

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

**Das T-Zell-spezifische Adapterprotein (TSA_d) in der Vermittlung
septischer Hyperzirkulation**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Morad Asadi
aus Der El Asad / Israel
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Kupatt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Joseph Briegel
PD Dr. Johannes Tschöpf

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 01.10.2020

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 VEGF-Faktoren und VEGF-Rezeptoren	1
1.1.1 Die VEGF-Faktoren	1
1.1.2 VEGFR-Tyrosinkinasen und ihre Verteilung im Körper	3
1.1.3 Bindung der VEGF-Faktoren an den VEGF-Rezeptoren	4
1.1.4 Signalling der VEGF-Rezeptoren	5
1.2 Das T-Zell-spezifische Adapter (TSAd)	5
1.3 Die Src-Familie von Tyrosinkinasen	6
1.4 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)	6
1.5 VEGF/STAT3-Interaktion	7
1.6 VE-Cadherin	8
1.7 TSAd vermittelte VEGF abhängige Regulierung der Endothelbarriere	9
1.8 Perizyten	12
1.8.1 Perizyten und glatte Muskelzellen	12
1.8.2 Funktion der Perizyten	14
1.9 Sepsis	14
1.9.1 Definition	14
1.9.2 Epidemiologie der Sepsis	15
1.9.3 Pathophysiologie der Sepsis	16
1.9.4 Aktuelle Probleme in der Sepsistherapie	20
1.10 Zielsetzung	20
2. Materialien und Methoden	21
2.1 Herstellung von induzierbaren TSAd-shRNA Expressionskonstrukte	21
2.1.1 Klonieren der TSAd-shRNA-Sequenzen	21
2.1.2 Restriktion des Eintrittsvektorplasmid (pENTR-THTIII)	23
2.1.3 Ligierung der Inserts in das pENTR-THTIII-Eintrittsvektor-Plasmid	24
2.1.4 Transformation von kompetenten Zellen und Selektion auf Gentamicin-Platten	24
2.1.5 Umklonieren der Inserts mit Hilfe der LR-Klonase-Reaktion	25
2.2 Lentivirus-Produktion und Generierung von TSAd-knock down Zellen	27
2.2.1 Vorbereitung der HEK-293T-Zellen für Transfektion	28
2.2.2 Transfektion von HEK-Zellen	28
2.2.3 Ernte der Lentiviren	28
2.2.4 Puromycin-Kill-Kurve	29
2.2.5 Transduktion von b.End.3-Zellen mit shRNA-kodierenden Lentiviren	29
2.2.6 Regulation der TSAd-shRNA-Expression (induzierbares System)	30
2.3 Zellkulturmodell der Sepsis	31
2.4 Western Blotting	31
2.5 Immunfluoreszenz-Färbung in Zellkultur	32
2.6 Versuchstiere	33
2.7 Tierversuchsablauf	33
2.8 Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis	34
2.9 Narkose	34
2.10 Nicht-invasive Blutdruckmessung	35

Inhaltsverzeichnis

2.11 Organernte und Aufbereitung	36
2.12 Histologie/Immunfluoreszenz	36
2.13 Mikroskopie	37
2.14 Statistik	37
2.15 Tabellen zur Zusammenfassung der verwendeten Materialien und Zubehör	37
2.15.1 Antikörper	37
2.15.2 Chemikalien	38
2.15.3 Geräte	38
2.15.4 Histologie	39
2.15.5 Medien und Zusatzstoffe	39
2.15.6 Substanzen und Materialien für die Klonierung	39
2.15.7 Sequenzierprimer	40
2.15.8 DNA-Sequenzen der TSAAd-shRNA	40
2.15.9 Western Blotting	41
2.15.10 Zubereritug von Puffer/Lösungen	41
2.15.11 Zellkultur	42
3. Ergebnisse	43
3.1 Modell der Sepsis in vitro	43
3.1.1 Immunfluoreszenzfärbung für VE-Cad/STAT3	43
3.1.2 Signalproteine in MLECs-Lysate nach Inkubation mit CM/2	44
3.1.3 Signalproteine in b.End.3-Zell-Lysate nach Inkubation mit vollem CM	44
3.1.4 Signalproteine in b.End.3-Zell-Lysate nach Inkubation mit LPS	48
3.1.5 Signalproteine in b.End.3-Zell-Lysate nach Inkubation mit TNF α	49
3.1.6 Signalproteine in b.End.3-Zell-Lysate nach Inkubation mit CM/Flt-1	49
3.1.7 Induzierbares Lentivirus-vermitteltes knock down von TSAAd	50
3.1.8 Inkubation der knock down Zellen mit CM	51
3.2 Nicht-invasive Blutdruckmessungen	52
3.3 Kapillar- und Perizytendichte im peripheren Muskel	53
3.4 Immunfluoreszenzfärbungen der Signalkaskade	53
3.4.1 C-Src-Phosphorylierung	54
3.4.2 STAT3-Translokation	54
3.4.3 VE-Cadherin-Herunterregulierung	55
3.5 Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere nach der LPS-Behandlung	57
4. Diskussion	58
4.1 Signaltransduktion unter septischen Bedingungen in vitro	58
4.2 Beteiligung von LPS an dem Zusammenbruch der endothelialen Barriere	59
4.3 Beteiligung von TNF α an dem Zusammenbruch der endothelialen Barriere	59
4.4 VEGF-Vermittelte Aktivierung von STAT3	60
4.5 TSAAd-Restaktivität und VE-Cadherin	60
4.6 Aufrechterhalten eines höheren Blutdrucks in Abwesenheit von TSAAd	61
4.7 TSAAd-Effekt auf Kapillaren und Perizyten im peripheren Muskel	62
4.8 Unterdrückung der Signalkaskade durch TSAAd-Defizienz in vivo	62
4.9 TSAAd-Defizienz verbessert die Überlebensrate von Mäusen nach LPS-Injektion	65

Inhaltsverzeichnis

5. Zusammenfassung	67
Literaturverzeichnis	70
Danksagung	81
Curriculum vitae	82

Liste der Abkürzungen

1.	
ACCP	American college of chest physicians
att	Attachment site
b.End.3-Zellen	mouse brain endothelial cells
Blk	B-lymphoid tyrosine kinase
BM	Basalmembran
BREC	retinal microvascular endothelial cells
BSA	bovine serum albumin
c-Src	Zusammengesetztes Akronym aus cellular und sarcoma
CLR	C-Typ-Lectine-Rezeptor
CM	conditioned medium
Csk	c-Src-Kinase
CTD	carboxyterminale Domäne
CTK	zytoplasmatische Tyrosinkinase
DAMPs	danger-associated molecular patterns
DCs	dendritische Zellen
ddH2O	Double-distilled water
DIC	disseminated intravascular coagulation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

2.	
ECM	extracellular matrix
ERK	extracellular-signal regulated kinases
Etbr	Ethidiumbromid
FAK	focal adhesion kinase
FCS	fetal calf serum
Fgr	Gardner-Rasheed feline Kinase
Flk1	fetal liver kinase 1
Flt1	fms like tyrosine kinase 1
fw	forward
Hck	hematopoietic cell kinase
HEK-Zellen	Human embryonic kidney-Zellen
i.p.	Intraperitoneal
IFN	Interferon
IHF	Integration host factor
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Form der NO-Synthase
JMD	Juxtamembrandomäne
Kb	Kilo Base
kDa	Kilo Dalton
KID	Kinaseinsertionsdomäne
LB-Medium	lysogeny broth Medium

Liste der Abkürzungen

3.	
Lck	lymphocyte-specific tyrosine kinase
LPS	Lipopolysaccharid
Lyn	Lck/Yes novel tyrosine kinase
MAP	Mean arterial pressure
MAPK	mitogen-activated protein-Kinase
MCs	Monozyten
MLECs	mouse lung endothelial cells
MODS	Multiple Organ Dysfunction Syndrom
MSC	mesenchymal stem cellx
N-Cad	neuronal cadherin
NF	nuclear factor
NG2	Neuron-glia antigen 2
NLR	Nod-artiger Rezeptor
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein
NRP	Neuropilin
Oligo	Oligomer
P-Cad	placental cadherin
PAI	Plasminogenaktivator-Inhibitor

4.	
PAK	p21 activated kinase
PAMPs	pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
pen	Penicillin
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	phosphoinositid-3-Kinase
PIGF	placental growth factor
PRRs	pattern recognition receptors
rev	reverse
RLR	RIG-I-ähnlicher Rezeptor
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
SBE	Smad binding element
SCCM	Society of critical care medicine
Scr	scrambled
shRNA	small hairpin RNA

Liste der Abkürzungen

5.	
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SOC-Medium	Super Optimal broth with Catabolite repression
STAT	Signal transducer and activator of transcription
strep	Streptomycin
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TBS-T	Tris-buffered saline with Tween20
TCR	T cell receptor
TIR	Toll-Interleukin receptor
TK	Tyrosinkinase
TLR	Toll-like Rezeptore
TMD	Transmembrandom äne
TNF	Tumornekrosefaktor
TPLSM	Two-photon laser scanning microscopy
TSA_d	T cell-specific adapter protein
VE-Cad	vacular endothelial cadherin
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VEGFR_{TK}	VEGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen

6.	
VPR	Volume-Pressure-Recording
WT	Wild type
Yrk	Yes-related kinase
ZO1	Zonula occludens-1

1. Einleitung

1.1. VEGF-Faktoren und VEGF-Rezeptoren

Die VEGFs (vascular endothelial growth factors) bilden eine Gruppe von Wachstumsfaktoren, die eine entscheidende Rolle in der Regulation der Endothelzellaktivität und der vaskulären Funktion spielen. Sowohl im Erwachsenen als auch im Embryo ist das genaue Zusammenspiel der einzelnen Faktoren dieser Gruppe für die Funktion von Blut- und Lymphgefäßen sowie für das Immunsystem von sehr großer Bedeutung.

Es sind 5 Glykoproteine der VEGF-Familie bekannt: VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD und der plazentare Wachstumsfaktor (PLGF). Sie haben jeweils ein Molekulargewicht von ungefähr 40 Kilo Dalton (kDa) und sind in folgenden Regionen im humanen Genom kodiert:

VEGFA: (6p12)

VEGFB: (11q13)

VEGFC: (4q34.1-q34.3)

VEGFD: (Xp22.31)

PLGF: (14q24-q31)

Die verschiedenen Genprodukte binden als Liganden mit unterschiedlicher Affinität an VEGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (VEGFR TK)^{1,2}.

1.1.1 Die VEGF-Faktoren

Die 5 Mitglieder der VEGF-Familie sind unter Wirbeltierarten konserviert. Sie zeigen eine strukturelle Homologie zu PDGF (platelet derived growth factor) und gehören zur Gruppe der sogenannten Cystein-Knoten-Superfamilie von Polypeptidfaktoren. Diese kommen in vielzelligen Organismen vor und werden als Polypeptide mit einer hochkonservierten Rezeptor-bindenden Cystein-Knoten-Struktur sezerniert.

Als gemeinsames Merkmal hat diese Familie acht konservierte Cysteinreste an festen Positionen, die die typische Cystein-Knoten-Struktur durch die Verknüpfung von Disulfidbindungen bilden (Abbildung.1). Unter den 8 Cysteinen bilden 6 Reste 3 S-S intramolekulare Bindungen und erzeugen somit 3 Schleifenstrukturen. Die verbleibenden 2 Cysteine bilden 2 S-S-intermolekulare Bindungen, die zur stabilen Homo- oder Heterodimerstruktur von VEGF beitragen (Abbildung.1). Es werden bevorzugt Homodimere gebildet^{1,2,3,4}.

Durch den Prozess des alternativen Spleißens entstehen bei den einzelnen VEGFs verschiedene Isomere unterschiedlicher Länge, biologischer Wirkung und Fähigkeit,

Co-Rezeptoren zu binden, sezerniert zu werden oder an ECM (extracellular matrix) gebunden zu werden^{5,6}.

