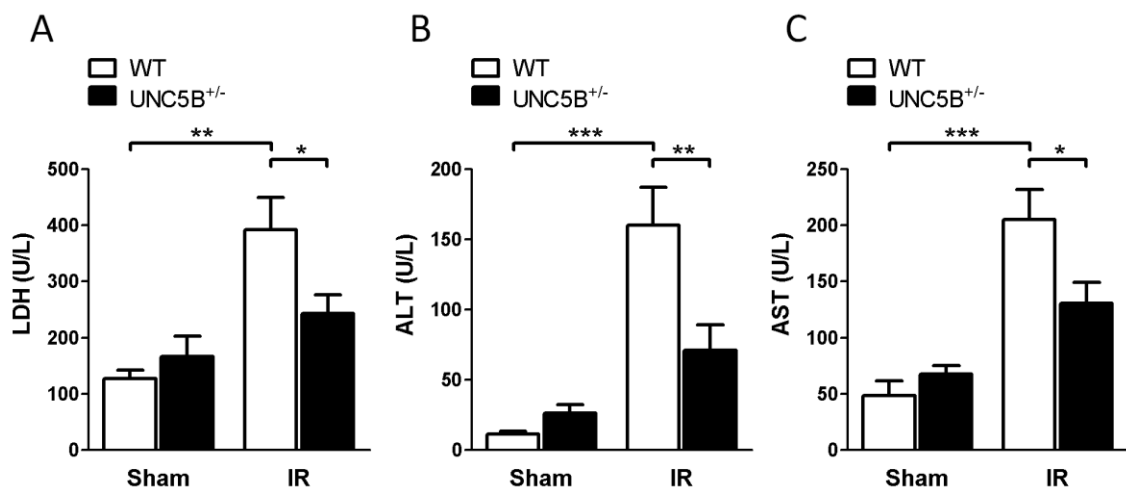


Abbildung 7

Serum-Spiegel von LDH, ALT und AST nach hepatischer IRI mit 30 Minuten Ischämie und drei Stunden Reperfusion oder Sham-OP

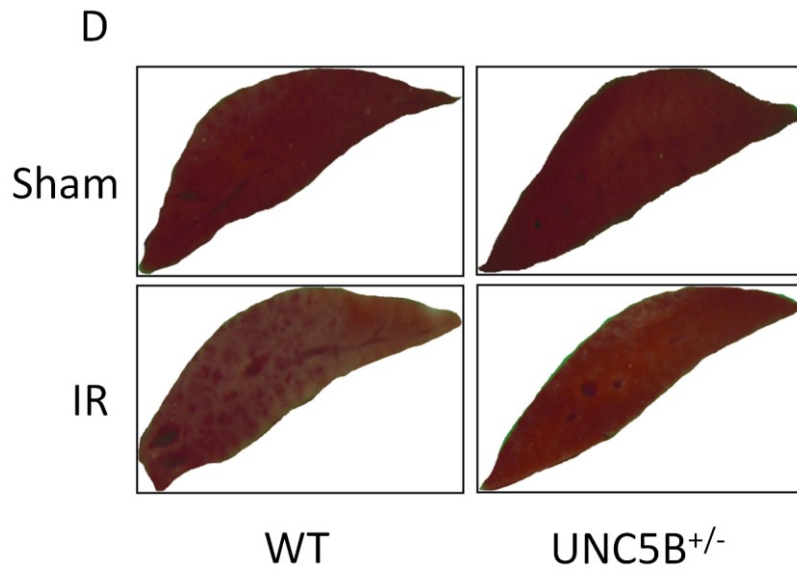


Abbildung 8

TTC gefärbte Leberlappen nach 30 Minuten Ischämie und anschließender drei-stündiger Reperfusion bzw. nach Sham-OP

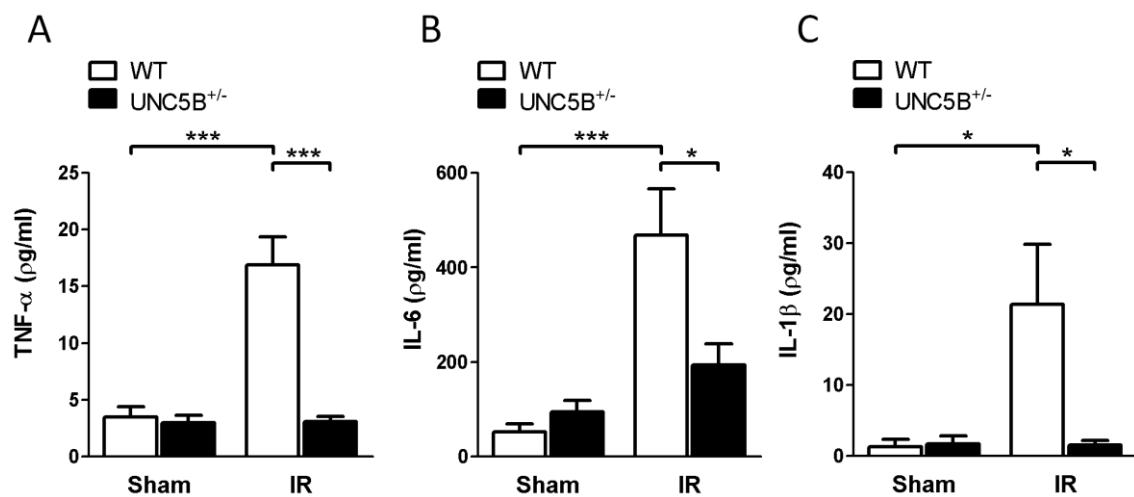


Abbildung 9

Serum Analysen von A) TNF- α , B) IL-6 und C) IL-1 β von WT und UNC5B^{+/-} Mäusen nach IRI oder Sham-OP

