

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I - Großhadern  
der Ludwig-Maximilians-Universität  
Direktor: Prof. Dr. med. M. Massberg

*Protektiver Effekt von PDGF-B in der Endotoxämie und  
polymikrobiellen Sepsis*

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Karolina Maria Weinmann,  
aus Mindelheim

2017

Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Josef Briegel  
Priv. Doz. Dr. Christian P. Schneider

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. T. Ziegler

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.01.2017

## Inhalt

1	Einleitung.....	7
1.1	Systemische Inflammation.....	7
1.1.1	Epidemiologie .....	7
1.1.2	Definition der Sepsis.....	7
1.2	Pathophysiologie der Sepsis .....	10
1.3	Aufbau und zelluläre Bestandteile der Mikrozirkulation.....	12
1.3.1	Endothelzellen .....	12
1.3.2	Perizyten .....	14
1.3.3	Wichtige Signalwege in der Endothelzell-Perizyten-Interaktion .....	15
1.3.3.1	TGF- $\beta$ .....	15
1.3.3.2	Angiopoietin-Tie2.....	16
1.3.3.3	PDGF-B und PDGFR-B.....	16
1.3.3.4	S1P und S1P <sub>1</sub> .....	16
1.4	Das Angiopoietin-Tie-2-System in der systemischen Inflammation .....	17
1.4.1	Angiopoietin-Tie-2-System .....	18
1.4.1.1	Angiopoietin-1.....	18
1.4.1.2	Angiopoietin-1 in der Inflammation.....	19
1.4.1.3	Angiopoietin-2.....	19
1.4.1.4	Angiopoietin-2 in der Inflammation.....	20
1.4.2	Förderung der Perizytenrekrutierung durch PDGF-B und PDGFR-B .....	20
1.4.2.1	Wechselwirkung von PDGF und Angiopoietinen.....	21
1.5	Adenoassoziierte Viren als gentherapeutisches Tool .....	22
1.6	Zielsetzung .....	23
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Rekombinante adenoassoziierte Viren - Produktion .....	24
2.1.1	Tripletransfektion der Trägerzellen.....	24
2.1.2	Ernte und Aufreinigung der adenoassoziierten Viren.....	25
2.1.3	Quantifizierung mittels qPCR .....	25
2.2	In-vivo Sepsis-Modell .....	26

2.2.1	Versuchstiere .....	26
2.2.2	Versuchsaufbau .....	26
2.2.3	Versuchsgruppen.....	28
2.2.3.1	LPS induzierte systemische Inflammation.....	28
2.2.3.2	Cecal Ligation and Puncture (CLP) induzierte Sepsis .....	28
2.2.3.3	PDGF-B – Überexpression .....	30
2.2.3.4	Angiopoietin-2-Antikörper .....	30
2.2.4	Sepsis-Severity-Score .....	30
2.2.4.1	Verhalten .....	30
2.2.4.2	Gewichtverlust .....	31
2.2.4.3	Schmerz.....	31
2.2.4.4	Aszites .....	32
2.2.4.5	Dyspnoe.....	32
2.2.4.6	Zusammenfassung .....	32
2.2.5	Nicht-invasive Blutdruckmessungen.....	32
2.2.5.1	Präparation des Versuchstieres .....	33
2.2.5.2	Durchführung der Messung .....	33
2.3	Messung der Gefäßpermeabilität .....	34
2.3.1	Versuchsvorbereitung.....	34
2.3.2	Versuchsdurchführung .....	35
2.4	Histologie .....	35
2.4.1	Immunhistochemie.....	35
2.4.1.1	PECAM-1/NG2 .....	36
2.4.2	X-Gal-Färbung .....	37
2.5	Molekularbiologische Analysen .....	37
2.5.1	Il-6 ELISA.....	37
2.6	Statistik .....	38
3	Ergebnisse .....	39
3.1	Der protektive Effekt von PDGF-B Überexpression in der LPS-induzierten Endotoxämie ...	39
3.1.1	Verifizierung der Endotoxämie durch Il-6-Spiegel-Messung .....	39
3.1.2	Permeabilitätsminderung der Gefäße bei PDGF-B Überexpression.....	40

3.1.3	Erhöhte Perizytenzahlen bei PDGF-B-Überexpression .....	41
3.1.3.1	Quantitative Perizyten-Endothelzell-Analyse in der peripheren Mikrozirkulation .....	42
3.1.3.2	Quantitative Perizyten-Endothelzell-Analyse im Herzmuskel .....	43
3.1.4	Minderung der Hypotension durch PDGF-B-Überexpression .....	45
3.1.5	Sepsis-Severity-Score bei PDGF-B Überexpression .....	46
3.1.6	Verbesserung der Überlebenszeit und Mortalität bei PDGF-B-Überexpression .....	47
3.2	Vergleich der LPS-induzierten Endotoxämie und der CLP-induzierten Sepsis .....	48
3.2.1	Sepsis-Severity-Score in Endotoxämie und Sepsis im Vergleich .....	48
3.3	Der Effekt von PDGF-B Überexpression in der CLP- induzierten Sepsis .....	49
3.3.1	Sepsis-Severity-Score bei PDGF-B Überexpression in der Sepsis .....	49
3.3.2	Verbesserung der Überlebenszeit und Mortalität bei PDGF-B-Überexpression in der Sepsis .....	50
3.3.2.1	Überlebenszeit.....	50
3.3.2.2	Überleben/Mortalität .....	51
3.4	Die Wirkung von Angiotensin-2 Antikörper in der CLP- induzierten Sepsis.....	51
3.4.1	Verbesserter Sepsis-Severity-Score bei Angiotensin-2 Antikörpergabe in der Sepsis....	52
3.4.2	Verbesserung der Überlebenszeit bei Gabe von Angiotensin-2 Antikörpern.....	53
3.4.2.1	Überlebenszeit.....	53
3.4.2.2	Überleben/Mortalität .....	54
4	Diskussion .....	55
4.1	Endotoxämie und Sepsis im Mausmodell .....	55
4.1.1	Endotoxämie vs. Sepsis .....	55
4.1.2	Parameter der Evaluation und Validierung.....	56
4.1.2.1	Sepsis-Severity-Score .....	56
4.1.2.2	Nicht-invasive Blutdruckmessungen.....	57
4.1.2.3	Gefäßpermeabilität .....	57
4.2	„Capillary leak“ – erhöhte Permeabilität in der Sepsis .....	57
4.2.1	Permeabilitätsminderung der Gefäße bei PDGF-Überexpression .....	57
4.2.2	Einfluss auf die Mikrozirkulation, Hämodynamik, Allgemeinzustand und Mortalität in der Sepsis .....	58
4.2.2.1	Veränderungen der Mikrozirkulation in der Sepsis.....	58

4.2.2.2	Positiver Einfluss der PDGF-B Überexpression auf die Hämodynamik, Allgemeinzustand und Mortalität .....	59
4.2.2.3	Besserer Allgemeinzustand und verminderte Mortalität unter PDGF-B Therapie.....	60
4.3	Transfer von der Endotoxämie in die polymikrobiellen Sepsis.....	61
4.3.1	Therapieoptionen und -grenzen zwischen Perizytenverlust und –rekrutierung .....	61
4.3.2	Minderung der Mortalität sowie Besserung des Allgemeinzustands durch PDGF-B Überexpression in der polymikrobiellen Sepsis .....	61
4.3.2.1	Grenzen der Therapie.....	62
4.3.3	Angiopietin-2 Antikörper und verminderte Perizytenabwanderung in der Sepsis .....	63
4.3.3.1	Grenzen der Therapie.....	63
5	Zusammenfassung.....	65
6	Abkürzungsverzeichnis .....	67
7	Abbildungsverzeichnis.....	69
8	Literaturverzeichnis .....	71
9	Danksagung .....	83
10	Curriculum vitae.....	84

# 1 Einleitung

## 1.1 Systemische Inflammation

### 1.1.1 Epidemiologie

Weltweit erkranken jährlich ca. 18 Millionen Menschen an einer Sepsis (1). Langzeituntersuchungen in den USA zeigen eine steigende Inzidenz dieser schweren Diagnose, die mit einer hohen Letalität assoziiert ist. So benötigt die Hälfte aller hospitalisierten Patienten eine intensivmedizinische Betreuung. Auf Intensivstationen rangiert die schwere Sepsis an erster Stelle der Todesursachen (2-4). Insgesamt wird sie in den USA als zehnthäufigste Todesursache aufgeführt (5).

In Deutschland liegt die geschätzte Inzidenz der Sepsis bzw. schweren Sepsis bei 116 bzw. 110 Fällen pro 100.000 Einwohner, so liegt die erwartete Zahl von jährlichen Neuinfektionen bei 79.000 bzw. 75.000. Auf deutschen Intensivstationen (ICU) beträgt die Prävalenz der Sepsis 12,4%, die der schweren Sepsis und des septischen Schocks 11,0%. Die 90-Tage Mortalität liegt bei der schweren Sepsis bei 54% (6). Somit stellen septische Erkrankungen die 7. häufigste Krankenhausdiagnose dar und mit rund 60.000 Todesfällen pro Jahr die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Lange wurde die sozioökonomische Bedeutung der Sepsis auf Grund fehlender valider Daten in Deutschland unterschätzt. Die Kosten für die intensivmedizinische Betreuung der Sepsis verbrauchen rund 30% des Gesamtbudgets für Intensivmedizin, dies entspricht einer Summe von 1,77 Milliarden Euro jährlich (7). Um diesem Problem entgegenzuwirken wurde 2001 ein Kompetenznetzwerk Sepsis ins Leben gerufen, die Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V.. Diese trägt Zuständigkeit für Forschungs-, Öffentlichkeits- und Aufklärungsarbeit auf dem Gebiet der Sepsis, gefördert durch das Ministerium für Bildung und Forschung (8), um in Zukunft die „Evidence Based Medicine“ auf dem Gebiet der Sepsis zu ermöglichen.

### 1.1.2 Definition der Sepsis

Der Grundstein dieser modernen, „evidence based“ Aufarbeitung der Sepsis wurde im August 1991 in der „Consensus Conference“ vom „American College of Chest Physicians“ (ACCP) und der „Society of Critical Care Medicine“ (SCCM) gelegt. Dieses Zusammentreffen erarbeitete erstmals eine allgemeingültige Definition der Sepsis und ihrer Folgen. Zudem wurden objektivierbare Parameter eruiert, die eine Klassifizierung der Patienten anhand ihrer klinischen Situation ermöglicht. Zum besseren Monitoring wurde auch eine Art Sepsis Scoring Methode entwickelt, um Vorhersagen über die Prognose und Mortalität der Patienten zu treffen.

Die klar abgesteckten Ziele der ACCP/SCCM Consensus Conference waren: Erstens die Förderung der Sepsis-Früherkennung, um eine frühzeitige therapeutische Intervention zu ermöglichen. Zweitens eine Standardisierung von Forschungsprotokollen, als Voraussetzung für die Publikation valider klinischer Studien. Außerdem sollte die Konferenz Anstoß zur weiteren Erforschung der Pathophysiologie der Sepsis sein, um dieses komplexe Krankheitsbild, seine Ursachen und Folgen zu verstehen. Definiert wird unter anderem das Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS), die Sepsis, die schwere Sepsis sowie der septische Schock als folgenschwerste Komplikation der Sepsis.

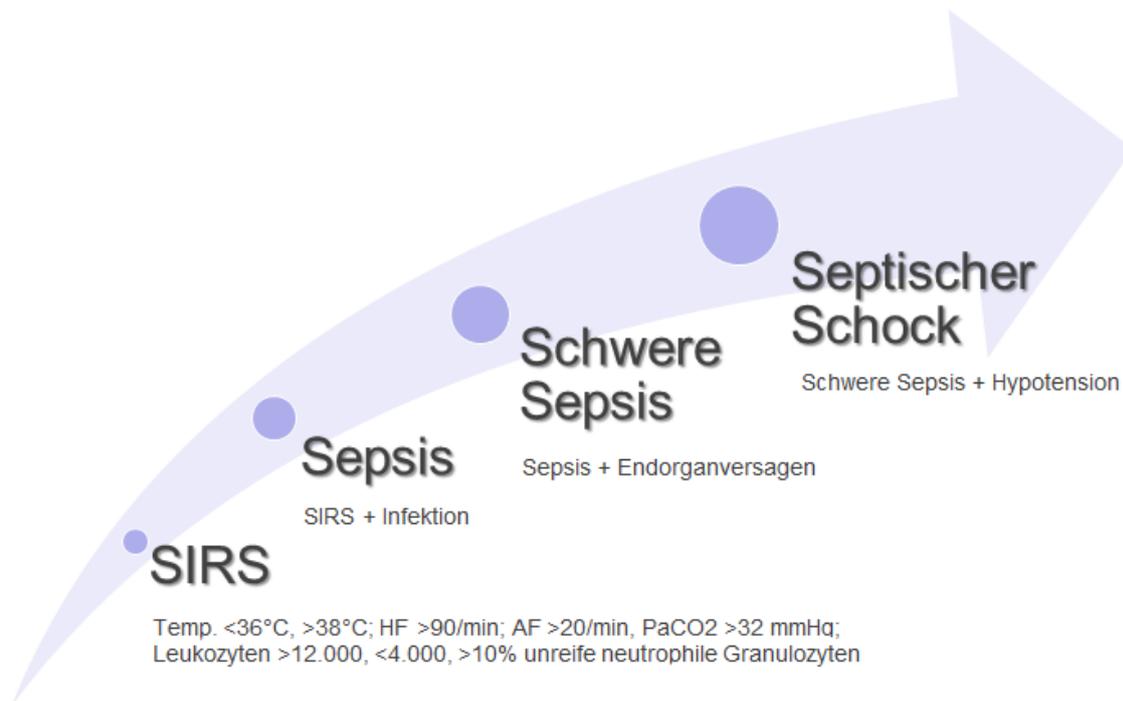
Laut Definition der ACCP/SCCM Consensus Conference liegt ein Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) vor, wenn zwei oder mehr der folgenden klinischen Kriterien erfüllt sind:

<b>Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS)</b>		
<b>Körpertemperatur</b>	> 38 °C	< 36 °C
<b>Herzfrequenz</b>	> 90 Schläge/Minute	
<b>Atemfrequenz</b>	> 20 Atemzüge/Minute	PaCO <sub>2</sub> < 32 mmHg
<b>Leukozytenzahl</b>	> 12.000 / cu mm	< 4.000 / cu mm
	> 10% unreife neutrophile Granulozyten	

**Abb. 1** Definition des Systemic Inflammatory Response Syndrome (9)

Eine Körpertemperatur höher als 38°C oder kleiner als 36°C, des Weiteren eine Herzfrequenz von über 90 Schläge pro Minute. Ein weiteres mögliches Kriterium ist eine Tachypnoe mit über 20 Atemzügen pro Minute oder eine Hyperventilation mit einem Kohlenstoffdioxid Partialdruck (PaCO<sub>2</sub>) von weniger als 32mmHg, oder eine Leukozytose mit mehr als 12000/µl Leukozyten bzw. eine Leukozytopenie mit weniger als 4000/µl weißen Blutkörperchen oder mehr als 10% unreifen neutrophilen Granulozyten.

Die SIRS ist das Resultat einer Vielzahl möglicher Ursachen, wie Trauma, Ischämie, Pankreatitis, hämorrhagischer Schock, etc.. Eine infektiöse Genese ist dabei jedoch nicht nachweisbar. Als schwere Komplikation ist die Organsystemdysfunktion anzusehen, mit einer akuten Schädigung der Lunge, akutem Nierenversagen, Schock und einem Multiplen Organdysfunktions Syndrom (MODS). Die Sepsis ist als ein SIRS infolge eines akuten, aktiven infektiösen Prozesses im Kranken zu sehen (9). Die schwere Sepsis ist durch das zusätzliche Auftreten einer Sepsis bedingten Hypotension, Hypoperfusion sowie einer Organdysfunktion definiert. Daraus kann ein akutes Kreislaufversagen mit anhaltender Hypotension resultieren und wird dann als septischer Schock bezeichnet, sofern keine andere Genese ersichtlich ist (9, 10).



**Abb. 2** Von der systemischen Inflammation hin zum septischen Schock (9, 11)

Eine weitere „Consensus Conference“ fand 2001 statt, um die damals festgelegten Kriterien der SIRS/Sepsis Klassifikation zu überarbeiten bzw. diese zu erweitern. Die SCCM, die European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), die ACCP, die American Thoracic Society (ATS) und die Surgical Infection Society (SIS) definierten die Sepsis, wie 1991, als eine SIRS mit einer nachgewiesenen oder vermuteten Infektion. Die oben bereits genannten klinischen Parameter wurden um folgende Kriterien erweitert: veränderter mentaler Status, signifikantes Ödem oder positive Flüssigkeitsbilanz sowie Hyperglykämie in Abwesenheit eines Diabetes mellitus. Die inflammatorischen Parameter beinhalten nun, neben der Leukozytenzahl, den Anstieg des C-reaktiven Proteins sowie des Procalcitonin-Spiegels im Plasma. Zu den hämodynamischen Parametern wurde eine venöse Sauerstoffsättigung von über 70% sowie ein cardiac index größer  $3,5 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-2,3}$  hinzugefügt. Folgende Variablen wurden festgelegt um eine Organdysfunktion zu erkennen: Arterielle Hypoxie, akute Oligurie, Kreatinin-Anstieg, abnorme Gerinnungsparameter, Ileus, Thrombozytopenie und Hyperbilirubinämie. Zuletzt wurden Variablen berücksichtigt, die eine Aussage über eine verminderte Gewebepfusion erlauben, wie eine Hyperlaktatämie und eine verlängerte Rekapillarierungszeit. Die Definition der schweren Sepsis blieb als Sepsis mit einer komplizierenden Organdysfunktion unverändert. Der septische Schock ist durch ein akutes Kreislaufversagen mit persistierender, arterieller Hypotension gekennzeichnet. Diese Definitionen erlauben kein genaues Staging von Patienten mit einer Sepsis, welches Informationen über Outcome sowie einen potenziellen therapeutischen Nutzen geben kann. Deshalb wurden, in Anlehnung an die TNM-Klassifikation maligner Tumorerkrankungen, die PIRO-Kriterien geschaffen. Diese berücksichtigen prädisponierende Faktoren, das Ausmaß der Infektion, der Immunantwort sowie der Organdysfunktion (12, 13).

## 1.2 Pathophysiologie der Sepsis

Die Sepsis entsteht durch die systemische Ausbreitung einer lokalen Infektion über den Blutweg. Die häufigsten Auslöser sind Bakterien wie deren Toxine, aber auch Viren, Pilze und Parasiten können ursächlich sein. Bei der bakteriellen Sepsis unterscheidet man, abhängig von den auslösenden Bakterien, die gramnegative (beispielsweise Enterobakterien) und die heute häufigere, grampositive (beispielsweise Enterokokken) Sepsis (3, 10). Gramnegative Bakterien wirken über das Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) (14). Bei grampositiven Mikroorganismen sind die initialen Auslöser der Entzündungsreaktion Peptidoglykane der bakteriellen Zellwand sowie von den Bakterien freigesetzte Exotoxine (15). Diese stellen Liganden für verschiedene membranständige Rezeptoren der Entzündungszellen dar und werden von diesen gebunden und erkannt. Über eine intrazelluläre Signalkaskade wird schließlich ein Stimulus zur Transkription verschiedener proinflammatorischer Mediatoren gesetzt (10, 16-19).

Die ersten, sogenannten primären Mediatoren, führen zur Freisetzung sekundärer, signalverstärkender Mediatoren und so zu einer weiteren Aktivierung des Immunsystems. Die Quantifizierung solcher Entzündungsmediatoren im Blutplasma wie beispielsweise Interleukin-6 (IL-6), erlaubt eine frühe Erkennung bakterieller Infektionen sowie ein Monitoring der Schwere der Infektion. Das Immunsystem versucht die akute Hyperinflammation mit einer zeitgleich ablaufenden antiinflammatorischen Reaktion, der sog. CARS „Compensatory antiinflammatory response syndrome“ zu bremsen. Das genaue Zusammenspiel dieser antagonistisch wirkenden Prozesse und deren klinische Folgen sind noch weitgehend ungeklärt (10, 20, 21).

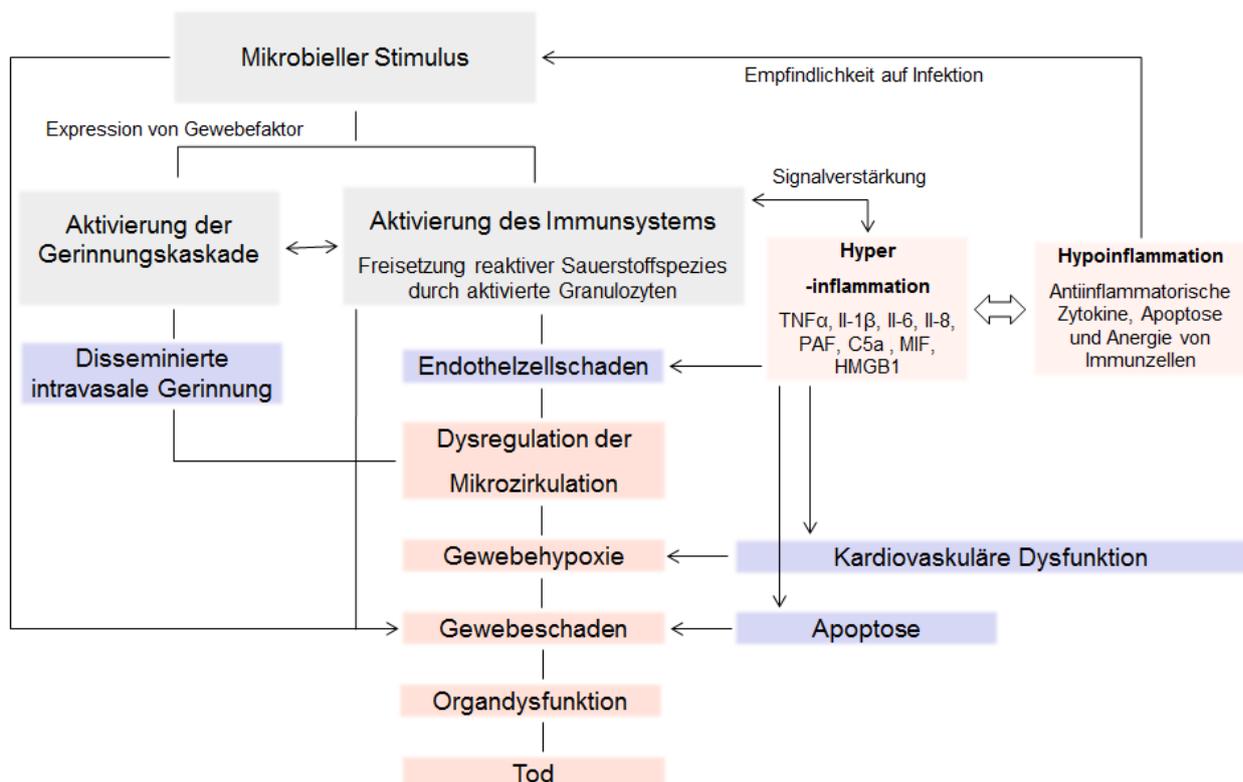
Eine weitere gewichtige Folge der Sepsis ist die „Disseminierte intravasale Gerinnung“. Es besteht eine Dysregulation des Gerinnungssystems, die einerseits zu einer Hyperkoagulation, andererseits zu Blutungen führen kann. Ebenso wie die Immunantwort, wird diese Reaktion durch proinflammatorische Mediatoren ausgelöst (22). Die auftretende Thrombenbildung okkludiert kleinste Gefäße der Mikrozirkulation und beeinträchtigt so die Durchblutung und folglich die adäquate Sauerstoffversorgung des Gewebes (23). Dieser Faktor trägt mit zur Organdysfunktion in der schweren Sepsis bei.

Auch das Myokard ist in seiner Kontraktilität beeinträchtigt. So kommt es beim septischen Schock nach einer anfänglichen hyperdynamen Phase mit reduziertem peripheren Widerstand, niedriger arteriovenöser Sauerstoffdifferenz, jedoch noch normalem Blut- und zentralem Venendruck (ZVD), zu einer sekundären hypodynamen Phase. Diese ist gekennzeichnet durch erhöhten peripheren Gefäßwiderstand, einer erhöhten arteriovenösen Differenz des Sauerstoffgehalts sowie sinkendem Blutdruck und ZVD. Die sinkende Auswurfleistung des linken Ventrikels ist ein weiterer Faktor, der die angemessene Sauerstoffversorgung der Organe mindert (10, 24-26).

Neben einer Vielzahl von endokrinologischen Störungen findet sich des Weiteren eine systemische Störung der Mikrozirkulation, durch die oben bereits erwähnten Dysfunktionen. Die Hyperkoagulabilität in den Gefäßen führt zu Mikrothromben (23). Durch die toxische Schädigung der Endothelzellen bildet sich ein perizelluläres Ödem, welches zur Beeinträchtigung der Durchblutung der entsprechenden

Areale führt (27). Die vermehrte Leukozytenadhäsion (28) sowie die verminderte Verformbarkeit der Erythrozyten (29) haben ebenfalls einen negativen Einfluss auf die Gewebedurchblutung und sind mitverantwortlich für die Organdysfunktion in der schweren Sepsis (10).

Das Endothel nimmt eine wichtige Rolle bei der Störung der Mikrozirkulation auf zellulärer Ebene ein. Auf der Oberfläche der Endothelzellen kommt es in der akuten Inflammation zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten, um deren Einwanderung in das Gewebe zu ermöglichen bzw. zu fördern (30). Die von den Entzündungszellen freigesetzten zytotoxischen Substanzen zur Erregerabwehr schädigen in gewissem Ausmaß auch die körpereigenen Zellen, besonders die Endothelzellen mit engem Kontakt zum Blutstrom. Zudem reagieren diese Zellen auf den inflammatorischen Stimulus mit der Freisetzung vasoaktiver Substanzen, was zur Dilatation der Gefäße führt. Dadurch wird vermehrt Volumen in der Peripherie gepoolt, eine relative Hypovolämie entsteht (10, 31).



**Abb. 3** Pathophysiologie der Sepsis, modifiziert nach (10)

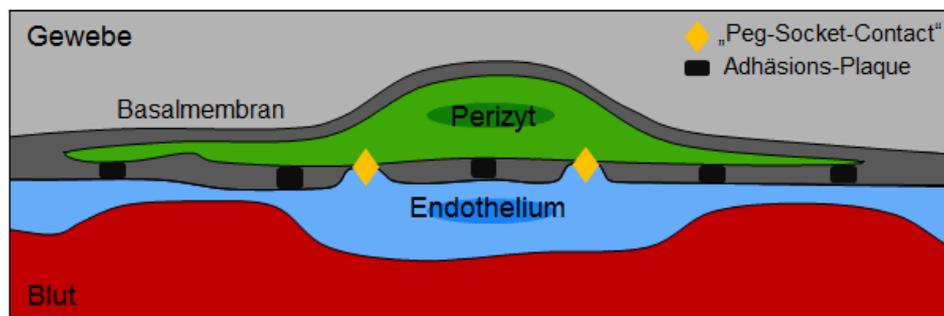
HMBG: High mobility group B, II: Interleukin, MIF: migration inhibitory Factor, PAF: platelet activation factor, TNF: Tumor necrosis factor

Neben der relativen Form tritt auch die absolute Hypovolämie auf. Durch die erhöhte Permeabilität der Gefäße, der Mikrozirkulation sowie dem „Capillary leak“ in der Sepsis kommt es zu einem massiven Flüssigkeitsverlust, resultierend in Aszites und Gewebsödem (32). Diese Faktoren tragen maßgebend

zur Entstehung des hypovolämischen, septischen Schocks bei (33, 34). Da die septische Dysregulation im Wesentlichen die Gefäße der Mikrozirkulation betrifft, sollen diese kurz einzeln erwähnt werden.

### 1.3 Aufbau und zelluläre Bestandteile der Mikrozirkulation

Gefäße unterscheiden sich in ihrem Wandaufbau abhängig von ihrer Größe und Funktion. Kleinste Gefäße bestehen nur aus einem Endothelzellschlauch, größere Gefäße besitzen hingegen einen komplexeren, dreischichtigen Wandaufbau (35): Luminal werden diese Gefäße von einer Endothelzellschicht ausgekleidet, diese schafft im Inneren des Gefäßes eine antithrombogene Oberfläche und hat Einfluss auf die Extravasation von Plasma wie Entzündungszellen (36). Dem Endothelium liegt außen eine Basalmembran an, in der Perizyten oder glatten Muskelzellen liegen (37, 38). Perizyten finden sich vor allem assoziiert mit präkapillären Arteriolen, Kapillaren und postkapillären Venolen, hier sind auch keine glatten Muskelzellen um die Gefäße gruppiert zu finden (37, 39-42). Die kleinsten Kapillaren sind nur von einer Schicht Perizyten umgeben (43, 44). Die Diskontinuität der Basalmembran ermöglicht eine direkte Interaktion von Perizyten und Endothelzellen. Die beiden Zelltypen kommunizieren und beeinflussen sich gegenseitig über diverse Zellkontakte und Signalwege (37, 38).



**Abb. 4** Endothelzell-Perizyten-Interaktion in Gefäßen der Mikrozirkulation. Perizyten umgeben die Endothelzellen und teilen sich eine Basalmembran. Direkte Endothelzell-Perizyten-Kontakte sind in den sog. „peg-socket-contacts“ lokalisiert, hier fehlt die Basalmembran (37, 43, 45, 46).

Abbildung nach (37, 47)

#### 1.3.1 Endothelzellen

Endothelzellen sind flache, längliche Epithelzellen, die die Gefäße aller Organsysteme sowie die Kreislauforgane des menschlichen Körpers auskleiden und direkten Kontakt zum Blutstrom haben. In ihrem Zytoplasma finden sich neben den üblichen Zellorganellen, die endothelzellspezifischen Weibel-Palade-Bodies, in welchen unter anderem Angiopoietin-2 gespeichert wird.