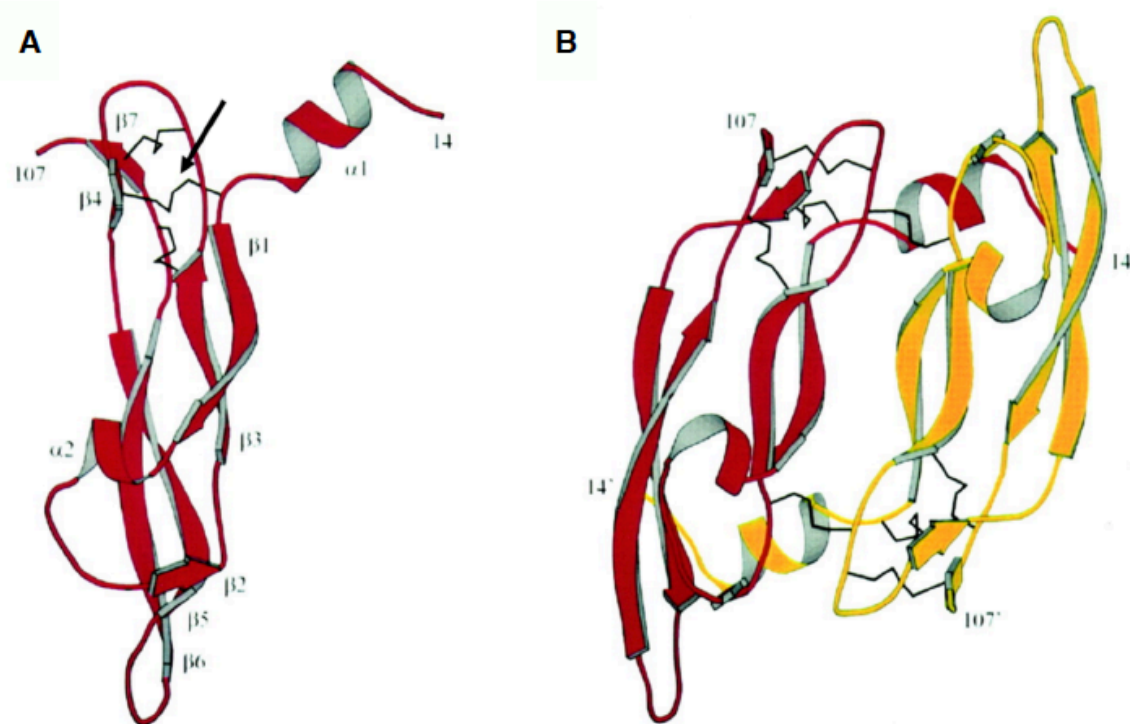


Abbildung 1: Banddarstellung der Rezeptorbindungsdomäne von VEGF. In A, ein VEGF-Monomer mit der typischen Cystein-Knoten-Struktur. Der Pfeil markiert eine intramolekulare S-S-Bindung, die als schwarze Linie im charakteristischen Cystein-Knoten-Motiv dargestellt wird. In B, ein VEGF-Dimer in antiparalleler Organisation

(modifiziert nach Hoeben et al.)¹⁰⁷

Das alternative Spleißen des menschlichen VEGFA, das eine konservierte Acht-Exon-Struktur besitzt (alle andere VEGFS besitzen eine Sieben-Exon-Struktur) führt zu mindestens sechs verschiedenen Transkripten, die Isoformen der folgenden Längen der Aminosäuresequenzen kodieren:

VEGFA 121

VEGFA 145

VEGFA 165

VEGFA 165b

VEGFA 183

VEGFA 189

VEGFA 206

Außer VEGFA 121, besitzen die verschiedenen Isoformen eine basische Grundstrecke nahe dem Carboxyterminus, die ihnen die Bindung an sauren Membranproteinen wie Co-Rezeptoren oder an ECM ermöglicht. Die Isoformen 121, 145, 165 und 165b werden sezerniert und die Isoformen 183, 189 und 206 bleiben an ECM gebunden, sie können aber durch Spaltung freigesetzt werden. Die Isoform 165b ist eine inhibitorische Spleißvariante des VEGFA 165¹.

VEGFA165 ist die häufigste und biologisch aktivste Form von VEGF, die auch sehr effektiv sezerniert wird und Co-Rezeptoren wie NRP1 (Neuropilin 1) und NRP2 binden kann (Abbildung.2). Kürzlich wurde eine weitere Subvariante von VEGFA (VEGFAxxx_b) in Menschen beschrieben, die den VEGFR (VEGF-Rezeptor) viel schwächer aktiviert als das normale VEGFA^{1,7}.

Zusätzlich zum alternativen Spleißen werden manche VEGFs durch proteolytische Verarbeitung reguliert. Dieser Mechanismus kann den Faktoren die Bindung an spezifischen Rezeptoren ermöglichen². Die Faktoren VEGFC und VEGFD werden als Vorstufen produziert und durch Proteasen wie Furin sowohl an dem amino- als auch an dem carboxyterminalen Abschnitt gespalten und dadurch aktiviert⁷.

1.1.2 VEGFR-Tyrosinkinasen und ihre Verteilung im Körper

Die VEGFRs sind ähnlich wie die PDGF-Rezeptor-Familie typische Rezeptortyrosinkinasen (RTK) mit einer extrazellulären Domäne von ungefähr 750 Aminosäuren für die Ligandbindung. Diese Domäne ist in sieben Immunoglobulin (Ig)-ähnliche Falten organisiert und ist mit einer einzelnen Transmembranregion verbunden, der eine gespaltene Tyrosinkinasedomäne folgt, die durch ein 70-Aminosäurekinaseinsert unterbrochen wird, und von einem C-terminalen Schwanz gefolgt wird^{7,8} (Abbildung.2).

Der Effekt der VEGFs auf Körpergewebe ist zum einen von den jeweiligen VEGF-Liganden, zum anderen von der Rezeptorverteilung und Rezeptortyp (Abwesenheit oder Existenz einer Tyrosinkinaseaktivität) abhängig^{7,8}.

Es sind 3 VEGFRs im Körper des Menschen bekannt: VEGFR1 (Flt1), VEGFR2 (Flk1) und VEGFR3 (Abbildung.2). Die posttranskriptionale Modifikation von den VEGFRs führt zu sezernierten Varianten von VEGFR1 (sVEGFR1) und VEGFR2 (sVEGFR2) (Abbildung.2) und in Menschen zu einem C-Terminal verkürzten VEGFR3. Zwar zeigen die VEGFRs eine gewisse Überlappung in ihrem Expressionsmuster, aber sie sind generell wie folgt im Körper verteilt: VEGFR1 in Monozyten und Makrophagen, VEGFR2, der als frühester Marker für vaskuläre Endothelzellen bekannt ist, kommt in vaskulären Endothelzellen vor. VEGFR3 ist in lymphatischen Endothelzellen lokalisiert^{5,9}.

1.1.3 Bindung der VEGF-Faktoren an den VEGF-Rezeptoren

VEGFR1 bindet VEGFA, VEGFB und PlGF. VEGFA bindet sowohl an sVEGFR1 als auch an den VEGFR1 mit voller Länge. Im vaskulären System weist der VEGFR1 eine beeinträchtigte Kinaseaktivität auf, während er in Monozyten nach der Bindung von VEGFB und PlGF intrazelluläre Signalwege wie ERK, MAPK, PI3K und p38MAK induziert^{5, 10}. Die Funktion vom VEGFR1 im vaskulären System beinhaltet "Ligand Trapping" und Rezeptor-Homo- und Heterodimerisierung (Abbildung.2)⁵.

VEGFR2 bindet VEGFA mit stärkster Affinität, VEGFC und VEGFD können durch proteolytische Prozessierung an den VEGFR2 binden (Abbildung.2), jedoch binden diese beiden Faktoren an VEGFR2 mit geringerer Affinität als an VEGFR3².

Die verschiedenen Faktoren bilden bevorzugt Homodimere, die nach der Bindung an ihren Rezeptoren eine Rezeptor-Homo- oder Heterodimerisierung induzieren (Abbildung.2)⁵.

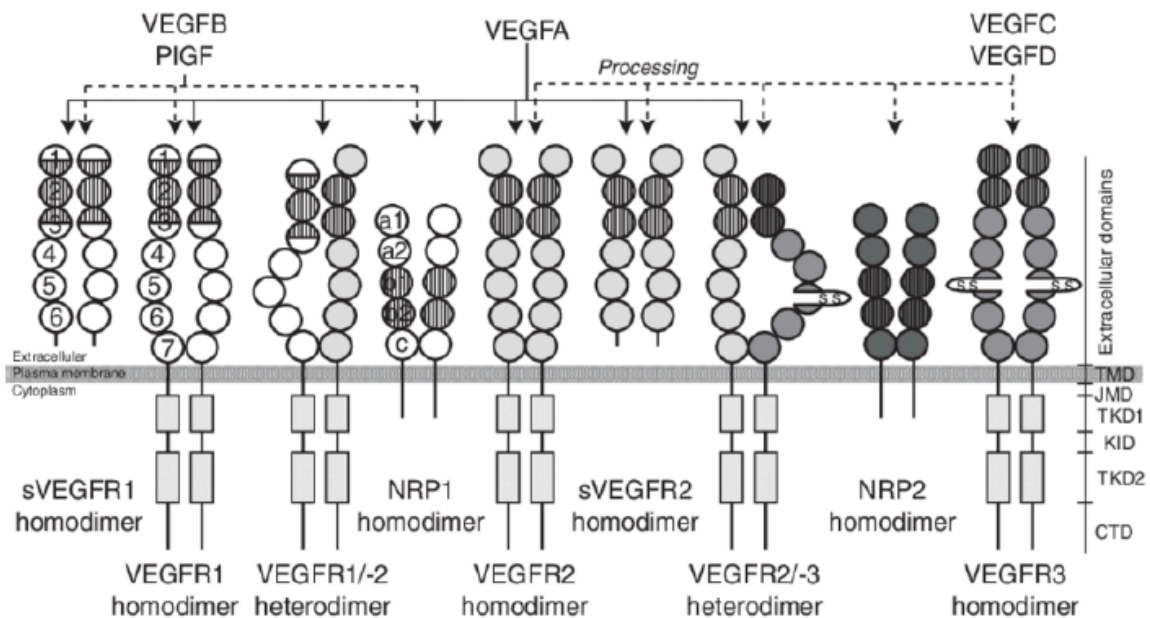


Abbildung 2: Zeigt die 5 VEGF-Faktoren und ihre Rezeptoren. VEGFs binden mit unterschiedlichen Affinitäten an drei VEGFR TK und zwei NRP-Korezeptoren und initiieren eine Homo- oder Heterodimerbildung. Die extrazellulären Domänen von VEGFRs und NRPs, die an der VEGF-Bindung beteiligt sind, sind durch schraffierte Kreise gekennzeichnet. PlGF, Plazentarer-Wachstumsfaktor; sVEGFR1, löslicher VEGFR1; sVEGFR2, löslicher VEGFR2; TMD, Transmembrandomäne; JMD, Juxtamembrandomäne; TKD1, ATP-Bindungsdomäne; KID, Kinaseinsertionsdomäne; TKD2, Phosphotransferasedomäne; CTD, carboxyterminale Domäne.

(modifiziert nach Koch et al.)⁵

1.1.4 Signalling der VEGF-Rezeptoren

Nach der Bindung der VEGFs an die entsprechenden Rezeptoren, führt die daraus resultierende Änderung der Rezeptorkonformation zur Exposition von ATP-Bindungsstellen in der intrazellulären Kinasedomäne mit Kinaseaktivierung und Auto- oder Transphosphorylierung von Tyrosinresten am Rezeptordimer selbst sowie an nachgeschalteten Signalwandlern⁵. Phosphorylierte Tyrosinreste und Carboxy-terminale Aminosäurereste des Phosphotyrosins stellen Bindungsstellen für intrazelluläre Signalmediatoren mit SH2-Domänen dar, die die Bildung von intrazellulären Signalketten ermöglichen. Diese führen zu diversen VEGFR-vermittelten biologischen Reaktionen in den Zielzellen^{5, 10}.

1.2 Das T-Zell-spezifische Adapter (TSAd)

Das T-Zell-spezifische Adapterprotein (TSAd) -auch unter VEGFR-assoziiertem Protein (VRAP) bekannt- ist ein klassisches ungefähr 46 kDa-intrazelluläres Adapterprotein, das durch das SH2D2A-Gen kodiert wird und eine zentrale SH2-Domäne, ein C-terminales Prolin-reiches SH3-Bindungsmotiv und mehrere potentielle Phosphotyrosinstellen enthält^{11, 12, 13, 14}. Es wurde anfänglich gezeigt, dass TSAd in peripheren Blut-T-Zellen in Menschen und Mäusen exprimiert wird¹³. In T-Zellen wird TSAd erst exprimiert, nachdem die anfängliche Aktivierung von naiven T-Zellen aufgetreten ist.