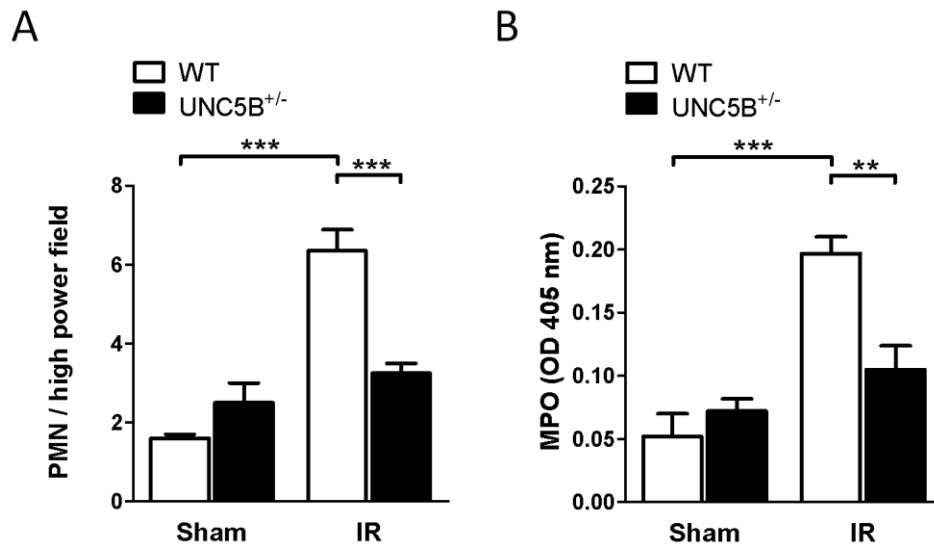


Abbildung 10

A) Zählung von PMN im Hochspannungsfeld aus gefärbtem Lebergewebe bei WT und UNC5B^{+/-} Mäusen. B) Relative MPO Aktivität im Lebergewebe bei WT und UNC5B^{+/-} Tieren

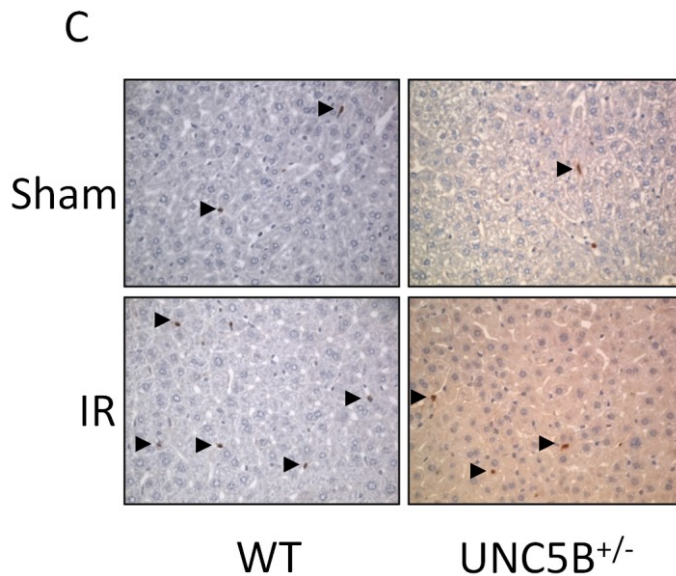


Abbildung 11

C) Repräsentative Bilder von PMN spezifisch angefärbten Leberläppchen (braun, mit Pfeilspitzen markiert) von WT und $UNC5B^{+/-}$ Mäusen nach IRI oder Sham-OP (400-fache Vergrößerung)

7.3 Die funktionelle Hemmung von UNC5B hat während eines Ischämie-Reperfusionsschadens der Leber einen schützenden Effekt

Schließlich testeten wir das therapeutische Potential einer funktionellen Hemmung von UNC5B bei Wildtyp Mäusen durch die Injektion eines Anti-UNC5B Antikörpers. Tiere, welche mit dem Antikörper behandelt worden waren, zeigten nach hepatischem IRI signifikant geringere Serumwerte von LDH, ALT und AST im Vergleich zu den Tieren der Kontroll-Gruppe.

Auch hier zeigte sich in den TTC-Färbungen eine signifikant niedrigere Infiltrationsrate von Granulozyten sowie geringere gemessene Aktivität von MPO im geschädigten Lebergewebe.

Zusätzlich waren die Serum-Werte der Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-1 β in der mit Antikörper behandelten Gruppe niedriger, jedoch nicht signifikant.