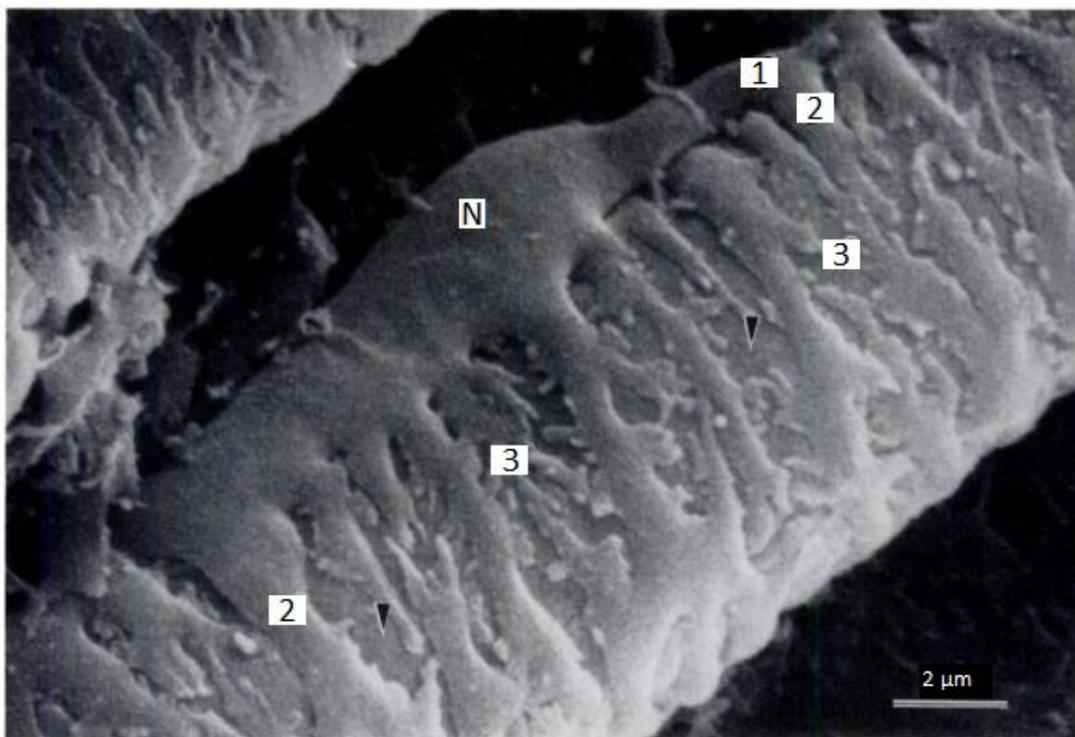
Das Endothelium hat verschiedene elementare Funktionen. Die wichtigste Funktion ist der geregelte Austausch von Gasen und Metaboliten zwischen Blut und umliegendem Gewebe. Des Weiteren haben Endothelzellen Einfluss auf die Gerinnung, indem sie antithrombotische wie antikoagulatorische Stoffe bilden (48). Eine weitere wichtige Aufgabe ist die Barrierefunktion des Endotheliums, die den jeweiligen Gewebebedürfnissen angepasst ist. Die Endothelzellen sind untereinander durch Zell-Zell-Kontakte (Tight junctions, Adhärenz Kontakte, Gap junctions) verbunden. Durch verschiedenste membranständige Rezeptoren wird eine selektive Barriere zwischen Blut und umliegendem Gewebe geschaffen. Basal regeln Endothelzellen durch spezifische Verbindungen und Rezeptoren die Zell-Matrix- sowie Zell-Zell-Kontakte. Zudem werden einige Bestandteile der extrazellulären Matrix vom Endothelium selbst synthetisiert. Eine weitere entscheidende Rolle spielt das Endothelium in der Regulation des Blutflusses über die Gefäßweite, vor allem durch die Synthese vasoaktiver Substanzen (wie beispielsweise NO) und spezialisierte Kontakte zu den glatten Muskelzellen bzw. Perizyten (49, 50).

Endothelzellen stellen aber nicht rein plastische Gebilde mit einer festgeschriebenen Funktion dar, sondern eine heterogene Gruppe, deren Eigenschaften von der Zusammensetzung des Blutes, vom jeweiligen Organsystem sowie von den Zell-Kontakten in der Gefäßwand abhängen (50, 51). Unter normalen Bedingungen befinden sich die Endothelzellen in einem ruhenden Zustand. Perizyten beispielsweise haben mit ihren direkten Kontakten eine inhibierende Funktion und somit einen stabilisierenden Einfluss auf das Endothelium. Werden die Umgebungsbedingungen der Endothelzellen verändert, wie durch die Induktion von Adhäsionsmolekülen, die gezielte Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren oder durch die Aktivierung von Stress-Genen (zum Beispiel Hypoxie, Azidose, Ischämie), so ändern die Endothelzellen ihren Phänotyp, durch verschiedene Zytokine getriggert. Die Endothelzellen passen ihren Phänotyp der neuen Situation an, um weiterhin ihre komplexen Aufgaben unter veränderten Voraussetzungen wahrnehmen zu können. Vor allem die Aktivierung der Endothelzellen während der Inflammation wurde genau beschrieben. Durch die zytokingetriggerte Expression von Zelladhäsionsmolekülen, wie E-Selectin, P-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1, auf der luminalen Oberfläche des Endothels können im Blut zirkulierende Entzündungszellen zum Ort der Inflammation geführt werden. Dies stellt einen der ersten Schritte in der Entzündungskaskade dar (51).

Auf die Integrität des ruhenden Endothels nimmt das Angiopoietin-Tie-2-System direkten Einfluss. Tie-2 ist eine ubiquitär auf Endothelzellen exprimierte Rezeptor-Tyrosin-Kinase mit den partiell antagonistisch wirkenden Liganden Angiopoietin-1 (Ang-1) und Angiopoietin-2 (Ang-2). Im Versuch stört exogen zugeführtes Angiopoietin-2 die Integrität einer einschichtigen Endothelzellschicht. So bewirkt die Blockade von Tie-2 die Abwanderung von Endothelzellen aus dem Verbund (52). Dieser Zusammenhang wird später (1.3.3) näher erläutert.

### 1.3.2 Perizyten

Perizyten sind murale Zellen, die von mesenchymalen Progenitorzellen abstammen und durch bestimmte Stimuli rekrutiert werden können (53-55). Sie gruppieren sich um die kleinsten Gefäße der Mikrozirkulation, wie präkapilläre Arteriolen, Kapillaren, postkapilläre Venolen (10, 12-14, 37) und liegen eingebettet in die Basalmembran. Die Körper der Zellen besitzen lange, zytoplasmatische Ausläufer die sich entlang des Gefäßverlaufs erstrecken. Diese unterteilen sich erneut in kleinere Fortsätze, die das Gefäß zirkulär umgeben (39, 56).



**Abb. 5** Elektronenmikroskopische Darstellung eines Perizyten auf der Oberfläche einer arteriellen Kapillare. Mit N ist der plumpe Zellkörper im Bereich des Zellkerns markiert. Der primäre, zytoplasmatische Ausläufer, welcher sich entlang der Gefäßachse erstreckt, ist mit 1 gekennzeichnet. Unter 2 zeigen sich sekundäre Ausläufer, welche sich zirkulär um das Gefäß anordnen. Tertiäre Ausläufer (gekennzeichnet mit 3) entspringen den Enden der sekundären Äste und verzweigen sich weiter entlang der Gefäßoberfläche. Die darunterliegende Endothelzellschicht ist am Ende der Pfeilspitzen zu sehen. (Abbildung und Text modifiziert nach 57)

Durch die fenestrierte Basalmembran treten Perizyten und Endothelzellen durch sog. „peg-socket-contacts“ direkt miteinander in Kontakt. Über diese Kontakte steht ein Perizyt oft mit mehreren Endothelzellen in Kontakt und kann so integrative wie koordinative Funktionen zwischen den benachbarten Endothelzellen vermitteln (37, 43, 45-47, 57). Weiterhin bestehen, abhängig vom Gewebe, auch „tight junctions“, „gap junctions“ und sog. „Adhaerens Plaques“ zwischen Perizyten und Endothelzellen. Die „Adhaerens Plaques“ bestehen aus dem Glycoprotein Fibronectin auf der Plasmamembran der Perizyten und schaffen eine mechanische Verbindung zwischen zwei Zellen (39, 58, 59). Zudem übernehmen Perizyten auch eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des

Gefäßtonus der Mikrozirkulation. Über die Rho-GTPase kann, ähnlich wie in glatten Muskelzellen, eine Modulation der Perizytenmorphologie und -kontraktilität erfolgen und der Gefäßdurchmesser beeinflusst werden (60). Durch die Zell-Zell-Kontakte kann eine Kontraktion der Perizyten auf die Endothelzellen übertragen werden.

Perizyten wirken stabilisierend auf die Gefäße und Regulieren die Gefäßreifung, -entwicklung sowie das Remodelling (37). Perizyten hemmen die Endothelzellmigration (61), so findet sich eine hohe Dichte an Perizyten um Gefäße in reifem Gewebe mit niedrigem Zellumsatz (39, 62, 63). Um die aussprossenden Kapillaren in einer heilenden Wunde finden sich anfangs hingegen kaum Perizyten (39, 40). Endothelzellen können so in dieses Gewebe mit hohem „turnover“ spontan einwandern (61). Das Ausmaß des Perizytenbesatzes ist außerdem von der Funktion des jeweiligen Gefäßbettes abhängig. Je höher das Verhältnis von Perizyten zu Endothelzellen, desto fester sind die interendothelialen Verbindungen und desto dichter die entsprechenden Gefäße. Den durchschnittlich höchsten Perizytenbesatz und damit die höchste Barrierefunktion zwischen Blut und umliegendem Gewebe besitzen die Gefäße der Retina (41%) und des Gehirns (22-32%). Im Herz- (11%) und Skelettmuskel (21%) hingegen wird der Austausch von Gas- und Metaboliten mit dem umliegenden Gewebe durch eine geringere Anzahl an Perizyten begünstigt (37, 39, 64).

Eine wichtige Rolle bei der Interaktion von Endothelzellen und Perizyten spielen Wachstumsfaktoren. Durch den direkten Kontakt von Perizyten und Endothelzellen kann die Proliferation und Migration der Endothelzellen gehemmt werden. Dieser inhibitorische Effekt wird vor allem durch aktiviertes TGF- $\beta$  verursacht. Perizyten produzieren latentes TGF- $\beta$ , welches durch den direkten Zellkontakt in seine aktive Form überführt wird (39, 63). Des Weiteren besitzen Perizyten einen PDGF-B-Rezeptor. Das von Endothelzellen produzierte PDGF-B führt zur Rekrutierung von Perizyten. Hierdurch wird ein stabilisierender Einfluss auf das Gefäß bewirkt. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine Störung der PDGF-B Funktion Perizyten von den Endothelzellen abwandern (39, 65). Endothelin-1, ebenfalls von den Endothelzellen produziert, stimuliert die Perizytenproliferation in vitro (39, 66). Auch molekulare Bestandteile der extrazellulären Matrix tragen zur Modulation von Phänotyp und Funktion der Perizyten bei (39, 67, 68).

### 1.3.3 Wichtige Signalwege in der Endothelzell-Perizyten-Interaktion

Essentiell für die Integrität von Gefäßen ist die Interaktion von Perizyten und Endothelzellen. Die beiden Zelltypen sind voneinander abhängig. Viele der im Folgenden dargestellten Mediatoren haben Auswirkungen auf Endothelzellen und Perizyten und stellen so wichtige Interaktionsmedien dar (37).

#### 1.3.3.1 TGF- $\beta$

Wie bereits erwähnt, wird der Wachstumsfaktor Tumor-Growth-Factor-Beta (TGF- $\beta$ ) in seiner latenten Form von Perizyten gebildet. Voraussetzung für seine Aktivierung ist der direkte Zellkontakt zwischen Endothelzellen und Perizyten (57, 69). Im Wesentlichen reguliert aktiviertes TGF- $\beta$  die Proliferation

und Differenzierung von Endothelzellen (57, 70). In diesem Kontext scheint TGF- $\beta$  einen stabilisierenden Effekt auf Gefäße zu haben, da es die Endothelzellmigration hemmt, die Synthese von extrazellulärer Matrix stimuliert und die Rekrutierung von Perizyten aus mesenchymalen Zellen reguliert (39, 57, 70-81).

### 1.3.3.2 Angiopoietin-Tie2

Ein weiterer wichtiger Signalweg für die Interaktion von Perizyten und Endothelzellen, ist der Angiopoietin-Tie2-Signalweg. Tie2, eine Rezeptor-Tyrosinkinase, wird endothelzellspezifisch expremiert und besitzt im Wesentlichen zwei antagonistisch wirkende Aktionspartner: Angiopoietin-1 und -2 (37, 82, 83). Der agonistisch wirkende Ligand, Angiopoietin-1, wird vor allem von muralen Zellen wie Perizyten expremiert (37, 73, 84, 85). Dieser parakrine Mediator zwischen Endothelium und Perizyten spielt eine wichtige Rolle in der Gefäßreifung und -stabilisierung. In Abwesenheit von Angiopoietin-1 kommt es zum Verlust der Perizyten entlang der Gefäßwand sowie zur Dichteabnahme dieser gefäßumgebenden Zellen (37, 73, 83, 85, 86). Erhöhte Angiopoietin-1 Konzentrationen führen hingegen zu stabilen und dichten Gefäßen (37, 87, 88). Das bereits oben genannte Angiopoietin-2, stellt den natürlichen Antagonisten zu Angiopoietin-1 dar (37, 89). Die Angiopoietin-2-Effekte gleichen einer Angiopoietin-1- bzw. Tie-2-Rezeptor-Dysfunktion. Folglich führen erhöhte Angiopoietin-2 Level zu einer Auflockerung der Gefäßstruktur, unter anderem durch den Verlust von Perizyten und im weiteren Verlauf zu einer Gefäßdestabilisierung (37, 90).

### 1.3.3.3 PDGF-B und PDGFR-B

Die PDGF-B und PDGFR-B Interaktion spielt eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung von Perizyten in neugebildeten Gefäßen (91, 92). PDGF-B wird von Endothelzellen sezerniert, vor allem in unreifen Kapillaren und an den Spitzen neuer Gefäßsprossen (37, 73, 93). Somit wird die Migration und Proliferation von Perizyten, die den PDGFR-B exprimieren, gefördert. Beim Knockout von PDGF-B und PDGFR-B kommt es zur Verringerung der Perizytdichte um die Gefäße der Mikrozirkulation (94, 95). In Abwesenheit der Perizyten entstehen Lecke in den Gefäßen und es kommt zur Ausbildung instabiler Mikroaneurysmata (37, 57, 93, 96). Somit zeigt sich PDGF-B als ein wichtiger Faktor für die Gefäßstabilisierung, der initial die Differenzierung von Perizyten aus einem Pool von Vorläuferzellen fördert und vor allem die Ansiedelung der Perizyten entlang wachsender Gefäße begünstigt. Folglich sind an Stellen aktiver Angiogenese auch höhere Konzentrationen an PDGF-B nachweisbar (37, 93, 97).

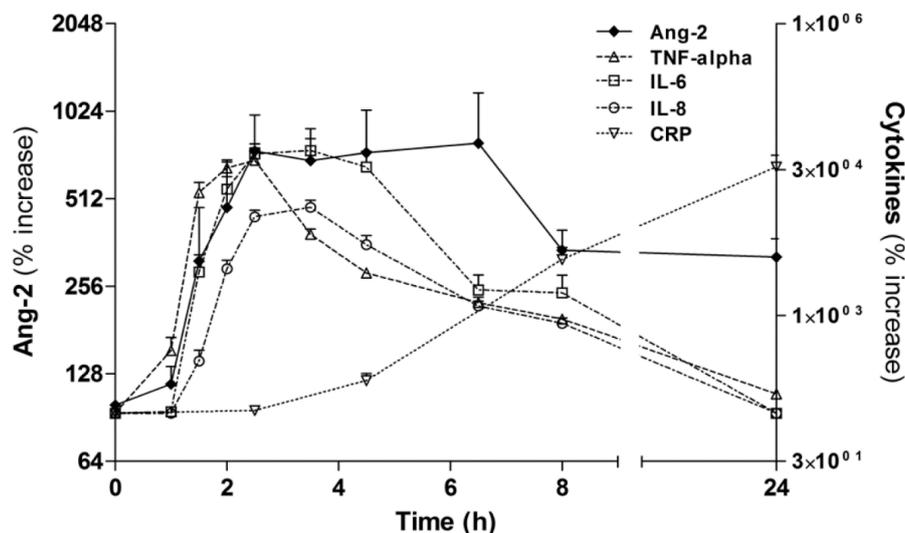
### 1.3.3.4 S1P und S1P<sub>1</sub>

Das sezernierte Sphingolipid Sphingosin-1-Phosphat wirkt über den G-Protein gekoppelten Rezeptor S1P<sub>1</sub>, der auf Endothelzellen und mesenchymalen Zellen expremiert wird. N-Cadherin beeinflusst die Rekrutierung von muralen Zellen über den S1P<sub>1</sub>-Signalweg. In Endothelzellen gelangt vermehrt N-

Cadherin durch den S1P<sub>1</sub>-Signalweg über Rac an die Plasmamembran, um dort Zellkontakte zwischen Perizyten und Endothelzellen zu ermöglichen bzw. zu festigen. Die bereits erwähnten „peg-socket-contacts“ sind Beispiele für N-Cadherin basierte Zellverbindungen (37-40, 57, 58, 98).

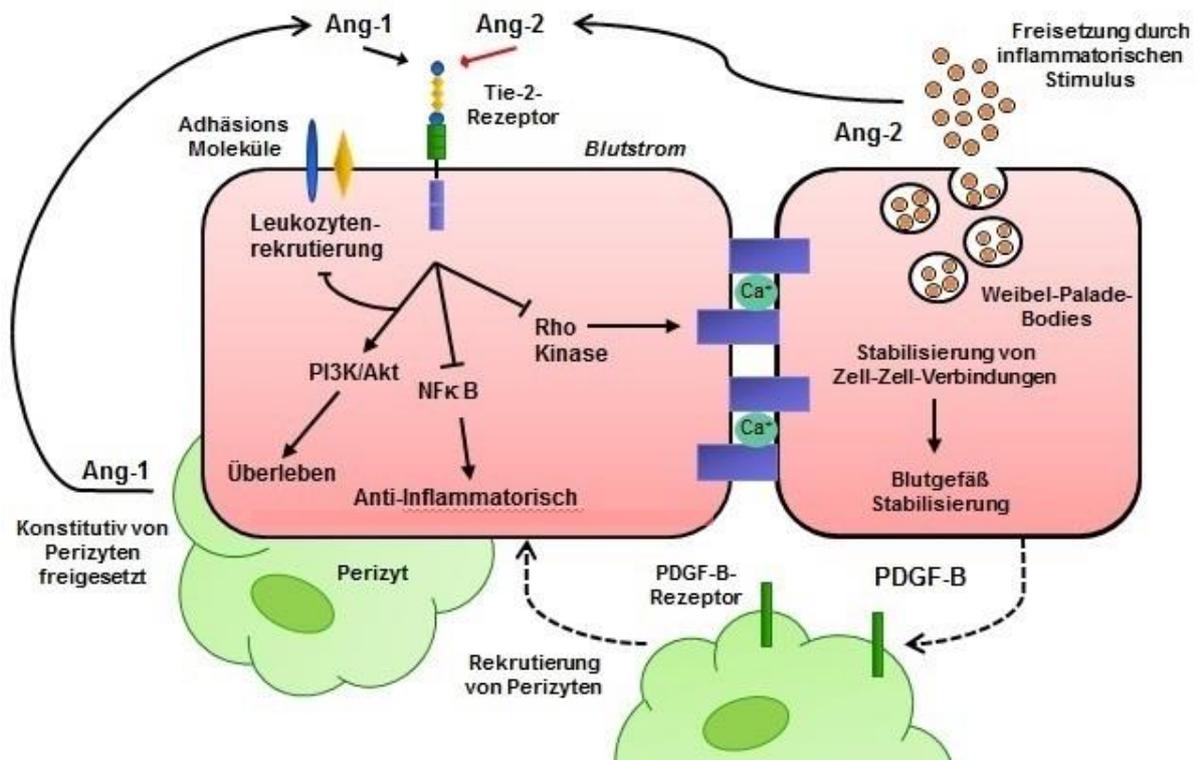
#### 1.4 Das Angiopoietin-Tie-2-System in der systemischen Inflammation

Das Angiopoietin-Tie-2-System spielt mit seinen antagonistisch wirkenden Liganden eine wichtige Rolle in der Angiogenese. Angiopoietin-1 erfüllt im ruhenden Gewebe eine stabilisierende Funktion. Die physiologische Wirkung von Angiopoietin-2 hingegen ist die Auflockerung von Gefäßstrukturen, um zusammen mit weiteren Wachstumsfaktoren, das Aussprossen von neuen Gefäßästen zu ermöglichen (37, 84, 89, 99). Das Angiopoietin-Tie2-System spielt auch unter pathologischen Bedingungen eine wichtige Rolle. Angiopoietin-2 destabilisiert die Gefäße und erhöht damit das Gefäßleck (100). Folge dieses sog. „Capillary-Leak“ in der systemischen Inflammation ist die relative Hypovolämie im septischen Schock (32). In der LPS induzierten Endotoxämie und in der schweren Sepsis werden in Patienten signifikant erhöhte Angiopoietin-2-Level gefunden. Angiopoietin-2 zeigt in diesem Zusammenhang ein ähnliches kinetisches Profil wie die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 und Interleukin-8. Das in der Endotoxämie zirkulierende Angiopoietin-2 korreliert mit TNF- $\alpha$  und dem Adhäsionsmolekül E-Selektin. Klinische Studien zeigen, dass erhöhte Angiopoietin-2-Serumwerte mit der Schweregrad der Sepsis sowie der Mortalität der Patienten korrelieren. Deshalb wird Angiopoietin-2 in neusten Studien bereits als Biomarker der Zukunft, mit hohem Vorhersagewert für das Outcome von Patienten in gesundheitlich kritischem Zustand diskutiert (100-102).



**Abb. 6** Konzentrationen von zirkulierendem Angiopoietin-2 im Vergleich zum Plasmalevel weiterer proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, und C-reaktives Protein (CRP)) nach LPS-Injektion, n= 6 gesunde Patienten. (Abbildung und Text (101))

### 1.4.1 Angiopoietin-Tie-2-System



**Abb. 7** Interaktionen der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Tie2 (modifiziert nach (103))

Der Tie-2-Rezeptor ist eine Rezeptor-Tyrosinkinase, die, wie oben bereits erwähnt, fast ausschließlich auf Endothelzellen exprimiert wird. Die Wachstumsfaktoren Angiopoietin-1 und Angiopoietin-2 sind die am besten charakterisierten Liganden von Tie-2 und haben die gleiche Rezeptoraffinität zu Tie-2 (104-110).

Die Angiopoietine binden kompetitiv an den Tie-2 Rezeptor. Tie-2 kann dadurch einerseits positiv durch Angiopoietin-1 und negativ durch Angiopoietin-2 reguliert werden. Dieses System scheint für die Kommunikation von Endothelzellen mit dem umliegenden Mesenchym notwendig zu sein, um stabile zelluläre und biochemische Interaktionen auszubilden (89).

#### 1.4.1.1 Angiopoietin-1

Angiopoietin-1 wird von verschiedenen Zellen konstitutiv exprimiert, unter anderem von Perizyten und glatten Muskelzellen. Die Bindung von Angiopoietin-1 an die Rezeptor-Tyrosinkinase Tie-2 führt zur Phosphorylierung des Rezeptors und nachfolgend zur Aktivierung oder Blockade intrazellulärer Signalwege. Die Aktivierung des Protein-Kinase-B/Akt-Signalweg inhibiert die Endothelzell-Apoptose sowie die Angiopoietin-2-Expression und -Sekretion. Die Blockade des NFκB-Signalwegs hat auch einen protektiven Effekt auf die Endothelzellen (82, 104, 111, 112). Wie bereits erwähnt, spielt

Angiopoietin-1 auch eine wichtige Rolle in der Interaktion zwischen Endothelzellen und Perizyten. Die vermehrte Rekrutierung von Perizyten durch Angiopoietin-1 entlang der Gefäßwand führt zur Stabilisierung und Verminderung der Gefäßpermeabilität (37, 83-85, 87, 88, 113). Folglich zeigen sich Gefäße bei transgener Angiopoietin-1-Überexpression generell resistent gegenüber Gefäßleckage (87). Auch via Adenovirus induzierte Überexpression führt im Tierversuch zur Reduktion der basalen Gefäßpermeabilität und ein durch Reizstoffe (Senföl, VEGF oder Thrombin) provoziertes Gewebsödem zeigt eine geringere Ausprägung als in der Kontrollgruppe (88, 111). Zusammengefasst wirkt Angiopoietin-1 antiapoptotisch auf Endothelzellen und fördert die Perizytenrekrutierung sowie das ruhende, dichte Endothelium.

#### 1.4.1.2 Angiopoietin-1 in der Inflammation

Im septischen Schock, als Folge einer LPS-induzierten Endotoxämie, zeigt Angiopoietin-1 einen protektiven Effekt. Die systemische Entzündungsreaktion ist charakterisiert durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität der Kapillaren, Lungenödem/Dyspnoe und eine erhöhte Expression proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- $\alpha$  und Il-6. Im Tierversuch weisen die Angiopoietin-1-überexpressierenden Mäuse geringere Mortalitätsraten als ihre Kontrollgruppe auf. Neben dem längeren Überleben zeigen die Tiere auch eine verbesserte hämodynamische Situation (114).

Außerdem wirkt Angiopoietin-1 antiinflammatorisch. Die Einwanderung von Entzündungszellen in das Gewebe wird durch Zytokine wie TNF- $\alpha$  induziert und durch interendotheliale Verbindungen reguliert. Witzensbichler et al. zeigen in der Lunge eine verminderte Expression von zytokin-induzierten Adhäsions-Molekülen (VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin) bei Angiopoietin-1-Überexpression via Adenovirus (114). Die Vorbehandlung von Endothelzellen mit Angiopoietin-1 verhindert die Transmigration der inflammatorischen Zellen ins Gewebe, ohne die Neutrophilenzahl oder den TNF- $\alpha$ -Spiegel zu beeinflussen. Somit ist Angiopoietin-1 eine antiinflammatorische Wirkung zuzuschreiben (111).

#### 1.4.1.3 Angiopoietin-2

Die Hauptquelle von Angiopoietin-2 stellen die Endothelzellen dar. Hier wird Angiopoietin-2 in Sekretgranula, den sog. Weibel-Palade-Bodies, zusammen mit weiteren Stoffen wie P-Selektin, Interleukin-8, Endothelin-1, Gewebefibrinogen-Aktivator (t-PA) gespeichert und kann innerhalb von Sekunden bis Minuten freigesetzt werden (104, 115).

Angiopoietin-2 antagonisiert die Angiopoietin-1-Tie2 vermittelten Funktionen durch Rezeptorblockade, ohne selbst einen nachfolgenden Signalweg zu aktivieren (35, 89). Transgene Angiopoietin-2-überexpressierende Tiere besitzen diskontinuierliche und undichte Gefäße. So ähneln diese transgenen Mäuse einem Angiopoietin-1/Tie2-defizienten Phänotyp (89, 116). Auch die intensive Gabe von rekombinantem Angiopoietin-2-Protein verändert die Integrität des Endotheliums und erhöht die Permeabilität der Gefäße. Folglich kommt es zur Ausbildung von Ödemen. Roviezzo et al. untersuchten die Ödembildung nach lokaler Angiopoietin-2-Applikation in die Mauspfote. Das

Ergebnis war eine dosis- und zeitabhängige Volumenzunahme der Pfote. Auch Scharpfenecker et al. bestätigen die schnelle Angiopoietin-2-vermittelte Wirkung, die innerhalb von 30 bis 60 Minuten zur Störung der Integrität einer einschichtigen Endothelzellschicht führt. Die Gabe von löslichem Tie2-Rezeptor und Angiopoietin-1 verhinderten die Angiopoietin-2 induzierte Ödembildung (52, 116). Durch die funktionelle Blockade des Tie2-Rezeptors, kommt es zu einer gestörten Perizytenrekrutierung. Dies hat den Verlust von Perizyten entlang der Gefäße zur Folge. Die gestörte Integrität der Gefäße führt auch wiederum zur Erhöhung der Permeabilität (90, 117). Die Freisetzung von Angiopoietin-2 führt demzufolge zu einer schnellen Destabilisierung des Endotheliums (104).

Die Aktivierung des Endothels ist ein wichtiger regulatorischer Faktor der Angiopoietin-2-Expression. Das Endothel wird, wie oben bereits erwähnt, durch verschiedene Zytokine (wie VEGF, Tumor Nekrose Faktor (TNF), etc.) oder durch Stressfaktoren (wie Hypoxie, Superoxide, etc.) aktiviert (104, 115). Daraufhin erfolgt auch die Ausschüttung der Weibel-Palade-Bodies, deren freigesetzte Faktoren eine wichtige Rolle in der Induktion von Entzündung, Koagulation, Angiogenese und weiterer Endothelzellfunktionen spielen. In ruhenden Endothelzellen ist kaum Angiopoietin-2 mRNA nachweisbar, hingegen findet sich nach Aktivierung des Endothels ein starker Angiopoietin-2 Anstieg (104, 112, 118-120).

#### 1.4.1.4 Angiopoietin-2 in der Inflammation

Angiopoietin-2 wirkt proinflammatorisch. So zeigen Angiopoietin-2 Knockout Mäuse bei einer kurzzeitigen Inflammation, durch die intraperitoneale Injektion von Mercaptoessigsäure, eine verminderte Fähigkeit einer Entzündungsreaktion, im Sinne einer Neutrophilenrekrutierung, auszulösen. Nach intraperitonealer Applikation von *Staphylococcus aureus* (Stamm AH12) zeigen Wild-Typ-Mäuse mit normaler Angiopoietin-2-Produktion innerhalb weniger Stunden starke, klinische Krankheitssymptome. Angiopoietin-2 defiziente Tiere zeigen hingegen keinerlei Symptome und keine Rekrutierung von Entzündungszellen zum Ort der Inflammation. Fiedler et al zeigten, dass Angiopoietin-2 die Endothelzellen für die TNF- $\alpha$ -induzierte Anhaftung von Monozyten und TNF- $\alpha$ -abhängige Ausbildung von Zell-Adhäsions-Molekülen sensibilisiert (121). Auch bei Angiopoietin-2-defizienten Mäusen liegt eine Beeinträchtigung der bereits erwähnten, zytokin-induzierten Adhäsionsmoleküle der luminalen Endothelzelloberfläche vor. Zusammengefasst hat Angiopoietin-2 eine proinflammatorische Wirkung in der Entzündungsantwort und trägt zur Erhöhung der Permeabilität der Gefäße bei (104).