Es wurde berichtet, dass TSAd seine Rolle bei der Regulation der Aktivierung von T-Zellen durch die Hemmung der Signalübertragung vom T-Zell-Rezeptor (TCR)-Komplex spielt^{14, 15, 16}. Dies geht einher mit der Tatsache, dass das Fehlen von TSAd in T-Zellen *in vivo* eine systemische Autoimmunität induziert¹⁷. Später wurde eine Expression von TSAd auch in Endothelzellen und anderen Organzellen beschrieben¹³.

Im Jahre 2012, zeigten Sun et al TSAd als Vermittler der VEGF-induzierten vaskulären Permeabilität in einem Tiermodell. Durch zusätzliche *in vitro* Experimente wurde die Bindungsstelle am aktivierten VEGFR2 identifiziert, an die TSAd mit höchster Affinität bindet (Y951 in Menschen, Y949 in Mäusen) und konsequenterweise die Phosphorylierung der stromabwärts gelegenen zytoplasmatischen TK (c-Src) (Siehe 1.3) an der Position Y418 in Endothelzellen vermittelt. Es wurde außerdem eine TSAd-abhängige Komplexbildung zwischen phosphoryliertem c-Src und VE-Cad (Siehe 1.6) nach VEGF-Stimulation sowie eine Reorganisation von VE-Cad an der Zellgrenze in der Zellkultur gezeigt¹². Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von TSAd in der Regulation der interendothelialen Zell-Zell-Verbindungen als Antwort auf die VEGF-Stimulation.

Da es genug Daten über einen erhöhten VEGF-Spiegel unter septischen Bedingungen in Menschen sowie in Tieren vorliegen¹⁰⁵, sollte die Interaktion von TSAd mit dem VEGFR2 in Endothelzellen unter septischen Bedingungen näher untersucht und die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der VEGF-vermittelten Permeabilitätssteigerung ausgearbeitet werden.

1.3 Die Src-Familie von Tyrosinkinasen

Tyrosinkinasen spielen eine Rolle in der Modifizierung von Proteinen, indem sie die Phosphorylierung von Tyrosinresten katalysieren. Die resultierende Phosphotyrosinmodifikation (pTyr) kann dann von einem anderen Protein mit SH2 oder SH3-Domäne erkannt werden, die spezifisch pTyr bindet^{18,19}.

Tyrosinkinasen werden in RTKs und zytoplasmatische Tyrosinkinasen (CTKs) unterteilt, die auch als Nicht-Rezeptortyrosinkinasen bekannt sind²⁰. CTKs, die eine eigene SH2-Domäne enthalten, signalisieren häufig downstream von RTKs. Darüber hinaus kann die Bindung einer CTK an RTK oder an andere phosphorylierte Proteine durch ihre SH2-Domäne zur Aktivierung des CTK führen²¹.

Die Src-Familie von Tyrosinkinasen bildet eine eng verwandte Gruppe von CTKs, die eine entscheidende Rolle bei der eukaryotischen Signaltransduktion spielen¹⁹. Sie sind in allen Metazoa-Zellen vorhanden, wo ihre regulierte Aktivierung durch verschiedene Wachstumsfaktor-, Cytokin-, Adhäsions- und Antigen-Rezeptoren für die Erzeugung einer geeigneten zellulären Reaktion auf äußere Reize kritisch ist. Diese Familie besteht aus 9 Mitgliedern: Src, Lck, Hck, Fyn, Blk, Lyn, Fgr, Ja und Yrk^{22, 23}. Sie sind hochkonservierte Signalproteine, bei denen einer katalytischen Tyrosinkinasedomäne zwei Peptidbindungsmodule vorangehen, die Src-Homologiedomänen SH2 und SH3. Diese Module binden an Ziele, die Phosphotyrosine bzw. Polyproline Typ II-Helices enthalten und vermitteln die Bildung von Protein-Protein-Komplexen während der Signalübertragung²³.

Die SH2-Domäne in Src-Kinasen interagiert nicht nur mit Phosphotyrosinresten anderer Proteine, sondern mit einem Phosphotyrosinrest in den Src-Kinasen selbst (Tyr 527 in c-Src). Diese Wechselwirkung führt zu einer Unterdrückung der katalytischen Aktivität von c-Src. Diese inhibitorische Phosphorylierung an Tyr527 wird durch die c-Src-Kinase (Csk) durch Schaffung einer intramolekularen Bindungsstelle für die Src-SH2-Domäne vermittelt^{23, 24, 25}. Andererseits, führt die Phosphorylierung vom Tyrosinrest 416 (Tyr416) zu einer Aktivierung von c-Src²⁶. Tyr416 und Tyr527 haben daher entgegengesetzte Effekte auf die katalytische Aktivität, wenn eine Phosphorylierung dort stattfindet.

Außerdem wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt, dass c-Src durch Phosphorylierung an Tyr418 und reduzierte Phosphorylierung an Tyr527 TSAd abhängig regulatorisch aktiviert werden kann¹².

1.4 Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)

STAT3 ist ein ungefähr 80 kDa großer Transkriptionsfaktor, der früher unter dem Namen Akute-Phase-Response-Faktor (APRF) bekannt war. Er ist Mitglied einer Familie von Transkriptionsfaktoren (STAT1 bis STAT6) mit SH2-Domänen, die durch Tyrosinphosphorylierung als Antwort auf eine große Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Nach der Aktivierung bilden die STATs Homo-

oder Heterodimere, die dann in den Zellkern translozieren, wo sie die Transkription einer Reihe von Zielgenen aktivieren²⁷⁻³².

Es wurde bereits beschrieben, dass der STAT3-Signalweg durch die Src-Familie von TKs aktiviert werden kann. Die Src-Familie kann die direkte STAT3-Tyrosinphosphorylierung und Stimulierung der DNA-Bindungsaktivität fördern^{32, 33}.

Ebenfalls wurde bereits gezeigt, dass STAT3 durch den aktiven IL6 (Interleukin6)-Rezeptor *in vitro* durch Phosphorylierung aktiviert wird. Diese Aktivierung wurde von der Herabregulation von "Junction-Proteinen" begleitet, hauptsächlich ZO1 (Zonula occludens-1) und Occludin und in geringerem Maße auch VE-Cad. Das hat zur Folge, dass die endotheliale Permeabilität erhöht wird³⁴. Zusätzlich wurde aktiviertes STAT3 mit der Induktion des IL6-Gens in humanen Endothelzellen in Verbindung gebracht³⁵.

1.5 VEGF/STAT3-Interaktion

VEGF ist der Hauptantrieb der vaskulären Permeabilität über den VEGFR2³⁶. Mehrere Studien haben gezeigt, dass der distale VEGF-Promoter ein STAT3-Bindungselement enthält, das für die induzierte VEGF-Expression durch zahlreiche Zytokine, Wachstumsfaktoren, multiple onkogene Proteine und sogar Hypoxie entscheidend ist³⁷⁻⁴¹. Das zeigt, dass STAT3 als Regulator des VEGF-Gens fungieren kann.

STAT3 kann über verschiedene Mechanismen die transkriptionale Aktivierung von VEGF regulieren (Abbildung.3): Über Bindung an das erkannte STAT3-Bindungselement im VEGF-Promoter, um die Transkription direkt zu steuern (Abbildung.3A), Interaktion mit Sp1 (specificity protein 1) / Sp3 im SBE-freien Promoter (Abbildung. 3B) und Kooperative Interaktion von STAT3 mit Transkriptionsfaktoren (Abbildung.3C).

Außerdem, kann aktiviertes STAT3 in Endothelzellen als Mediator und Biomarker der VEGF-vermittelten Endothelaktivierung angesehen werden⁴². Eine Studie von Bartoli et al. hat in Endothelzellen der Rinderretina (BREC) gezeigt, dass VEGF schnell STAT3-Tyrosinphosphorylierung und nukleäre Translokation induziert, was als STAT3-abhängige VEGF-induzierte VEGF-Expression bezeichnet wird⁴³. Eine STAT3-Translokation wurde in makrovaskulären Endothelzellen der Aorta nicht beobachtet⁴³.

Die meisten Studien zur STAT3-Aktivierung wurden an Endothelzellen *in vitro* durchgeführt. Ob die Mechanismen, die hier beschrieben sind *in vivo* oder in Endothelzellen verschiedener anatomischer Herkunft im selben Tier gleich sind, das muss noch ausgearbeitet werden.

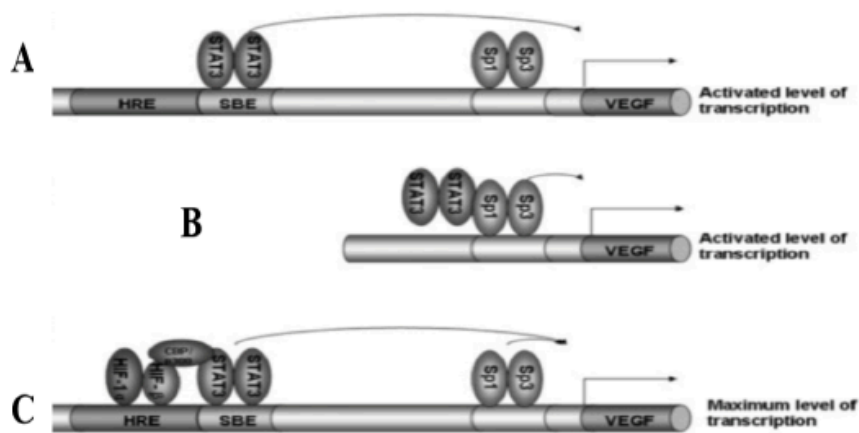


Abbildung 3: Zeigt Mögliche Mechanismen der Transkriptionsaktivierung des VEGF-Gens durch STAT3. In A, direkte Steuerung des VEGF-Promoters durch STAT3. In B, Interaktion mit den an SBE gebundenen Sp1/ Sp3. In C, maximale Transkription durch Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren.

(Modifiziert nach Chen et al)¹¹⁴

1.6 VE-Cadherin

VE-Cadherin ist ein 120 kDa großes Protein, das strikt an endothelialen Verbindungen lokalisiert ist. Es scheint der Hauptvermittler von endothelialen Zell-Zell-Kontakten zu sein. Es gehört zu der Gruppe der Cadherine, eine Gruppe von Calcium-abhängigen adhäsiven Proteine, die Interaktion zwischen Zellen vermitteln⁴⁴.

Jeder Cadherin-Typ hat ein typisches Gewebeverteilungsmuster. Für die meisten von ihnen ist die Expression nicht nur auf einen Zelltyp beschränkt und mehr als ein Cadherin-Typ kann an der Oberfläche einer bestimmten Zelle nachgewiesen werden. Es wurde demonstriert, dass Endothelzellen N-Cad, VE-Cad und in geringerem Maße P-Cad exprimieren^{45, 46}. Unter diesen wird nur VE-Cad spezifisch in Endothelzellen exprimiert. Weiterhin ist VE-Cad konsistent mit interzellulären Verbindungen assoziiert, während N-Cad auf der Zellmembran diffus bleibt⁴⁷.

Das VE-Cad-Gen wurde ursprünglich identifiziert und unter Verwendung eines RT-PCR-Ansatzes als eines von 8 neuen Cadherinen kloniert. Cadherin5, welches später in VE-Cad umbenannt wurde, war das einzige endotheliale Cadherin unter ihnen⁴⁸.

Das VE-Cad-Gen (Locus Cdh5) mappt auf Maus-Chromosom 8, wo es mit E-Cad (Locus Cdh1), P-Cad (Locus Cdh3) und M-Cad (Locus Cdh14) Gene kolokalisiert ist, was darauf hindeutet, dass es Teil eines größeren Clusters von Cadherin-Sequenzen sein

könnte. Es besteht aus 12 Exons, die ein konventionelles Wirbeltierspleißmuster zeigen. Das erste Exon wird vollständig nicht translatiert, und beide Exons, 2 und 12 enthalten nicht translatierte Regionen⁴⁴.

Die Regulierung der Aktivität von VE-Cad oder seiner Anwesenheit an Zellkontakten ist ein wesentlicher Schritt, der die Permeabilität der Blutgefäßwand für Zellen und Substanzen steuert⁴⁹. Eine Serie von in vivo sowie in vitro Experimente bestätigten den Beweis für die Funktion von VE-Cad als Bestandteil der Endothelzellkontakte und seine Rolle als Regulator der Adhäsion von Endothelzellen^{34, 50-52}.

1.7 TSAd vermittelte VEGF-abhängige Regulierung der Endothelbarriere

In Endothelzellen spielt das Adapterprotein TSAd eine Rolle in der Vermittlung der vaskulären Reaktion auf Permeabilitätsfaktoren stromabwärts vom VEGFR2^{5, 12}.