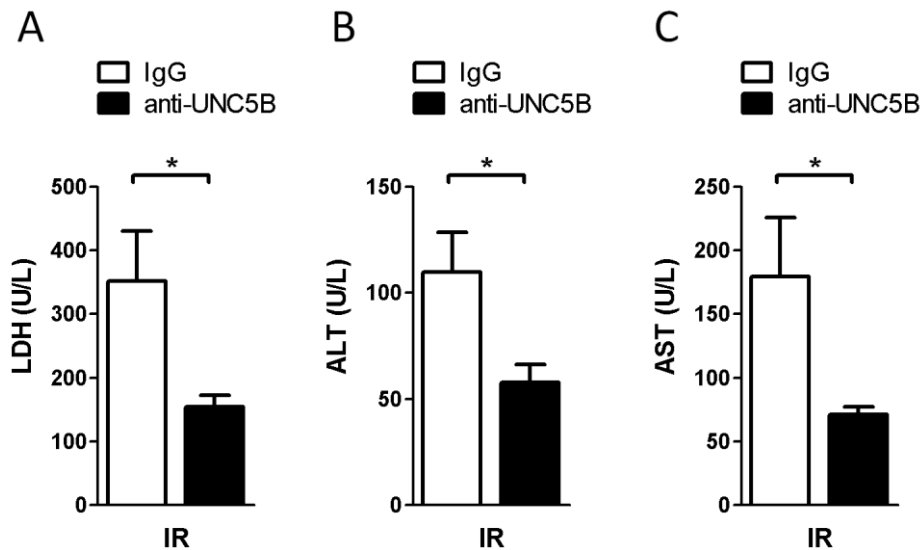


Abbildung 12

WT Tiere welche vor der IRI Induktion mit einem anti-UNC5B Antikörper oder IgG behandelt wurden. Jeweils Serumwerte für A) LDH, B) ALT, C) AST

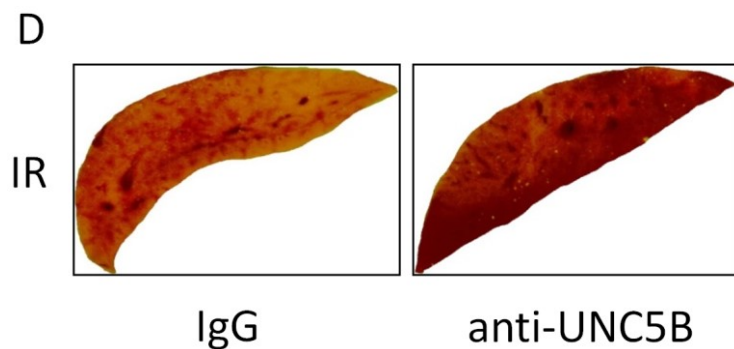


Abbildung 13

Repräsentative Bilder von TTC gefärbten Leberläppchen

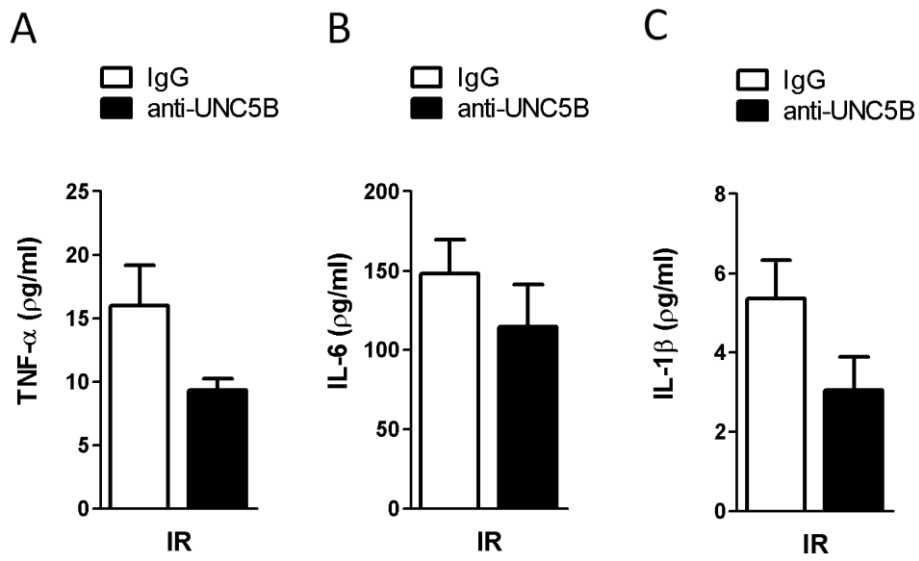


Abbildung 14

Serumwerte von WT Tieren, welche entweder mit einem anti-UNC5B-Antikörper oder IgG als Kontrolle vor IRI vorbehandelt wurden. Messungen wurden durchgeführt für A) TNF- α , B) IL-6, C) IL-1 β

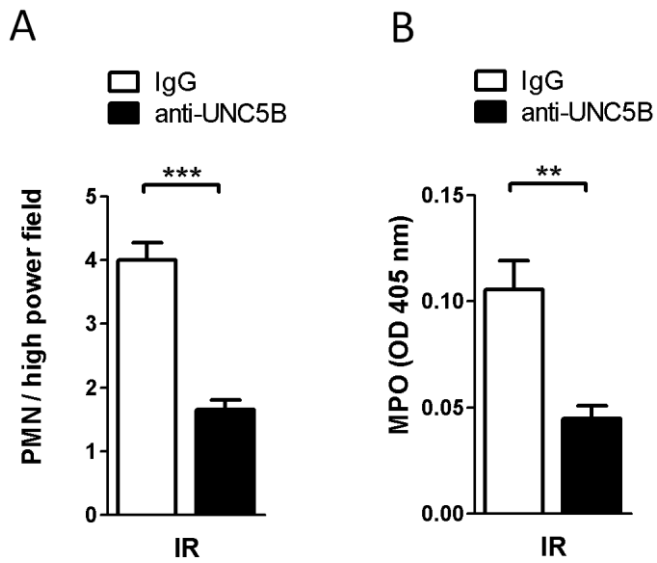


Abbildung 15

A) Zählung von PMN im Hochspannungsfeld aus gefärbtem Lebergewebe bei Mäusen, welche entweder mit einem anti-UNC5B-Antikörper oder IgG als Kontrollgruppe vor IRI vorbehandelt wurden. B) Relative MPO Aktivität im Lebergewebe bei Tieren, welche entweder mit einem anti-UNC5B-Antikörper oder IgG als Kontrollgruppe vor IRI vorbehandelt wurden