#### 1.4.2 Förderung der Perizytenrekrutierung durch PDGF-B und PDGFR-B

Die Synthese von gefäßwirksamen PDGF-B erfolgt vor allem durch Endothelzellen (96), meist getriggert durch einen externen Stimulus, wie Hypoxie, Wachstumsfaktoren, Zytokine, Thrombin etc. Die PDGF-B Rezeptor-Tyrosinkinase (PDGFR-B) werden unter anderem auf Perizyten und glatten Muskelzellen exprimiert. Die Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche ist nicht konstant sondern unterliegt ebenfalls externen Stimuli. Beispielsweise erhöht sich das Expressionslevel der

PDGFR-B auf Bindegewebszellen in vivo in der Inflammation. Die Bindung des dimeren PDGF-B Proteins führt zur Dimerisierung des PDGFR-B und nachfolgenden Aktivierung verschiedener Signalwege. PDGF-B erfüllt wichtige Funktionen während der Embryogenese, besonders in der Entwicklung von Blutgefäßen, Nieren, Lunge und dem zentralen Nervensystem (ZNS). In diesen Organen befinden sich auch die PDGF-abhängigen Zelltypen, wie Perizyten, alveoläre Fibroblasten, Zellen des Mesangiums der Niere und Gliazellen im ZNS (122).

Wie bereits erwähnt hat PDGF-B Einfluss auf die Perizytenproliferation und stimuliert die Perizytenmigration entlang neu gebildeter Gefäße (93, 123). Die Perizytenrekrutierung um die Gefäße trägt entscheidend zur Gefäßreifung und -stabilisierung bei (35). In diesem Zusammenhang ist das Endothelium eine wichtige PDGF-B Quelle, ohne die es zum Perizytenverlust entlang der Gefäße kommt. Die endotheliale PDGF-B-Expression findet sich nur an Stellen aktiver Perizytenproliferation und -rekrutierung (37). So ist das von Kapillaren produzierte PDGF-B hauptsächlich wichtig um Perizyten zu rekrutieren und sorgt somit für die strukturelle Gefäßintegrität (96, 122, 124). Folglich findet in Mausembryos in Abwesenheit von PDGF-B keine Stabilisierung der Gefäßwand durch Perizyten statt. Die Folge sind undichte, instabile Gefäße mit zahlreichen Mikroaneurysmata die zur Ausbildung einer letalen Hämorrhagie und Ödemen in der späten Embryogenese führen (96). Da PDGF-B-Defizienz in Mäusen einen embryonal letalen Phänotyp induzieren, eliminierte die Arbeitsgruppe um Ch. Bestholtz das PDGF-B *retention motif*. Das PDGF-B *retention motif* dient dazu, das sezernierte PDGF-B auf den Zellen, die den Faktor produziert haben, zu speichern. Bei Fehlen dieses Motifs in Zellkultur wird vermehrt PDGF-B sezerniert und akkumuliert im Medium. Lindblom et al. zeigten, dass das PDGF-B retention motif (*PDGF-B<sup>ret/ret</sup>*) eine wichtige Rolle bei der Bindung von sezerniertem PDGF-B an Proteine oder Proteoglykane auf der Endothelzelloberfläche oder der periendothelialen Matrix spielt. Hier wird PDGF-B den umliegenden PDGFR-B positiven Zellen präsentiert, unter anderem den Perizyten. In Versuchen mit *PDGF-B<sup>ret/ret</sup>*-Tieren wurde beobachtet, dass die Perizyten teilweise vom Gefäß abgelöst waren und ihre dendritischen Fortsätze von den Gefäßen abstrecken. Dies deutet darauf hin, dass das *retention motif* eine wichtige Rolle für die gezielte Perizytenmigration zur Gefäßwand spielt. Die *PDGF-B<sup>ret/ret</sup>* Mäuse zeigen auch eine beeinträchtigte Integration der Perizyten in die Gefäßwände der Mikrozirkulation (123). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das PDGF-B - PDGFR-B System eine wichtige Rolle in der Attraktion von Perizyten sowie deren Einbindung in die Gefäßwand spielen und folglich zur Gefäßreifung und -stabilisierung beiträgt.

#### 1.4.2.1 Wechselwirkung von PDGF und Angiopoietinen

Der PDGF-B-Signalweg und das Angiopoietin-Tie2-System sind beide wichtig für die Gefäßstabilisierung und erfüllen wichtige Rollen in der Endothelzell-Perizyten-Interaktion. Die Wachstumsfaktoren beeinflussen sich auch gegenseitig. So wurde gezeigt, dass PDGF-B die Angiopoietin-1 Expression in Perizyten und glatten Muskelzellen hochreguliert. Die Stimulation von Endothelzellen mit Angiopoietin-1 zeigte eine leichte Hemmung der PDGF-B-Expression. Somit unterstützt PDGF-B abgesehen von seiner Funktion als Chemoattraktant für Perizyten, die

antiinflammatorische und protektiv-stabilisierende Wirkung von Angiotensin-1 (125). Zudem wurde nach PDGF-B Stimulation von glatten Muskelzellen eine Herabregulierung der Angiotensin-2 mRNA Level um 75% innerhalb von vier Stunden beobachtet, mit folglich sinkenden Angiotensin-2 Proteinlevels. PDGF-B hat keinen Einfluss auf die Angiotensin-2 Transkriptionsrate, sondern destabilisiert die Angiotensin-2 mRNA. Die Halbwertszeit der Ang-2 mRNA war in einer Studie um wenigstens 50% reduziert (126).

## 1.5 Adenoassoziierte Viren als gentherapeutisches Tool

Der adeno-assoziierte Virus (AAV) ist ein Einzelstrang-DNA Parvovirus und gehört zur Gattung des Dependovirus (127). Der AAV stellt ein vielversprechendes Werkzeug der Gentherapie dar. Als Dependovirus benötigt der AAV die Gene eines Helfer-Virus zur Replikation, wie beispielsweise die eines Adenovirus oder eines Herpesvirus, da dieser selbst nicht replikationsfähig ist (127, 128). Das ca. 4,7 kilobasen große Genom des AAV enthält zwei Open Reading Frames, die Rep und die Cap Region. Die Rep Region codiert für die Replikations-assoziierten Proteine, die Cap Region codiert hingegen für drei Proteine (VP1, VP2 und VP3) die zusammen das virale Capsid bilden (127). Das virale Genom wird von zwei Inverted Terminal Repeats (ITRs) flankiert, diese werden benötigt um die DNA in Capside zu verpacken. Zudem wird in den AAVs die Wild-Typ codierende Region durch ein anderes Gen oder eine DNA Sequenz von Interesse ersetzt. Bei vielen Capsid Serotypen wurde ein Gewebetropismus entdeckt (127). Rekombinante AAV (rAAV) Gen-liefernde Vektoren können produziert werden, indem die beiden viralen Gene, Rep und Cap, entfernt werden und stattdessen eine transgene Expressionscassette zwischen die beiden ITRs eingefügt wird. Da in einem rAAV keine viralen Gene enthalten sind, ist die mit diesen Vektoren assoziierte Toxizität minimal.

So stellen rAAV Vektoren ein ideales Werkzeug der Gentherapie dar, welches die in vielen Krankheitsmodellen eingesetzt werden kann (128). Voraussetzung für ein gutes, therapeutisches Ergebnis, ist eine sichere Infektion des Zielgewebes sowie eine langandauernde Genexpression. Für den rAAV konnte umfassend gezeigt werden, dass er viele verschiedene Zell- und Gewebetypen, wie beispielsweise Gehirn, Muskel, etc., sowie sich teilende und ruhende Zellen transfizieren kann. Daneben konnte in verschiedensten Tiermodellen eine Langzeit-Expressionsrate von über 1,5 Jahren gezeigt werden. Auf zellulärer Ebene wird die Genexpression wie folgt erreicht: Zunächst bindet der AAV an einen zellulären Oberflächenrezeptor, anschließend wird dieser durch Endozytose in die Zelle eingeschleust und zum Zellkern geleitet. Hier verliert der Virus sein Capsid, um das Genom freizusetzen. Zuletzt erfolgt die Konversion der Einzelstrang-DNA in eine Doppelstrang-DNA als Transkriptionsvorlage im Zellkern (128).

Es werden 11 verschiedene AAV Serotypen unterschieden. Definiert ist ein Serotyp dadurch, dass ein Antikörper, welcher sich reaktiv zum Capsid eines Serotyps zeigt, unfähig ist, auf einen anderen Serotyp zu reagieren. Der erstbeschriebene AAV, war der AAV Serotyp 2. Bis heute ist der Serotyp 2 der best-charakterisierte Serotyp, weshalb viele Studien mit diesem Serotyp durchgeführt wurden.

In den folgenden Versuchsreihen wurde ebenfalls ein AAV Serotyp 2 zur Überexpression von PDGF-B, vor allem in Herzmuskel und Skelettmuskelzellen, verwendet.

## 1.6 Zielsetzung

Der septische Schock ist charakterisiert durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität und Hypotension. Ziel der vorliegenden Arbeit war es,

1. den Einfluss von PDGF-B auf die Gefäßpermeabilität in der systemischen Inflammation
2. das Verhalten der Perizyten als morphologisches Korrelat der erhöhten Gefäßpermeabilität
3. den Einfluss von PDGF-B in der systemischen Inflammation
4. den protektiven Effekt von PDGF-B in Bezug auf die Mortalität in der systemischen Inflammation

zu untersuchen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Rekombinante adenoassoziierte Viren - Produktion

Der folgende Abschnitt beschreibt die Produktion des verwendeten rAAV 2.9 PDGF-B.

#### 2.1.1 Tripletransfektion der Trägerzellen

Die Herstellung rekombinanter, adenoassoziierter Viren erfolgt in Human Embryonic Kidney Trägerzellen (HEK293). Diese wurden mit drei Plasmiden transfiziert. Das Adenovirus-Helferplasmid enthält die genetische Information des Helfervirus, um die Replikationsfähigkeit zu gewähren. Das Transplasmid beinhaltet die entsprechenden AAV-Anteile (hier PDGF-B und LacZ), sowie die Rep und Cap Sequenzen. Zuletzt das Cisplasmid, welches für das eigentliche Zielgen, also PDGF-B codiert, inklusive dem benötigten Promoter sowie den Inverted Terminal Repeat Sequenzen (ITRs) (129).

Die Trägerzellen wurden auf etwa 50 Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von ca. 5,3 cm gesplittet und bis zu einer Konfluenz von 70-80 % weiter kultiviert. Das Medium wurde bis zwei Stunden vor Transfektion belassen und dann durch frisches, serumfreies Medium ersetzt. Das benötigte Transfektionsgemisch (40 ml für 50 Zellkulturschalen) enthält 1300 µg pA Δ F6 Adenovirus Helferplasmid, 650 µg p 600 Transplasmid sowie 650 µg Cisplasmid. Das Medium und die Transfektionslösung wurden zusammengeführt, gevortext und anschließend auf vier Falcons, mit je 10 ml aufgeteilt. Nach Hinzugabe von 1300 µl Polyethylenimin (PEI) in der Konzentration 1 µg/µl und erneutem Mischen erfolgte eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurde jede Zellkulturschale gleichmäßig mit 2,1 ml der Lösung versetzt. Nach erneuten vier Stunden Inkubation im Inkubator wurde dem Medium 5 ml DMEM mit 50% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin hinzugefügt.

Über Ultrazentrifugation und Dichtebestimmung über einen Cäsiumchloridgradienten erfolgte die Aufreinigung der Viruspartikel. Pro Milliliter Überstand wurden 0,454 g Cäsiumchlorid (CsCl) zugeführt. Nach Vermischen sollte das Gesamtvolumen ca. 32-34 ml betragen. Der 2-Phasencäsiumchloridgradient wurde wie folgt hergestellt: Zunächst wurden je 9 ml einer CsCl-Lösung mit einer Dichte von 1,41g/ml in zwei SW-28 Tubes pipettiert, anschließend wurden vorsichtig erneut je 9 ml einer CsCl-Lösung mit einer höheren Dichte von 1,61g/ml unterpipettiert. Danach erfolgte die Hinzugabe von jeweils 16-17 ml des Zelllysates, ohne den entstandenen Dichtegradienten zu zerstören. Der CsCl-Gradient entspricht annähernd der Dichte der Viruspartikel. Unter erneuter Ultrazentrifugation mit 25.000 rpm über 18-20 Stunden bei einer Temperatur von 15 °C sinken die Partikel nach unten. Danach wurde jeder Ansatz in 1 ml Schritten auf Eppendorfgefäße verteilt.

Zur Sicherstellung eines ausreichenden AAV-Partikelanteils in den Eppendorfgefäßen wurden jeweils 5 µl extrahiert, um den Refraktionsindex mittels Refraktiometer zu bestimmen. Die weiteren Arbeitsschritte wurden nur mit Proben mit einem Refraktionsindex zwischen 1,362 und 1,373 durchgeführt. Die einzelnen Proben wurden in zwei 70 µl Ti-quick-seal Röhrchen zusammengeführt und

bei Bedarf mit 1,41p CsCl aufgefüllt. Nach Verschließen der Röhrchen wurden die Proben erneut bei 60.000 rpm für 20-24 Stunden bei 15 °C zentrifugiert.

Die verschlossenen Gefäße wurden mit einer 16G Nadel punktiert und jeweils 1 ml extrahiert und auf zwei Eppendorf-Tubes verteilt. Nach Eröffnung des Röhrchens erfolgt die Verteilung von jeweils 500 µl des verbliebenen Ansatzes auf Eppendorfgefäße. Anschließend wird erneut der Refraktionsindex geprüft und nur die im Zielbereich liegenden Proben weiterverwendet. Nach erneuter Ultrazentrifugation und weiterer 500 µl weiser Fraktionierung wurde der Refraktionsindex bestimmt. Der Zielbereich liegt schließlich zwischen 1,364 und 1,371. Die Fraktionen mit dem gewünschten Brechungsindex wurden schließlich vereint und von Cäsiumchlorid befreit.

Die Reinigung von Cäsiumchlorid erfolgte mittels Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units. Nach Anfeuchtung des Filters mittels PBS, wurde die Viruslösung sowie weitere 4-5 ml PBS hinzugegeben. Das Endvolumen von ca. 12 ml wurde schließlich bei 3.000 rpm für 15 Minuten zentrifugiert. Abschließend erfolgte eine zwölfmalige Wäsche mit PBS. Nach erneuter Zentrifugation zeigte sich die Lösung auf ca. 2 ml konzentriert.

### 2.1.2 Ernte und Aufreinigung der adenoassoziierten Viren

Ein erneuter Austausch des Zellmediums wurde 24 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Nach weiteren 48 Stunden konnte das Ernten der Viren erfolgen. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen mittels Zellschaber gelöst. Nach Überführung der Zellen in ein Falcon-Tube erfolgte die Zentrifugation der Zell-Suspension bei 4000 rpm für 15 Minuten. Das entstandene Zell-Pallett wurde über Nacht bei -80 °C gefroren.

Im nächsten Schritt erfolgte die Virusaufreinigung. Hierzu wurde das gefrorene Material zunächst über ca. 10 Minuten bei 37 °C aufgetaut. Die Resuspension des Zellpalletts erfolgte in 27 ml TMN-Puffer. Nach Erreichen eines Endvolumens von 35 ml, erfolgte die Kühlung auf Eis. Im Eiswasserbad erfolgte die Sonifizierung der Zellsuspension über dreimal 30 Sekunden zur Lösung der Zellen. Durch Hinzugabe von 3 µl Benzonase, mit einer Endkonzentration von 25 U/ml, wurde der Abbau freier RNA und DNA erzielt. Während der anschließenden Inkubation über 20 Minuten bei 37 °C wurde das Zelllysate alle fünf Minuten einmal gewendet. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch die Hinzugabe von 1,25 ml Desoxycholsäure (10%). Nach erneuter Inkubation über zehn Minuten bei 37 °C und anschließend über 15 Minuten auf Eis, erfolgte die Reinigung der Suspension unter Zentrifugation mit 4000 rpm über 15 Minuten bei 4 °C. Der gewonnene Überstand wurde in ein steriles Falcon überführt.

### 2.1.3 Quantifizierung mittels qPCR

Durch eine quantitative real-time PCR erfolgte die Bestimmung der Viruskonzentration in der hergestellten Lösung.

Mittels DNase Amplification Grade Kit, wurde zum Verdau der Viruslösung eine DNase zugefügt. Anschließend wurden 10 µl Probelösung, 4 µl DNase, 10 µl DNase-Puffer und 76 µl dH<sub>2</sub>O zusammengefügt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase-Aktivität wurde durch Hinzugabe von 2 µl 25 mM EDTA beendet und dann erfolgte eine erneute Inkubation der Probe über zehn Minuten bei 65 °C mit anschließender Kühlung auf Eis. Die benötigte Standardserie wurde aus einem CMV-Vektor Plasmid erstellt, mit vier seriellen Verdünnungen begonnen bei 0,001 ng bis 1 ng. In den PCR-Tubes wurden schließlich der Standard und die Proben mit dem TaqMan-Mix und Primern des virusspezifischen bGH-Gen zusammengefügt. Der Vergleich der PCR Kurven der Proben mit denen des Standards konnte die Konzentration der Viruslösung quantifiziert werden. Die Lagerung der rekombinanten adenoassoziierten Viren erfolgte bei 4 °C.

## 2.2 In-vivo Sepsis-Modell

Mit Hilfe des Sepsis-Modells wird unter kontrollierten Bedingungen eine Sepsis in Mäusen induziert. In regelmäßigen Abständen erfolgen die Überwachung und Evaluation der Sepsisschwere mittels eines Score-Systems sowie hämodynamischen Messungen.

### 2.2.1 Versuchstiere

Für die gesamten Tierversuche werden Mäuse mit dem Hintergrund C57/Bl6 (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Versuchstiere waren männlich und 18 bis 22 Gramm schwer. Die Durchführung der Versuche ist durch die Regierung von Oberbayern unter der Tierversuchsantragsnummer 165-11 genehmigt.

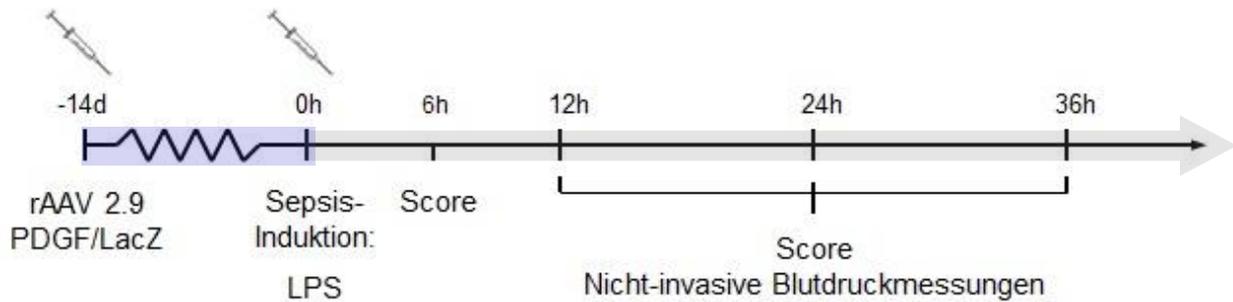
Die Überexpression von PDGF-B, vor allem in Skelett- und Herzmuskelzellen, wird durch die intravenöse (i.v.) Applikation eines adeno-assoziierten Virus (rAAV 2.9) über die Schwanzvene der Versuchstiere erreicht. Nach 14 Tagen Inkubation erfolgt der Einschluss der Tiere in den Versuch. Die Kontrollgruppe wird mittels rAAV 2.9 LacZ transfiziert.

### 2.2.2 Versuchsaufbau

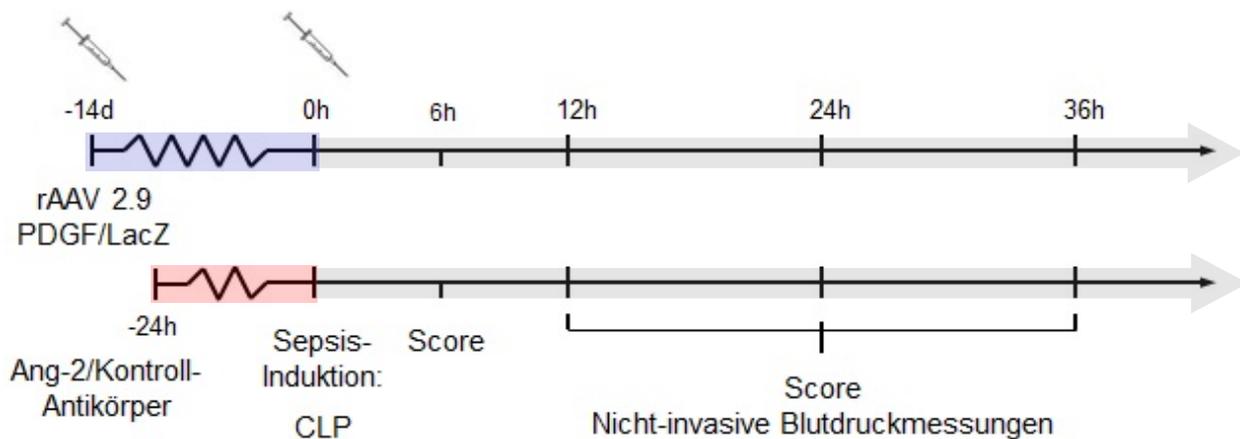
Die systemische Inflammation erfolgt durch intraperitoneale (i.p.) Applikation von Lipopolysacchariden (LPS) oder durch die „Cecal Ligation and Puncture“ (CLP) zum Zeitpunkt null Stunden. Zur Schmerzmedikation erhalten die Tiere erstmals mit Sepsis-Induktion und dann alle weiteren zwölf Stunden ein Opiat (Temgesic Ampullen 0,3 mg, Verdünnung 1:10 NaCl, Buprenorphin, 50 µl i.p. und 50 µl subkutan). Im Verlauf entwickeln die Tiere relativ zuverlässig eine Sepsis, deren Evaluation erstmals nach sechs Stunden mittels Score-System erfolgt. Die Darstellung unten zeigt die weitere Beurteilung der Tiere anhand des „Sepsis-Severity-Scores“ im zwölf Stundentakt, sowie die zeitgleiche Durchführung nicht-invasiver Blutdruckmessungen.

## Sepsis-Mausmodell

### A LPS induzierte Sepsis



### B CLP induzierte Sepsis



**Abb. 8** Versuchsschema des Sepsis-Modells mit Sepsis-Induktion zum Zeitpunkt 0h und Score- und Blutdruckerhebungen im Verlauf. Zu sehen auch die zwei Versuchsreihen **A** PDGF-B Überexpression via rAAV 2.9 PDGF-B und LPS induzierter Sepsis **B** PDGF-B Überexpression und Angiotensin-2-Antikörper Injektion 24 Stunden vor Sepsis-Induktion mittels CLP

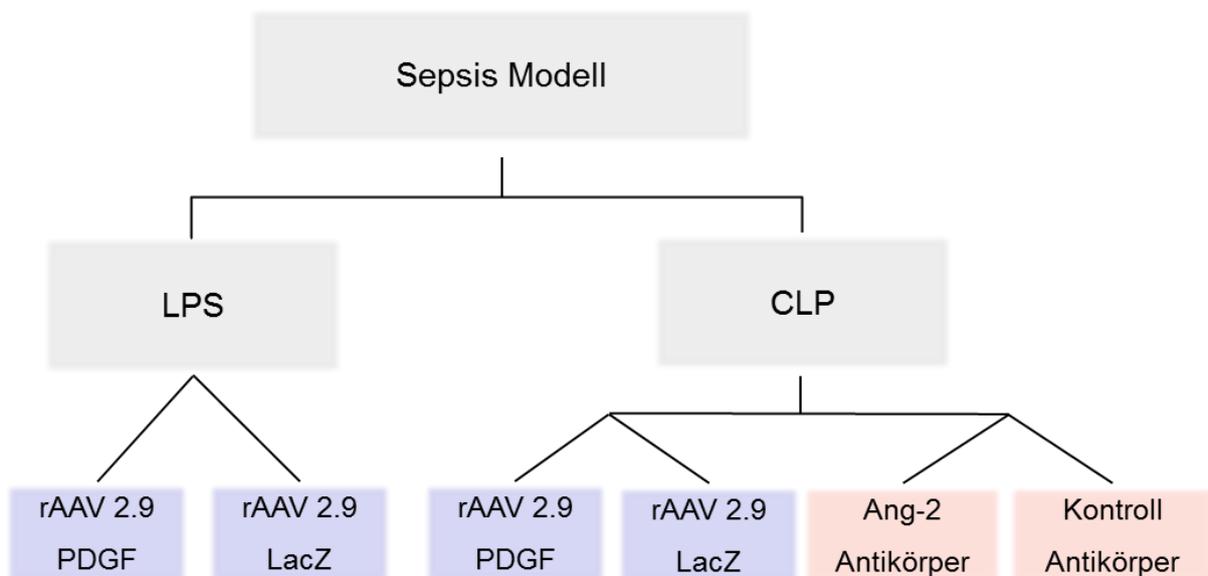
Ein kumulativer Wert von 20 Punkten im Sepsis-Severity-Score fordert aus tierschutzrechtlichen Gründen die Beendigung des Versuchs mit Euthanasie des Versuchstieres zu diesem Zeitpunkt.

Liegt der Score eines Tieres nach 60 Stunden Versuchsdauer noch unter 20 Punkten, wird dies als „Überleben“ gewertet. Dementsprechend gibt das Modell Informationen zur Mortalität bzw. zum Überleben der septischen Mäuse.

Die Serum- und Organentnahme zur weiteren Analyse und Auswertung erfolgen nach Beendigung des Versuchs.

### 2.2.3 Versuchsgruppen

Nachfolgend werden die einzelnen Versuchsgruppen näher erläutert. Wie unten skizziert, bestehen zwei Versuchsansätze, zum einen die LPS-induzierte Sepsis mit PDGF-B-überexprimierenden Tieren und zum anderen eine durch CLP erzeugte Sepsis, mit einer PDGF-B Überexpression und Injektion von Ang2-Antikörpern (Ak) mit jeweils entsprechender Kontrollgruppe.



**Abb. 9** Übersicht über die Gruppen der beiden Versuchsansätze

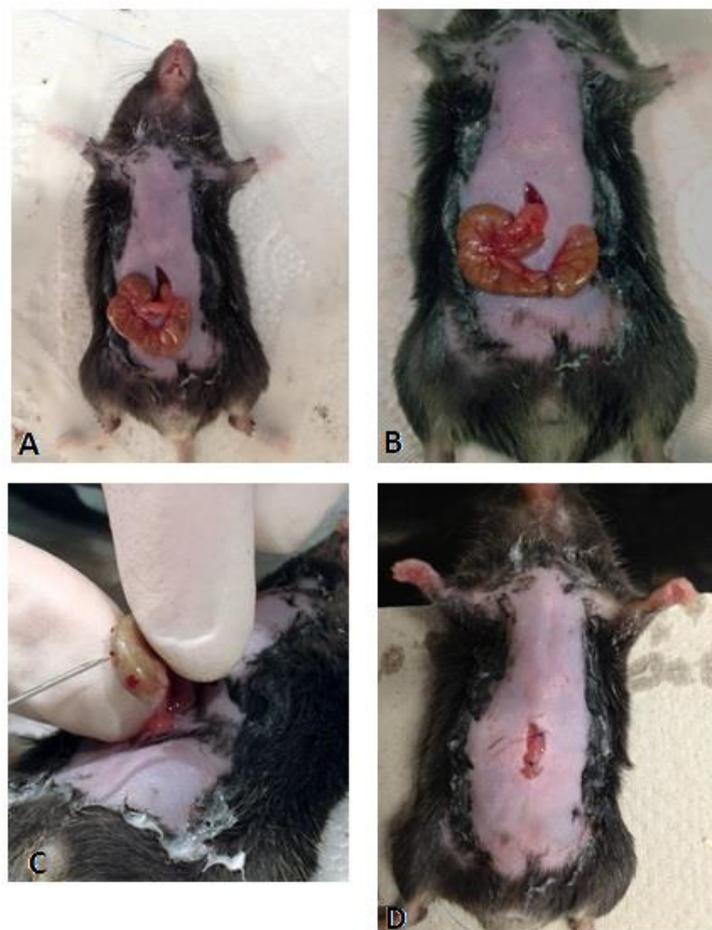
#### 2.2.3.1 LPS induzierte systemische Inflammation

Durch die i.p. gewichtsadaptierte (20 mg/kg Körpergewicht) Injektion von Lipopolysacchariden (LPS, von *E. coli*; L-2880, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) kann zuverlässig eine systemische Inflammation erzeugt werden (siehe **Abb. 15** 3.1.1.). Die so induzierte Inflammation stellt einen gut kontrollierten, einmaligen, gram-negativen, inflammatorischen Stimulus für das Versuchstier dar.

#### 2.2.3.2 Cecal Ligation and Puncture (CLP) induzierte Sepsis

Der inflammatorische Stimulus der CLP gleicht einer perforierenden Appendizitis mit nachfolgender Peritonitis. Die Anästhesie der Maus erfolgt mit der i.p. Injektion von 150 µl der Dreifachkombination MMF (Medetomidin, Midazolam, Fentanyl) aus einem Sedativum (0,5 mg/kg KG, Medetomidin, Domitor®, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Germany), einem Hypnotikum (5 mg/kg KG, Midazolam, Dormicum®, Roche Pharma AG, Grenzach-Wyhlen, Germany) und einem Analgetikum (0,05 mg/kg KG, Fentanyl, Fentanyl®, Rotexmedica GmbH, Trittau, Germany). Die Maus wird in Rückenlage mit Pflasterstreifen an jeder Gliedmaße fixiert. Mit einer Enthaarungscreme (Veet Sensibel, Reckitt Benckiser Deutschland GmbH, 69115 Heidelberg) wird das Fell am Bauch der Maus entfernt und

anschließend das Operationsfeld mit 70% Ethanol desinfiziert. Nach Einwirken der Desinfektionslösung wird ein ca. 1 cm langer medianer Hautschnitt gesetzt. Das darunterliegende Peritoneum wird entlang der Linea alba eröffnet. Nun erhält man Sicht auf die Dünndarmschlingen der Maus. Mit einer stumpfen Pinzette wird der Appendix vermiformis der Maus gesucht und durch die Bauchöffnung luxiert. In diesen Darmanteil wird retrograd der Kot ausgestrichen und ein ca. 1 cm langes Stück mittels eines chirurgischen Fadens (Nahtmaterial Prolene, monofil, P 3, USP 6-0, 0,7 metric, 45 cm, blau) abgebunden. Der abgeschnürte Darmanteil wird mit einer Einmalkanüle (Sterican® Gr. 16, G 23 x 1" / ø 0,60 x 25 mm, blau; B. Braun, Melsungen AG, Deutschland) dreimal punktiert und etwas Darminhalt nach außen gepresst, um die Durchgängigkeit der Punktionsstelle sicher zu stellen. Der Appendix wird zurück in die Bauchhöhle verlagert und das Peritoneum sowie die Bauchdecke verschlossen. Nach Wiegen des Versuchstiers wird ihm eine Schmerzmedikation (Temgesic Ampullen 0,3 mg, Verdünnung 1:10 NaCl, Buprenorphin, 50 µl i.p. und 50 µl subkutan) verabreicht und 200 µl eines Antagonisten (Atipamezol (Antisedan®, 2,5 mg/kg KG), Flumazenil (Anexate®, 0,5 mg/kg KG) und Naloxon (Naloselect®, 1,2 mg/kg KG)) i.p. gespritzt um die Maus aus der Anästhesie zu erwecken.