VEGF ist der Hauptantrieb der vaskulären Permeabilität über den VEGFR2³⁶. Die Bindung von VEGFA an VEGFR2 in mikrovaskulären Endothelzellen fördert die Rezeptordimerisierung, wodurch Trans/Autophosphorylierungen von intrazellulären Tyrosinresten am Rezeptordimer selbst sowie an nachgeschalteten Signalwandlern ermöglicht wird⁵.

Eine wichtige Phosphorylierungsstelle am VEGFR2 nach VEGFA Bindung ist die Tyrosine Y951 in Menschen (Y949 in Mäusen). TSAd bindet mit höchster Affinität an Phosphotyrosin Y951 (pY951) am aktivierten VEGFR2 und präsentiert mehrere Bindungsstellen für intrazelluläre Signalmoleküle mit SH2-Domänen wie die c-Src, die die Wirkung vom aktiven VEGFR2 in Endothelzellen weiter vermittelt (Abbildung.4)^{12, 13, 53}.

Es entsteht nach Bindung von VEGF-A an VEGFR2 ein Komplex aus VEGFR2 und TSAd sowie TSAd und dem nachgeschalteten Molekül c-Src⁵³. Dieser Komplex führt in Abhängigkeit von TSAd zu einer Phosphorylierung von c-Src an der Position Y418 sowie einer Dephosphorylierung an der Position Y527 (Abbildung.4). Außerdem zeigt c-Src nach dessen Aktivierung eine leichte Phosphorylierung an anderen Stellen sowie eine Kolokalisation von aktiviertem c-Src mit VE-Cad-positiven Adhärenzverbindungen von Endothelzellen sowohl in vitro als auch in vivo¹². Diese Kolokalisation ist essentiell für die Phosphorylierung von VE-Cad durch die aktivierte c-Src mit nachfolgender Relaxation der interzellulären Kontakte, die normalerweise eine Leckage begrenzen⁵⁴.

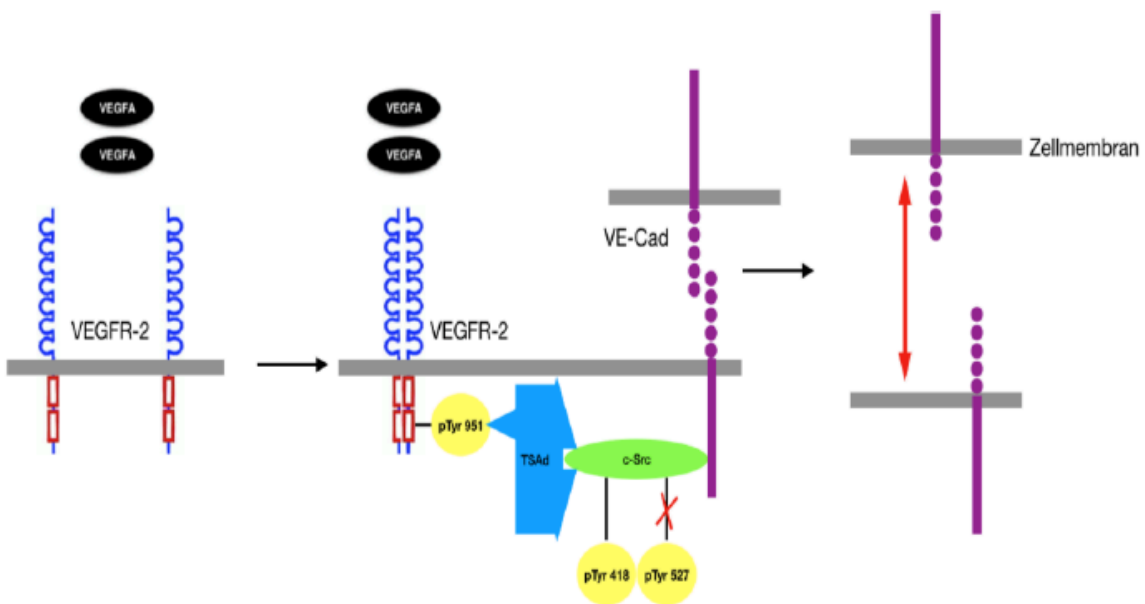


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Komplexbildung unter den aktiven VEGFR2, TSAd, c-Src und VE-Cad. Nach Bindung von VEGFA an den VEGFR2 kommt es zu einer Dimerisierung mit nachfolgender Exposition von pTyr951. TSAd vermittelt die Bindung zwischen VEGFR2 und c-Src. Die Phosphorylierung von c-Src an Tyr418 bei gleichzeitiger Dephosphorylierung an Tyr527 ist essentiell für die Interaktion des Komplexes mit dem VE-Cad und nachfolgender Relaxation interzellulärer Kontakte^{12, 54}.

Zusätzlich zur beschriebenen Lockerung der interzellulären Verbindungen, wurde ein anderer Mechanismus in Endothelzellen beschrieben, der zur Störung der Barrierefunktion beiträgt, nämlich die VEGF-vermittelte c-Src-abhängige Phosphorylierung von VE-Cad mit nachfolgender Endozytose⁵⁵.

Dieser Prozess wird durch die aktivierte c-Src vermittelt. Diese führt zur Phosphorylierung von einem Guaninnukleotid-Austauschfaktor (Vav2). Vav2-Phosphorylierung führt wiederum zur Aktivierung der GTPase (Rac), die die Serin-Threonin-Kinase (PAK) aktiviert. Aktivierte PAK führt zur Serinphosphorylierung eines hochkonservierten Motivs innerhalb des intrazellulären Schwanzes von VE-Cad, was zur Rekrutierung von β -Arrestin2 zu serin-phosphoryliertem VE-Cad führt, sodass seine Internalisierung in Clathrin-beschichteten Vesikel und der daraus folgende Abbau von interzellulären Verbindungen gefördert wird (Abbildung.5)⁵⁵.

Eine Studie von Orsenigo et al.¹⁰⁸ hat eine zusätzliche Möglichkeit der Regulation von VE-Cad durch Phosphorylierung beschrieben. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Tyrosinphosphorylierung von VE-Cad an der Position 658 und 685 (Tyr658/Tyr685) eine Rolle bei der VE-Cad-Internalisierung spielt. Dieser Mechanismus wurde für Endothelzellen im venösen System beschrieben und gilt unter inflammatorischen Bedingungen wie Histamin- oder Bradykininstimulation¹⁰⁸.

Die genauen Mechanismen der VE-Cad-Regulation durch Phosphorylierung in Endothelzellen unter septischen Bedingungen sind noch nicht genug verstanden.

Neben der direkten Wirkung von c-Src auf VE-Cad, werden fokale Zell-Zell- und Zell-extrazelluläre Matrix-Adhäsionen durch Src-abhängige Aktivierung von FAK und von $\alpha\beta 5$ -Integrin-vermittelten Matrixinteraktionen mit dem Endothelzell-Zytoskelett reguliert⁵⁶. Die Reorganisation des Zytoskeletts, die interendotheliale Adhäsionen unterbricht, wird durch die Src-stimulierte Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette weiter gefördert⁵⁷.

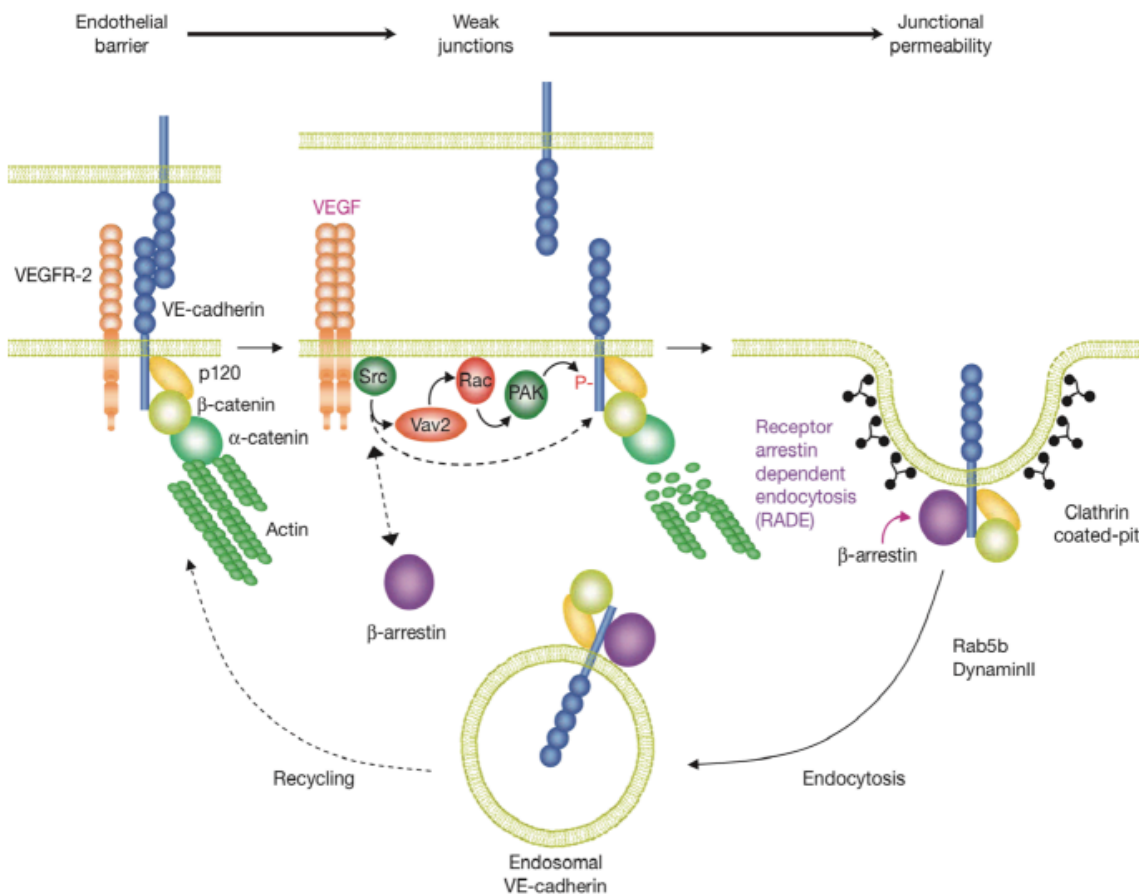


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Interaktion intrazellulärer Proteine, die an der Regulation der VE-Cad-Internalisierung beteiligt sind. Nach Bindung von VEGFA an den VEGFR2 kommt es zu einer Dimerisierung des Rezeptors mit nachfolgender Src-, Vav2-, Rac- und PAK- Aktivierung. Aktivierte PAK führt zur Serinphosphorylierung von VE-Cad. pVE-Cad rekrutiert β-Arrestin2, was zu einer Receptor-Arrestin-abhängige Endozytose (RADE) führt. Die Internalisierung erfolgt in Klathrin-beschichteten Vesikel und ist mit einer Dissoziation des VE-Cad/Catenin/Aktin-Komplex verbunden.

(Modifiziert nach Gavard, 2006)⁵⁵

1.8. Perizyten

1.8.1 Perizyten und glatte Muskelzellen

Perizyten und glatte Muskelzellen sind als murale im Gefäßsystem bekannt⁵⁸. Diese muralen Zellen haben einen komplexen Ursprung, der von ihrer Position im Embryo abhängig ist. Sie werden aus einer Vielzahl von Vorläuferzellen gebildet (glatte Muskelvorläufer). Diese umfassen mesenchymale Zellen, embryonale Neuralleistenzellen und Vorläuferzellen im embryonalen Epikard. Glatte Muskelzellen werden auch aus Endothelzellen gebildet. Die Stimulation der glatten Muskelvorläufer mit PDGF-BB veranlasst die Differenzierung in glatte Muskelzellen oder Perizyten (Abbildung.6)⁵⁹.