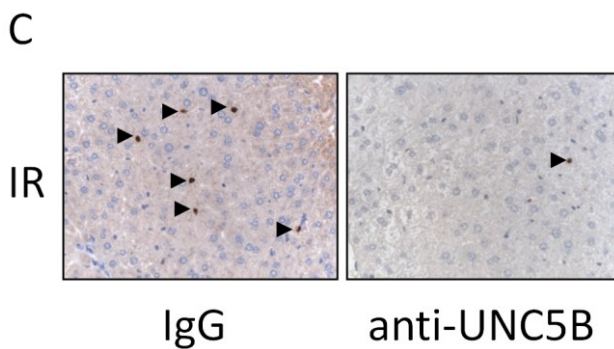


Abbildung 16

C) Repräsentative Bilder Von PMN spezifisch angefärbten Leberläppchen (braun, mit Pfeilspitzen markiert) von Mäusen, welche vor IRI entweder mit einem anti-UNC5B-Antikörper oder IgG vorbehandelt wurden (400-fache Vergrößerung)

8 Diskussion

In den ersten Beschreibungen des NGP Rezeptors UNC5B in den 1990er Jahren konnte zunächst vor allem eine funktionelle Rolle in Zusammenhang mit der Wachstumsrichtungsbestimmung von Axonen bei der Entwicklung des Zentralnervensystems nachgewiesen werden. In den Fokus der intensivmedizinischen Grundlagenforschung rückte UNC5B jedoch, als die Ergebnisse aus neueren Untersuchungen auch eine Beteiligung von UNC5B an immunologischen und inflammatorischen Vorgängen zeigen konnten. Diese Rolle bei der Vermittlung von Entzündungsreaktionen, dort besonders bei der Adhäsion und Migration von Zellen der Immun-Abwehr, sowie bei der durch Interferone und Interleukine chemotaktisch modulierten akuten Entzündungsantwort im Rahmen einer Ischämie-Reperfusionsschaden der Leber intensiver zu untersuchen und in ihrer Relevanz als möglichen zukünftigen therapeutischen Ansatzpunkt zu bewerten waren die Ziele der hier vorliegenden Arbeit.

Da die Pathomechanismen eines Ischämie-Reperfusionsschadens dem Ablauf einer aseptischen Entzündungsreaktion in vielerlei Hinsicht sehr ähnlich sind, bzw. teilweise entsprechen [54], und bereits für andere Organe gezeigt werden konnte, dass UNC5B an diesen Prozessen beteiligt ist, überrascht es nicht, dass Tadagavadi et al. bereits 2010 für den Ischämie-Reperfusionsschaden der Niere eine Beeinflussung des reperusionsbedingten Schadensausmaßes zeigen konnten [49].

Auf den Ergebnissen aus diesen Studien aufbauend stellten wir die Vermutung auf, dass UNC5B im Rahmen von hepatischen Ischämie-Reperfusionsschäden möglicherweise ebenfalls eine Rolle bei der Vermittlung der post-ischämischen Inflammation spielen könnte.

Um diesen Zusammenhang zu klären untersuchten wir die Rolle von UNC5B während der hepatischen Ischämie und Reperfusion mittels des von Hart et al. beschriebenen „hanging-weight-system“ für Leberischämie bei Mäusen [36], welches die Möglichkeit bietet unter standardisierten Bedingungen in definierten

Lebersegmenten eine temporäre Ischämie mit anschließender Reperfusionsphase zu generieren.

Unsere Hypothese konnte durch die Ergebnisse unserer Untersuchungen gestützt werden. Es gelang uns in dieser Arbeit zu zeigen, dass UNC5B Knock-out-Mäuse einen deutlich geringeren IR-Schaden aufwiesen, als die WT-Tiere aus der Kontrollgruppe.

Diese Interpretation unserer Ergebnisse stützt sich auf mehrere Säulen.

Als Surrogat Parameter der direkten Leberschädigung nutzen wir die Bestimmung der Serumwerte von LDH, ALT und AST, welche bei den Knock-out-Mäusen entsprechend niedrigere Werte erreichten als bei den WT-Tieren.

Diese Beobachtung ließ sich mit geringeren Zeichen der systemischen Entzündungsreaktion untermauern, wie wir anhand der verminderten Expression von TNF- α und Il-6 nachweisen konnten.

IL-6 in seiner Eigenschaft als pluripotenter Mediator von Inflammation eignet sich in seiner quantitativen Bestimmung hervorragend als Parameter, welcher bei systemisch relevanten Entzündungsgeschehen in erhöhtem Maße exprimiert wird [6].

Darüber hinaus konnte auch in unseren histologischen Leberschnitten gezeigt werden, dass die Einwanderung und Aktivität von neutrophilen Granulozyten in das betroffene Lebergewebe bei UNC5B Knock-out-Mäusen verringert war.

Schließlich konnten wir nachweisen, dass die Vorbehandlung mit einem UNC5B Antikörper bei Wildtyp-Tieren zu einer signifikanten Verminderung des Leberschadens, der Menge an einwandernden Granulozyten sowie deren Aktivität, als auch zu niedrigeren systemischen post-ischämischen Zytokin-Spiegeln führte.

Aus den Ergebnissen unserer Untersuchungen schlussfolgern wir, dass UNC5B im Rahmen von Ischämie-Reperfusionsschäden der Leber als pro-inflammatorischer Rezeptor agiert und somit ein mögliches zukünftiges Ziel für medikamentöse Therapie-Ansätze zur Verringerung und damit positiven Beeinflussung von Reperfusions-induzierten Schäden der Leber darstellen könnte.