**Abb. 10** Operationsschritte der „Cecal Ligation and Puncture“: **A:** Luxierter Appendix vermiformis bei eröffneter Bauchhöhle; **B:** Ligation eines ca. 1 cm langen Stückes; **C:** Punktion des ligierten Darmabschnittes mit einer 16G Einmalkanüle; **D:** Chirurgischer Verschluss der Bauchhöhle

### 2.2.3.3 PDGF-B – Überexpression

Die Transfektion der Versuchstiere via rAAV 2.9 erzielt die vermehrte Produktion von PDGF-B, vor allem in Skelett- und Herzmuskel. 14 Tage nach der intravenösen rAAV Applikation in der Konzentration  $1 \cdot 10^{11} / \mu\text{l}$ , findet die Sepsis-Induktion bei konstant höherer PDGF-B Expression statt. Als Kontrollvektor wird ein rAAV 2.9 LacZ (Konzentration  $1 \cdot 10^{12} / \mu\text{l}$ ) verwendet.

### 2.2.3.4 Angiopoietin-2-Antikörper

Ein Teil der Tiere erhält den LC 06 Angiopoietin-2-spezifischen Antikörper (RO5314193, Roche, Penzberg, Germany, Ang-2 Ak) (130) 24 Stunden vor Sepsis-Induktion i.p.. Der entsprechenden Kontrollgruppe wird zum selben Zeitpunkt ein Kontroll-Antikörper (AP112, Millipore, Billerica, MA, USA) i.p. appliziert.

## 2.2.4 Sepsis-Severity-Score

Der „Sepsis-Severity-Score“ bewertet die Schwere der Sepsis anhand klinischer Symptome. Die zu bewertenden Kriterien umfassen das Verhalten, den Gewichtsverlust, Schmerz, Dyspnoe und Aszites. Die Punktevergabe gemäß des Score-Systems erfolgt in Korrelation zum Allgemeinzustand sowie dem Gewichtsverlust der Maus. Eine erreichte Punktzahl von 20 Punkten indiziert die Beendigung des Versuchs und die Dokumentation der Überlebenszeit der Tiere.

### 2.2.4.1 Verhalten

Das Kriterium Verhalten evaluiert die Verhaltensbeeinträchtigung des septischen Tiers im Vergleich zu einer gesunden C57 Bl6 Maus. Die genaue Beobachtung der Tiere im Käfig lässt eine objektive Beurteilung des Verhaltens der Versuchstiere zu.

Das nicht-septische Tier zeigt sich dem Beobachter sehr bewegungsaktiv durch ununterbrochenes Laufen, Putzen, Klettern, Fressen und Trinken. Die Bewegungen sind schnell, flüssig und zielgerichtet. Ein weiteres auffälliges Verhaltensmerkmal ist das Wühlen in der Einstreu und das Bauen von Nestern aus Zellulosepapier. Beim Fangen und wieder Zurücksetzen in den Käfig, zeigen die Mäuse einen ausgeprägten Fluchtreflex. Das Halten der Tiere ist nur an der Schwanzspitze möglich, wobei die Mäuse versuchen sich durch Beißen zu befreien.

Das oben beschriebene Verhalten entspricht dem Normalzustand und fließt mit null Punkten in den Sepsis-Severity-Score ein.

Die leichte Beeinträchtigung des Verhaltens wird im Score-System mit fünf Punkten bewertet. Eine abgeschwächte Bewegungsaktivität zeigt sich durch langsames Laufen und weniger häufiges Klettern. Die Bewegungsabläufe sind jedoch noch flüssig und zielgerichtet. In diesem Zustand sind Putzen, Fressen und Trinken für den Beobachter nicht verändert. Ein weiteres Kennzeichen der nur

leichten Beeinträchtigung ist das Graben in der Einstreu. Das erleichterte Fangen der Maus weist auf eine Einschränkung des Fluchtreflexes hin.

Zehn Punkte werden für die moderate Verhaltensbeeinträchtigung vergeben. Das Versuchstier fällt durch eine deutlich abgeschwächte Bewegungsaktivität auf. Die Gangart der Maus ist ataktisch, statt flüssigen Laufbewegungen zeigt sich ein unsicherer, stelzenartiger Gang mit aufgebäumten bzw. gekrümmten Rücken. Klettern, Putzen, Fressen und Trinken werden kaum noch beobachtet. Nestbautendenzen sind in diesem Zustand nicht mehr vorhanden. Der Fluchtreflex beschränkt sich nur mehr auf das Ausweichen in die gegenüberliegende Käfigecke, die Diagonale wird nicht mehr durchquert. Der Bewegungsantrieb ist stark vermindert, jedoch bewegt sich Maus noch von selbst durch den Käfig. Zusätzlich zeigt sich eine vermehrte Geräuschempfindlichkeit.

Liegt eine schwere Verhaltensbeeinträchtigung bzw. eine Bewertung mit 15 Punkten vor, bewegt sich die Maus nur noch auf Antippen durch den Käfig. Ihr Gang ist ähnlich dem der moderaten Beeinträchtigung, jedoch ausgeprägter und deutlich langsamer. Die Bewegungen wirken vorsichtig und die Geräuschempfindlichkeit zeigt sich deutlich stärker. Kennzeichnend sind auch das vollkommene Einstellen von Klettern, Putzen, Fressen und Trinken.

20 Punkte beschreiben einen komatösen Zustand der Maus ohne jeglichen Bewegungsantrieb. Der Versuch wird umgehend beendet.

#### 2.2.4.2 Gewichtverlust

Die Bestimmung des Ausgangsgewichts in der Einheit Gramm erfolgt zum Zeitpunkt 0h. Der Gewichtsverlust bei jeder weiteren Messung errechnet sich aus der Differenz zwischen ursprünglichem und aktuellem Körpergewicht.

Eine Gewichtsabnahme von null bis fünf Prozent des Ausgangsgewichts wird mit null Punkten bewertet. Fünf bis zehn Prozent Gewichtsverlust fließen mit fünf Punkten, zehn bis 15 Prozent mit zehn Punkten in den Sepsis-Severity-Score ein. Über 15% Gewichtsverlust entsprechen im Score 20 Punkten und haben die Beendigung des Versuchs zur Folge.

#### 2.2.4.3 Schmerz

Als weiteres Kriterium für die Schwere der Sepsis fließt die Beurteilung des Schmerzes in den Score ein. Da die Bewertung des Schmerzes eng mit der des Verhaltens in Beziehung steht, beschränkt sich die Vergabe von Schmerzpunkten auf die hier explizit genannten Auffälligkeiten.

Zittern und Schüttelfrost, gekrümmte Haltung und Aufstellen des Fells entsprechen den gewerteten Charakteristika der Schmerzsymptomatik. Je nach Vorhandensein und Ausprägung werden null bis 20 Punkte für dieses Kriterium vergeben.

#### 2.2.4.4 Aszites

Aszites beschreibt eine „seröse Flüssigkeitsansammlung in der freien Peritonealhöhle“ (26). Eine deutliche Bauchumfangszunahme der Maus innerhalb kurzer Zeit entspricht je nach Ausprägung null (= kein Aszites) bis 20 Punkten (= starker Aszites) im Score-System.

#### 2.2.4.5 Dyspnoe

Die Dyspnoe beschreibt den Zustand der Atemnot. Dieses Kriterium ist wieder eng mit dem Verhalten verbunden, sodass sich die Punktevergabe hier auf offensichtliche respiratorische Probleme beschränkt. Diese äußern sich für den Beobachter in starken Thoraxexkursionen beim Atmen sowie angestregtes Atmen mit lauten Atemgeräuschen.

#### 2.2.4.6 Zusammenfassung

Diese fünf Kriterien werden einzeln zu den definierten Zeitpunkten erhoben und addiert. Die Summe entspricht dem Sepsis-Severity-Score, welcher Auskunft über die Schwere einer Sepsis gibt. Ein Score Wert von 20 und mehr Punkten verlangt die Beendigung des Versuchs für dieses Tier, auch aus tierschutzrechtlichen Gründen.

**Tabelle 1** Sepsis-Severity-Score mit den fünf zu bewertenden Kriterien

<b>Punkte</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
<b>Verhalten / Beeinträchtigung</b>	normal	leicht	<b>10</b> moderat <b>15</b> schwer	komatös
<b>Gewichtsverlust</b>	0 – 5%	5 – 10%	10 – 15%	> 15%
<b>Schmerz</b>	kein	gering	mittel	stark
<b>Aszites</b>	kein	gering	mittel	stark
<b>Dyspnoe</b>	kein	gering	mittel	stark

#### 2.2.5 Nicht-invasive Blutdruckmessungen

Die Messung des arteriellen Mitteldrucks der septischen Tiere zu definierten Zeitpunkten erlaubt die objektive Beurteilung der hämodynamischen Situation des Organismus.

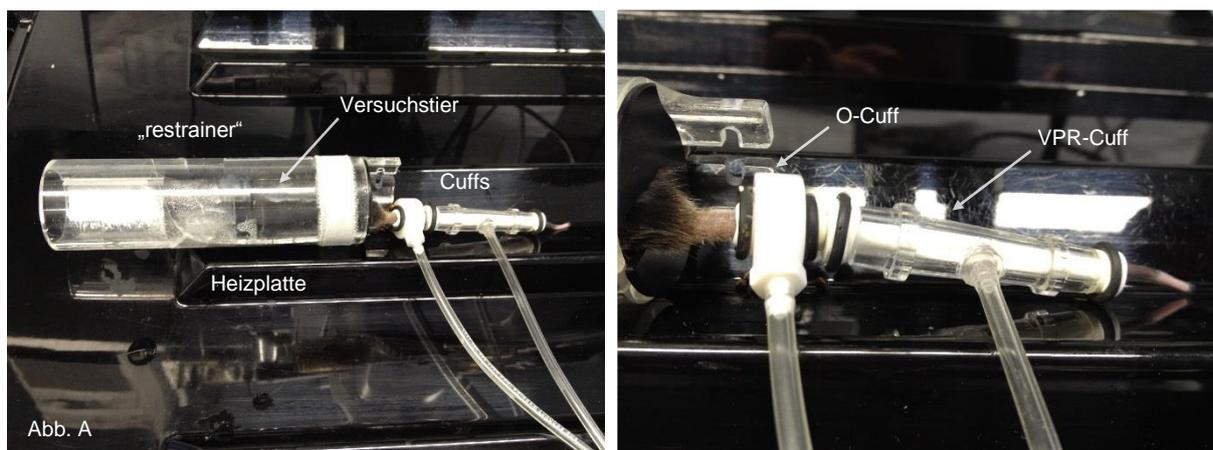
Die nicht-invasiven Blutdruckmessungen finden zu den Zeitpunkten zwölf Stunden, 24 Stunden und 36 Stunden statt. Das verwendete Messsystem „Coda2“ (Coda Serial.Nr. 20295, Kent Scientific

Corporation, Torington, USA) misst mittels „Volume-Pressure Recording“ den systolischen, diastolischen sowie arteriellen Mitteldruck am Schwanz des Versuchstieres.

### 2.2.5.1 Präparation des Versuchstieres

Die Maus begibt sich ohne Anästhesie in einen „restrainer“ (Kent Scientific Corporation, USA), eine Röhre mit integrierter Öffnung für den Austritt des Schwanzes. Die Anwärmung des „restrainers“ mit Hilfe einer Heizplatte für mindestens fünf Minuten ist für das Erreichen einer Versuchstemperatur der Maus von 32 bis 35 °C erforderlich. Diese Zeitspanne dient der Maus ebenfalls sich an die neue Umgebung zu gewöhnen. Um eine Verfälschung der Blutdruckmessung zu vermeiden, empfiehlt sich die Röhre ab diesem Zeitpunkt nicht mehr unnötig zu berühren.

Die Abbildung unten zeigt den Schwanz der Maus in den Cuffs des Messsystems: der O (Occlusion)-Cuff, zur Unterbrechung des Blutflusses, befindet sich soweit proximal wie möglich und distal davon der VPR (Volume-Pressure Recording)-Cuff, zur Detektion des gesamten Blutvolumens im Schwanz des Tieres (131).



**Abb. 11 A:** Übersicht des Versuchsaufbaus: der „restrainer“ mit den beiden Cuffs auf dem Schwanz des Versuchstiers positioniert **B:** Detailansicht der Cuff-Positionen: proximal am Schwanzansatz der O-Cuff, distal der VPR-Cuff

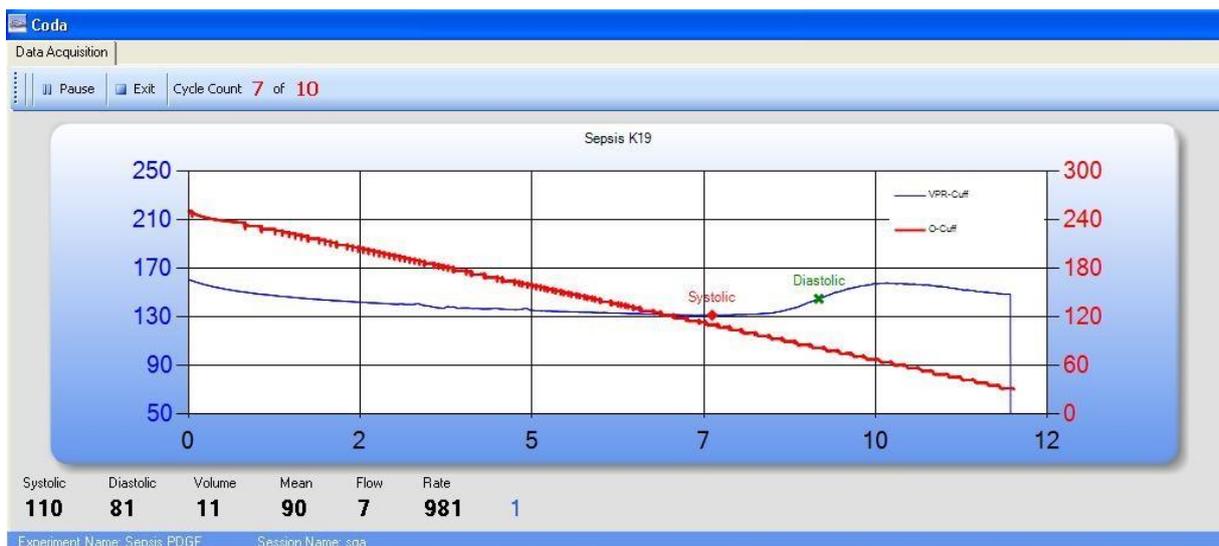
### 2.2.5.2 Durchführung der Messung

In ruhiger Umgebung, möglichst ohne Störfaktoren, bei einer Raumtemperatur um 20°C und nach Prüfung der richtigen Funktionsweise der Cuffs wird die Messung gestartet.

Zunächst bläst sich der VPR-Cuff auf, um das vorhandene Blut aus dem Schwanz zu verdrängen, das anschließende Aufpumpen des O-Cuffs verhindert den Rückstrom des Blutes in den Schwanz. Der O-Cuff entlässt langsam die Luft. Der systolische Blutdruck entspricht dem Druck, bei dem sich der Schwanz wieder beginnt mit Blut zu füllen, sich also das Blutvolumen im Schwanz wieder erhöht. Bei weiterer Druckminderung auf die Schwanzgefäße stellt sich ein Gleichgewicht zwischen

einströmendem und ausströmendem Blut ein. An diesem Punkt entspricht der O-Cuff Druck dem diastolischen Blutdruck. Aus diesen Werten errechnet sich der mittlere arterielle Blutdruck (132).

Pro Versuchstier erfolgen mindestens zehn, maximal 30 Messungen. Bei zehn verwertbaren Blutdruckmessungen wird die Messung beendet und die Maus zurück in den Käfig gesetzt. Bei 30 Messungen ohne brauchbares Ergebnis ergibt sich der gerade nicht mehr messbare arterielle Mitteldruck von 40 mmHg. Oft lässt die schlechte hämodynamische Situation und Zentralisation des Kreislaufs des septischen Tieres keine Messungen mehr zu.



**Abb. 12** Screenshot einer Blutdruckmessung mit dem „Tail-Cuff-System“

## 2.3 Messung der Gefäßpermeabilität

Die Darstellung und Quantifizierung der erhöhten Kapillarpermeabilität zum Zeitpunkt sechs Stunden nach Sepsis-Induktion erfolgt mittels Multi-Photonenmikroskopie und Second Harmonics Generation (SHG). Der genaue Versuchsablauf wird in den folgenden Abschnitten genauer erläutert.

### 2.3.1 Versuchsvorbereitung

Die Tiere werden mit der Dreifachkombination MMF (vgl. 2.2.3.2) analgosediert. Ca. 10 Minuten nach intraperitonealer Applikation des MMF tritt die Wirkung der Narkose ein.

Der Versuch erfordert einen i.v. Zugang über einen Schwanzvenenkatheter. Dieser besteht aus einem dünnen Plastikschlauch (Durchmesser 0,28 mm, Länge ca. 15 cm), mit einer Einmal-Injektions-Kanüle 30G (Braun, Meisungen, Deutschland) am einen Ende und aus der Nadel einer 30G Kanüle (ohne Plastikadapter) am anderen Ende. Nach der Spülung des Katheters mit NaCl, erfolgt die Punktion der Schwanzvene und dessen anschließende Fixierung mittels kleinem Pflasterstreifen.

Bei sicherer i.v. Lage des Katheters, wird die Maus in Seitenlage positioniert und das freie Ohr vorsichtig mit einem Wattestäbchen auf Silikongel ausgestrichen. Das Ohr sollte eine möglichst ebene Fläche senkrecht zur optischen Achse bilden. Vor Positionierung des Versuchstieres unter dem Mikroskop wird ein Tropfen Wasser auf das Ohr der Maus gegeben.

Als nächstes beginnt die Suche nach einer geeigneten Stelle für die Permeabilitätsmessungen, im Optimalfall stellt sich ein klar erkennbares Gefäß, möglichst zentriert im Gesichtsfeld dar. Die genaue Einstellung des Gefäßes erfolgt mittels SHG.

### 2.3.2 Versuchsdurchführung

Mit Starten des Versuchs erfolgt alle 15 Sekunden die Aufnahme eines 3D-Films über insgesamt fünf Minuten mit einem 200x200x36 µm stack (10 Ebenen mit jeweils 534 Pixel-Quadraten). Nach den ersten 15 Sekunden-Durchlauf wird 750 µg TRITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 4 kD (T1037, Sigma-Aldrich, Munich, Germany) gelöst in 150 µl PBS, als Bolus über den Schwanzvenenkatheter gegeben. Die Anflutung von TRITC-Dextran im Gefäß und progrediente Extravasation ist durch die Multi-Photonen-Mikroskopie detektierbar, diese erfolgt mit TriMScope (LaVision BioTec, Bielefeld, Germany) in einem Einzelpunkt Scanmodus. Mit einer Wellenlänge von 860 nm gelingt es simultan die TRITC Fluoreszenz (aufgenommen mit einem 580/60 nm Filter) und die SHG von Kollagen (447/60 Filter) anzuregen (133).

Die Analgosedierung ist nach Beendigung des Versuchs mittels einer Dreifachkombination aus Atipamezol (Antisedan®, 2,5 mg/kg KG), Flumazenil (Anexate®, 0,5 mg/kg KG) und Naloxon (Naloselect®, 1,2 mg/kg KG) antagonisierbar.

Für die Auswertung des Versuchs wird das Bildverarbeitungsprogramm ImageJ (W.S. Rasband, U. S. National Institutes of Health, Md, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012) verwendet.

## 2.4 Histologie

Die Entnahme von Herz und Skelettmuskel (Musculus quadriceps femoris) zwölf Stunden nach Sepsis-Induktion dient der histologischen Aufarbeitung der Organe. Hierzu lagern die Proben bei -80°C eingebettet in Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande), um im Verlauf mit Hilfe des Kryotoms 5 µm dicke Axialschnitte anzufertigen.

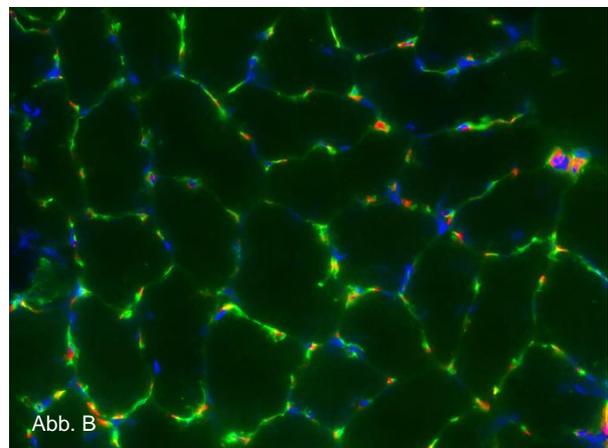
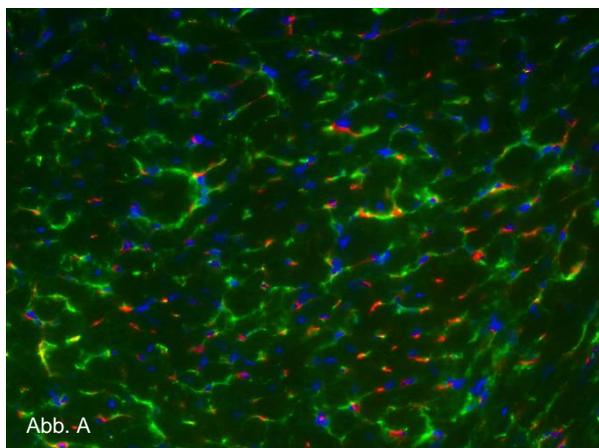
### 2.4.1 Immunhistochemie

Die anschließende fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Endothelzellen und Perizyten gelingt durch die entsprechende immunhistochemische Färbung der Gefrierschnitte. Dies ermöglicht die anschließende Quantifizierung der verschiedenen Zellpopulationen. Das Prinzip einer immunhistochemischen Färbung besteht in der selektiven Bindung eines primären Antikörpers an eine möglichst zellartspezifische Struktur. Der sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper bindet spezifisch

an den primären Antikörper. Die Detektion der fluoreszierenden Struktur erfolgt mittels Fluoreszenzmikroskopie.

#### 2.4.1.1 PECAM-1/NG2

Das Färbeprotokoll beginnt mit der Fixierung der 5 µm dünnen Proben von Herz und Skelettmuskel auf den Objektträgern mittels Aceton (bei 4°C, über 15 Minuten). Danach inkubieren die Proben für ca. 30 Minuten in einer „Blocking Solution“ (2% Bernsteinsäureanhydrid (BSA), 0,2% Triton® X-100 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) in phosphate buffered saline (PBS)). Der in einer Verdünnung (mit Antibody Diluent, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) von 1:200 auf die Proben pipettierte, primäre Antikörper (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland) bindet spezifisch an das Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1(CD-31)), ein für Endothelzellen spezifisches, transmembranes Adhäsionsmolekül (134). Die anschließende Inkubationszeit beträgt mindestens acht Stunden bei 4°C. Zur Entfernung noch nicht gebundener Antikörper erfolgt nun dreimaliges Waschen in PBS über fünf Minuten. Der im nächsten Schritt auf die Proben pipettierte sekundäre, fluoreszenzmarkierte Antikörper (1:200) (Cy3-AffiniPure Donkey Anti-Rat IgG, 712-165-153JR, Stratech Scientific Ltd, Newmarket, UK) wirkt für ca. zwei Stunden bei Raumtemperatur ein. Dieser stellt sich später durch das Fluoreszenzmikroskop rot dar. Danach erfolgen erneut drei Waschungen mit PBS. Der zweite primäre Antikörper (1:200) (Millipore, Schwalbach, Deutschland) markiert spezifisch das von Perizyten exprimierte Proteoglykan NG-2 (135) und benötigt dafür eine Inkubationszeit von mindestens acht Stunden (bei 4°C). Nach dem Waschen mit PBS, wird der sekundäre, grün fluoreszierende Antikörper (1:200) (Alexa Fluor® 488 Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), A-11008, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) für ca. zwei Stunden (bei Raumtemperatur) auf die Proben gegeben. Das anschließende Waschen mit PBS entfernt die restlichen Antikörperüberstände. Zuletzt wird VECTASHIELD® (Mounting Medium with DAPI, Dako, Hamburg, Deutschland) auf die Proben gegeben und diese mit einem Deckglas geschützt. Nach der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Proben, erfolgt die Sicherung und weitere Auswertung der Bilder.

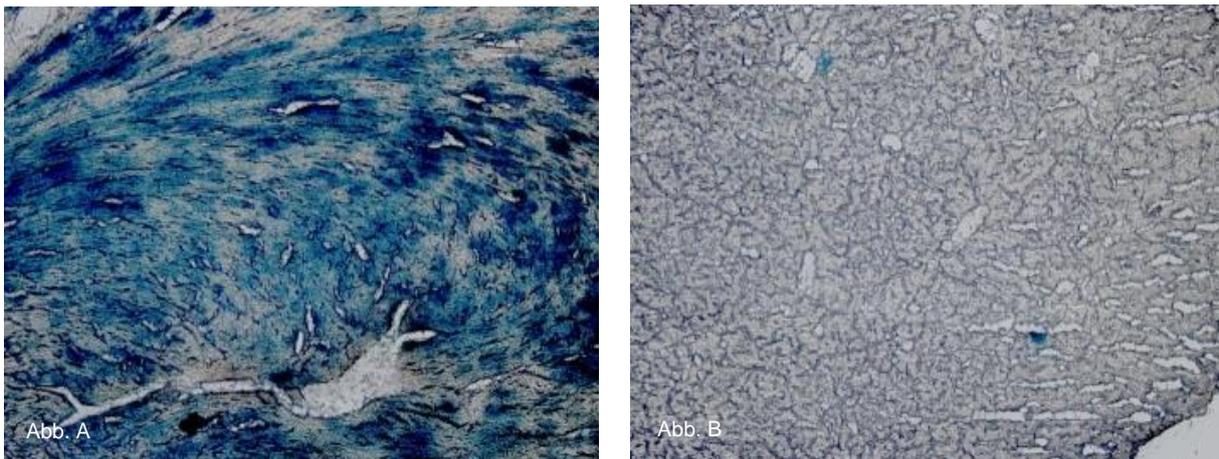


**Abb. 13 Beispiel** PECAM-1 (rot), NG-2 (grün), DAPI (blau) **A** Herzmuskel **B** Skelettmuskel

## 2.4.2 X-Gal-Färbung

Zum Nachweis der Überexpression des rAAV 2.9 vor allem in Skelett- und Herzmuskel werden die Kontrolltiere, wie oben beschrieben, mittels eines rAAV 2.9 LacZ (Konz.  $1 \cdot 10^{12}/\mu\text{l}$ ) transfiziert. LacZ, Bestandteil des lac Operon (E.coli), codiert für  $\beta$ -Galactosidase. Dieses Enzym hydrolysiert unter anderem X-Gal, dabei entsteht ein intensiv blaues Reaktionsprodukt (136).

Die Fixierung der Schnitte erfolgt mittels Glutaraldehyd 0,5% ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) in PBS+. In der 15 minütigen Inkubationszeit kann die X-Gal-(5-bromo-4-chloro-3-indoyl-b-D-galactopyranoside)-Färbelösung vorbereitet werden. Diese besteht aus drei Bestandteilen: PBS+ (20 ml), 20x KC (1 ml) und 40x F-Gal (0,5 ml). Das KC setzt sich aus 0,82 g Kalium-Ferrizyanid ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{Cn})_6$ ) und 1,05g Kalium-Ferrocyanid ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{Cn})_6$ ) gelöst in 25ml PBS, zusammen und sollte lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die fertige, filtersterilisierte X-Gal-Färbelösung wird großzügig auf die Proben pipettiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Blaufärbung der Proben lässt sich (wie auf den Beispielbildern, siehe unten) durch das Lichtmikroskop (BX 51 Mikroskop Olympus, Hamburg, Deutschland) darstellen, mit entsprechender Software digitalisieren und sichern.



**Abb. 14** Darstellung der Proben mit Lichtmikroskopie **A** Herzmuskel nach  $\beta$ -Galactosidase-Reaktion mit sichtbarem, blauem Reaktionsprodukt, als Nachweis einer erfolgreichen Transfektion **B** Leber ohne Blaufärbung

## 2.5 Molekularbiologische Analysen

### 2.5.1 IL-6 ELISA

Interleukin-6 (IL-6) ist ein wichtiger Mediator der Entzündungsreaktion (20) und liegt in der Sepsis IL-6 in erhöhten Konzentrationen im Serum vor (137). Um die Sepsis der Versuchstiere zu verifizieren, erfolgt eine IL-6-Konzentrationsbestimmung mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) im asservierten Serum. Hierfür wird das ELISA Kit Mouse IL-6 Quantikine® (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) verwendet und gemäß den Herstellerinstruktionen durchgeführt.

## 2.6 Statistik

Die vorliegenden Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (standard error of the mean, SEM) dargestellt. Die statistischen Berechnungen wurden mittels ungepaarten T-Tests und ANOVA-Analysen durchgeführt. Statistische Signifikanz wird durch einen p-Wert  $<0,05$  angezeigt. Als Grenzwert für hohe Signifikanz wurde ein p-Wert von  $<0,005$  gewählt.