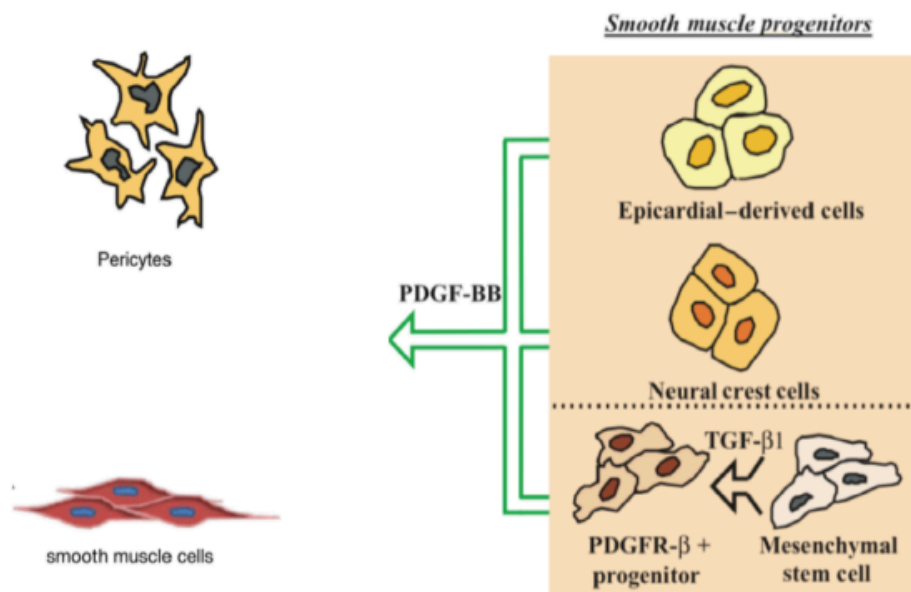


Abbildung 6: Gemeinsamer Ursprung der kontraktilen muralen Zellen im Gefäßsystem: Die Stimulation der glatten Muskelvorläufer mit PDGF-BB veranlasst die Differenzierung in glatte Muskelzellen oder Perizyten.

(Modifiziert nach Carmeliet et al)¹¹⁵

Perizyten, die muralen Zellen von Blutmikrogefäßen, wurden erstmals von Eberth beschrieben. Zwei Jahre später, beschrieb Charles-Marie Benjamin Rouget eine Population von kontraktilen Zellen, die die Endothelzellen kleiner Blutgefäße umgeben. Zimmermann nannte diese Zellen später "Rouget-Zellen" und prägte auch den Begriff der "Perizyten" in Anspielung auf ihre Lage in der Nähe der Endothelzellen⁶⁰.

Perizyten, die Kapillaren einlagern, haben einen nahezu gerundeten Zellkörper, der zu einigen primären Ausläufern führt, die auf dem Endothel in der Länge der Kapillare verlaufen. Die primären Ausläufer führen zu sekundären perpendikularen Ausläufern. Die Spitzen von den Sekundärausläufern haften fest am Endothel (Abbildung.7A).

Endothelzellen und Perizyten sind durch eine Basalmembran (BM) getrennt, die sie co-produzieren und sich teilen (Abbildung. 7B).

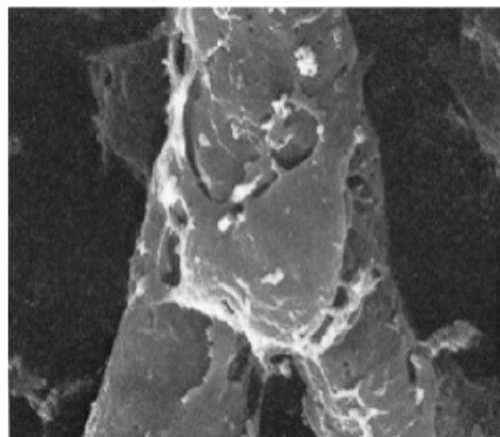
Obwohl Perizyten in der BM von Mikrogefäßen eingebettet sind⁶¹, machen sie mit mehreren Endothelzellen zahlreiche direkte Kontakte unterschiedlicher Art, wobei der größte Teil der Perizyten-Endothel-Grenzfläche durch eine BM getrennt ist (Abbildung. 7B)⁶⁰. Zu diesen direkten Kontakten gehören:

- peg-socket type: Perizyten-zytoplasmatische Zapfen in endotheliale Einlagerungen
- close or occluding contacts: Sie sind am Rande der Perizytenprozesse und spielen möglicherweise eine Verankerungsrolle
- adhesion plaques: enthalten Fibronectin und ähneln ultrastrukturell den Adhärenzverbindungen.
- Gap junctions⁶⁰⁻⁶³

Es wurde berichtet, dass glatte Muskelzellen im Gegensatz zu Perizyten nicht in die Basalmembran eingebettet sind und möglicherweise nicht direkt mit dem Endothel in Kontakt kommen⁶⁴.

Perizyten und glatte Muskelzellen teilen eine Vielzahl von phänotypischen Charakteren, was vermuten lässt, dass sie phänotypische Varianten der gleichen Linie darstellen. Da es an strikt perizyten-spezifischen Markern mangelt, erfordert die eindeutige Identifizierung dieser Zellen häufig eine Immunfärbung mehrerer Antigene oder eine sorgfältige Analyse morphologischer Kriterien.

A



B

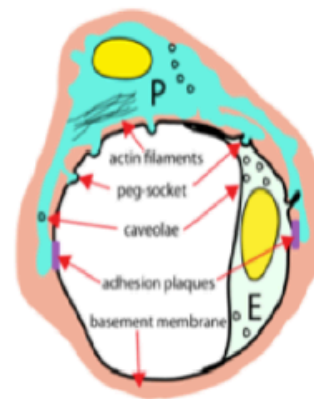


Abbildung 7: A Rasterelektronenmikroskopische Oberflächenansicht von einem Perizyten an der Verzweigung einer Netzhautkapillare von Kaninchen. Aus (Murakami, 1979)¹⁰⁹. B Eine BM trennt Perizyten (P) von Endothelzellen (E). An manchen Stellen, kommt es zu verschiedenen Direktkontakttypen zwischen Endothelzellen und Perizyten (modifiziert nach Armulik et al)⁶⁰

1.8.2 Funktion der Perizyten

Es ist allgemein anerkannt, dass Perizyten wachsende Gefäße stabilisieren und die Endothelpermeabilität kontrollieren^{60, 65}.

Viele funktionelle Eigenschaften von Perizyten und ihre genaue Rolle bei der Regulation des angiogenen Blutgefäßwachstums bleiben schwer fassbar. VEGFA führt zur Aktivierung von VEGFR2 in vaskulären Endothelzellen. Das hat zur Folge, dass Mikrogefäße destabilisiert werden und, dass ihre Permeabilität erhöht wird^{36, 60}.

Eine neue Studie hat gezeigt, dass die Expression des VEGFR1 durch Perizyten in der Maus-Retina den VEGF-Signalweg räumlich beschränkt, und, dass angiogenetische Defekte, die durch Perizytendepletion verursacht werden, durch intraokulare Injektion von VEGFA oder Perizyten-spezifischer Inaktivierung des für VEGFR1 kodierenden Mausgens reproduziert werden können⁶⁶. Dies legt einen Mechanismus nahe, durch den Perizyten durch molekulares Einfangen ``molecular trapping`` zur Gefäßstabilität und der Regulation der Gefäßpermeabilität beitragen.

Eine zusätzliche und häufig untersuchte funktionelle Eigenschaft von Perizyten ist ihre Fähigkeit, sich zusammenzuziehen. Die meisten Studien befassten sich mit Perizyten bei der Regulation des Blutflusses im Gehirn und ZNS. Unter Verwendung von TPLSM (Two-Photon Laser Scanning Microscopy) konnte die Perizytenkonstriktion in kortikalen Kapillaren von heterozygoten adulten β -Actin-GFP-transgenen Mäusen als Antwort auf die Gabe von U46619, einem TBXA2-Rezeptor-Agonisten und potenten Vasokonstriktor erfolgreich visualisiert werden⁶⁷. Überzeugende Beweise für eine Kontrolle des Blutflusses, die allein auf Kapillarebene in vivo erfolgt, fehlen noch⁶⁰.

Außerdem, sind mesenchymale Stammzellen (MSCs) in vielen adulten Geweben eng mit perivaskulären Nischen assoziiert und co-exprimieren viele Marker gemeinsam mit Perizyten. Die Fähigkeit von Perizyten, als MSCs zu agieren, bleibt jedoch umstritten. Es wurde durch die Verwendung von Methoden zur genetischen Abstammungsverfolgung gezeigt, dass einige Perizyten zu spezialisierten Zahnmesenchym-abgeleiteten-Zellen (Odontoblasten) während des Zahnwachstums oder als Reaktion auf eine Schädigung in vivo differenzieren⁶⁸. Außerdem sind Zellen von Hodenblutgefäßen, nämlich vaskuläre glatte Muskelzellen und Perizyten die Vorläufer von Leydig-Zellen⁶⁹. In einer neueren Studie wurde jedoch die verbreitete Annahme in Frage gestellt, dass endogene Perizyten multipler Organe multipotente geweberesidente Vorläuferzellen sind⁷⁰.

1.9 Sepsis

1.9.1 Definition

Sepsis ist ein potentiell lebensbedrohliches Syndrom von physiologischen, pathologischen und biochemischen Abnormalitäten, die durch eine Infektion hervorgerufen werden⁷¹ und sie stellt ein großes Problem für die öffentliche Gesundheit

dar, das 2011 mehr als 20 Milliarden US-Dollar (5,2%) der gesamten US-Krankenhauskosten ausmachte⁷².

Die Definition der Sepsis hat sich im Laufe der Jahre abhängig von der Studienlage mehrfach geändert⁷¹⁻⁷⁴. 2014 wurde eine Konsensuskonferenz ins Leben gerufen. Ziel war es, anhand einer systematischen Literaturanalyse und eines Delphi-Prozesses eine neue Sepsisdefinition zu erstellen⁷¹. Diese Konferenz ist die erste empirische, datenbasierte und somit evidenzgetriebene Beschreibung der Sepsis und sie kam mit folgenden Empfehlungen:

- Sepsis wird definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine fehlregulierte Wirtsreaktion auf eine Infektion verursacht wird.
- Eine Organfunktionsstörung kann als eine akute Veränderung des Gesamt-SOFA-Wertes ≥ 2 Punkte nach der Infektion identifiziert werden.
- Patienten mit Verdacht auf Infektion, die wahrscheinlich längere Zeit auf der Intensivstation bleiben oder im Krankenhaus sterben, können sofort am Bett mit qSOFA identifiziert werden, e.g. eine Veränderung des mentalen Status, des systolischen Blutdrucks ≥ 100 mm Hg oder der Atemfrequenz ≥ 22 .
- Der septische Schock ist eine Untergruppe der Sepsis, bei der zugrundeliegende Kreislauf- und zelluläre/metabolische Anomalien genug ausgeprägt sind, um die Mortalität wesentlich zu erhöhen.
- Patienten mit einem septischem Schock können mit einem klinischen Konstrukt der Sepsis mit persistierender Hypotonie identifiziert werden, bei dem Vasopressoren erforderlich sind, um MAP ≥ 65 mm Hg und einen Serumlactatspiegel > 2 mmol/L (18mg/dL) trotz adäquater Volumenreanimation aufrechtzuerhalten. Mit diesen Kriterien liegt die Krankenhausmortalität bei über 40%.

Von Singer et al⁷¹

Somit liefert die Konsensuskonferenz von 2014 das aktuelle Update zur Definition der Sepsis.

1.9.2 Epidemiologie der Sepsis

Sepsis ist die häufigste Todesursache durch Infektionen, und stellt in den meisten Ländern ein großes Problem für das Gesundheitssystem dar.

Global umfassendes Wissen über Sepsis-Inzidenz und Mortalität ist immer noch nicht ausreichend vorhanden. Fleischmann et al.⁷⁵ lieferten vor 3 Jahren die Ergebnisse einer Metaanalyse von Arbeiten, die zwischen 1979 und 2015 veröffentlicht wurden zur Beurteilung der Inzidenz und Mortalität von Krankenhaus-Sepsis in sieben Ländern mit hohem Einkommen. Für diese Länder lag die Populationsinzidenzrate für die im Krankenhaus behandelten Sepsisfälle bei 288 und für die krankenhaus-behandelte

schwere Sepsis bei 148 pro 100.000 Personenjahre. Die Krankenhausmortalität betrug 17% für Sepsis und 26% für schwere Sepsis während des letzten Jahrzehnts⁷⁶.

In Deutschland betrug die geschätzte landesweite Prävalenz auf Intensivstationen in einer prospektiven multizentrischen Studie, die vom deutschen Kompetenznetzwerk Sepsis durchgeführt und 2007 publiziert wurde 12,4% für Sepsis und 11,0% für schwere Sepsis. Es wurden 415 Patienten untersucht, bei 33 von denen gab es keine ausreichende Information und von den übrigen 382 Patienten starben 55,2%, die meisten von ihnen auf der Intensivstation⁷⁷.