Bei Wirbeltieren moduliert UNC5B die anti- chemotaktischen Eigenschaften des Neuronalen Wachstumsproteins Netrin-1 während der Entwicklung des Zentralnervensystems [33]. Allerdings kommt UNC5B nicht nur im ZNS vor. Bereits vorangegangene Studien bestätigend, konnten wir eine deutliche Expression von UNC5B in einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen zeigen: sowohl in Herz, Lunge, Leber, Darm, Milz, Blut, neutrophilen Granulozyten, sowie Makrophagen und Lymphozyten gelang uns der Nachweis. Diese weit verbreitete Expression legt nahe, dass UNC5B auch außerhalb des ZNS eine funktionale Rolle spielt.

In der Tat konnte bereits früher gezeigt werden, dass UNC5B auch eine Rolle bei verschiedenen anderen Wachstumsprozessen wie zum Beispiel der Angio- [55] und der Kanzerogenese [56] , sowie bei der Modulation von akuten Entzündungsreaktionen [48] und bei Ischämie-Reperfusionssyndromen [49] spielt.

Ein Ausfall der genetischen UNC5B Expression während der Angiogenese führte zu vermehrter Ausbildung von Endothelzellausläufern, sowie abnormaler Aufzweigung und Wachstumsrichtung der Gefäße [55].

Im Rahmen der Kanzerogenese wird UNC5B bei verschiedenen Tumor Entitäten downreguliert [56], was sowohl Auswirkungen auf das verankerungs- unabhängige Wachstum, die Invasivität, als auch das Überleben der Tumorzellen hat.

UNC5B ist nachweislich in der Lage, mit Hilfe seiner „death domain“ [22], welche abgespalten wird wenn Netrin-1 nicht am UNC5B Rezeptor gebunden ist, p-53 induzierte Apoptose zu vermitteln und damit auch direkt das Absterben von Zellen herbeizuführen.

Da die Migration, die Adhäsion und das Überleben von Entzündungszellen essentielle Faktoren bei der Beeinflussung von akuten Entzündungsreaktionen sind, könnte man erwarten, dass UNC5B bei der Kontrolle von Entzündung und Ischämie-Reperusionsphänomenen eine Rolle spielt.

Bezüglich der Migrationseigenschaften von Leukozyten existieren widersprüchliche Daten für die Rolle von UNC5B. Neuere Studien, welche den UNC5B Liganden Netrin-1 untersuchten [48, 49] konnten jedoch zeigen, dass

Netrin-1 die Migration und Infiltration von Zellen der Immunabwehr wie PMN und Monozyten in geschädigtes Gewebe in UNC5B abhängiger Weise hemmt. Die Behandlung mit einem anti-UNC5B Antikörper ließ den Effekt von Netrin-1 bei fMLP induzierter Chemotaxis in vitro [48] und renaler Ischämie-Reperfusion in vivo [49] verschwinden, wie die Versuche von Ly et al. und Tdadagavadi et al. zeigen konnten.

Darüber hinaus gelang es Mirakaj et al. [57] zu zeigen, dass der anti-inflammatorische Effekt von Netrin-1 bei der durch Zymosan A Instillation ausgelösten Peritonitis über den A2BAR Rezeptor reguliert wird. Diese Daten werden von den Ergebnissen von Aherne et al. [58] gestützt, welche zeigten, dass die Blockade von UNC5B keinen Einfluss auf eine durch DSS induzierte Kolitis hatte, sondern abhängig vom A2BAR Rezeptor war.

Im Gegensatz dazu zeigen unsere Ergebnisse, dass sowohl bei heterozygoten Knock-out Tieren, als auch bei einer funktionellen Hemmung von UNC5B eine Reduktion des hepatischen Ischämie-Reperfusionsschadens zu beobachten ist. Die Reduktion der IRI konnte sowohl anhand von niedrigeren Serumwerten von LDH, ALT, AST und Zytokinen, als auch an TTC-Färbungen und einer geringeren Infiltrations- und Aktivitätsrate von neutrophilen Granulozyten im geschädigten Lebergewebe dargestellt werden.

Es bleibt allerdings festzustellen, dass LDH, ALT und AST lediglich Surrogat Parameter für eine Leberschädigung sind und wir daher nicht sagen können, ob unsere Ergebnisse möglicherweise Folge eines verminderten Schadens über einen p-53 Signalweg sind, oder ihnen aber eine Veränderung bei der Migration und Adhäsion von Granulozyten zu Grunde liegt.

Die entscheidenden Unterschiede zwischen unserer Arbeit und bereits vorangegangenen Untersuchungen, welche ebenfalls UNC5B einsetzten, betreffen den Zeitpunkt sowie die Art der Antikörper-Verabreichung und die verwendete Dosis.

Wir applizierten den anti-UNC5B Antikörper 15 Minuten vor dem operativen Eingriff intravenös. Die verwendete Dosis betrug 5µg pro Maus (entsprechend 200 µg/kg/KG). In der Arbeit von Tdagavadi et al. [49] wurde der anti-UNC5B Antikörper 18 Stunden vor der IRI intraperitoneal verabreicht und die

verwendete Dosis betrug 800 µg/kg/KG. Bei den Versuchen von Aherne et al. [58] wurde die intraperitoneale Verabreichung des anti-UNC5B Antikörpers zwei Tage vor Beginn der Induktion der DSS Kolitis gestartet. Die verwendete Dosis bei dieser Arbeit betrug ebenfalls 800 µg/kg/KG.