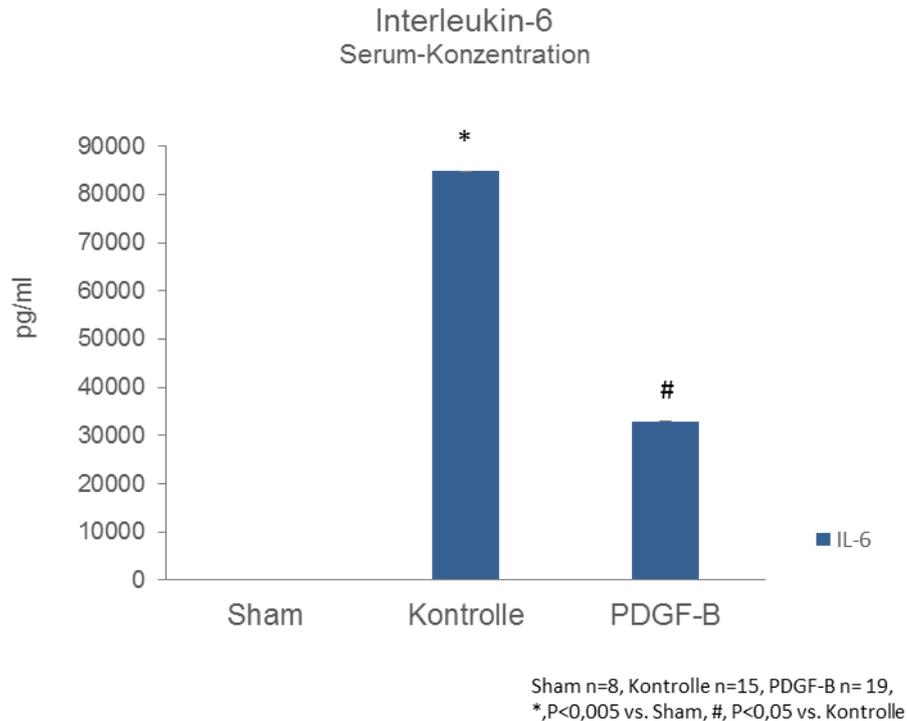
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Der protektive Effekt von PDGF-B Überexpression in der LPS-induzierten Endotoxämie

Dieser erste Versuch der Arbeit untersucht den protektiven Effekt von PDGF-B in der LPS induzierten Endotoxämie. In den Versuchstieren wird durch die gewichtsadaptierte, intraperitoneale Injektion von LPS eine kontrollierte Endotoxämie erzeugt. In der systemischen Inflammation wurden Tiere untersucht, die via adenoassoziiertem Virus PDGF-B überexprimieren sowie die entsprechende Kontrollgruppe. (siehe 2.2.3).

#### 3.1.1 Verifizierung der Endotoxämie durch Il-6-Spiegel-Messung

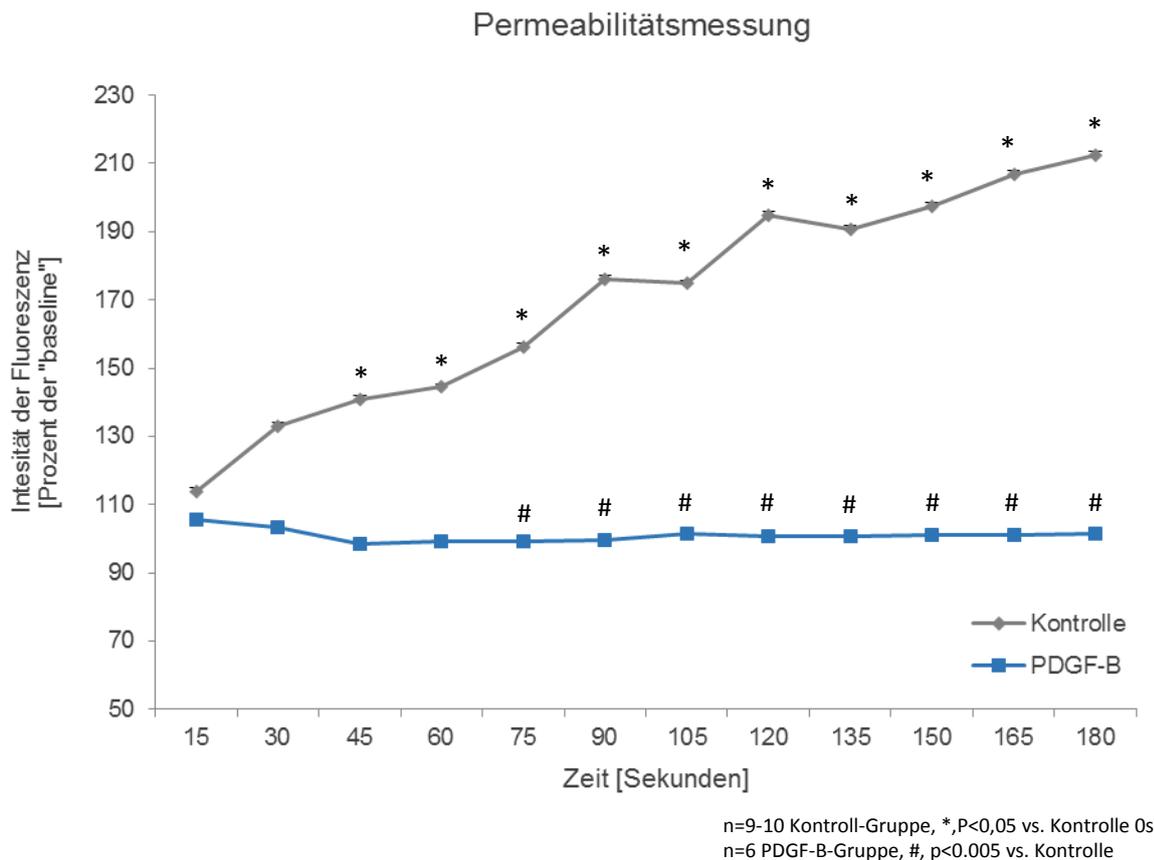
Die Messung des laborchemischen Entzündungsparameters Interleukin-6 im Serum dient zunächst dem Nachweis der systemischen Entzündungsreaktion nach intraperitonealer LPS-Injektion. Im folgenden Diagramm sind die Interleukin-6 Serumwerte von Wildtyp-Mäusen ohne inflammatorischen Stimulus, einer rAAV.LacZ transfizierten Kontrollgruppe und einer Gruppe via rAAV.PDGF-B überexprimierenden Tiere dargestellt. In der Kontroll- und PDGF-B Gruppe wurde Il-6 im Serum bei intraperitonealer LPS-Injektion und nach Erreichen von 20 Punkten im Sepsis-Severity-Score quantifiziert. Im Vergleich zur Shamgruppe zeigt die Kontrollgruppe und die Gruppe der PDGF-B überexprimierenden Tiere mit Endotoxämie deutlich erhöhte Il-6 Serumwerte (**Abb. 15** Sham:  $35,3 \pm 17,7$  pg/ml, Kontrolle:  $84819,7 \pm 20069,0$  pg/ml, PDGF-B:  $32984,0 \pm 10360,2$  pg/ml)).



**Abb. 15** Die Graphik zeigt die Interleukin-6-Serumkonzentration im Wild-Typ (Sham) sowie in der Endotoxämie. Die Kontrolltiere zeigen einen signifikanten Unterschied zur Sham-Gruppe (Sham: 35,3±17,7 pg/ml, Kontrolle: 84819,7±20069,0 pg/ml). Das im Serum gemessene Interleukin-6 war in den PDGF-B überexprimierenden Tieren signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe (Kontrolle: 84819,7±20069,0 pg/ml, PDGF-B: 32984,0±10360,2 pg/ml). Die PDGF-B Gruppe zeigt im Vergleich zum Wild-Typ ohne inflammatorischen Stimulus tendenziell höhere Interleukin-6 Werte, jedoch in diesem Zusammenhang keine Signifikanz (Sham: 35,3±17,7 pg/ml, PDGF-B: 32984,0±10360,2 pg/ml).

### 3.1.2 Permeabilitätsminderung der Gefäße bei PDGF-B Überexpression

Die quantitative Analyse der Gefäßpermeabilität in der Mikrozirkulation bei systemischer Inflammation erfolgt über die Messung des Fluoreszenzanstiegs im Interstitium alle 15 Sekunden nach intravenöser TRITC-Dextran-Injektion mittels 2-Photonen-Mikroskopie (siehe 2.3). In der Kontrollgruppe zeigt sich ein deutlicher Fluoreszenzanstieg im Interstitium. Die Fluoreszenz ist nach 180 Sekunden (s) über das Doppelte des Ausgangswertes angestiegen. (**Abb. 16** Kontrolle: 0 s: 100±0 % der Baseline; 180 s: 213±10% der Baseline). Die via adenoassoziiertem Virus PDGF-B überexprimierenden Tiere zeigten, gemessen über die Zeit, keinen interstitiellen Fluoreszenzanstieg (**Abb. 16** PDGF: 0 s: 100±0 % der Baseline; 180 s: 102±7 % der Baseline) und somit keine Extravasation des TRITC-Dextran. Im Vergleich von Kontrollgruppe und PDGF-B-Gruppe, ist ab dem Zeitpunkt 75 Sekunden in den Kontrolltieren ein hochsignifikanter Fluoreszenzanstieg zu messen (**Abb. 16**).



**Abb. 16** Die Gefäßpermeabilität der Kontrolltiere zeigt einen progredienten Anstieg gemessen über die Zeit. Im Vergleich dazu ist bei den PDGF-B überexprimierenden Tieren über die Zeit kein Anstieg der Extravasation von TRITC-Dextran detektierbar.

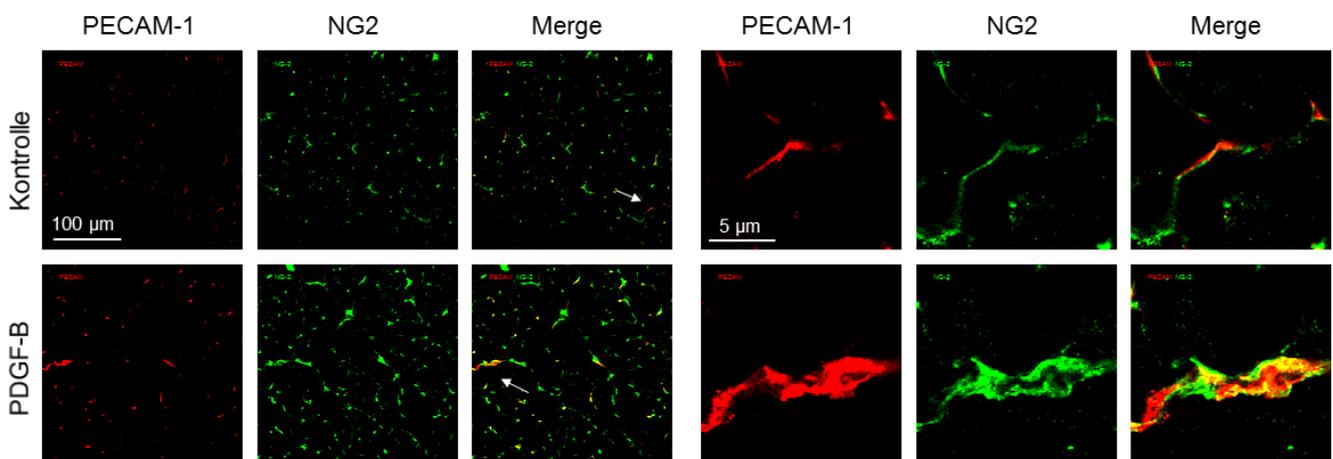
Dieser Versuch beantwortet die Frage nach der Wirkung, von PDGF-B in der Endotoxämie. Da PDGF-B eine starke chemotaktische Wirkung auf Perizyten hat, wurde nachfolgend untersucht, ob die Perizytenzahl unter PDGF-B Einfluss bei geminderter Gefäßpermeabilität erhöht ist.

### 3.1.3 Erhöhte Perizytenzahlen bei PDGF-B-Überexpression

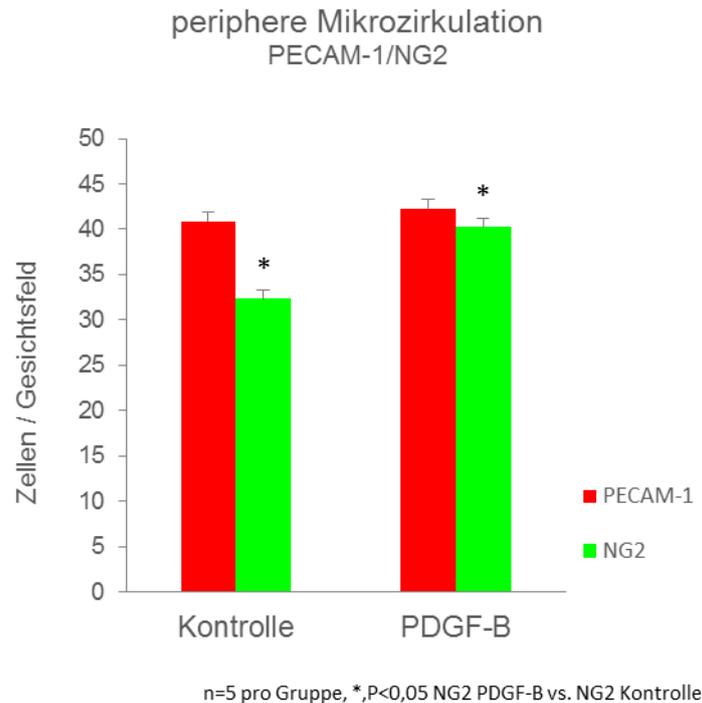
Die nachgewiesene Inhibition der Gefäßleckage in der Inflammation bei PDGF-B Überexpression wurde nun auf das entsprechende morphologische Korrelat untersucht. Durch die immunhistochemische Färbung von PECAM-1 (Endothelzellen) und NG2 (Perizyten) erfolgt die Quantifizierung von Endothelzellen und Perizyten in der Mikrozirkulation. Die Analyse ergab insgesamt erhöhte Perizytenzahlen unter spezifischer PDGF-B Überexpression, zwölf Stunden nach inflammatorischem Stimulus durch intraperitoneale LPS-Injektion.

### 3.1.3.1 Quantitative Perizyten-Endothelzell-Analyse in der peripheren Mikrozirkulation

Die Analyse der Zellzahlen zeigt eine höhere Perizytenzahl in der peripheren Mikrozirkulation in PDGF-B überexprimierenden Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe in der systemischen Inflammation (**Abb. 18** Kontrolle:  $32,4 \pm 1,6$  Zellen/Gesichtsfeld; PDGF-B:  $40,3 \pm 2,3$  Zellen/Gesichtsfeld). Bei den Endothelzellen hingegen ist unter PDGF-B Einfluss kein Unterschied zur Kontrolle messbar. (**Abb. 18** Kontrolle:  $41,0 \pm 2,0$  Zellen/Gesichtsfeld; PDGF-B:  $42,3 \pm 2,9$  Zellen/Gesichtsfeld). In den folgenden immunhistochemischen Färbungen stellt sich die höhere Perizyten-dichte (NG2) in der Mikrozirkulation von PDGF-B überexprimierenden Tieren deutlich im Vergleich zur Gruppe der Kontrolltiere dar (siehe **Abb. 17**). Die Dichte der Endothelzellen ist visuell als gleichbleibend zu werten.



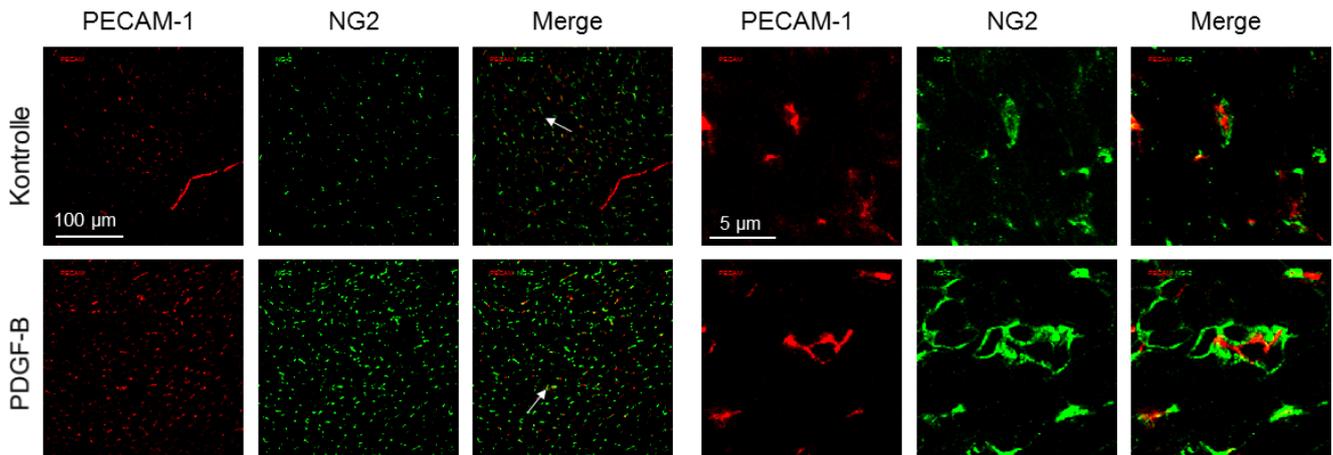
**Abb. 17** Höhere Perizyten-dichte (NG2) in PDGF-B Überexpression in der peripheren Mikrozirkulation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Endothelzell-dichte (PECAM-1) stellt sich in beiden Gruppen gleich dar.



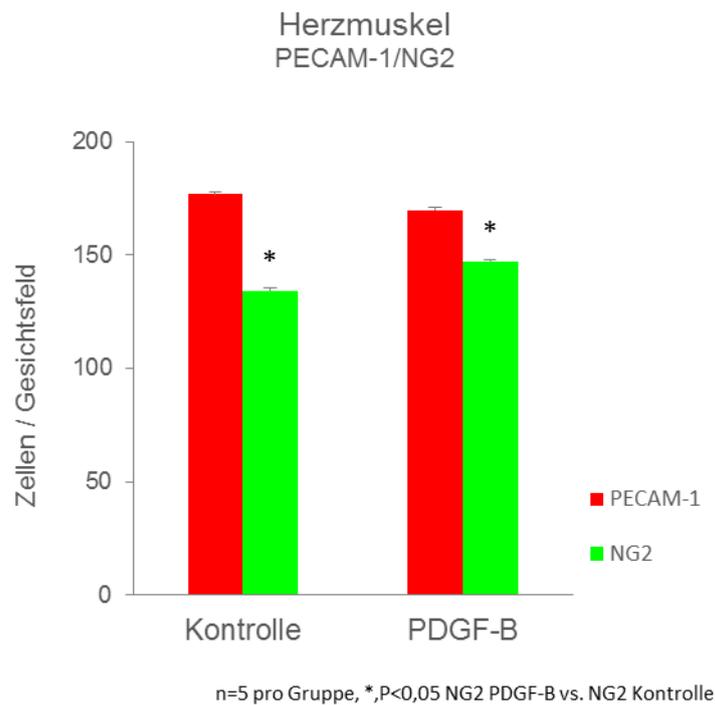
**Abb. 18** Die Quantifizierung der Perizyten und Endothelzellen in der peripheren Mikrozirkulation, zeigt signifikant höhere Perizytenzahlen in der PDGF-B Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hingegen ist der Unterschied der Endothelzellzahlen in den beiden Gruppen vernachlässigbar.

### 3.1.3.2 Quantitative Perizyten-Endothelzell-Analyse im Herzmuskel

Im Herzmuskel wurde gezeigt, dass die Perizytenzahlen in den PDGF-B überexprimierenden Versuchstieren höher sind als in der entsprechenden Kontrollgruppe (**Abb. 20** Kontrolle:  $134,2 \pm 3,4$  Zellen/Gesichtsfeld; PDGF-B:  $147,1 \pm 3,1$  Zellen/Gesichtsfeld). Die Zahl der Endothelzellen zeigt in der zentralen Mikrozirkulation auch keinen Unterschied zwischen der PDGF-B- und Kontrollgruppe (**Abb. 20** Kontrolle:  $176,8 \pm 6,3$  Zellen/Gesichtsfeld; PDGF-B:  $169,8 \pm 4,2$  Zellen/Gesichtsfeld). Deutlich kann der Unterschied der Perizyten-dichte an den Gefäßen des Herzmuskels von PDGF-B überexprimierenden und Kontrolltieren mittels Immunhistochemie (siehe **Abb. 19**) visualisiert werden.



**Abb. 19** In der immunhistochemischen Färbung zeigt sich in den PDGF-B überexprimierenden Tieren eine höhere Perizytdichte (NG2) als in den Kontrolltieren. Die Endothelzelldichte (PECAM-1) stellt sich in beiden Gruppe gleich dar.



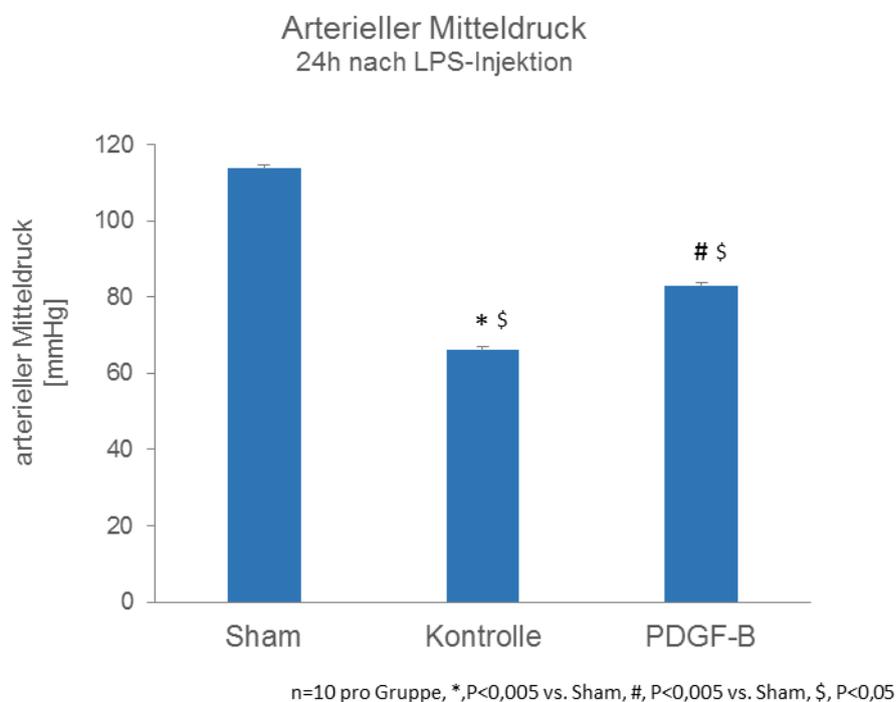
**Abb. 20** Im Herzmuskelgewebe ist ebenfalls die Perizytenzahl bei rAAV.PDGF-B Vorbehandlung der Tiere signifikant größer als in der Kontrollgruppe. In der Endothelzellquantifizierung zeigt PDGF-B Überexpression keinen Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend zeigt die immunhistochemische Analyse, dass das morphologische Korrelat der geminderten Gefäßleckage eine erhöhte Perizytenzahl in der peripheren wie zentralen

Mikrozirkulation darstellt. Dies stützt die These, dass durch die Perizytenrekretierung, das charakteristische „Capillary-Leak“ in der Inflammation verhindert werden kann.

### 3.1.4 Minderung der Hypotension durch PDGF-B-Überexpression

Ein wichtiges klinisches Symptom der erhöhten Gefäßpermeabilität ist die Hypotension. Der Einfluss der PDGF-B Überexpression wurden mittels nicht-invasiven Blutdruckmessungen 24 Stunden nach LPS-Injektion untersucht (siehe 2.2.5). Der arterielle Mitteldruck (MAP) einer gesunden Wild-Typ C57/Bl6 Maus liegt bei  $113,68 \pm 2,70$  mmHg. 24 Stunden nach LPS-Injektion zeigen die Kontrolltiere sowie die PDGF-B überexpressierenden Tiere, mit MAP von  $66,07 \pm 4,46$  mmHg und  $82,85 \pm 3,17$  mmHg eine deutliche Hypotension im Vergleich zur Sham-Gruppe (siehe **Abb. 21**). Bei Betrachtung der MAP-Werte in der Endotoxämie wird der oben beschriebene protektive Effekt von PDGF-B deutlich. Der gemessene MAP bei PDGF-B Überexpression ist im Durchschnitt um über 15mmHg höher als in den rAAV.LacZ transfizierten Tieren (**Abb. 21** Kontrolle:  $66,07 \pm 4,46$  mmHg, PDGF-B:  $82,85 \pm 3,17$  mmHg).

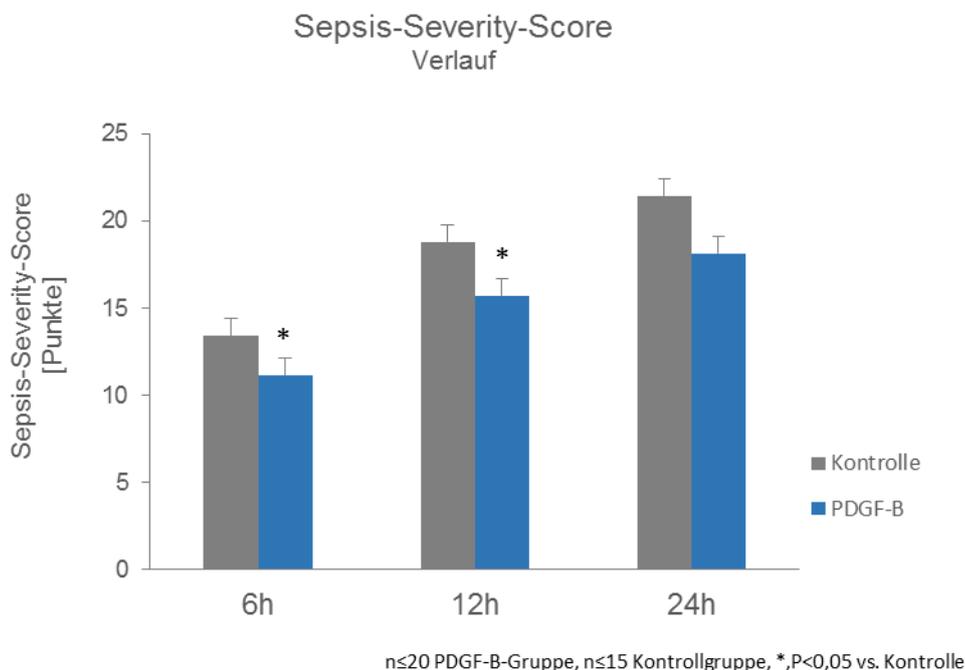


**Abb. 21** Die Sham-Gruppe zeigt den arteriellen Mitteldruck einer gesunden C57/Bl6 Maus. Die Hypotension 24h Stunden nach LPS-Injektion ist in der Kontrollgruppe am deutlichsten ausgeprägt. Bei den via rAAV PDGF-B überexpressierenden Tieren lassen sich hoch signifikant bessere arterielle Mitteldrücke messen. Diese sind im Vergleich zur Sham-Gruppe jedoch immer noch deutlich hypoton.

Das klinische Symptom der Hypotension zeigt sich unter PDGF-B Einfluss vermindert. Dies stützt die vorangegangene Untersuchung der verminderten Gefäßpermeabilität sowie der vermehrten Perizytenrekrutierung in der PDGF-B Überexpression. Eine weiterführende Frage ist nun inwiefern sich die verbesserte hämodynamische Situation auf die schwere der systemischen Inflammation sowie auf den Allgemeinzustand der Tiere auswirkt.

### 3.1.5 Sepsis-Severity-Score bei PDGF-B Überexpression

Um die Schwere der Sepsis anhand klinischer Symptome zu messen, wurde der Sepsis-Severity-Score eingeführt. Dieser gibt unter Berücksichtigung von Verhaltensbeeinträchtigung, Gewichtsverlust, Schmerzen, Dyspnoe und Aszites, ein umfassendes Bild des Allgemeinzustands des Versuchstieres (siehe auch 2.2.4). Nach der gezeigten verminderten Gefäßpermeabilität und Hypotension wird nun der Effekt von PDGF-B auf die Sepsis-Schwere sechs, zwölf und 24 Stunden nach LPS-Injektion evaluiert. Dabei zeigt sich der Gesamtscore bei PDGF-B Überexpression stets niedriger als in der Kontrollgruppe (**Abb. 22** 6h: Kontrolle:  $13,40 \pm 0,74$  Punkte, PDGF-B:  $11,15 \pm 0,60$  Punkte; 12h: Kontrolle:  $18,79 \pm 0,71$  Punkte, PDGF-B:  $15,70 \pm 0,89$  Punkte; 24h: Kontrolle:  $21,40 \pm 0,88$  Punkte, PDGF-B:  $18,13 \pm 0,89$  Punkte).

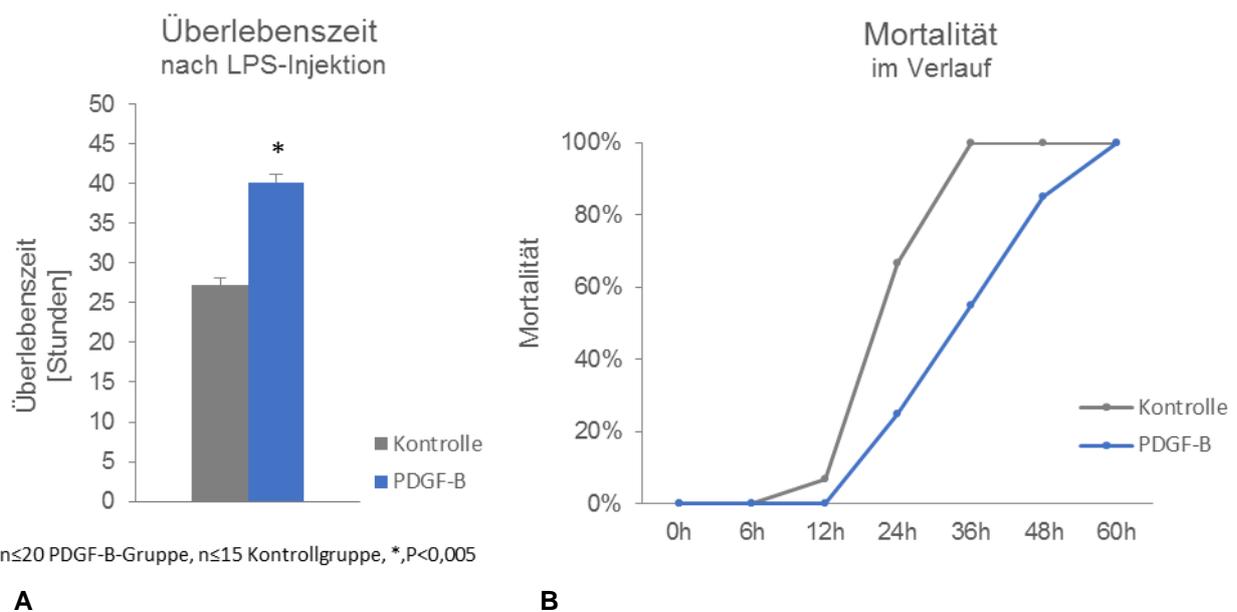


**Abb. 22** Im Verlauf weist die PDGF-B überexprimierende Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe stets niedrigere Werte im Sepsis-Severity-Score auf. Zu den Zeitpunkten sechs und zwölf Stunden ist dieser Unterschied signifikant.