Sepsis bleibt ein kritisches Problem mit signifikanter Morbidität und Mortalität. Selbst in der modernen Ära der Intensivpflege und der Fortschritte im medizinischen Forschungsbereich, stellt Sepsis immer noch sowohl eine gesundheitliche als auch eine ökonomische Belastung in der Medizin dar.

1.9.3 Pathophysiologie der Sepsis

Auf den Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen und dendritische Zellen) des Wirts werden Mustererkennungsrezeptoren (pattern-recognition receptors, PRRs) exprimiert. Die PRRs erkennen konservierte Motive, die von Pathogenen mit der Bezeichnung pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs) exprimiert werden, wie Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan, Lipopeptide, Lipoteichonsäure, Flagellin und bakterielle DNA⁷⁸. Die PRRs können auch endogene Gefahrensignale erkennen, die als "DAMPs" (danger-associated molecular patterns) bezeichnet werden und bei entzündlichen Belastungen (z. B. Verbrennungen, Trauma und Gewebsnekrose) freigesetzt werden^{79, 80}.

Die PRRs werden auf Grundlage ihrer zellulären Lokalisierung in zellmembrangebundene und zytosolische PRRs eingeteilt. Zu diesen Rezeptoren gehören die Toll-like Rezeptoren (TLR), die hauptsächlich zellmembrangebunden sind und die zytosolische PRRs einschließlich Nod-artiger Rezeptoren (NLRs), C-Typ-Lectine-Rezeptoren (CLRs) und RIG-I-ähnlicher Rezeptoren (RLRs). Die TLR gehören zu den PRRs, die am häufigsten im Zusammenhang mit Sepsis untersucht wurden⁸¹.

Bis heute sind 10 TLRs (TLR1-TLR10) Berichten zufolge im menschlichen Genom kodiert, die in Zellen des angeborenen Immunsystems (dendritische Zellen und Makrophagen) exprimiert werden. Es wurde mindestens ein Ligand für jeden TLR identifiziert mit Ausnahme von TLR8 und TLR10 (Abbildung.8)⁸².

Nach der Erkennung von PAMPs und DAMPs rekrutieren die TLRs TIR (Toll-Interleukin receptor)-Domänen enthaltende Adapterproteine wie MyD88, ein Adapterprotein, das fast von allen bekannten TLRs gemeinsam genutzt wird. Je nach TLR-Typ, werden Signaltransduktionswege initiiert, die in einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Weg eingeteilt werden. Der MyD88-abhängige Weg führt zur Aktivierung von NF (nuclear factor)- κ B, der die Transkription von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF (Tumornekrosefaktor)- α , IL6, IL1 und IL12

reguliert (Abbildung.8), während der MyD88-unabhängige Weg zur Induktion vom IFN- β (Interferon beta) und IFN-induzierbaren Genen führt und die Reifung von dendritischen Zellen mit langsamer Aktivierung von NF- κ B und MAP-K vermittelt⁸³⁻⁸⁵.

Während die TLRs hauptsächlich Transmembranrezeptoren sind, stellen die NLRs zytoplasmatische Rezeptoren für PAMPs dar. Die zwei am umfassendsten untersuchten Mitglieder der NLR-Familie sind NOD1 und NOD2 (Nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Erkennung eindringender pathogener Bakterien an ihren Zellwandkomponenten (Peptidoglykane)⁸⁶⁻⁸⁸. NOD1 wird sowohl in stromalen als auch in hämatopoetischen Zellen ubiquitär exprimiert⁸⁹, während NOD2 nur in Leukozyten einschließlich Monozyten/Makrophagen und DCs und in Epithelzellen bei inflammatorischer Stimulation exprimiert wird⁹⁰.

Ähnlich wie bei der TLR-Signalgebung, rekrutieren NOD1 und NOD2 nach ihrer Aktivierung Adapterproteine und aktivieren den MAP-K (mitogen-activated protein kinase)-Signalweg sowie den IKK-Komplex (I κ B kinase) und den stromabwärts gelegenen NF- κ B. Die Aktivierung der NF- κ B- und MAP-K-Signaltransduktionswege stimuliert die Transkription und Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen⁹¹.

Außerdem, werden angeborene und adaptive Immunantworten auf Pilze hauptsächlich durch CLRn vermittelt, wobei der Patternrezeptor Dectin1 am besten im Zusammenhang mit Pilzinfektionen charakterisiert ist⁹². Dectin1 erkennt β -Glucan und induziert multiple zelluläre Funktionen durch seine Signaldomäne und es ist essentiell für die schützende Immunantwort gegen *Candida albicans* und andere Pilze⁹³. Der Dectin1-vermittelte Schutz gegen *C. albicans*-Infektionen wurde kürzlich auf die Produktion von Typ-I-IFN durch DCs zurückgeführt⁹⁴.

Zusätzlich sind PAMPs auch in viraler RNA vorhanden. Sie können von RLRn erkannt werden, die als zytoplasmatische Sensoren der PAMPs innerhalb viraler RNA fungieren. Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt auch zur Aktivierung von IFN⁹⁵.

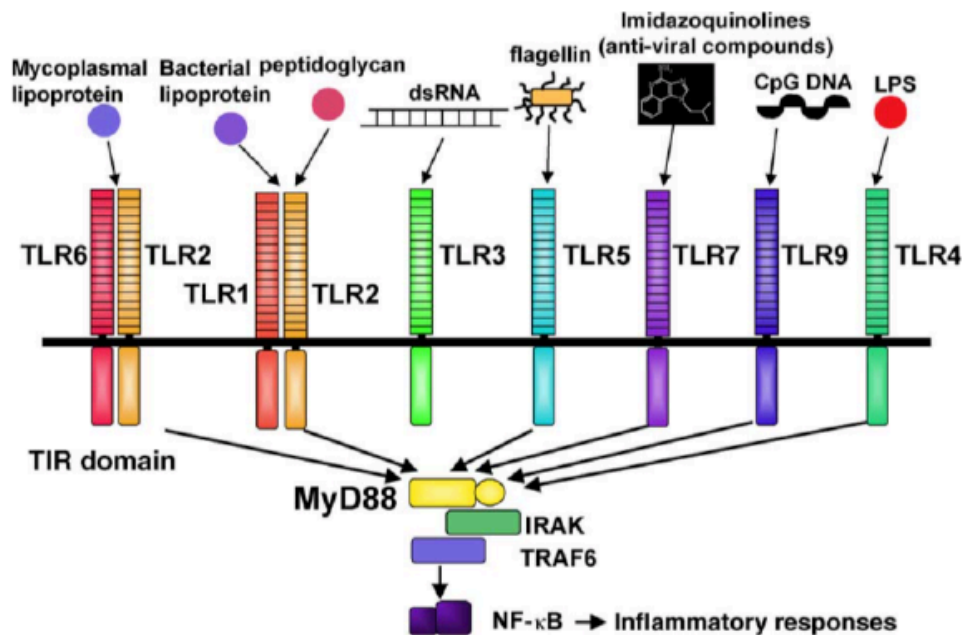


Abbildung 8: Die verschiedenen TLRs erkennen unterschiedliche molekulare Bestandteile, die mit Bakterien assoziiert sind. MyD88 ist ein Adapterprotein, das stromabwärts von TLRs gelegen ist und es vermittelt die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen. modifiziert nach Yamamoto et al.⁸⁴

Die beschriebene Produktion von inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen führt zusätzlich zur Aktivierung der Blutgerinnung (Hyperkoagulabilität). Dies geschieht über 3 Mechanismen (Abbildung.9)⁹⁶⁻⁹⁸:

- 1- Stimulation der Freisetzung vom gerinnungsaktivierenden Gewebefaktor (TF) aus Monozyten und Endothelzellen durch infektiöse Agenzien und inflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ und IL1.
- 2- Beeinträchtigung der physiologischen gerinnungshemmenden Signalwege, die hauptsächlich von dysfunktionellen Endothelzellen gesteuert werden.
- 3- Unterdrückung der Fibrinolyse aufgrund der erhöhten Produktion von Plasminogenaktivator-Inhibitor-1 (PAI-1) durch Endothelzellen.

Diese prokoagulatorischen Veränderungen der Homeostase führen eventuell zu lokalisierten venösen Thromboembolien und zu einer akuten disseminierten intravaskulären Koagulation (DIC), die durch massive Thrombinbildung und weit verbreitete mikrovaskuläre Thrombose gekennzeichnet ist. Die DIC ist teilweise für das Entstehen des "Multiple Organ Dysfunction Syndrom" (MODS) verantwortlich. In schwersten Fällen kommt es anschließend zum Verbrauch von Thrombozyten und Gerinnungsproteinen sowie Blutungserscheinungen.

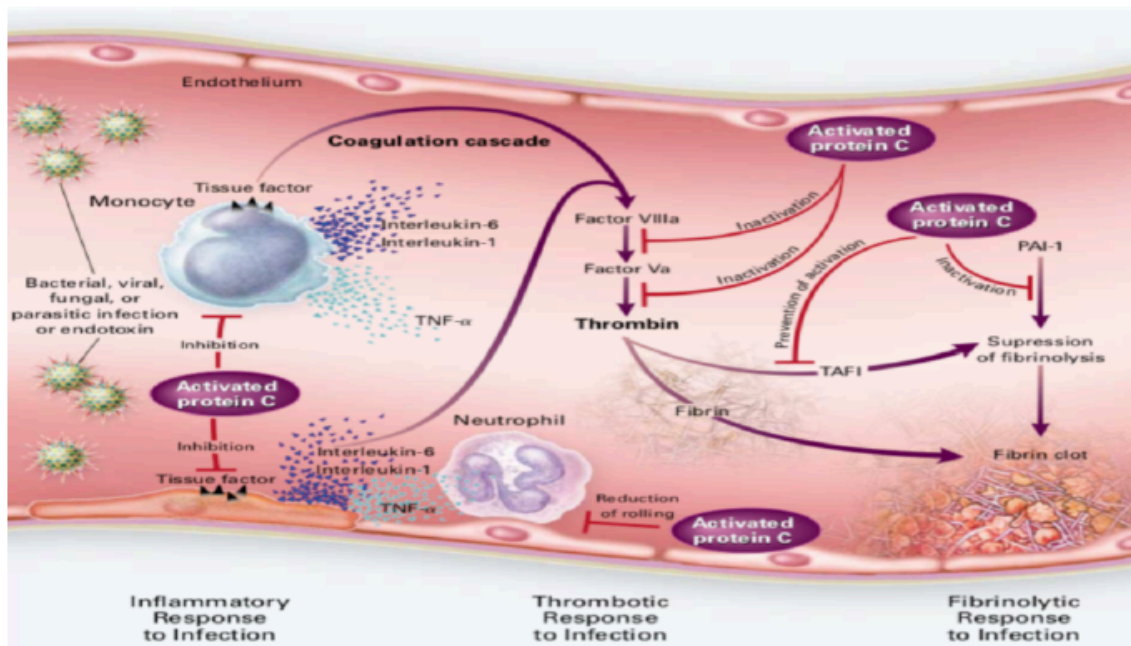


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen dem Immun- und dem Gerinnungssystem in Sepsis. Infektiöse Agenzien stimulieren die Freisetzung von TF, ILs und TNF α aus MCs und ECs. Diese führen zu einer Aktivierung von Gerinnungsfaktoren im Blut wie Faktor VIII.

Modifiziert nach Bernard et al.¹¹⁶

Außerdem, wurde für Sepsis eine Assoziation mit kardialer Dysfunktion beschrieben⁹⁹, die durch verminderte Kontraktilität und ventrikuläre Dilatation gekennzeichnet ist¹⁰⁰. Zirkulierenden Faktoren wie Zytokine (TNF α , IL1) wurde eine direkte hemmende Wirkung auf die Myozytenkontraktilität zugeschrieben^{101, 102}.

Weiterhin, induzieren Erregerbestandteile wie LPS und Zytokine wie TNF α , IL1, und IFN- γ die induzierbare Form der NO-Synthase (iNOS) im Endothel, in vaskulären glatten Muskelzellen, in Makrophagen und in verschiedenen Parenchymzellen. Die Überproduktion von NO durch die iNOS kann wie beim septischen Schock zu einer Hypotonie, einer Kardiodepression und einer vaskulären Hyporeaktivität beitragen¹⁰³.

Zusätzlich zu den beschriebenen indirekten Mechanismen, die Endothelzellen während der Sepsis stimulieren, können Bakterielle Lipoproteine die Apoptose der Endothelzellen direkt aktivieren. Dieser Effekt wird durch TLR2 vermittelt und er könnte bis zu einem gewissen Grad zu einer erhöhten Permeabilität beitragen¹⁰⁴.