Deshalb lassen sich die Unterschiede unserer Ergebnisse zu den vorangegangenen Studien möglicherweise durch den unterschiedlichen Zeitpunkt der Verabreichung, den Verabreichungsweg sowie die verwendete Dosis an anti-UNC5B Antikörper erklären.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Unterdrückung beziehungsweise funktionelle Hemmung von UNC5B in der Frühphase einer IRI der Leber einen direkten protektiven Effekt auf das Lebergewebe hat und darüber hinaus ein generell protektives Potential besitzt. Somit stellt UNC5B möglicherweise einen zukünftigen Ansatzpunkt dar, um Reperusions-bedingte Gewebeschäden in der Leber oder sogar in ihrer systemischen Auswirkung zu reduzieren.

Es bedarf allerdings noch weiterführender Studien, welche es sich zum Ziel machen sollten die exakten Wirkungsmechanismen von UNC5B auf zellulärer Ebene im Lebergewebe zu untersuchen. Weitere wichtige noch intensiver zu beforschende Gesichtspunkte sind die Frage nach dem optimalen Zeitpunkt und der Dauer einer therapeutischen Intervention. Darüber hinaus ist natürlich auch noch die Klärung der benötigten Dosis zur Erzielung eines maximalen therapeutischen Effekts von großer Bedeutung und benötigt weitere Studien um dies zu ermitteln.

9 Zusammenfassung

Die Bemühungen zum tieferen Verständnis der Vorgänge im Rahmen von Entzündungsreaktionen im Organismus bildeten einen Schwerpunkt in der klinisch orientierten Grundlagenforschung der vergangenen Jahrzehnte.

Hierbei stellten die Forschungen zu Ischämie- und Reperfusionenphänomenen und die Suche nach möglichen Ansatzpunkten diese zu beeinflussen einen bedeutenden Aspekt dar [7]. Das Auftreten von IR-Phänomenen im Rahmen diverser, lebensbedrohlicher klinischer Zustände und Erkrankungen [8, 9] gibt die Bedeutung der Thematik wieder. Im besonderen Fokus diesbezüglich befand sich die Gruppe der Neuronalen-Guidance-Proteine [25-29], welcher auch der in der vorliegenden Arbeit untersuchte UNC5B Rezeptor zuzuordnen ist. UNC5B gehört zur Familie der Netrin Rezeptoren und wird beim Menschen im Zentralnervensystem, sowie in diversen anderen Geweben und in Zellen des Immunsystems exprimiert [31]. Nachdem bereits für die akute Nierenschädigung [59] und myokardiale Reperfusionsschäden [60] eine Modulation durch UNC5B nachgewiesen werden konnte, war es Ziel dieser Arbeit die Frage zu beantworten, ob sich in der Leber als weiteres Organ welches eine geringere Ischämie Toleranz aufweist, ähnliche Effekte für UNC5B zeigen lassen. Zur Beantwortung dieser Frage verwendeten wir das von Hart et al. beschriebene „hanging-weight system for liver ischemia“ [36].

Zuerst konnte gezeigt werden, dass UNC5-B auch außerhalb des ZNS exprimiert wird, so zum Beispiel im Herzmuskel und im Intestinum.

Darüber hinaus konnte ein Nachweis von UNC5-B in verschiedenen Zellen des Immunsystems gelingen, wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, sowie Lymphozyten. In einem nächsten Schritt konnte gezeigt werden, dass der hepatische IR-Schaden bei UNC5-B Knock-out Mäusen deutlich geringer ausfällt, als bei den WT-Tieren der Kontrollgruppe. Als Nachweis hierfür dienten die geringeren Serumlevel der Transaminasen, geringer Zytokinexpression, sowie der Nachweis einer geringeren Lymphozytenmigrationsrate im Präparat.

Zur weiteren Untersuchung unserer Hypothese und des potentiellen Nutzens von UNC5-B im Rahmen des hepatischen IR-Schadens führten wir im

Anschluss eine therapeutische Versuchsreihe mit WT-Tieren durch, bei welchen im Rahmen der IR eine funktionelle Hemmung mittels eines UNC5B Antikörpers durchgeführt wurde. Auch in diesen Versuchen konnte eine signifikante Verringerung der Transaminasen im Serum und der Migration von Entzündungszellen im Lebergewebe gezeigt werden. Die Spiegel der exprimierten Zytokine waren ebenfalls verringert, jedoch nicht signifikant.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass UNC5-B im Rahmen eines IR-Schadens der Leber eine bedeutende Rolle spielt und die funktionelle Hemmung von UNC5-B einen möglichen Ansatz zur Verringerung eines hepatischen IR-Schadens darstellt. Die in den therapeutischen Versuchen bei WT-Tieren im Vergleich zu den Effekten bei den Knock-out Tieren etwas geringer ausgeprägten Effekte legen nahe, dass es noch weiterer Versuche zur Dosisfindung benötigt um einen maximalen Therapieeffekt zu erreichen.