Diese Ergebnisse bestätigen den protektiven Effekt von PDGF-B in der systemischen Inflammation auf die Gesamtsymptomatik und Sepsisschwere. Als letzter Schritt wurden die Auswirkungen auf die Überlebenszeit und die Mortalität untersucht.

### 3.1.6 Verbesserung der Überlebenszeit und Mortalität bei PDGF-B-Überexpression

Die Zeit von der intraperitonealen LPS-Injektion bis zum Erreichen von 20 Punkten im Sepsis-Severity-Score kennzeichnet die Überlebenszeit. Die Untersuchungen ergaben, dass die PDGF-B Überexpression zu einer um eine Drittel erhöhten Lebenszeit führt (**Abb. 23 (A)** Kontrolle:  $27,2 \pm 1,8$  Stunden, PDGF-B:  $40,2 \pm 2,7$  Stunden). Folglich zeigten die Mortalitätsanalysen, dass zum Zeitpunkt 36 Stunden noch über die Hälfte der PDGF-B überexprimierenden Versuchstiere leben, in der Kontrollgruppe liegt die Mortalität zu diesem Zeitpunkt bereits bei 100% (**Abb. 23 (B)** Mortalität: Kontrolle: 36h 100%, PDGF-B: 36h 55%).



**Abb. 23** PDGF-B zeigt einen Vorteil im Überleben der Tiere. **(A)** Die PDGF-B überexprimierenden Tiere zeigen eine signifikant verlängerte Überlebenszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe in der systemischen Inflammation. **(B)** In der Mortalitätsanalyse zeigt sich ein Überlebensvorteil von 24 Stunden bei PDGF-B Überexpression.

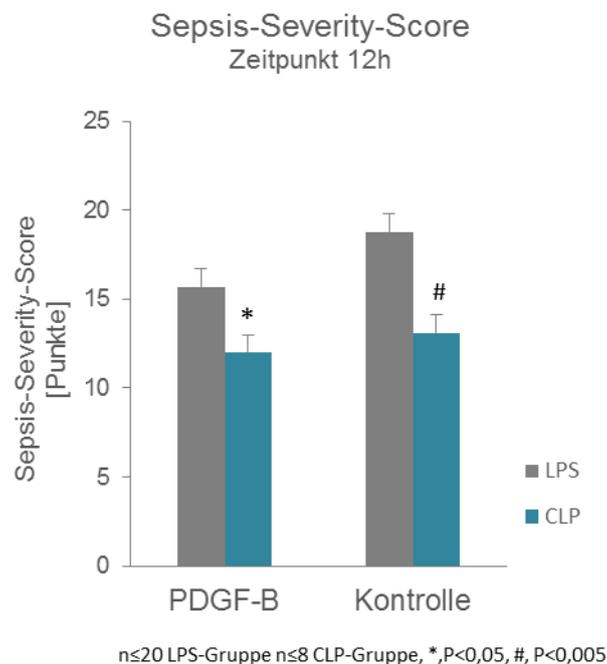
So wird der Protektive Effekt einer vorangehenden PDGF-B via rAAV Transfektion, wie auch schon in der Gefäßpermeabilität, der Perizytenzahl, der Hypotension und der Sepsis-Schwere, im Überleben der Versuchstiere bestätigt.

### 3.2 Vergleich der LPS-induzierten Endotoxämie und der CLP-induzierten Sepsis

Die mittels Single-Shot LPS induzierte Endotoxämie und die CLP-induzierte Sepsis unterscheiden sich in ihrem Verlauf und der Zytokin-Kinetik deutlich. Durch LPS-Applikation wird eine akute Reaktion des Organismus erzeugt. Die sich langsam entwickelnde polymikrobielle Sepsis hat einen vergleichsweise prolongierten Verlauf und niedrigeren Zytokin-Anstieg (138).

#### 3.2.1 Sepsis-Severity-Score in Endotoxämie und Sepsis im Vergleich

Der anhand der Höhe des Sepsis-Severity-Scores objektivierte Allgemeinzustand der Versuchstiere zeigt zum zwölf Stunden Zeitpunkt, nach Endotoxämie- bzw. Sepsis-Induktion einen signifikanten Unterschied. In der PDGF-B überexprimierenden Gruppe sowie in der Kontrollgruppe lässt sich bei den Tieren nach LPS-Injektion ein schlechterer Allgemeinzustand, folglich ein höherer Sepsis-Severity-Score dokumentieren (**Abb. 24** Die CLP-induzierte Sepsis zeigt zum Zeitpunkt 12 Stunden einen signifikant milderen Verlauf, in der PDGF-B- sowie Kontrollgruppe, gemessen am Sepsis-Severity-Score. **Abb. 24** 12h: PDGF-B: LPS 15,70±3,99 Punkte, CLP 12,00±2,83 Punkte, Kontrolle: LPS 18,79±2,65 Punkte, CLP 13,13±3,82 Punkte).



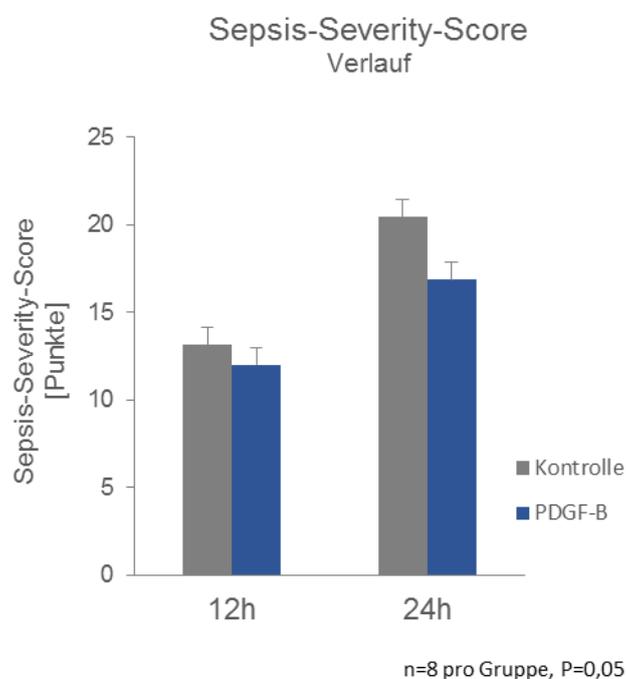
**Abb. 24** Die CLP-induzierte Sepsis zeigt zum Zeitpunkt 12 Stunden einen signifikant milderen Verlauf, in der PDGF-B- sowie Kontrollgruppe, gemessen am Sepsis-Severity-Score.

### 3.3 Der Effekt von PDGF-B Überexpression in der CLP- induzierten Sepsis

Die bisherigen Ergebnisse zeigen einen Vorteil der Versuchsgruppen, die im Herzmuskel und in der peripheren Mikrozirkulation PDGF-B überexpressieren, im Modell der kontrollierten LPS-induzierten Endotoxämie. Zur Evaluation des klinischen Effekts einer PDGF-B Überexpression in einer multimikrobiellen Sepsis, werden die Sepsis-Schwere sowie das Überleben zusätzlich im Mausmodell der CLP-induzierten Inflammation analysiert (139).

#### 3.3.1 Sepsis-Severity-Score bei PDGF-B Überexpression in der Sepsis

Ein Teil der Tiere wurde 14 Tage vor CLP mit einem rAAV.PDGF-B transfiziert. Zwölf und 24 Stunden nach CLP-Operation erfolgte die Evaluierung der Sepsis-Schwere unter Berücksichtigung der Verhaltensbeeinträchtigung, des Gewichtsverlusts, von Schmerzen, Aszites und Dyspnoe (siehe 2.2.4). Dabei zeigt sich zu beiden Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied zwischen den PDGF-B überexpressierenden Tieren und der Kontrollgruppe (**Abb. 25** 12h: Kontrolle:13,13±1,44 Punkte, PDGF-B: 12,00±1,07 Punkte; 24h: Kontrolle: 20,43±2,14 Punkte, PDGF-B: 16,88±1,08 Punkte). Tendenziell befinden sich die Tiere bei PDGF-B Überexpression in einem besseren Allgemeinzustand und weisen eine mildere Sepsis auf als die Kontrollgruppe.



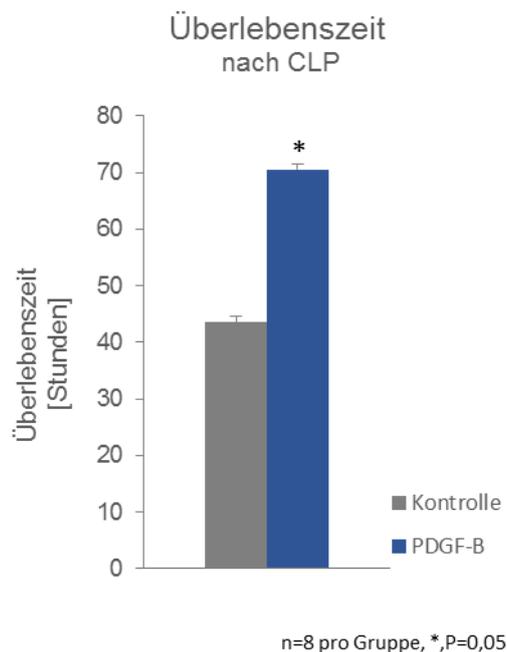
**Abb. 25** Die PDGF-B Überexpression führt tendenziell zu einer Milderung der Sepsis im Vergleich zu den Kontrolltieren. Ein signifikanter Unterschied der beiden Versuchsgruppen ist jedoch nicht nachweisbar.

### 3.3.2 Verbesserung der Überlebenszeit und Mortalität bei PDGF-B-Überexpression in der Sepsis

Nach CLP wurden die Versuchstiere über einen Zeitraum von 120 Stunden beobachtet und die Überlebenszeit nach Sepsis-Induktion dokumentiert. Hieraus lässt sich die Mortalität in den verschiedenen Versuchsgruppen berechnen. Hier ist wie in der Endotoxämie ein protektiver Effekt von PDGF-B nachweisbar.

#### 3.3.2.1 Überlebenszeit

Die Überlebenszeit, d.h. der Zeitspanne von CLP bis nach dem Erreichen von 20 Punkten im Sepsis-Severity-Score, wurde in beiden Versuchsgruppen beobachtet. Das Ergebnis zeigt, dass die Tiere bei PDGF-B Überexpression fast doppelt so lange überleben wie ihre Kontrollgruppe (**Abb. 26** Kontrolle:  $43,50 \pm 4,71$  Stunden, PDGF-B:  $70,50 \pm 10,91$  Stunden).

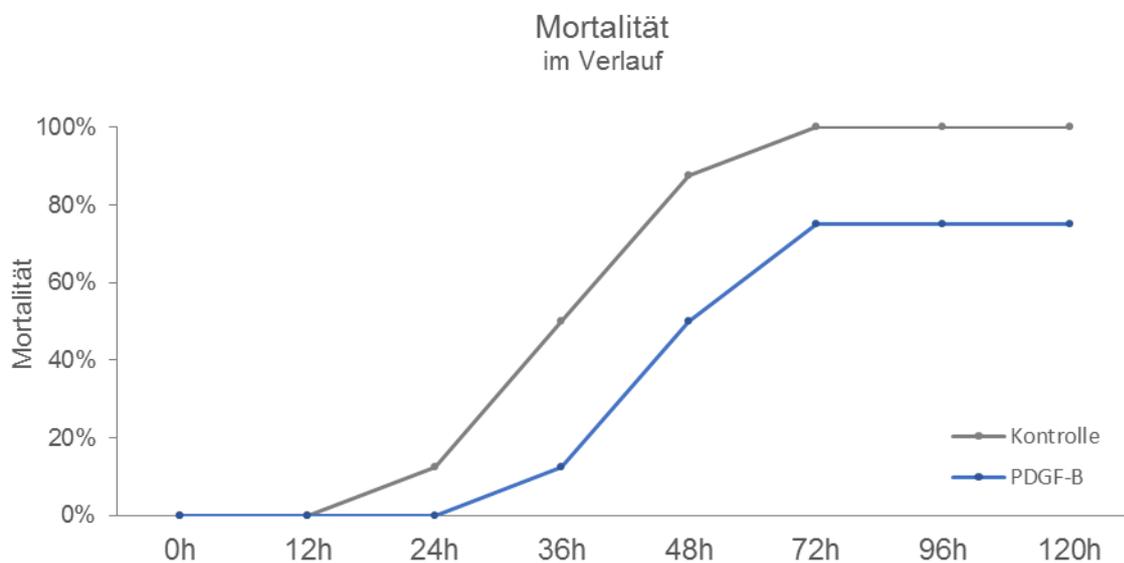


**Abb. 26** Die PDGF-B Gruppe zeigt eine deutlich längere Überlebenszeit als die Kontrollgruppe in der Sepsis.

So zeigt PDGF-B, wie schon in der Endotoxämie, einen Vorteil der Überlebenszeit, auch in der polymikrobiellen Sepsis.

### 3.3.2.2 Überleben/Mortalität

Auch in der Mortalität zeigt sich folglich das gleiche Bild. Betrachtet man die Mortalität der Tiere über einen Zeitraum von 120 Stunden, so zeigt PDGF-B Überexpression einen klaren Vorteil in der CLP-induzierten Sepsis. In der Gruppe der PDGF-B überexprimierenden Tiere überleben 25% die Sepsis. In der Kontrollgruppe ist zum Zeitpunkt 72 Stunden nach CLP kein Tier mehr am Leben. Bereits einen Tag nach Sepsis-Induktion leben in der Kontrollgruppe nur noch die Hälfte der Tiere. In der PDGF-B Gruppe sind nach zwei Tagen 50% der Tiere tot. Das bedeutet einen Überlebensvorteil von 24 Stunden bei vermehrter PDGF-B Produktion.



**Abb. 27** Die Mortalitätskurve zeigt eine geringere Sterblichkeit der PDGF-B überexprimierenden Gruppe. Auch die Gesamtmortalität nach 120 Stunden ist in der Kontrollgruppe um 25% höher als bei PDGF-B Überexpression.

### 3.4 Die Wirkung von Angiopoietin-2 Antikörpern in der CLP- induzierten Sepsis

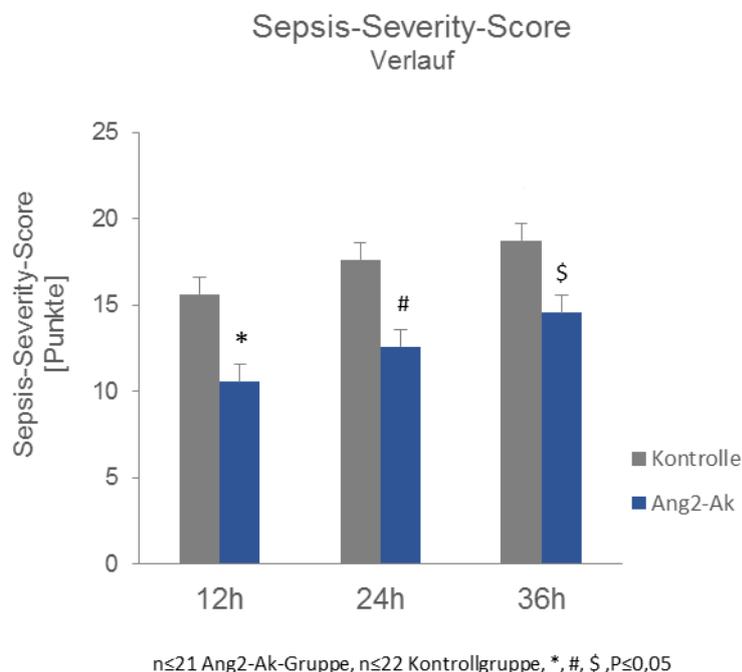
In dieser Versuchsreihe wurde der therapeutische Effekt eines Angiopoietin-2-Antikörpers in der Sepsis gezeigt. T. Ziegler et al. untersuchten bereits den protektiven Effekt dieses Antikörpers in der Endotoxämie, vergleichbar mit den PDGF-B Überexpressions-Experimenten.

PDGF-B wirkt über Angiopoietin-1 als Chemoattraktant für Perizyten und vermindert, wie oben bereits gezeigt, das „Capillary Leak“ in der Endotoxämie, resultierend in einer geringeren Sterblichkeit sowie erhöhten Überlebenszeit in der multimikrobiellen Sepsis. Im Folgenden wird gezeigt wie durch die Reduktion von aktivem Angiopoietin-2 mittels spezifischem Angiopoietin-2-Antikörper LC 06

(RO5314193, Roche, Penzberg, Germany, Ang-2 Ak) ebenfalls ein positiver Effekt auf Allgemeinzustand sowie Mortalität der Versuchstiere in der CLP-induzierten Sepsis erzielt werden kann.

### 3.4.1 Verbessertes Sepsis-Severity-Score bei Angiotensin-2 Antikörpergabe in der Sepsis

Einem Teil der Tiere wurde 24 Stunden vor CLP-Operation ein Angiotensin-2 Antikörper i.p. injiziert. Diese Versuchsgruppe zeigt im Verlauf einen milderen Sepsis-Verlauf, gemessen am Sepsis-Severity-Score. Dieser wurde zu den Zeitpunkten zwölf, 24 und 36 Stunden nach Sepsis-Induktion erhoben. An den Messpunkten zwölf und 24 Stunden zeigt sich sogar ein hoch signifikanter Unterschied zugunsten der Angiotensin-2 Antikörper vorbehandelten Tieren. Auch nach 36 Stunden befinden sich diese Tiere in einem deutlich besseren Allgemeinzustand, gemessen an Verhalten, Gewichtsverlust, Schmerzen, Aszites und Dyspnoe (**Abb. 28** 12h: Kontrolle:  $15,64 \pm 1,13$  Punkte, PDGF-B:  $10,57 \pm 1,03$  Punkte; 24h: Kontrolle:  $17,61 \pm 0,93$  Punkte, PDGF-B:  $12,60 \pm 1,06$  Punkte; 36h: Kontrolle:  $18,75 \pm 1,52$  Punkte, PDGF-B:  $14,56 \pm 1,35$  Punkte).



**Abb. 28** Durch die Angiotensin-2 Antikörper wird die Schwere der Sepsis abgemildert. Dieser Effekt ist zu den Zeitpunkten zwölf, 24 und 36 Stunden nach CLP-Operation nachweisbar. Hier ist der Sepsis-Severity-Score signifikant niedriger als in der entsprechenden Kontrollgruppe.

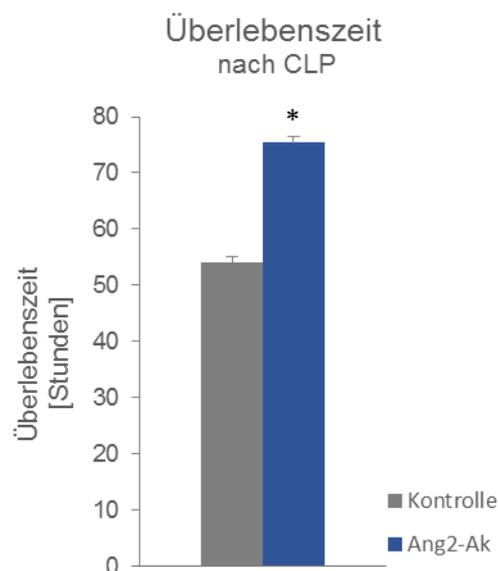
Im Vergleich zu den PDGF-B überexprimierenden Tieren in der Sepsis (siehe 3.3.1) zeigt die Angiotensin-2 Antikörper Behandlung einen Einfluss auf die Sepsis-Schwere.

### 3.4.2 Verbesserung der Überlebenszeit bei Gabe von Angiotensin-2 Antikörpern

Die Überlebenszeit und Mortalität wurde auch unter Angiotensin-2 Antikörpertherapie in der CLP-induzierten Sepsis untersucht. Hier zeigt sich ein deutlicher therapeutischer Nutzen der Antikörperbehandlung (24 Stunden vor CLP).

#### 3.4.2.1 Überlebenszeit

Die i.p. Injektion von Angiotensin-2 Antikörpern 24 Stunden vor CLP-Operation führt zu einer durchschnittlichen Überlebenszeit von 75 Stunden und ist somit im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht (**Abb. 29** Kontrolle:  $54,00 \pm 6,58$  Stunden, PDGF-B:  $75,43 \pm 6,86$  Stunden).

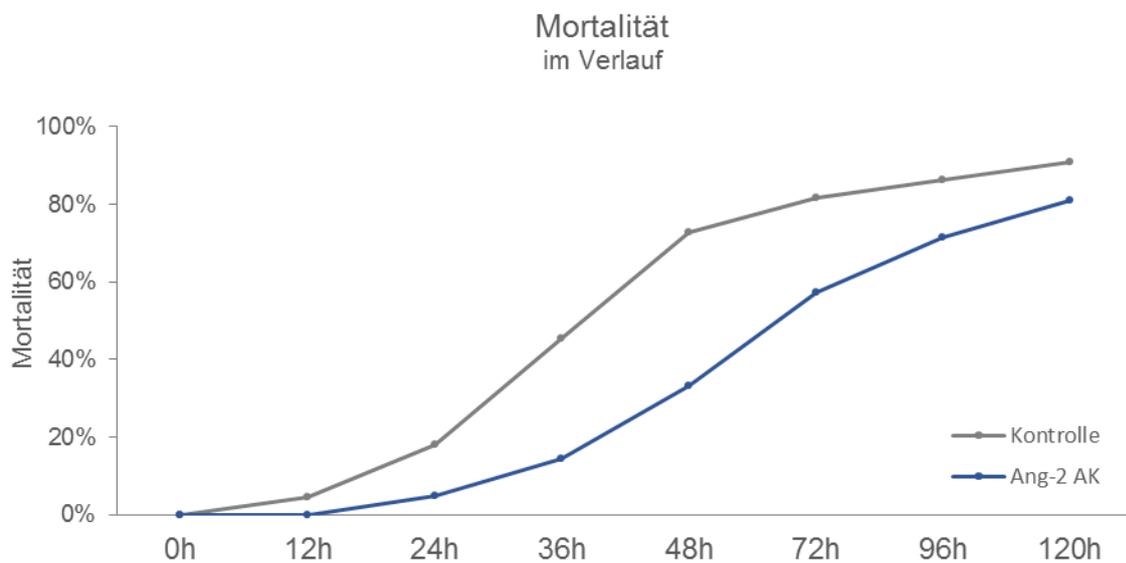


n≤21 PDGF-B-Gruppe, n≤22 Kontrollgruppe, \*, p<0,05 vs. Kontrolle

**Abb. 29** Die Überlebenszeit nach Angiotensin-2 Antikörperbehandlung ist signifikant höher im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

### 3.4.2.2 Überleben/Mortalität

Die Untersuchungen der Mortalität unter Angiotensin-2 Antikörpertherapie zeigen entsprechend der längeren Überlebenszeit eine niedrigere Mortalität. Zum Zeitpunkt 36 Stunden leben noch 55% der Kontrolltiere, jedoch noch 86% der Tiere mit Antikörpertherapie. Etwa die Hälfte (43%) der mit Angiotensin-2 Antikörpern behandelten Mäuse ist nach 72 Stunden post-CLP noch am Leben. An diesem Messpunkt leben hingegen nur noch 18% der Kontrolltiere. Am Versuchsendpunkt bei 120 Stunden leben noch ein Fünftel (19%) der therapierten Tiere (120h: Kontrolle 9%).



**Abb. 30** Die Mortalitätskurve zeigt die niedrigere Sterblichkeit der Tiere die mit einem Angiotensin-2 Antikörper vorbehandelt wurden. Auch zum Versuchsende überleben mehr Mäuse aus dieser Versuchsgruppe im Vergleich zu den Kontrolltieren.

## 4 Diskussion

### 4.1 Endotoxämie und Sepsis im Mausmodell

Die systemische Inflammation ist ein komplexer, dynamischer Prozess mit einem sehr heterogenen Patientenkollektiv. In einer Vielzahl von experimentellen Modellen stellt einerseits die LPS-induzierte Endotoxämie den einfachsten Ansatz, andererseits die CLP induzierte Peritonitis den Goldstandard unter den gram-negativen Sepsis-Modellen dar.

Die LPS-induzierte gram-negative Endotoxämie stellt ein etabliertes, gut untersuchtes Modell der systemischen Inflammation dar. LPS ist ein stabiler, gut lagerbarer und relativ reiner Stoff. Die Möglichkeit der genauen, gewichtsadaptierten Dosierung ermöglicht in den Versuchstieren eine reproduzierbare, untersucherunabhängige, systemische Inflammation zu induzieren. Die Induktion erfolgte mittels eines gewichtsadaptierten Single-Shot (140). Diese Methode wurde aus den oben genannten Gründen gewählt, um initial die Effekte einer Therapie mittels PDGF-B-Überexpression in einer systemischen Inflammation zu untersuchen.

Um zusätzlich ein hohes Maß an Homogenität im heterogenen Prozess der systemischen Inflammation zu gewähren, wurde die aufgestellte Hypothese an einem murinen Sepsis-Modell untersucht. Neben der kostengünstigen Verfügbarkeit der Tiere, besteht eine weitgehend homogene Risikogruppe vor Sepsis-Induktion (beispielsweise im Vergleich zu einer klinischen Studie) (141). Als Versuchstiere wurden ausschließlich männliche C57/Bl6 Mäuse mit identischem genetischem Hintergrund, Alter und Gewicht gewählt.

Im Vergleich zur Sham-Gruppe zeigten die LPS-behandelten Tiere signifikant höhere IL-6-Serumkonzentrationen. Dies wurde in den Versuchsreihen als Nachweis einer sicheren Sepsis-Induktion gewertet. Ebong et al. zeigten bereits, dass die IL-6 Konzentration in der systemischen Inflammation direkt mit der Sepsis-Schwere wie auch mit der Mortalität der Versuchstiere korreliert (141, 142).

#### 4.1.1 Endotoxämie vs. Sepsis

Die LPS-induzierte systemische Inflammation als Sepsis-Modell ist definitionsgemäß eine gram-negative Endotoxämie. Die Handhabung und Durchführung des Modells ist einfach und reproduzierbar. Ein weiterer Vorteil ist die akute, dosisabhängige Reaktion des Organismus auf einen inflammatorischen Stimulus (140). Somit stellt diese Form der Endotoxämie ein kontrolliertes und standardisiertes Modell der systemischen Inflammation dar. Der Nachteil der LPS induzierten Endotoxämie, ist die überwiegend Toll-Like-Rezeptor-4 (TLR-4) abhängige Reaktion des Organismus (143, 144). TLR-4 defiziente Mäuse zeigen eine verminderte Reaktion auf LPS-Exposition (145).

Somit wird im Vergleich zur polymikrobiellen Sepsis im Menschen nicht die Gesamtheit der komplexen Reaktionsmechanismen repräsentiert. Auf Grund eines einmaligen, starken, inflammatorischen Stimulus, in Form einer Bolusinjektion, wird ein schneller, hoher aber nur vorübergehender Anstieg von Zytokinen im Organismus getriggert. Dies steht im Gegensatz zur klinischen Situation, in welcher ein infektiöser Fokus über einen längeren Zeitraum besteht (140).

Eine weitere Grenze des Modells stellen die Versuchstiere dar. Kleine Säugetiere zeigen physiologischerweise eine relative Insensitivität gegenüber Endotoxinen und reagieren dosisabhängig verschieden. Der menschliche Organismus reagiert nach einer LPS-Bolusinjektion mit einem initial schnellen Anstieg der Serumkonzentration sowie im Verlauf mit einem steilen Abfall selbiger. Auf eine länger anhaltende low-dose Endotoxin-Applikation reagiert der gesunde, menschliche Körper mit Influenza-ähnlichen Symptomen mit Tachykardie, Fieber, erhöhten Leukozyten sowie einer katabolen Stoffwechsellage. Die Zytokinkonzentrationen sind niedriger als bei einer Single-Shot induzierten Endotoxämie, jedoch ähnlich denen einer Sepsis (140).

Trotz der hohen Standardisierung des Modells, bestehen dennoch in einzelnen Publikationen Unterschiede in Applikationsart, Dosis und Art des Toxins (138).

Die CLP stellt heute in der Sepsis-Forschung den Goldstandard dar. Ausgehend von einem parenteralen, infektiösen Fokus entwickelt sich eine polymikrobielle Sepsis mit dem gesamten Spektrum der wirtseigenen, intestinalen Flora. Die CLP reproduziert den Verlauf der Sepsis im menschlichen Körper mit ähnlichen metabolischen, hämodynamischen sowie hypo- und hyperinflammatorischen Phasen. Der Zytokin-Verlauf stellt sich im Vergleich zum Menschen prolongiert und weniger hoch dar. Die Schwere der Sepsis ist von der Strecke der Ligation, der Anzahl der Punktionen sowie auch entsprechend operateurabhängig (138, 139). Um ein hohes Maß an Standardisierung zu erreichen, wurde die Ligationsstrecke wie Anzahl der Punktionen genormt.

## 4.1.2 Parameter der Evaluation und Validierung

### 4.1.2.1 Sepsis-Severity-Score

Die Allgemeinzustandsänderung der Tiere wurde durch den Sepsis-Severity-Score beurteilt. Die Kriterien umfassen Verhalten, Gewichtsverlust, Schmerz, Dyspnoe und Aszites. Somit wird eine umfassende Beurteilung des Gesundheitszustandes des Tieres möglich. Der Score setzt sich aus der Summe der einzelnen Kriterien zusammen. Da der Gewichtsverlust den einzigen, objektiv messbaren Parameter darstellt, zeigt sich der Score untersucherabhängig. Um ein Höchstmaß an Validität zu erzeugen, wurden die Tiere stets durch den gleichen Untersucher beurteilt. Die Höhe des Scores beeinflusst zudem direkt die Höhe der Mortalität der Versuchsgruppen, da ein Cut-off-Punktwert die Beendigung des Versuchstieres vorschreibt. In den Ergebnissen ergibt sich somit eine Korrelation von Allgemeinzustandsverschlechterung und erhöhter Sterblichkeit als Folge des Versuchsdesigns.