Schließlich, ist Sepsis mit einem zeitabhängigen Anstieg der zirkulierenden Spiegel von VEGF und PlGF in Tier- und Menschen-Sepsismodellen assoziiert. Dieser Anstieg könnte bei der Erhöhung der vaskulären Permeabilität und zumindest teilweise beim septischen Schock eine Rolle spielen^{12, 105}.

1.9.4 Aktuelle Probleme in der Sepsistherapie

Trotz der Ära der modernen Medizin und der Fortschritte in der Intensivmedizin, bleibt Sepsis ein Krankheitsbild mit hoher Mortalität. Eine kausale Therapie, die sich auf der Pathophysiologie der Sepsis basiert und die damit verbundene hohe Mortalität effektiv senkt, fehlt noch. Erst ein besseres Verstehen der Grundlagenmechanismen, die das Fortschreiten der Sepsis vermitteln, wird die Therapie der Sepsis maßgeblich verbessern.

1.10 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der VEGFR2-TSAd-Interaktion in der Vermittlung des Verlusts der mikrovaskulären Integrität in der Sepsis zu bestimmen. Dazu wurden Experimente an primären Zellen (MLECs-mouse lung endothelial cells) sowie an einer b.End.3-Zelllinie durchgeführt, um die VEGFR2-TSAd-abhängigen Signalmolekülen zu untersuchen, die während der Sepsis an der Signaltransduktion teilnehmen und dadurch die endotheliale Integrität durch Regulierung der Junction-Proteine (VE-Cadherin, ZO-1) beeinflussen.

Zusätzlich wurden Experimente an einem Mausmodell der TSAd knock out und der VEGFR2-951-LOF-Mutation durchgeführt.

2. Materialien und Methoden

2.1 Herstellung von induzierbaren TSAd-shRNA-Expressionskonstrukte

Um die Interaktion von TSAd-VEGFR2 unter inflammatorischen Bedingungen in Endothelzellen zu untersuchen, wurden induzierbare lentivirale TSAd-shRNA-Expressionskonstrukte mit Hilfe der Gateway-Rekombination-Klonierungstechnologie hergestellt. Diese wurden später mit Verpackungsplasmiden für die Transfektion von HEK-Zellen gemischt. Danach wurde das lentivirushaltige Medium geerntet und für die Transduktion von Endothelzellen verwendet. Ziel war es, eine induzierbare und stabile Unterdrückung der TSAd-Expression in diesen Zellen zu erreichen (knock down).

2.1.1 Klonieren der TSAd-shRNA-Sequenzen

Zuerst wurde für die Herstellung von TSAd-shRNA-Sequenzen die mRNA-Sequenz von TSAd auf der NCBI-Nucleotide-Seite gesucht. Dort wurden zwei mRNA-Sequenzen vorgeschlagen, die Spleißvarianten desselben Genproduktes (SH2D2A) darstellen. Diese Sequenzen trugen die NCBI-Referenznummern NM_021309.3 für die Variante 1 und NM_001025571.2 für die Variante 2. Danach wurden diese Sequenzen kopiert und in einer Software (siRNA wizard Software 3.1, InvivoGen) eingefügt, um 19-basenlange Targeting-Sequenzen zu finden, die mit dem Genprodukt überlappen und mit anderen Genprodukten möglichst keine signifikante Überlappung zeigen. Es wurde zusätzlich eine Nicht-Targeting-Sequenz als negative Kontrolle (Scr) entworfen. Diese Scr-Sequenz zeigte keine Überlappung mit Säugetier-Genprodukten. Die ausgewählten Sequenzen sind in der Abbildung 10 in Rot dargestellt.

Um das Targeting-Verhalten der ausgewählten Sequenzen zu beurteilen und um Überlappungen mit anderen mRNA-Sequenzen auszuschließen, wurden diese mithilfe eines anderen Programms (Blast, NCBI) geblastet. Alle ausgewählten Sequenzen zeigten eine signifikante Überlappung mit der erwünschten mRNA-Sequenz, aber keine signifikante Überlappung mit mRNAs anderer Gene. Außerdem, zeigte die Scr-Sequenz gar keine Überlappung mit dem erwünschten Genprodukt.

Danach wurden die Sequenzen wie in der Abbildung 10 geschrieben und an (Eurofins, DE) geschickt. Sie wurden mit einem Phosphat am 5'-Ende hergestellt, um eine spätere Legierung in einem Eintrittsvektor zu ermöglichen.

Die bestellten shRNA-Sequenzen kamen von Eurofins jeweils als fw (forward)- und rev (reverse)-Sequenzen in Pulverform. Das Pulver wurde in ddH₂O gelöst um eine Konzentration von 100 pmol/μl zu erreichen. Danach wurde die Lösung auf einem Shaker bei 50 °C für 10 Minuten gemischt.

Für das Annealing der komplementären Oligonukleotidpaare (fw/rev), wurden in 5 neue PCR-Röhrchen jeweils die folgenden Bestandteile des Annealing-Mix pipettiert:

- 1,5 µl fw Oligo
- 1,5 µl rev Oligo
- 47 µl Annealing-Puffer (100 mM NaCl, 50 mM HEPES, PH 7.4)
- Endvolumen= 50 µl / Röhrchen oder Oligo (rev + fw)

Danach wurden die 5 Röhrchen in einen Thermocycler für den Annealing-Prozess gelegt. Es wurde das folgende Programm genutzt:

- 90 °C für 4 min
- 70 °C für 10 min
- Langsame Abkühlung zu 73 °C (-1 °C jede 10 sec)
- Inkubation bei 37 °C für 15 min
- Abkühlung auf 10 °C

Der Annealing-Prozess ergab doppelsträngige shRNA-Inserts mit ``sticky ends``, die für eine spätere Klonierung in einem Eintrittsvektor geeignet sind. Die ausgerichteten Sequenzen der verschiedenen Oligos werden in der Abbildung 10 gezeigt.

shTSAAd.1

5' GATCCCC GTCCTGTCTGTCAATAAT TTCAAGAGA ATTATTGACAGACAGAGAC TTTTGGAAA-3'

shTSAAd.2

5' GATCCCC GAAGGATATTAAGGTCAGA TTCAAGAGA TCTGACCTTAATATCC TTC TTTTGGAAA-3'

shTSAAd.3

5' GATCCCC GCTGTTACCCCGATTACT TTCAAGAGA AGTAAATCGGGGTAACAGC TTTTGGAAA-3'

shTSAAd.4

5' GATCCCC GGCCAGCATGCAAGTTAT TTCAAGAGA ATAACCTGCATGCTGGGCC TTTTGGAAA-3'

shScr

5' GATCCCC GCTGCAGGGCATTACCTAT TTCAAGAGA ATAGGTAATGCCCTGCAGC TTTTGGAAA-3'

Restriktionsenzym-site / Target Sequenz / Hairpin loop / Target Sequenz / Restriktionsenzym-site

Abbildung 10: Zeigt die ausgewählten 5 Sequenzen, die für die Herstellung von TSAAd-shRNA-kodierenden Inserts verwendet wurden. Jeweils ein Oligonukleotidpaar (fw/rev) wurde für die Herstellung von doppelsträngigen Inserts verwendet. In Gelb sind die Nukleotidbasen markiert, die als Restriktionsstelle fungieren. In Rot ist die Zielsequenz markiert, und in Grün die Haarnadelsequenz. Die Sequenzen werden als fw-Version dargestellt. fw= forward, rev= reverse, Scr= scrambled.

2.1.2 Restriktion des Eintrittsvektorplasmid (pENTR-THTIII)

Für das Klonieren der doppelsträngigen TSA_{Ad}-ShRNA-Inserts in den Eintrittsvektor wurde das pENTR-THTIII-Plasmid, das freundlicherweise von AG-Laugwitz/Moretti geliefert wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen (BglII und HindIII) verdaut, um in der Restriktionsstelle im Plasmid ``sticky ends`` zu erzeugen, die den Enden der TSA_{Ad}-ShRNA-Inserts komplementär sind (Abbildung.11).

Der Restriktionsmix bestand aus den folgenden Komponenten:

- 24 µL pENTR-THT III-Plasmid (1.5 µg/µl)
- 1.5 µL BglII
- 1.5 µL HindIII
- 5 µL Puffer (smart cut)
- 18 µL H₂O
- Totales Volumen: 50 µL

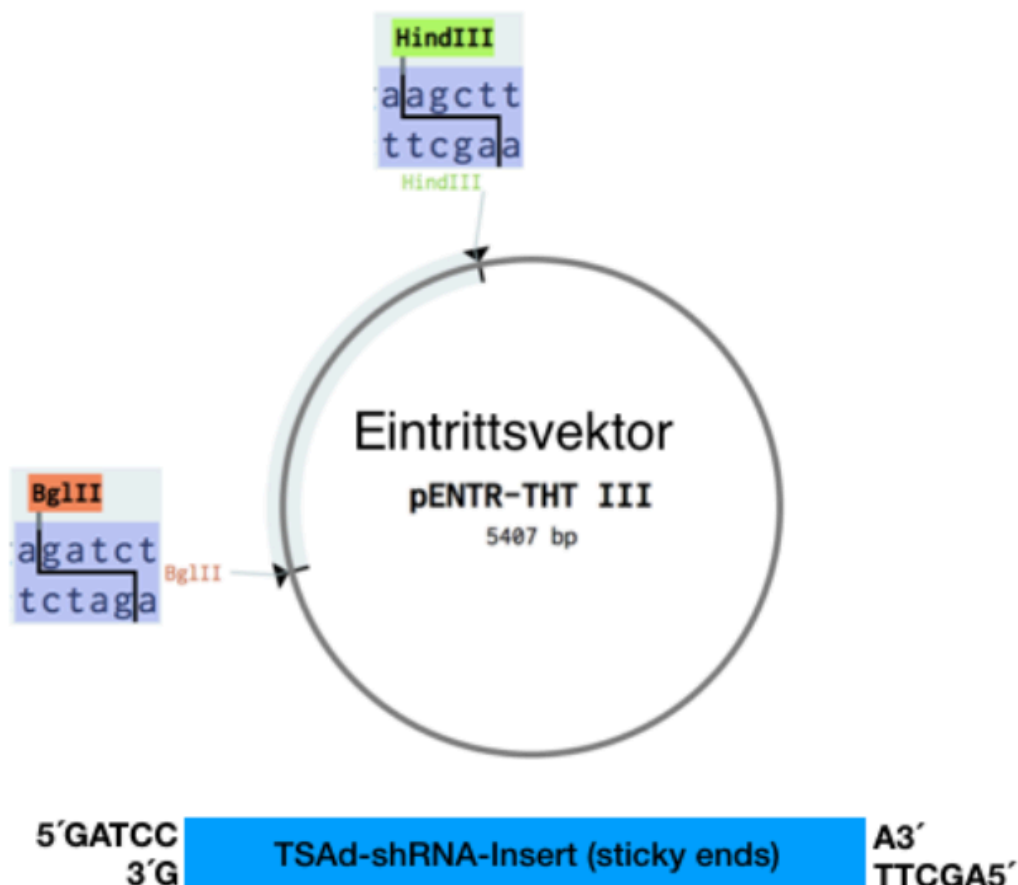


Abbildung 11: Verdauung des Eintrittsvektors mit den Restriktionsenzymen HindIII und BglII erzeugt ``sticky Ends``, die den sticky Ends der TSA_{Ad}-shRNA-Insert komplementär sind. Der Stuffer-Teil des Plasmids ist die Graue Linie, die mit Hellblau zwischen den Restriktionsstellen hervorgehoben ist.

Die Verdauungsreaktion wurde bei 37 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde das Plasmid mittels Antarctic Phosphatase dephosphoryliert. Das Dephosphorylierungsgemisch bestand aus den folgenden Komponenten:

- pENTR-THT III-Plasmid (2 pmol)
- 4 µl Antarctic Phosphatase Reaction Buffer (10X)
- 10 Einheiten Antarctic Phosphatase
- ddH₂O zu einem Endvolumen von 40 µl

Das Gemisch wurde zuerst bei 37 °C für 30 min inkubiert und danach bei 80 °C für 2 min, um die Phosphatase zu deaktivieren.

Um den Stuffer von dem geschnittenen Vektor zu trennen wurde das Dephosphorylierungsgemisch in zwei 20 µL große Kammern eines 1% Etbr Gels (1g Agarose/100 ml TBE x1) geladen. Dann wurden die Proben für 45 min bei 120 V auf dem Gel laufen gelassen. Nach deutlicher Trennung der Banden wurden die Banden bei 4 Kb vom Gel geschnitten, gewogen und mithilfe eines Gel und PCR Clean-up Kit purifiziert.