10 Literaturverzeichnis

1. Castellheim, A., et al., *Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis*. Scand J Immunol, 2009. **69**(6): p. 479-91.
2. Murphy K, T.P., Walport M, *Janeway's immunobiology. 7th edition*. Garland Science. New York and London, 2008: p. ISBN:0-8153-4123-7.
3. Delves, P.J. and I.M. Roitt, *The immune system. First of two parts*. N Engl J Med, 2000. **343**(1): p. 37-49.
4. Ehrlich, P., *Address in Pathology, ON CHEMIOTHERAPY: Delivered before the Seventeenth International Congress of Medicine*. Br Med J, 1913. **2**(2746): p. 353-9.
5. Nesargikar, P.N., B. Spiller, and R. Chavez, *The complement system: history, pathways, cascade and inhibitors*. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2012. **2**(2): p. 103-11.
6. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3463-8.
7. Lehmann, C., *Biochemie und Pathophysiologie von Ischämie und Reperfusion*. Deutsche Medizinische Wochenschrift, 2009. **134**: p. 109-110.
8. Serracino-Inglott, F., N.A. Habib, and R.T. Mathie, *Hepatic ischemia-reperfusion injury*. Am J Surg, 2001. **181**(2): p. 160-6.
9. Minasyan, H., *Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives*. J Crit Care, 2017. **40**: p. 229-242.
10. Romanque, U.P., M.M. Uribe, and L.A. Videla, *[Molecular mechanisms in liver ischemic-reperfusion injury and ischemic preconditioning]*. Rev Med Chil, 2005. **133**(4): p. 469-76.
11. Ackermann, M., et al., *Cytokine synthesis in the liver of endotoxin-tolerant and normal rats during hemorrhagic shock*. J Endotoxin Res, 2001. **7**(2): p. 105-12.

12. Chen, S., et al., *Donor Brain Death Leads to a Worse Ischemia-Reperfusion Injury and Biliary Injury After Liver Transplantation in Rats*. Transplant Proc, 2020.
13. Organspende, D.S., *Jahresbericht Organspende und Transplantation in Deutschland 2018*. 2019.
14. Kobashi, H., J. Toshimori, and K. Yamamoto, *Sepsis-associated liver injury: Incidence, classification and the clinical significance*. Hepatol Res, 2013. **43**(3): p. 255-66.
15. Laleman, W., et al., *Review article: non-biological liver support in liver failure*. Aliment Pharmacol Ther, 2006. **23**(3): p. 351-63.
16. Garcia Martinez, J.J. and K. Bendjelid, *Artificial liver support systems: what is new over the last decade?* Ann Intensive Care, 2018. **8**(1): p. 109.
17. Konishi, T., et al., *Fibrotic liver has prompt recovery after ischemia/reperfusion injury*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2020.
18. 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.
19. Serafini, T., et al., *The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to C. elegans UNC-6*. Cell, 1994. **78**(3): p. 409-24.
20. Kennedy, T.E., et al., *Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord*. Cell, 1994. **78**(3): p. 425-35.
21. Hinck, L., *The versatile roles of "axon guidance" cues in tissue morphogenesis*. Dev Cell, 2004. **7**(6): p. 783-93.
22. Tanikawa, C., et al., *p53RDL1 regulates p53-dependent apoptosis*. Nat Cell Biol, 2003. **5**(3): p. 216-23.
23. Tessier-Lavigne, M. and C.S. Goodman, *The molecular biology of axon guidance*. Science, 1996. **274**(5290): p. 1123-33.

24. Yu, T.W. and C.I. Bargmann, *Dynamic regulation of axon guidance*. Nat Neurosci, 2001. **4 Suppl**: p. 1169-76.
25. Wu, J.Y., et al., *The neuronal repellent Slit inhibits leukocyte chemotaxis induced by chemotactic factors*. Nature, 2001. **410**(6831): p. 948-52.
26. Henes, J., et al., *Inflammation-associated repression of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) reduces alveolar-capillary barrier function during acute lung injury*. FASEB J, 2009. **23**(12): p. 4244-55.
27. Rao, Y., et al., *Neuronal migration and molecular conservation with leukocyte chemotaxis*. Genes Dev, 2002. **16**(23): p. 2973-84.
28. Suzuki, K., et al., *Semaphorin 7A initiates T-cell-mediated inflammatory responses through alpha1beta1 integrin*. Nature, 2007. **446**(7136): p. 680-4.
29. 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.
30. Tang, X., et al., *Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(6): p. 698-706.
31. Konig, K., et al., *The uncoordinated-5 homolog B receptor affects hepatic ischemia reperfusion injury*. PLoS One, 2012. **7**(7): p. e41085.
32. Hedgecock, E.M., J.G. Culotti, and D.H. Hall, *The unc-5, unc-6, and unc-40 genes guide circumferential migrations of pioneer axons and mesodermal cells on the epidermis in C. elegans*. Neuron, 1990. **4**(1): p. 61-85.
33. Hong, K., et al., *A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion*. Cell, 1999. **97**(7): p. 927-41.
34. Llambi, F., et al., *Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC*. EMBO J, 2001. **20**(11): p. 2715-22.
35. Demetrius, L., *Of mice and men. When it comes to studying ageing and the means to slow it down, mice are not just small humans*. EMBO Rep, 2005. **6 Spec No**: p. S39-44.

-
36. Hart, M.L., et al., *Use of a hanging-weight system for liver ischemic preconditioning in mice*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2008. **294**(6): p. G1431-40.
 37. Kohler, D., et al., *Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) dampens hepatic ischemia-reperfusion injury*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e29494.
 38. Zimmerman, M., et al., *Use of a hanging-weight system for liver ischemia in mice*. J Vis Exp, 2012(66): p. e2550.
 39. Montalvo-Jave, E.E., et al., *Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury*. J Surg Res, 2008. **147**(1): p. 153-9.
 40. Lentsch, A.B., et al., *Inflammatory mechanisms and therapeutic strategies for warm hepatic ischemia/reperfusion injury*. Hepatology, 2000. **32**(2): p. 169-73.
 41. Dello, S.A., et al., *Total intermittent Pringle maneuver during liver resection can induce intestinal epithelial cell damage and endotoxemia*. PLoS One, 2012. **7**(1): p. e30539.
 42. Jaeschke, H., *Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts*. J Gastroenterol Hepatol, 2011. **26 Suppl 1**: p. 173-9.
 43. Jaeschke, H., et al., *Functional inactivation of neutrophils with a Mac-1 (CD11b/CD18) monoclonal antibody protects against ischemia-reperfusion injury in rat liver*. Hepatology, 1993. **17**(5): p. 915-23.
 44. Jaeschke, H., A. Farhood, and C.W. Smith, *Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo*. FASEB J, 1990. **4**(15): p. 3355-9.
 45. Jaeschke, H., *Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **284**(1): p. G15-26.
 46. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation*. N Engl J Med, 2006. **354**(6): p. 610-21.