#### 4.1.2.2 Nicht-invasive Blutdruckmessungen

Die Überwachung der hämodynamischen Situation während der Sepsis erfolgte durch nicht-invasive Blutdruckmessungen. Im Vergleich zur invasiven Blutdruckmessung, kann der Blutdruck am selben Versuchstier im Verlauf beurteilt werden, da die Methode schonend für das Versuchstier ist und der Verlauf der Sepsis nicht beeinflusst wird. Feng et al. zeigten, dass mittels VPR Tail-Cuff Methode genaue Messungen des Blutdrucks bei Mäusen im physiologischen Bereich des Blutdrucks gewährleistet wird. Im Vergleich zu invasiven radiotelemetrischen Messungen des Blutdrucks zeigten sich die mittels VPR-Tail-Cuff-System gemessenen Werte im Durchschnitt um 0,25 mmHg niedriger. Zudem zeigt sich die Methode bei sehr hohen und niedrigen (<110 und >180 mmHg) systolischen Blutdruckwerten weniger genau als eine invasive Blutdruckmessung mittels Radiotelemetrie (132).

Auf Grund des schlechten Allgemeinzustandes der Tiere war die Durchführung von invasiven Blutdruckmessungen nicht möglich.

#### 4.1.2.3 Gefäßpermeabilität

Die Messung der Gefäßpermeabilität mittels Multi-Photonenmikroskopie erlaubt ein intravitales Echtzeit-Abbild der aktuellen Permeabilitätslage der Gefäße der Mikrozirkulation. Das „Capillary Leak“ während der Sepsis kann somit mittels dieser Methode optimal visuell wiedergegeben werden und mittels Farbintensitätsmessungen quantifiziert werden.

Die genaue Quantifizierung der Endothelzellen und Perizyten erfolgte durch immunhistochemische Färbungen der angefertigten Gewebeschnitte von Skelett- und Herzmuskel. Durch die unterschiedliche Farbwahl für beide Zelltypen kann eine sichere, fluoreszenzmikroskopische Unterscheidung der beiden Zelltypen erfolgen. Die Quantifizierung zeigt sich jedoch von der Qualität der Färbungen und vom Untersucher abhängig.

### 4.2 „Capillary leak“ – erhöhte Permeabilität in der Sepsis

#### 4.2.1 Permeabilitätsminderung der Gefäße bei PDGF-Überexpression

Im Zustand der systemischen Inflammation zeigte sich ein deutlicher Fluoreszenzanstieg im Interstitium in der 2-Photonenmikroskopie durch die Extravasation des fluoreszierenden Zuckermoleküls TRITC-Dextran. Die Volumenverschiebung von intra- nach extravasal wird durch eine erhöhte Gefäßpermeabilität bedingt und als „Capillary Leak“ bezeichnet. Roviezzo et al. zeigten bereits, dass Angiotensin-2 die Ödementstehung zeit- und dosisabhängig begünstigt. Dieser endothelzellspezifische Wachstumsfaktor sowie Ligand des Tie2-Rezeptors wird durch proinflammatorische Stimuli reguliert und führt zu einer Destabilisierung des Endotheliums und erhöht die Gefäßpermeabilität (90). In Patienten mit schwerer Sepsis ist somit die Serum-Konzentration von Angiotensin-2 signifikant erhöht und gleicht in seiner Dynamik und Kinetik den Zytokinen TNF- $\alpha$  und IL-6 (100). Auf zellulärer Ebene führt Angiotensin-2 zu einer Destabilisierung der Endothelzellschicht

sowie einem Ablösen der Endothelzellen aus dem Verbund (52). In der Mikrozirkulation liegen der Endothelzellschicht von außen Perizyten an, durch deren lange zytoplasmatischen Ausläufer die Abdichtung der Gefäßwand erzielt wird. Hammes et al. konnten zeigen, dass Angiotensin-II dosisabhängig einen Perizytenverlust um die Gefäßwand der Retina zur Folge hat. Heterozygote Angiotensin-II-Defizienz hingegen verhindert einen Perizytenverlust der retinalen Gefäßwand. Ein hoher Perizytenbesatz besteht in ruhendem Gewebe und gewährt eine hohe Gefäßdichte sowie eine hohe Barrierefunktion des Gefäßbettes (37, 39, 64).

Am Tie2-Rezeptor konkurriert Angiotensin-II mit dem antagonistisch wirkenden Liganden Angiotensin-I (82). Angiotensin-I wirkt antiinflammatorisch und erhöht die Dichtigkeit von Gefäßen (87, 88). Rekombinantes Angiotensin-I führt zur Normalisierung der Gefäßarchitektur und zur Minderung erhöhter Gefäßpermeabilität, verursacht durch den Verlust von Perizyten (57, 146). Die vermehrte Perizytenrekrutierung trägt zur Gefäßstabilität bei und wird durch die vermehrte Freisetzung von perizytenrekrutierenden Faktoren aus den Endothelzellen, wie beispielsweise PDGF-B, bedingt (57, 147, 148). Zudem führt PDGF-B wiederum zu einer vermehrten Expression von Angiotensin-I in glatten Muskelzellen (125).

In der systemischen Inflammation konnte gezeigt werden, dass eine Extravasation von Plasmabestandteilen aufgrund ungenügender Gefäßdichtigkeit stattfindet. Die Überexpression von PDGF-B führt zu einer Minderung der Gefäßpermeabilität und resultiert in einem signifikant geringeren Fluoreszenzanstieg im Interstitium in den Permeabilitätsmessungen. Als morphologisches Korrelat auf zellulärer Ebene konnten im Skelett- wie Herzmuskel unter PDGF-B Überexpression in der systemischen Inflammation eine signifikant höhere Zahl an Perizyten um die Gefäßwand nachgewiesen werden. Die Zahl der Endothelzellen zeigte sich konstant.

So konnte eine vermehrte Perizytenrekrutierung und erhöhte Gefäßdichte in der Mikrozirkulation unter PDGF-B-Überexpression während einer generalisierten Entzündungsreaktion, wie beispielsweise der Sepsis gezeigt werden. Es stellt sich die Frage wie sich dieser Sachverhalt auf Hämodynamik, Allgemeinzustand und Mortalität auswirkt.

## 4.2.2 Einfluss auf die Mikrozirkulation, Hämodynamik, Allgemeinzustand und Mortalität in der Sepsis

### 4.2.2.1 Veränderungen der Mikrozirkulation in der Sepsis

Der septische Schock ist durch grundlegende, hämodynamische Veränderungen gekennzeichnet, assoziiert mit Organdysfunktion. Diese Veränderungen beinhalten das Auftreten einer Hypovolämie, die Abnahme des Gefäßtonus und die Beeinträchtigung der myokardialen Funktion.

In verschiedensten experimentellen Studien wurden Veränderungen der Mikrozirkulation während der Sepsis belegt. Normalerweise besteht ein dichtes Kapillarnetzwerk, welches zum größten Teil perfundiert ist. In der Sepsis zeigt sich eine Abnahme der Kapillardichte assoziiert mit einer

vermehrten Heterogenität der Perfusion. So zeigen sich nur intermittierend oder nicht durchblutete Kapillaren in enger Nachbarschaft zu gut durchbluteten Kapillaren. Diese Veränderungen konnten in der Endotoxämie sowie während einer bakteriellen Peritonitis nachgewiesen werden. Die Veränderungen der Mikrozirkulation beeinflussten die Organfunktion unter anderem von Gehirn, Herz und Skelettmuskel. Dies zeigte sich experimentell in Nagern sowie größeren Säugern. Sehr ähnliche Veränderungen der Mikrozirkulation konnten auch in Patienten mit einer schweren Sepsis sowie im septischen Schock nachgewiesen werden.

Die Abnahme der Kapillardichte erhöht einerseits die Diffusionsstrecke des Sauerstoffs, andererseits führt eine heterogene Durchblutung zu Veränderungen in der Sauerstoffextraktion und folglich zu hypoxischen Arealen, auch wenn ein normaler Blutfluss gewährt ist. In der Hypoperfusion zeigt sich in der Sepsis sogar eine weitere Aggravierung der heterogenen Kapillarperfusion. Diese Veränderungen spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung einer Organdysfunktion und sind Indikator für die Schwere einer Sepsis. Die Veränderungen in der Mikrozirkulation haben eine beeinträchtigte Gewebeoxygenierung zur Folge. Somit korreliert die Schwere der mikrozirkulatorischen Dysfunktion mit der Entwicklung eines Organversagens und der Mortalität.

Die endotheliale Dysfunktion ist einer der Schlüsselmechanismen der den Veränderungen in der Mikrozirkulation unterliegt. Dies beinhaltet eine verminderte endotheliale Reaktion auf vasoaktive Substanzen in der Sepsis. Zudem besteht eine eingeschränkte Kommunikation zwischen den Endothelzellen sowie zwischen Endothelzellen und vorgeschalteten Gefäßen (149).

#### 4.2.2.2 Positiver Einfluss der PDGF-B Überexpression auf die Hämodynamik, den Allgemeinzustand und die Mortalität

Der gefäßwirksame Wachstumsfaktor Angiopietin-2 trägt unter anderem zur endothelialen Destabilisierung der Gefäße bei, verursacht eine Zunahme des Gefäßlecks und induziert eine Entzündungsreaktion (52, 116, 150). Charakteristisch für den septischen Schock ist eine systemisch erhöhte Permeabilität der Mikrozirkulation, ein interstitielles und alveoläres Ödem sowie eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Zytokinen wie beispielsweise IL-6 (20, 114, 151). Eine Folge des „Capillary Leak“ ist die systemische Hypotension (114, 152). In der LPS-induzierten Sepsis zeigten sich ein deutlich geminderter MAP in den nicht-invasiven Blutdruckmessungen im Vergleich zu gesunden Kontrollen.

Fiusa et al. zeigten, dass erhöhte Angiopietin-2 Serumkonzentrationen sowie ein erhöhter Angiopietin-2/Angiopietin-1 Quotient vermehrt mit der Entwicklung eines septischen Schocks einhergehen (153). David et al. stellten fest, dass kranke Patienten mit besonders schlechter Prognose auch stark erhöhte Angiopietin-2 Konzentrationen aufwiesen. Patienten in besserem Allgemeinzustand und Sepsis-Überlebende zeigten geringere Angiopietin-2 Konzentrationen. Zudem zeichnete sich während der Allgemeinzustandsverschlechterung ein weiterer Anstieg der Angiopietin-2 Serum-Konzentration ab. So ist anzunehmen, dass Angiopietin-2 Beitrag zum Multiorganversagen und Tod in der Sepsis leistet (154). In Zusammenschau zeigt sich, dass Angiopietine in der Sepsis

nicht nur Regulatoren der Gefäßpermeabilität darstellen, sondern auch an der Dysregulation des Endotheliums in der Sepsis beteiligt sind (155).

Über den Downstream der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Tie-2 senkt Angiotensin-1 die Gefäßpermeabilität und wirkt gefäßstabilisierend sowie antiinflammatorisch (88, 111). Witznicher et al. konnten bereits zeigen, dass eine Überexpression des gefäßstabilisierenden Wachstumsfaktors Angiotensin-1 in einer LPS-induzierten Endotoxämie eine verminderte Mortalität sowie eine Besserung der hämodynamischen Situation zur Folge hat (114). PDGF-B bewirkt neben einer gesteigerten Perizytenrekrutierung auch eine vermehrte Angiotensin-1 Expression (125). Zudem führt eine Überexpression von PDGF-B zu einer verminderten Angiotensin-2 Produktion (126).

Mittels nichtinvasiven Blutdruckmessungen konnte durch PDGF-B Überexpression eine Verbesserung der Hämodynamik in der systemischen Inflammation demonstriert werden. Der MAP zeigte sich demzufolge in den PDGF-B überexprimierenden Tieren zum Zeitpunkt 24 Stunden signifikant höher. Dies bestätigt den protektiven Einfluss von PDGF-B auf die Mikrozirkulation.

#### 4.2.2.3 Besserer Allgemeinzustand und verminderte Mortalität unter PDGF-B Therapie

Als Ausdruck einer verbesserten Hämodynamik unter PDGF-B Überexpression zeigt sich in der Sepsis eine Minderung der Hypotension. Dies kann einerseits der Minderung des Gefäßlecks zugeschrieben werden, andererseits dem positiven Einfluss auf die endotheliale Funktion. Der Abfall des intravasalen Drucks wird vermindert. In Folge kann ein septischer Schock abgewendet und eine Organminderperfusion verhindert werden. Die ausreichende Organperfusion zeigt sich in einer Verbesserung des Allgemeinzustandes unter PDGF-B Überexpression. Zum Zeitpunkt sechs und zwölf Stunden nach Applikation des Endotoxins LPS zeigten die Tiere somit einen signifikant niedrigeren Sepsis-Severity-Score unter Berücksichtigung von Verhaltensbeeinträchtigung, Gewichtsverlust, Schmerzen, Dyspnoe und Aszites.

Witznicher et al. postulierten, dass eine Besserung der Hämodynamik durch Angiotensin-1 Überexpression in der Sepsis mit einer Senkung der Mortalität einhergeht (114). Auch prognostisch ist durch verminderte Angiotensin-2 Werte (siehe oben) auf Grund der PDGF-B Überexpression auf eine verminderte Mortalität zu schließen. In den durchgeführten Untersuchungen bestätigt sich eine verminderte Sterblichkeit bzw. ein besseres Überleben der PDGF-B überexprimierenden Versuchsgruppe.

In Zusammenschau der Ergebnisse ist das verbesserte Überleben der Tiere durch das Abwenden eines Multiorganversagens, durch das Gewähren einer suffizienten Organperfusion, zu erklären.

## 4.3 Transfer von der Endotoxämie in die polymikrobiellen Sepsis

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der Benefit einer PDGF-B Überexpression in der Endotoxämie sich auch in der polymikrobiellen Sepsis bestätigt. In den durchgeführten Untersuchungen hat sich gezeigt, dass ein Überlebensvorteil von 24 Stunden auch in der polymikrobiellen Sepsis erzielt werden konnte. Der Allgemeinzustand der Versuchstiere stellte sich zu den Zeitpunkten zwölf und 24 Stunden jedoch nur tendenziell, nicht signifikant, besser dar.

Die Erhebung des Sepsis-Severity-Score fand auf Grund der prologierten und auch niedrigeren Zytokin-Ausschüttung im Vergleich zur LPS-induzierten Endotoxämie zu späteren Zeitpunkten statt. Zum Zeitpunkt zwölf Stunden zeigt der Vergleich der Sepsis-Severity-Scores von LPS-induzierter Endotoxämie und CLP-induzierter Sepsis, in der CLP-Gruppe signifikant niedrigere Werte. Es ist anzunehmen, dass sich auf Grund der langsameren Kinetik die Allgemeinzustandsverbesserung zu diesem Zeitpunkt nur andeutet.

### 4.3.1 Therapieoptionen und -grenzen zwischen Perizytenverlust und -rekrutierung

Dem therapeutischen Ansatz der vermehrten Perizytenrekrutierung in der polymikrobiellen Sepsis mittels PDGF-B-Überexpression wird im Folgenden die Möglichkeit einer verminderten Perizytenabwanderung durch Neutralisierung von Angiopoietin-2 durch spezifische Antikörper gegenübergestellt. Die Effektivität der beiden Methoden wird am Allgemeinzustand der Tiere sowie der Mortalität gemessen.

### 4.3.2 Minderung der Mortalität sowie Besserung des Allgemeinzustands durch PDGF-B Überexpression in der polymikrobiellen Sepsis

Der überwiegend in Endothelzellen expremierte Wachstumsfaktor PDGF-B beeinflusst, wie bereits oben erwähnt, unter anderem das Angiopoietin-Tie2 System (125). Angiopoietin-1 agiert als Gefäßstabilisator und wirkt antiinflammatorisch (111, 114). Nishishita et al. konnten zeigen, dass PDGF-B die Angiopoietin-1 Expression in Perizyten und glatten Muskelzellen über den PI3 Kinase und PKC Signalweg hochreguliert. PDGF-B stimuliert ebenso die TGF- $\beta$ -Expression über den MAPK Signalweg und erzielt dadurch eine zusätzliche Gefäßstabilisierung (125). Durch die Tie-2 Aktivierung mittels Angiopoietin-1 erfolgt eine vermehrte Perizytenanlagerung entlang der Gefäßwand, diese wird stabilisiert und die Gefäßleckage gemindert (37, 83-85, 87, 88, 113).

In Zusammenschau ergibt sich auch in der CLP induzierten, polymikrobiellen Sepsis, wie schon in der Endotoxämie, im Vergleich zur Kontrollgruppe ein verbesserter Allgemeinzustand gemessen am Sepsis-Severity-Score. Die Überlebenszeit der behandelten Tiere zeigt sich annähernd doppelt so lange als in der Kontrollgruppe (siehe 4.3).

#### 4.3.2.1 Grenzen der Therapie

Die vermehrte Perizytenrekrutierung durch PDGF-B Überexpression stellt somit ein wirksames Therapeutikum in der systemischen Inflammation dar. Der Anwendbarkeit im klinischen Alltag stehen jedoch eine Vielzahl von Nebenwirkungen und potentiellen Risiken entgegen.

Zunächst stellt die Dosisfindung mit therapeutischem Wirkmaximum eine Herausforderung dar. Während PDGF-B essentiell für die Perizytenmigration und -proliferation entlang neu gebildeter Gefäße ist (93, 123), zeigt sich unter hohen PDGF-B Dosen ein paradoxer Effekt mit Abwanderung der Perizyten von den Gefäßwänden (156).

Des Weiteren bilden Perizyten zusammen mit Endothelzellen und Astrozyten die Bluthirnschranke und stellen somit einen wichtigen Faktor für die Integrität dieser dar. Je nach Perizyten-dichte wird die Barrierefunktion verstärkt oder abgeschwächt. Auf Grund der direkten Wirkungsbeziehung zwischen PDGF-B und Perizyten führen zu hohe PDGF-B Konzentrationen zu schwer kalkulierbaren neurokognitiven Funktionsstörungen (157).

PDGF-B ist ein starker Chemoattraktant für verschiedenste weitere Zelltypen. Neben Perizyten fördert PDGF-B unter anderem auch die Migration und Proliferation von Fibroblasten und mesenchymalen Zellen, wie beispielsweise pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen. Durch die vermehrte Fibroblastenmigration besteht die Gefahr, fibrosierende Erkrankungen wie beispielsweise die idiopathischen Lungenfibrose oder die systemischen Sklerose (sklerodermieartige Erscheinungen) auszulösen oder zu verstärken (158, 159). Auch in der Genese der idiopathischen pulmonalarteriellen Hypertonie spielt PDGF-B durch seinen Einfluss auf die pulmonal arteriellen glatten Muskelzellen eine Rolle (160).

Eine Überexpression von PDGF-B erzielt eine proangiogenetische Wirkung und führt zur Tumorinduktion (161). Diese unterstützt auch die Angiogenese und Zellreifung in Malignomen, einerseits durch die vermehrte Expression von Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und dessen fördernder Einfluss auf die Endothelzellmitogenese. Andererseits werden vermehrt Perizyten an die wachsenden Gefäße rekrutiert und hierdurch die Gefäßformation erleichtert (162). Dieser Effekt wurde besonders in Gliomen erforscht. Zudem konnte in Gliomzellen eine PDGF-B- und PDGFR-B-Überexpression nachgewiesen werden (161, 162).

Insgesamt zeigt sich so ein hohes potentiell, wenig beeinflussbares Nebenwirkungsprofil, welches den zukünftigen Einsatz als Therapeutikum im klinischen Alltag beschränkt. Somit stellt die vermehrte Perizytenrekrutierung eine schwer realisierbare Therapieoption dar. Eine verminderte Abwanderung von Perizyten kann beispielsweise durch Angiopoietin-2 Antikörperapplikation erzielt werden.

Zudem stellt der Applikationszeitpunkt eine große Limitation als therapeutisches Werkzeug dar. Da eine stabile Expression erst nach einigen Tagen bis Wochen erwartet werden kann, stellt die Applikation eines rekombinanten adenoassoziierten Virus zur PDGF-B Überexpression in der klinischen Praxis des akut, verlaufenden Krankheitsbildes der schweren Sepsis, keine realistische Therapieoption dar.

### 4.3.3 Angiopoietin-2 Antikörper und verminderte Perizytenabwanderung in der Sepsis

Angiopoietin-2 stellt eine Verbindung zwischen Inflammation und Angiogenese dar. Im Angiopoietin-Tie2-System wirkt Angiopoietin-2 antagonistisch zu Angiopoietin-1 und blockiert entsprechende Signalwege. Die Destabilisierung des ruhenden Endotheliums begünstigt und dessen Reaktion auf exogene angiogenetische sowie inflammatorische Stimuli (104). Eine Folge ist der Perizytenverlust sowie eine beeinträchtigte Perizytenrekrutierung entlang der Gefäßwand und Ausbildung des „Capillary Leak“ (90, 117). In der schweren Sepsis zeigten sich auch beim Menschen erhöhte Angiopoietin-2 Konzentrationen sowie eine direkte, konzentrationsabhängige Korrelation mit der Mortalität schwer kranker Patienten (102).

Als kausalen Therapieansatz erfolgte der Versuch der Angiopoietin-2 Antikörperapplikation. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung des Allgemeinzustandes gemessen am Sepsis-Severity Score zum zwölf, 24 und 36 Stunden Zeitpunkt. Zudem zeigte sich eine verminderte Mortalität sowie eine fast 10%-ige Überlebensrate in der CLP-induzierten Sepsis. Im Vergleich zum Ansatz der vermehrten Perizytenrekrutierung mittels PDGF-B-Überexpression präsentiert sich hier sogar eine effektivere Therapiemethode.

#### 4.3.3.1 Grenzen der Therapie

Therapieansätze mit spezifischen monoklonalen Antikörpern sind heute Bestandteil des klinischen Alltags. Ihr breites Einsatzgebiet erstreckt sich von der Hämatookologie, über die Rheumatologie, bis hin zur Dermatologie. Auch im Rahmen von Autoimmunerkrankungen stellen spezifische Antikörper eine Therapieoption dar (163).

In Zusammenschau der aktuellen Studienlage zeigen sich erhöhte Angiopoietin-2 Konzentrationen ausschließlich in pathologischen Zuständen wie beispielsweise einer schweren systemischen Inflammation (100), malignen Erkrankungen (164, 165), der systemischen Sklerose (166), etc.

In der Tumorangio-genese und -progression nimmt Angiopoietin-2 eine komplexe, kontroverse Funktion ein. Zusammen mit VEGF und Angiopoietin-1 reguliert Angiopoietin-2 die Tumorangio-genese. Einerseits stimuliert Angiopoietin-2 die Tumorangio-genese, -invasion und -metastasierung. Auf Grund der prognostischen Wertigkeit der Angiopoietin-2 Expression in verschiedenen Krebsarten wie beispielsweise Brustkrebs (164) und metastasiertem kolorektalem Karzinom (165) sowie erhöhte Angiopoietin-2 Serumkonzentrationen in Patienten mit Malignomen etablierte sich Angiopoietin-2 auch diesbezüglich als therapeutische Zielstruktur beim Einsatz von neutralisierenden Antikörpern. Andererseits wird auch Angiopoietin-2 verwendet um Tumorangio-genese und -invasion direkt zu hemmen.

Somit zeigt sich auch das Wirkungs- und Nebenwirkungsprofil von Angiopoietin-2-Antikörpern noch wenig erforscht und nur das bessere Verständnis zugrundeliegender Mechanismen kann eine bessere

Risikoeinschätzung potentieller Nebenwirkungen einer Antikörpertherapie gewähren (168, 169). Jedoch zeichnet sich eine neue Therapiemethode mit großem Potential ab, die auch in der Akutmedizin ihren Einsatz finden kann.

## 5 Zusammenfassung

Das Angiopoietin-Tie2-System nimmt eine zentrale Rolle in der Gefäßregulation der Mikrozirkulation ein. Die Rezeptor-Tyrosin-Kinase Tie2 besitzt zwei Liganden die konkurrierend, antagonistisch am Rezeptor wirken. Einerseits das gefäßstabilisierende und antiinflammatorisch wirkende Angiopoietin-1 und andererseits Angiopoietin-2 mit gefäßdestabilisierendem und proinflammatorischem Einfluss. In neuesten Untersuchungen zeigte Angiopoietin-2 eine gewichtige Rolle als prognostischer Biomarker in der Sepsis. Dieses System interagiert mit einer Reihe von weiteren endothelialen Wachstumsfaktoren wie beispielsweise PDGF-B, welches in diesem System syngem mit Angiopoietin-1 agiert und zudem einen potenten Chemoattraktant für Perizyten darstellt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die LPS-induzierte systemische Inflammation zu einer Dysregulation der Mikrozirkulation mit relevanter Erhöhung der Gefäßpermeabilität führt. Als morphologisches Korrelat konnte die Abwanderung der Perizyten um die Gefäßwände beobachtet werden. Als Folge dieser vermehrten Gefäßleckage zeigte sich eine Hypotension, die mittels nicht-invasiven Blutdruckmessungen objektiviert werden konnte. Als Folge der eingeschränkten Gewebe- und Organperfusion zeigte sich eine zunehmende Allgemeinzustandsverschlechterung der Tiere. Folglich endet die LPS-induzierte Endotoxämie im multiplen Organversagen, geschuldet der Organminderperfusion bei systemischer Hypotension.

Durch die Überexpression von PDGF-B konnte durch vermehrte Perizytenrekrutierung die Gefäßleckage signifikant verringert werden. Die durch die Perizyten am Gefäß erreichte Gefäßstabilisierung konnte zu einer Minderung der systemischen Hypotension führen. Durch das Gewähren einer ausreichenden Gewebe- und Organperfusion konnte ein besserer Allgemeinzustand der Tiere objektiviert werden. Als Resultat zeigten sich ein verlängertes Überleben der Versuchstiere sowie eine geringere Mortalität.

Auch die Übertragung des neuen Therapieansatzes in die polymikrobielle CLP-induzierte Sepsis, deren Zytokin-Kinetik und zeitlichem Verlauf eher der menschlichen Sepsis entspricht, zeigte sich ein positives Ergebnis mit gebessertem Allgemeinzustand und Überleben. Als limitierender Faktoren für den Einsatz dieses Therapieansatzes in der Akutmedizin ist vor allem die lange Dauer einer stabilen PDGF-B-Expression anzuführen. Zudem stehen der systemischen PDGF-B-Überexpression auch gravierende Nebenwirkungen wie beispielsweise Störungen der Blut-Hirn-Schranke, organbezogene und systemische Fibrosen sowie Förderung der Tumorangio-genese entgegen.

Entgegen des Therapieansatzes der vermehrten Perizytenrekrutierung durch PDGF-B wurde abschließend die Wirkung einer verminderten Perizytenabwanderung durch einen Angiopoietin-2 neutralisierenden Antikörper untersucht. In dieser Versuchsreihe konnten sogar ein besserer Allgemeinzustand und ein längeres Überleben festgestellt werden als durch die rAAV vermittelte PDGF-B Überexpression. Außerdem stellt die Verabreichung von Angiopoietin-2-Antikörpern auch in der Akutmedizin einen praktikablen Therapieansatz mit günstigerem Nebenwirkungsprofil dar.

In Zusammenschau stellt die Perizytenstabilisierung der Mikrozirkulation ein vielversprechendes Target in der modernen Sepsis Medizin dar.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µl	Mikroliter
AAV	Adeno-associated virus
AF	Atemfrequenz
Ak	Antikörper
Ang-1	Angiopoietin-1
Ang-2	Angiopoietin-2
CARS	Compensatory antiinflammatory response syndrome
CLP	Cecal ligation and puncture
CRP	C-reaktives Protein
CsCl	CäsiumChlorid
DNA	Deoxyribonucleic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetal calf serum
HF	Herzfrequenz
HMBG	High mobility group B
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Il-6, -8	Interleukin-6, -8
ITRs	Inverted terminal repeats
LPS	Lipopolysaccharid
MAP	Mean arterial pressure
MIF	Migration inhibitory factor
MMF	Medethomidin, Midazolam, Fentanyl
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule
MODS	multi organ dysfunction syndrome
mRNA	Messenger ribonucleic acid

NaCl	NatriumChlorid
NFκB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
O	Occlusion
PaCO <sub>2</sub>	Kohlendioxid-Partialdruck
PAF	Palettelet activation factor
PBS	Phosphate buffer solution
PDGF-B	Palettelet derived growth factor -B
PDGF-B	Palettelet derived growth factor receptor –B
PECAM-1	Platelet endothelial cell adhaesion moleculc -1
PEI	Polyethylenimin
rAAV	Recombinant adeno-associated virus
rpm	Rounds per minute
S1P(1)	Sphingosine-1-phosphate receptor (1)
SEM	Standard error of the mean
SGH	Second harmonics generation
SIRS	Systemic inflammatory respone syndrome
Temp.	Temperatur
TGF-α, -β	Tumor growth factor -α, -β
TLR-4	Toll-like-receptor-4
TNF	Tumor necrosis factor
tPA	Tissue-type plasminogen activator
VPR	Volume pressure recording
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indoyl-b-D-galactopyranoside
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZVD	Zentraler Venendruck

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1</b> Definition des Systemic Inflammatory Response Syndrome .....	8
<b>Abb. 2</b> Von der systemischen Inflammation hin zum Septischen Schock.....	9
<b>Abb. 3</b> Pathophysiologie der Sepsis .....	11
<b>Abb. 4</b> Endothelzell-Perizyten-Interaktion in Gefäßen der Mikrozirkulation. ....	12
<b>Abb. 5</b> Elektronenmikroskopische Darstellung eines Perizyten auf der Oberfläche einer arteriellen Kapillare.....	14
<b>Abb. 6</b> Konzentrationen von zirkulierendem Angiopoietin-2 .....	17
<b>Abb. 7</b> Interaktionen der Rezeptor-Tyrosin-Kinase Tie2 .....	18
<b>Abb. 8</b> Versuchsschema des Sepsis-Modells.....	27
<b>Abb. 9</b> Übersicht über die Gruppen beider Versuchsansätze .....	28
<b>Abb. 10</b> Operationsschritte der „Cecal Ligation and Puncture“ .....	29
<b>Abb. 11</b> Übersicht des Versuchsaufbaus einer nicht-invasiven Blutdruckmessung .....	33
<b>Abb. 12</b> Screenshot einer Blutdruckmessung mit dem „Tail-Cuff-System“ .....	34
<b>Abb. 13</b> Beispiel einer Immunhistochemische Färbungen.....	36
<b>Abb. 14</b> Darstellung der Proben mit Lichtmikroskopie nach $\beta$ -Galactosidase-Reaktion .....	37
<b>Abb. 15</b> Interleukin-6-Serumkonzentration .....	40
<b>Abb. 16</b> Gefäßpermeabilität.....	41
<b>Abb. 17</b> Perizyten-dichte in PDGF-B Überexpression in der periphere Mikrozirkulation .....	42
<b>Abb. 18</b> Immunhistochemische Quantifizierung von Perizyten und Endothelzellen in der peripheren Mikrozirkulation .....	43
<b>Abb. 19</b> Perizyten-dichte in PDGF-B Überexpression im Herzmuskelgewebe .....	44

<b>Abb. 20</b> Immunhistochemische Quantifizierung von Perizyten und Endothelzellen im Herzmuskelgewebe .....	44
<b>Abb. 21</b> Nicht-invasive Blutdruckmessungen in der LPS-induzierten Endotoxämie: arterieller Mitteldruck .....	45
<b>Abb. 22</b> Sepsis-Severity-Score LPS-induzierte Endotoxämie: Verlauf.....	46
<b>Abb. 23</b> Überleben und Mortalität PDGF-B vs. Kontrolle in der LPS induzierten Endotoxämie .....	47
<b>Abb. 24</b> Sepsis-Severity-Score PDGF-B vs. Kontrolle in der CLP-induzierten Sepsis: Zeitpunkt 12 h....	48
<b>Abb. 25</b> Sepsis-Severity-Score PDGF-B vs. Kontrolle in der CLP-induzierten Sepsis: Verlauf .....	49
<b>Abb. 26</b> Überleben PDGF-B vs. Kontrolle in der CLP-induzierten Sepsis. ....	50
<b>Abb. 27</b> Mortalität PDGF-B vs. Kontrolle in der CLP induzierten Sepsis .....	51
<b>Abb. 28</b> Sepsis-Severity-Score Angiopoetin-2 Antikörper vs. Kontrolle in der CLP-induzierten Sepsis: Verlauf .....	52
<b>Abb. 29</b> Überleben Angiopoetin-2 Antikörper vs. Kontrolle in der CLP-induzierten Sepsis.....	53
<b>Abb. 30</b> Mortalität Angiopoetin-2 Antikörper vs. Kontrolle in der CLP induzierten Sepsis.....	54

## 8 Literaturverzeichnis

1. Perman SM, Goyal M, Gaieski DF. Initial emergency department diagnosis and management of adult patients with severe sepsis and septic shock. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. 2012;20:41.
2. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical care medicine*. 2001;29(7):1303-10.
3. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(16):1546-54.
4. Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, et al. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA: the journal of the American Medical Association*. 1997;278(3):234-40.
5. Heron M, Tejada-Vera B. Deaths: leading causes for 2005. *National vital statistics reports : from the Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Health Statistics, National Vital Statistics System*. 2009;58(8):1-97.
6. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive care medicine*. 2007;33(4):606-18.
7. Brunkhorst FM. Epidemiologie, Ökonomie und Praxis - Ergebnisse der deutschen Prävalenzstudie des Kompetenznetzwerkes Sepsis (SepNet). *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2006;41(01):43-4.
8. Welte T. Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. Stand: 27.12.2013. (Abgerufen am 27.12.2013).
9. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101(6):1644-55.
10. Intensivmedizin. Thieme; 2007.
11. Defining Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and Sepsis Criteria [Internet]. *Internalize Medicine*. 18.02.2012.
12. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Intensive care medicine*. 2003;29(4):530-8.
13. Denoix P. Enquete permanent dans les centres anticancereaux. *Bull Inst Nat Hyg*. 1946;1:70-5.
14. Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*. 1990;249(4975):1431-3.