47. Mirakaj, V., et al., *Repulsive guidance molecule-A (RGM-A) inhibits leukocyte migration and mitigates inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(16): p. 6555-60.
48. Ly, N.P., et al., *Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14729-34.
49. Tadagavadi, R.K., W. Wang, and G. Ramesh, *Netrin-1 regulates Th1/Th2/Th17 cytokine production and inflammation through UNC5B receptor and protects kidney against ischemia-reperfusion injury*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3750-8.
50. Henes, J., et al., *Inflammation-associated repression of vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) reduces alveolar-capillary barrier function during acute lung injury*. The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2009. **23**(12): p. 4244-55.
51. Rosenberger, P., et al., *Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia*. Nature immunology, 2009. **10**(2): p. 195-202.
52. Rosenberger, P., et al., *Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 195-202.
53. Fishbein, M.C., et al., *Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique*. American heart journal, 1981. **101**(5): p. 593-600.
54. Eltzschig, H.K. and T. Eckle, *Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation*. Nat Med, 2011. **17**(11): p. 1391-401.
55. Lu, X., et al., *The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system*. Nature, 2004. **432**(7014): p. 179-86.
56. Thiebault, K., et al., *The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 4173-8.

57. Mirakaj, V., et al., *Netrin-1 signaling dampens inflammatory peritonitis*. J Immunol, 2011. **186**(1): p. 549-55.
58. Aherne, C.M., et al., *Neuronal guidance molecule netrin-1 attenuates inflammatory cell trafficking during acute experimental colitis*. Gut, 2012. **61**(5): p. 695-705.
59. Ranganathan, P., et al., *UNC5B receptor deletion exacerbates tissue injury in response to AKI*. J Am Soc Nephrol, 2014. **25**(2): p. 239-49.
60. Kohler, D., et al., *The uncoordinated-5 homolog B (UNC5B) receptor increases myocardial ischemia-reperfusion injury*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69477.

11 Appendix

11.1 Erklärungen zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Peter Rosenberger durchgeführt. Das Thema der Dissertation sowie die Konzeption der einzelnen Versuche, deren Ergebnisse in dieser Arbeit präsentiert werden, sowie das Schreiben des Manuskriptes für die Veröffentlichung in Plos One wurden von Prof. Dr. Peter Rosenberger und Dr. Klemens König erarbeitet.

Alle Tierversuche sowie die Messungen und Auswertungen der Serumanalysen erfolgten durch den Doktoranden unter Aufsicht von Dr. David Köhler. Die Entnahme, Aufarbeitung und Färbung der Gewebeproben für die TTC Färbungen führte der Doktorand selbständig durch.

Beteiligt waren des Weiteren Tiago Granja, Stefanie Laucher, David Köhler, Marion Faigle, Ariane Streißenberger und der Doktorand selbst.

Das Aufarbeiten der histologischen Präparate sowie die immunhistochemischen Färbungen der neutrophilen Granulozyten und Thrombozyten erfolgten durch Marion Faigle und Dr. David Köhler.

Die Analysen und Auswertungen der erhobenen Daten erfolgten durch den Doktoranden, Dr. Klemens König, Dr. David Köhler und Prof. Dr. Peter Rosenberger.

Tübingen, den

11.2 Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

König K, Köhler D, Tiago G, Jennewein C, Nguyen T, Mirakaj V, Kröhnert F, Rosenberger P 2012. The Uncoordinated-5 homolog B receptor affects hepatic ischemia reperfusion injury. Plos One (2012), Bd. 7, Article e41085

12 Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei meinem Chef und Doktorvater Herrn Prof. Dr. Peter Rosenberger für die Möglichkeit der berufsbegleitenden Promotion, die Freistellung zu Forschungszwecken sowie das zur Verfügung Stellen des interessanten Themas bedanken. Danke auch für die Geduld und anhaltende Unterstützung und Motivation zur rechten Zeit.

Darüber hinaus möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Dr. Klemens König und Herrn Dr. rer. nat. David Köhler bedanken, welche mir mit Rat und Tat bei dieser Arbeit stets zur Seite standen. Vielen Dank für die vielen theoretischen und praktischen Erklärungen rund um mein Thema, die wertvolle Unterstützung bei der Einarbeitung und Durchführung der Versuche und die kritische Durchsicht des Manuskripts. Ebenfalls möchte ich mich für die Betreuung und die wissenschaftliche Hilfe bei der Ergebnisauswertung ganz herzlich bedanken.

Ich möchte mich bei allen Labormitarbeitern für ihre immerwährende freundliche und sehr aufgeschlossene Art bedanken. Insbesondere Frau Stephanie Laucher möchte ich für die tägliche praktische Unterstützung während all meiner Labortätigkeiten danken.

Bei Frau Marion Faigle bedanke ich für die Unterstützung bei der der Erstellung und Färbung der Gewebeschnitte.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Frau Saskia, ohne deren stete Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, sowie meinen Kindern Marius, Helena und Emilia, für die zusätzliche Zeit, die sie auf ihren Vater verzichtet haben.