15. Bone RC. Gram-positive organisms and sepsis. *Archives of Internal Medicine*. 1994;154(1):26-34.
16. Macdonald J, Galley H, Webster N. Oxidative stress and gene expression in sepsis. *British journal of anaesthesia*. 2003;90(2):221-32.
17. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signalling*. 2001;13(2):85-94.
18. Faure E, Thomas L, Xu H, Medvedev AE, Equils O, Arditi M. Bacterial lipopolysaccharide and IFN- $\gamma$  induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF- $\kappa$ B activation. *The Journal of Immunology*. 2001;166(3):2018-24.
19. Galley H, Webster N. The immuno-inflammatory cascade. *British journal of anaesthesia*. 1996;77(1):11-6.
20. Hack CE, De Groot ER, Felt-Bersma RJ, Nuijens JH, Strack Van Schijndel RJ, Eerenberg-Belmer AJ, et al. Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis. *Blood*. 1989;74(5):1704-10.
21. Bone RC. Sir isaac newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Critical care medicine*. 1996;24(7):1125-8.
22. Levi M, ten Cate H. Disseminated Intravascular Coagulation. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(8):586-92.
23. ten Cate H, Schoenmakers SH, Franco R, Timmerman JJ, Groot AP, Spek CA, et al. Microvascular coagulopathy and disseminated intravascular coagulation. *Critical care medicine*. 2001;29(7):S95-S7.
24. Ognibene F, Parker M, Natanson C, Shelhamer J, Parrillo J. Depressed left ventricular performance. Response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *CHEST Journal*. 1988;93(5):903-10.
25. Natanson C, Fink MP, Ballantyne HK, MacVittie TJ, Conklin JJ, Parrillo JE. Gram-negative bacteremia produces both severe systolic and diastolic cardiac dysfunction in a canine model that simulates human septic shock. *Journal of Clinical Investigation*. 1986;78(1):259.
26. Herold G. *Innere Medizin*. Köln: Selbstverlag; 2011. 940 p.
27. Morisaki H, Bloos F, Keys J, Martin C, Neal A, Sibbald WJ. Compared with crystalloid, colloid therapy slows progression of extrapulmonary tissue injury in septic sheep. *Journal of Applied Physiology*. 1994;77(3):1507-18.
28. McCormack D, Mehta S, Tymi K, Scott J, Potter R, Rohan M. Pulmonary microvascular changes during sepsis: evaluation using intravital videomicroscopy. *Microvascular research*. 2000;60(2):131-40.
29. Powell R, Machiedo G, Rush Jr B. Decreased red blood cell deformability and impaired oxygen utilization during human sepsis. *The American surgeon*. 1993;59(1):65-8.
30. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. *Critical care medicine*. 2002;30(5):S302-S12.

31. Landry DW, Oliver JA. The pathogenesis of vasodilatory shock. *The New England journal of medicine*. 2001;345(8):588-95.
32. Dormehl I, Hugo N, Pretorius J, Redelinguys I. In vivo assessment of regional microvascular albumin leakage during *E. coli* septic shock in the baboon model. *Circulatory shock*. 1992;38(1):9.
33. Marx G, Vangerow B, Burczyk C, Gratz KF, Maassen N, Cobas Meyer M, et al. Evaluation of noninvasive determinants for capillary leakage syndrome in septic shock patients. *Intensive care medicine*. 2000;26(9):1252-8.
34. Groeneveld AB, Bronsveld W, Thijs LG. Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. *Surgery*. 1986;99(2):140-53.
35. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*. 2003;9(6):653-60.
36. Ryan US. The endothelial surface and responses to injury. *Federation proceedings*. 1986;45(2):101-8.
37. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/pericyte interactions. *Circulation research*. 2005;97(6):512-23.
38. Rucker HK, Wynder HJ, Thomas WE. Cellular mechanisms of CNS pericytes. *Brain research bulletin*. 2000;51(5):363-9.
39. Allt G, Lawrenson J. Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs*. 2001;169(1):1-11.
40. Sims DE. The pericyte—a review. *Tissue and Cell*. 1986;18(2):153-74.
41. Tilton RG. Capillary pericytes: perspectives and future trends. *Journal of electron microscopy technique*. 1991;19(3):327-44.
42. Herman IM. *Microvascular pericytes in development and disease*. The Blood-Brain Barrier Raven Press, LTD, New York. 1993.
43. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and tissue research*. 2003;314(1):15-23.
44. Sims DE. Diversity within pericytes. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2000;27(10):842-6.
45. Cuevas P, Gutierrez-Diaz JA, Reimers D, Dujovny M, Diaz FG, Ausman JI. Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries. *Anatomy and embryology*. 1984;170(2):155-9.
46. Tilton RG, Kilo C, Williamson JR. Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries. *Microvascular research*. 1979;18(3):325-35.
47. Gerhardt H, Wolburg H, Redies C. N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken. *Developmental Dynamics*. 2000;218(3):472-9.
48. Welsch U. *Sobotta-Atlas Histologie*. Eisevier Urban & Fischer Verlag. 2005;7:200-1.

49. Lüllmann-Rauch R. Histologie: De Boeck Supérieur; 2008.
50. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. 1998;91(10):3527-61.
51. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC. Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays*. 1994;16(12):901-6.
52. Scharpfenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *Journal of cell science*. 2005;118(4):771-80.
53. Hirschi KK, D'Amore PA. Pericytes in the microvasculature. *Cardiovascular research*. 1996;32(4):687-98.
54. Ekblom P, Sariola H, Karkinen-Jääskeläinen M, Saxén L. The origin of the glomerular endothelium. *Cell differentiation*. 1982;11(1):35-9.
55. Nakamura H. Electron microscopic study of the prenatal development of the thoracic aorta in the rat. *American journal of anatomy*. 1988;181(4):406-18.
56. Mazanet R, Franzini-Armstrong C. Scanning electron microscopy of pericytes in rat red muscle. *Microvascular research*. 1982;23(3):361-9.
57. von Tell D, Armulik A, Betsholtz C. Pericytes and vascular stability. *Experimental Cell Research*. 2006;312(5):623-9.
58. Courtoy PJ, Boyles J. Fibronectin in the microvasculature: localization in the pericyte-endothelial interstitium. *Journal of ultrastructure research*. 1983;83(3):258-73.
59. Heimark RL. Cell-cell adhesion of molecules the blood-brain barrier. *The Blood-brain Barrier: Cellular and Molecular Biology*, ed Pardridge WM (Lippincott-Raven, New York). 1993:88-106.
60. Kutcher ME, Herman IM. The pericyte: Cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvasc Res*. 2009;77(3):235-46.
61. Sato Y, Rifkin DB. Inhibition of endothelial cell movement by pericytes and smooth muscle cells: activation of a latent transforming growth factor-beta 1-like molecule by plasmin during co-culture. *The Journal of cell biology*. 1989;109(1):309-15.
62. Tilton R, Miller E, Kilo C, Williamson J. Pericyte form and distribution in rat retinal and uveal capillaries. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1985;26(1):68-73.
63. Wakui S, Furusato M, Muto T, Ohshige H, Takahashi H, Ushigome S. Transforming growth factor- $\beta$  and urokinase plasminogen activator presents at endothelial cell-pericyte interdigitation in human granulation tissue. *Microvascular research*. 1997;54(3):262-9.
64. Sims DE. Recent advances in pericyte biology--implications for health and disease. *The Canadian journal of cardiology*. 1991;7(10):431-43.

65. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*. 1998;125(9):1591-8.
66. Egginton S, Hudlicka O, Brown M, Graciotti L, Granata A. *In Vivo* Pericyte–Endothelial Cell Interaction during Angiogenesis in Adult Cardiac and Skeletal Muscle. *Microvascular research*. 1996;51(2):213-28.
67. Newcomb PM, Herman IM. Pericyte growth and contractile phenotype: Modulation by endothelial-synthesized matrix and comparison with aortic smooth muscle. *Journal of cellular physiology*. 1993;155(2):385-93.
68. Davies P, Smith BT, Maddalo FB, Langleben D, Tobias D, Fujiwara K, et al. Characteristics of lung pericytes in culture including their growth inhibition by endothelial substrate. *Microvascular research*. 1987;33(3):300-14.
69. Hirschi KK, Burt JM, Hirschi KD, Dai C. Gap junction communication mediates transforming growth factor- $\beta$  activation and endothelial-induced mural cell differentiation. *Circulation research*. 2003;93(5):429-37.
70. Goumans M-J, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors. *EMBO J*. 2002;21(7):1743-53.
71. Chambers RC, Leoni P, Kaminski N, Laurent GJ, Heller RA. Global Expression Profiling of Fibroblast Responses to Transforming Growth Factor- $\beta$  1 Reveals the Induction of Inhibitor of Differentiation-1 and Provides Evidence of Smooth Muscle Cell Phenotypic Switching. *The American journal of pathology*. 2003;162(2):533-46.
72. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, Kulkarni AB, Karlsson S, Akhurst RJ. Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development*. 1995;121(6):1845-54.
73. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *Journal of Clinical Investigation*. 2003;112(8):1142-51.
74. Larsson J, Goumans M-J, Sjostrand LJ, van Rooijen MA, Ward D, Leveen P, et al. Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF- $\beta$  type I receptor-deficient mice. *Science Signaling*. 2001;20(7):1663.
75. Oh SP, Seki T, Goss KA, Imamura T, Yi Y, Donahoe PK, et al. Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling in the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(6):2626-31.
76. Urness LD, Sorensen LK, Li DY. Arteriovenous malformations in mice lacking activin receptor-like kinase-1. *Nature genetics*. 2000;26(3):328-31.
77. Arthur HM, Ure J, Smith AJ, Renforth G, Wilson DI, Torsney E, et al. Endoglin, an ancillary TGF $\beta$  receptor, is required for extraembryonic angiogenesis and plays a key role in heart development. *Developmental biology*. 2000;217(1):42-53.

78. Bourdeau A, Dumont DJ, Letarte M. A murine model of hereditary hemorrhagic telangiectasia. *Journal of Clinical Investigation*. 1999;104(10):1343-51.
79. Li DY, Sorensen LK, Brooke BS, Urness LD, Davis EC, Taylor DG, et al. Defective angiogenesis in mice lacking endoglin. *Science*. 1999;284(5419):1534-7.
80. Oshima M, Oshima H, Taketo MM. TGF- $\beta$  receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis. *Developmental biology*. 1996;179(1):297-302.
81. Yang X, Castilla LH, Xu X, Li C, Gotay J, Weinstein M, et al. Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development*. 1999;126(8):1571-80.
82. Davis S, Aldrich TH, Jones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, et al. Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*. 1996;87(7):1161-9.
83. Sato TN, Tozawa Y, Deutsch U, Wolburg-Buchholz K, Fujiwara Y, Gendron-Maguire M, et al. Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. *Nature*. 1995;376(6535):70-4.
84. Sundberg C, Kowanetz M, Brown LF, Detmar M, Dvorak HF. Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. *Laboratory investigation*. 2002;82(4):387-401.
85. Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell*. 1996;87(7):1171-80.
86. Dumont DJ, Gradwohl G, Fong G-H, Puri MC, Gertsenstein M, Auerbach A, et al. Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo. *Genes & development*. 1994;8(16):1897-909.
87. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato T, Yancopoulos G, et al. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 1999;286(5449):2511-4.
88. Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nature medicine*. 2000;6(4):460-3.
89. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277(5322):55-60.
90. Hammes H-P, Lin J, Wagner P, Feng Y, vom Hagen F, Krzizok T, et al. Angiopoietin-2 Causes Pericyte Dropout in the Normal Retina Evidence for Involvement in Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. 2004;53(4):1104-10.
91. Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(4):215-28.
92. Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Development*. 2003;130(20):4769-84.

93. Hellstrom M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development*. 1999;126(14):3047-55.
94. Leveen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes & development*. 1994;8(16):1875-87.
95. Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes & development*. 1994;8(16):1888-96.
96. Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice. *Science*. 1997;277(5323):242-5.
97. Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *The Journal of cell biology*. 2001;153(3):543-54.
98. Andreeva E, Pugach I, Gordon D, Orekhov A. Continuous subendothelial network formed by pericyte-like cells in human vascular bed. *Tissue and Cell*. 1998;30(1):127-35.
99. Zhang L, Yang N, Park J-W, Katsaros D, Fracchioli S, Cao G, et al. Tumor-derived vascular endothelial growth factor up-regulates angiopoietin-2 in host endothelium and destabilizes host vasculature, supporting angiogenesis in ovarian cancer. *Cancer research*. 2003;63(12):3403-12.
100. Orfanos SE, Kotanidou A, Glynos C, Athanasiou C, Tsigkos S, Dimopoulou I, et al. Angiopoietin-2 is increased in severe sepsis: correlation with inflammatory mediators. *Critical care medicine*. 2007;35(1):199-206.
101. Kumpers P, van Meurs M, David S, Molema G, Bijzet J, Lukasz A, et al. Time course of angiopoietin-2 release during experimental human endotoxemia and sepsis. *Critical Care*. 2009;13(3):R64.
102. Kumpers P, Lukasz A, David S, Horn R, Hafer C, Faulhaber-Walter R, et al. Excess circulating angiopoietin-2 is a strong predictor of mortality in critically ill medical patients. *Critical care (London, England)*. 2008;12(6):R147.
103. van Meurs M, Kumpers P, Ligtenberg JJ, Meertens JH, Molema G, Zijlstra JG. Bench-to bedside review: Angiopoietin signalling in critical illness - a future target? *Critical care (London, England)*. 2009;13(2):207.
104. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends in immunology*. 2006;27(12):552-8.
105. Dumont D, Yamaguchi T, Conlon R, Rossant J, Breitman M. tek, a novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene*. 1992;7(8):1471-80.
106. Iwama A, Hamaguchi I, Hashiyama M, Murayama Y, Yasunaga K, Suda T. Molecular Cloning and Characterization of Mouse *TIE* and *TEK* Receptor Tyrosine Kinase Genes and Their Expression in Hematopoietic Stem Cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;195(1):301-9.

107. Korhonen J, Polvi A, Partanen J, Alitalo K. The mouse tie receptor tyrosine kinase gene: expression during embryonic angiogenesis. *Oncogene*. 1994;9(2):395-403.
108. Partanen J, Armstrong E, Mäkelä T, Korhonen J, Sandberg M, Renkonen R, et al. A novel endothelial cell surface receptor tyrosine kinase with extracellular epidermal growth factor homology domains. *Molecular and cellular biology*. 1992;12(4):1698-707.
109. Sato TN, Qin Y, Kozak CA, Audus KL. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(20):9355-8.
110. Schnurch H, Risau W. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development*. 1993;119(3):957-68.
111. Gamble JR, Drew J, Trezise L, Underwood A, Parsons M, Kasminkas L, et al. Angiopoietin-1 is an antipermeability and anti-inflammatory agent in vitro and targets cell junctions. *Circulation Research*. 2000;87(7):603-7.
112. Stratmann A, Risau W, Plate KH. Cell type-specific expression of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 suggests a role in glioblastoma angiogenesis. *The American journal of pathology*. 1998;153(5):1459-66.
113. Suri C, McClain J, Thurston G, McDonald DM, Zhou H, Oldmixon EH, et al. Increased vascularization in mice overexpressing angiopoietin-1. *Science*. 1998;282(5388):468-71.
114. Witzenbichler B, Westermann D, Kneuppel S, Schultheiss H-P, Tschöpe C. Protective role of angiopoietin-1 in endotoxic shock. *Circulation*. 2005;111(1):97-105.
115. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, et al. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*. 2004;103(11):4150-6.
116. Roviezzo F, Tsigkos S, Kotanidou A, Bucci M, Brancaleone V, Cirino G, et al. Angiopoietin-2 causes inflammation in vivo by promoting vascular leakage. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2005;314(2):738-44.
117. Feng Y, Hagen Fv, Pfister F, Djokic S, Hoffmann S, Back W, et al. Impaired pericyte recruitment and abnormal retinal angiogenesis as a result of angiopoietin-2 overexpression. *THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS-STUTTGART*. 2007;97(1):99.
118. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2004;5(4):261-70.
119. Johnson-Léger C, Imhof BA. Forging the endothelium during inflammation: pushing at a half-open door? *Cell and tissue research*. 2003;314(1):93-105.
120. Pfaff D, Fiedler U, Augustin HG. Emerging roles of the Angiopoietin-Tie and the ephrin-Eph systems as regulators of cell trafficking. *Journal of leukocyte biology*. 2006;80(4):719-26.
121. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF- $\alpha$  and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nature medicine*. 2006;12(2):235-9.

122. Heldin C-H, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiological reviews*. 1999;79(4):1283-316.
123. Lindblom P, Gerhardt H, Liebner S, Abramsson A, Enge M, Hellström M, et al. Endothelial PDGF-B retention is required for proper investment of pericytes in the microvessel wall. *Genes & development*. 2003;17(15):1835-40.
124. Sundberg C, Ljungström M, Lindmark G, Gerdin B, Rubin K. Microvascular pericytes express platelet-derived growth factor-beta receptors in human healing wounds and colorectal adenocarcinoma. *The American journal of pathology*. 1993;143(5):1377.
125. Nishishita T, Lin PC. Angiopoietin 1, PDGF-B, and TGF- $\beta$  gene regulation in endothelial cell and smooth muscle cell interaction. *Journal of cellular biochemistry*. 2004;91(3):584-93.
126. Phelps ED, Updike DL, Bullen EC, Grammas P, Howard EW. Transcriptional and posttranscriptional regulation of angiopoietin-2 expression mediated by IGF and PDGF in vascular smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 2006;290(2):C352-C61.
127. Schultz BR, Chamberlain JS. Recombinant Adeno-associated Virus Transduction and Integration. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2008;16(7):1189-99.
128. Choi VW, McCarty DM, Samulski RJ. AAV Hybrid Serotypes: Improved Vectors for Gene Delivery. *Current gene therapy*. 2005;5(3):299-310.
129. Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. *Nat Protocols*. 2006;1(3):1412-28.
130. Thomas M, Kienast Y, Scheuer W, Bähner M, Kaluza K, Gassner C, et al. A Novel Angiopoietin-2 Selective Fully Human Antibody with Potent Anti-Tumoral and Anti-Angiogenic Efficacy and Superior Side Effect Profile Compared to Pan-Angiopoietin-1/-2 Inhibitors. *PloS one*. 2013;8(2).
131. Daugherty A, Rateri D, Hong L, Balakrishnan A. Measuring blood pressure in mice using volume pressure recording, a tail-cuff method. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2009(27).
132. Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K. Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *American journal of hypertension*. 2008;21(12):1288-91.
133. Rehberg M, Krombach F, Pohl U, Dietzel S. Label-free 3D visualization of cellular and tissue structures in intact muscle with second and third harmonic generation microscopy. *PloS one*. 2011;6(11):e28237.
134. Newman PJ. The biology of PECAM-1. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(11 Suppl):S25-9.
135. Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. *Molecular biology of the cell*. 2004;15(8):3580-90.
136. Juers DH, Matthews BW, Huber RE. LacZ beta-galactosidase: structure and function of an enzyme of historical and molecular biological importance. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 2012;21(12):1792-807.

137. Naugler WE, Karin M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends in molecular medicine*. 2008;14(3):109-19.
138. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in microbiology*. 2011;19(4):198-208.
139. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue III LW, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005;24:52-7.
140. Parker S, Watkins P. Experimental models of Gram-negative sepsis. *British journal of surgery*. 2001;88(1):22-30.
141. Remick DG, Bolgos GR, Siddiqui J, Shin J, Nemzek JA. Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock*. 2002;17(6):463-7.
142. Ebong S, Call D, Nemzek J, Bolgos G, Newcomb D, Remick D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infection and immunity*. 1999;67(12):6603-10.
143. Lakhani SA, Bogue CW. Toll-like receptor signaling in sepsis. *Current opinion in pediatrics*. 2003;15(3):278-82.
144. Salomao R, Martins PS, Brunialti MK, Fernandes Mda L, Martos LS, Mendes ME, et al. TLR signaling pathway in patients with sepsis. *Shock*. 2008;30 Suppl 1:73-7.
145. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *The Journal of Immunology*. 1999;162(7):3749-52.
146. Uemura A, Ogawa M, Hirashima M, Fujiwara T, Koyama S, Takagi H, et al. Recombinant angiopoietin-1 restores higher-order architecture of growing blood vessels in mice in the absence of mural cells. *The Journal of clinical investigation*. 2002;110(11):1619-28.
147. Stoeltzing O, Ahmad SA, Liu W, McCarty MF, Wey JS, Parikh AA, et al. Angiopoietin-1 inhibits vascular permeability, angiogenesis, and growth of hepatic colon cancer tumors. *Cancer research*. 2003;63(12):3370-7.
148. Hawighorst T, Skobe M, Streit M, Hong Y-K, Velasco P, Brown LF, et al. Activation of the tie2 receptor by angiopoietin-1 enhances tumor vessel maturation and impairs squamous cell carcinoma growth. *The American journal of pathology*. 2002;160(4):1381-92.
149. De Backer D, Cortes DO, Donadello K, Vincent J-L. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. *Virulence*. 2013;5(1):0--1.
150. Parikh SM, Mammoto T, Schultz A, Yuan HT, Christiani D, Karumanchi SA, et al. Excess circulating angiopoietin-2 may contribute to pulmonary vascular leak in sepsis in humans. *PLoS Med*. 2006;3(3):e46.
151. Hotchkiss RS, Karl IE. *The Pathophysiology and Treatment of Sepsis*. *New England Journal of Medicine*. 2003;348(2):138-50.
152. Marx G. Fluid therapy in sepsis with capillary leakage. *European journal of anaesthesiology*. 2003;20(6):429-42.

153. Luz Fiusa MM, Costa-Lima C, de Souza GR, Vigorito AC, Penteadó Aranha FJ, Lorand-Metze I, et al. A high angiopoietin-2/angiopoietin-1 ratio is associated with a high risk of septic shock in patients with febrile neutropenia. *Critical care (London, England)*. 2013;17(4):R169.
154. David S, Mukherjee A, Ghosh CC, Yano M, Khankin EV, Wenger JB, et al. Angiopoietin-2 may contribute to multi-organ dysfunction and death in sepsis. *Crit Care Med*. 2012;40(11):3034-41.
155. Siner JM. A tale of two ligands: angiopoietins, the endothelium, and outcomes. *Critical care (London, England)*. 2013;17(5):1007.
156. Niu F, Yao H, Liao K, Buch S. HIV Tat 101-mediated loss of pericytes at the blood-brain barrier involves PDGF-BB. *Therapeutic targets for neurological diseases*. 2015;2(1).
157. Wong AD, Ye M, Levy AF, Rothstein JD, Bergles DE, Searson PC. The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Frontiers in Neuroengineering*. 2013;6:7.
158. Aono Y, Kishi M, Yokota Y, Azuma M, Kinoshita K, Takezaki A, et al. Role of platelet-derived growth factor/platelet-derived growth factor receptor axis in the trafficking of circulating fibrocytes in pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2014;51(6):793-801.
159. Kaviani N, Servettaz A, Marut W, Nicco C, Chereau C, Weill B, et al. Sunitinib inhibits the phosphorylation of platelet-derived growth factor receptor beta in the skin of mice with scleroderma-like features and prevents the development of the disease. *Arthritis and rheumatism*. 2012;64(6):1990-2000.
160. Perros F, Montani D, Dorfmüller P, Durand-Gasselín I, Tcherakian C, Le Pavec J, et al. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(1):81-8.
161. Lindberg N, Holland EC. PDGF in gliomas: more than just a growth factor? *Upsala journal of medical sciences*. 2012;117(2):92-8.
162. Guo P, Hu B, Gu W, Xu L, Wang D, Huang HJ, et al. Platelet-derived growth factor-B enhances glioma angiogenesis by stimulating vascular endothelial growth factor expression in tumor endothelia and by promoting pericyte recruitment. *Am J Pathol*. 2003;162(4):1083-93.
163. Neye DH. Monoklonale Antikörper: Ximab, Zumab und Umab als Arzneimittel. *Pharmazeutische Zeitung online*. 2006;43/2006.
164. Li P, He Q, Luo C, Qian L. Diagnostic and prognostic potential of serum angiopoietin-2 expression in human breast cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2015;8(1):660-4.
165. Jary M, Vernerey D, Lecomte T, Dobi E, Ghiringhelli F, Monnier F, et al. Prognostic value of angiopoietin-2 for death risk stratification in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2015;24(3):603-12.
166. Michalska-Jakubus M, Kowal-Bielecka O, Chodorowska G, Bielecki M, Krasowska D. Angiopoietins-1 and -2 are differentially expressed in the sera of patients with systemic sclerosis: high angiopoietin-2 levels are associated with greater severity and higher activity of the disease. *Rheumatology (Oxford, England)*. 2011;50(4):746-55.

167. Theelen TL, Lappalainen JP, Sluimer JC, Gurzeler E, Cleutjens JP, Gijbels MJ, et al. Angiopoietin-2 blocking antibodies reduce early atherosclerotic plaque development in mice. *Atherosclerosis*. 2015;241(2):297-304.
168. Hu B, Cheng SY. Angiopoietin-2: development of inhibitors for cancer therapy. *Current oncology reports*. 2009;11(2):111-6.
169. Kim I, Kim J-H, Moon S-O, Kwak HJ, Kim N-G, Koh GY. Angiopoietin-2 at high concentration can enhance endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. *Oncogene*. 2000;19(39):4549-52.

## 9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ch. Kupatt möchte ich zunächst für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes herzlich bedanken. In jeder Phase der Entstehung der Arbeit und darüber hinaus erfuhr ich stets Unterstützung.

Besonderen Dank möchte ich für die Einführung in die Welt der experimentelle Forschung aussprechen und im Verlauf die stets anhaltende Förderung. Zudem möchte ich mich für die Ermutigung und Unterstützung bei Teilnahme an Kongressen bedanken und nicht zuletzt für die Möglichkeit von Forschungsaufenthalten im Ausland, um weitere wertvolle Erfahrungen zu sammeln.

Mein besonderer Dank gilt zudem meinem Betreuer Herrn Dr. Tilman Ziegler und Frau Dr. Rabea Hinkel für die mühevollen und geduldigen Einarbeitung sowie im Verlauf für stetige sachkundige, erfahrene Unterstützung in allen Belangen. Die stetige Motivation und enge Zusammenarbeit haben wesentlich zum Entstehen der Arbeit beigetragen.

Außerdem möchte ich mich bei allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe bedanken, besonders bei Herrn Cuong Kieu und Frau Elisabeth Raatz für die erfahrene und sachkundige Hilfe bei technischen Fragen und für die Unterstützung beim Erlernen neuer Methoden.

Besonders möchte ich mich bei meinen Mitdoktoranden bedanken, besonders bei Frau Vanessa Pfetsch für die Einführung in Thema und Methodik sowie die stetige angenehme Zusammenarbeit. Herrn Sascha d'Almada möchte ich für die gewissenhafte Fortführung des Projektes danken.

## Eidesstattliche Versicherung

Weinmann, Karolina Maria

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema  
Der protektive Effekt von PDGF-B in der Endotoxämie und polymikrobiellen Sepsis

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ulm, 26.01.2017

---

Ort, Datum

---

Unterschrift Doktorandin/Doktorand