2.1.3 Ligierung der Inserts in das pENTR-THTIII-Eintrittsvektor-Plasmid

Mithilfe eines (Fast-Link™ DNA Ligation Kit) und gemäß dem Informationsblatt wurden für die Ligierung die folgenden Komponenten in ein 1.5 µL Eppendorf-Röhrchen gemischt:

- 1.5 µl 10X Fast-Link Ligation Buffer
- 1.5 µl 10 mM ATP
- 1 µl pENTR-THTIII (verdaut und purifiziert) 100 ng/µL
- 2 µl Insert DNA (100 ng/µL)
- Steriles Wasser zu einem Volumen von 14 µl
- 1 µl Fast-Link DNA Ligase
- Totales Volumen: 15 µl

Diese Mischung wurde bei Raumtemperatur für fünf Minuten inkubiert, dann wurde sie bei 70 °C für 15 Minuten für die Deaktivierung der Ligase inkubiert. Danach wurde die Ligierungsreaktion für die Transformation der Bakterien verwendet.

2.1.4 Transformation von kompetenten Zellen und Selektion auf Gentamicin-Platten

Für die Vermehrung der Ligierungsreaktion wurden Bakterien (NEB® 10-beta Competent E. coli High Efficiency Bakterien) verwendet.

5 Inserts wurden in pENTR-THTIII Vektor-Plasmid legiert (4 TSAd-shRNA und ein Scr-shRNA als Kontrolle) und es wurden für deren Amplifizierung 3 Bakterienröhrchen verwendet (50 µl Bakterien/Röhrchen). Die Bakterienröhrchen wurden für 10 min auf Eis aufgetaut. In 5 neue 1.5 ml Eppendorf-Röhrchen wurden jeweils 20 µl Bakterien und 1µl von einem der Ligierungsreaktionen überführt und durch vorsichtiges Umdrehen der Röhrchen gemischt. Die Röhrchen wurden auf Eis für fünf Minuten gelagert und dann bei 42 °C in ein Wasserbad für 30 Sekunden eingetaucht. Danach wurden sie für weitere fünf Minuten auf Eis zurückgestellt. Schließlich wurde zu jedem Röhrchen zusätzlich 500 µl SOC Medium hinzugefügt und sie wurden für 1 Stunde in einem Inkubator-Shaker mit UV-Schutz bei 37 °C und 250 rpm inkubiert.

Da das Plasmid pENTR-THTIII für das Enzym Gentamicin Acetyltransferase unter der Kontrolle des Pc-Promoters (Klasse 1 Integron Promoter) kodiert, sind transformante Bakterien gentamicinresistent (siehe Abbildung.12). Daher wurden von jedem Röhrchen nach Inkubation bei 37 °C 300 µl entnommen und auf LB-Agarplatten mit 50 µg/mL Gentamicin ausplattiert um transformante Kolonien zu selektieren. Die Platten wurden dann in einem Inkubator bei 37 °C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden gentamicinresistente Kolonien von den Platten ausgewählt (5 Kolonien/Ligierungsreaktion), und in Kulturröhrchen mit einem gentamicinhaltigen LB-Medium überführt (50 µg/mL Gentamicin). Die Röhrchen wurden zur Propagierung in einem Inkubator-Shaker mit UV-Schutz bei 250 rpm und 37 °C für 16 Stunden inkubiert. Danach wurde die Plasmid-DNA mit einem Miniprep-Kit purifiziert.

Nach Amplifizierung in einer über Nacht-Kultur und Durchführung von Minipreps, wurden die Minipreps für weitere Schritte mit dem Primer THT-seq. Fw: CTG CAG GAA TTC GAA CGC TGA CG sequenziert. Zeigten die Sequenzierergebnisse die erwarteten Sequenzen, so wurden die entsprechenden Klone für die Klonase-Reaktion mit dem Zielvektor verwendet (Abbildung.12).

Es wurden die Klone, die folgende Konstrukte enthalten für die Klonase-Reaktion verwendet:

- 1- pENTR-THTIII-TSAd.1-shRNA
- 2- pENTR-THTIII-TSAd.3-shRNA
- 3- pENTR-THTIII-TSAd.4-shRNA
- 4- pENTR-THTIII-TSAd.Scr-shRNA

Die Klone, die das Konstrukt pENTR-THTIII-TSAd.2-shRNA enthalten (siehe Abbildung.10) wurden aufgrund von unerwarteten Sequenzierungsergebnisse nicht mehr verwendet.

2.1.5 Umklonieren der Inserts mit Hilfe der LR-Klonase-Reaktion

Es wurde für die Klonierung der TSAd-ShRNA-Inserts in einem Zielvektor das Gateway™ LR Clonase™ Enzyme mix verwendet. Dieser Mix enthält die

rekombinanten Proteine Integrase (Int) und Excisionase (Xis) des Bakteriophagen Lambda sowie das E. coli-kodierte Protein Integrations-Wirt-Faktor (IHF). Diese Enzymmischung fördert die in vitro-Rekombination zwischen einem Eintrittsklon (attL-flankiertes Gen) und einer beliebigen Anzahl von attR-enthaltenden Zielvektoren, um attB-haltige Expressionsklone zu erzeugen. Die att-Sequenzen stellen flankierende Rekombinationssequenzen dar (Abbildung.12).

Für die Herstellung von einem LR-Klonase-Reaktionsgemisch wurde 1 µl pENTR-THT-III-TSAd-shRNA (150 ng/µl) als Eintrittsvektor mit 1 µl pGLTR-X-PURO (150 ng/µl) als Zielvektor gemischt (Abbildung.12). pGLTR-X-PURO wurde freundlicherweise von AG-Laugwitz/Moretti geliefert.

Dazu wurden die folgenden Komponenten gegeben:

- TE-Buffer, pH 8.0 gefüllt bis 8 µl
- LR Clonase™ II enzyme mix: 2 µl

Nach einer gründlichen Mischung mit dem Vortex wurde die Reaktion bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Dann wurde 1 µl Proteinase K-Lösung zu jeder Probe gegeben und die Proben wurden bei 37 °C inkubiert, um die Klonasereaktion zu beenden. Nach diesem Inkubationsschritt wurden die Proben für die Transformation von TOP-10 Bakterien (NEB® 10-beta Competent E. coli High Efficiency) wie vorher beschrieben verwendet (siehe 2.1.4).

Der Zielvektor (pGLTR-X-PURO) enthält unter der Kontrolle des Amp^R-Promoters ein Gen für eine Ampicillinresistenz. Deswegen sind transformante Bakterien ampicillinresistent. Außerdem enthält pGLTR-X-PURO das Gen für das CcdB-Protein, ein natürliches Gift, das mit der bakteriellen Gyrase interagiert. Daher wurden Transformanten auf LB-Agarplatten mit 50 µg/mL Ampicillin selektiert. Dieser Schritt garantiert, dass nur die Bakterien überleben, die den Zielvektor mit dem Zielgen aufnehmen (pGLTR-X-Puro-TSAd-shRNA). Die Ursachen dafür sind (siehe Abbildung. 12):

- 1- pENTER-THTIII verleiht den Bakterien keine Ampicillin-Resistenz, deswegen können Bakterien die nur dieses Plasmid aufnehmen in Ampicillin nicht wachsen.
- 2- Die Bakterien, die pGLTR-X-Puro-ccdB aufnehmen, das nicht an der Klonasereaktion teilnimmt (nicht-Rekombinanten) sind zum Tod vorbestimmt, weil das ccdB-Gen für ein Gyrase-Gift-Protein kodiert.

Für die Amplifizierung der pGLTR-X-puro-TSAd-shRNA-Konstrukte in höherer Zahl, wurden Bakterien (NEB® 10-beta Competent E. coli High Efficiency) wie vorher beschrieben verwendet (siehe 2.1.4). Nach der Transformation wurden die Bakterien in 500 ml Flaschen überführt, die jeweils 200 mL LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/mL) enthalten. Die Flaschen wurden dann in einem Shaker bei 250 rpm und 37 °C für 16 Stunden inkubiert. Danach wurde die Plasmid DNA mithilfe eines Plasmid-DNA-

Purifizierungskit Isoliert. Die Proben wurden danach bis zu ihrer Verwendung bei -20 °C gelagert.

Für ein besseres Verständnis der LR-Klonasereaktion und der Herstellung der Zielvektoren, die verschiedene TSAd-shRNA kodieren, siehe Abbildung.12

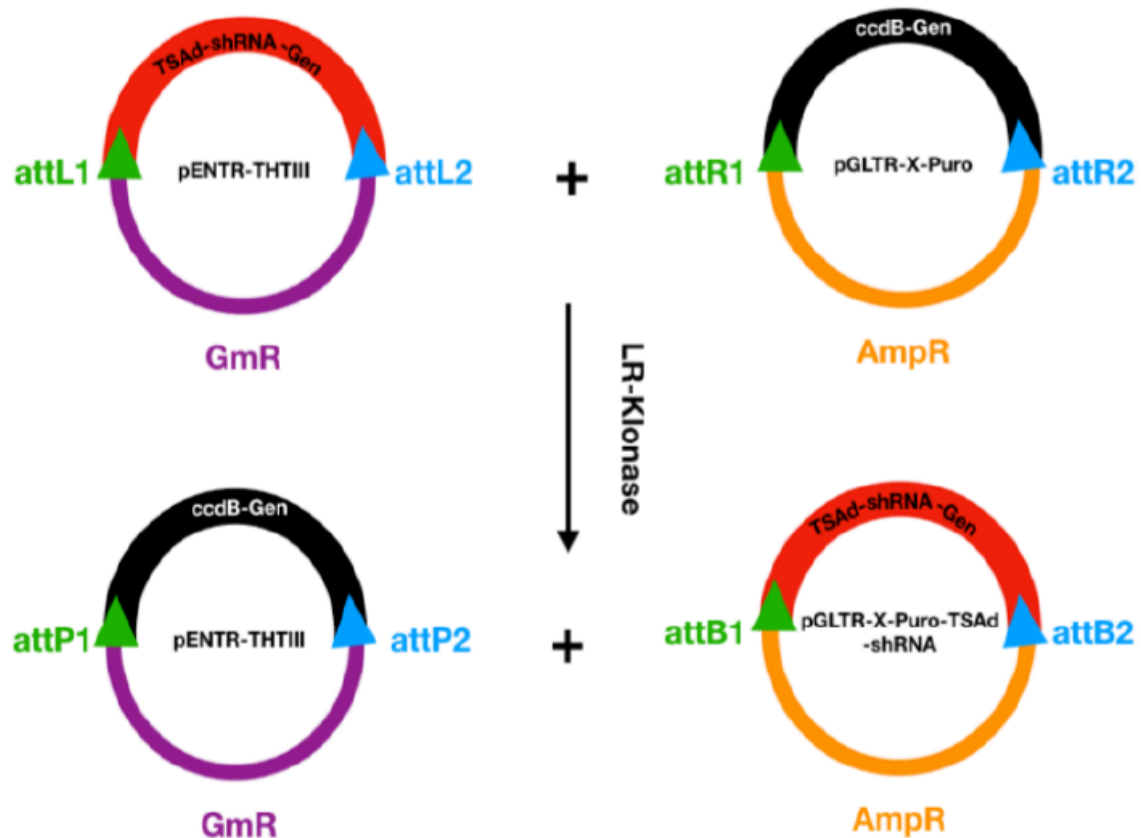


Abbildung 12: Darstellung der LR-Klonase-Reaktion zwischen dem Eintrittsvektor (pENTR-THTIII) mit der Gentamicinresistenz (Lila) und dem Zielvektor (pGLTR-X-Puro). Nur die Transformanten, die den Zielvektor mit dem Zielgen (Rot) aufnehmen (pGLTR-X-Puro-TSAd-shRNA) sind in der Lage in Ampicillin zu wachsen. GmR= Gentamicinresistenz, AmpR= Ampicillinresistenz, att= Attachment site, ccdB= Gyrase-Gift-Gen.

2.2 Lentivirus-Produktion und Generierung von TSAd-knock down-Zellen

Lentivirale Vektoren sind wichtige Werkzeuge für die Übertragung von Genen in eukaryontischen Zellen. Das vorteilhafte Merkmal von Lentivirusvektoren ist ihre Fähigkeit, eine effektive Transduktion und eine stabile Genexpression in sich teilenden und sich nicht teilenden Zellen sowohl in vitro als auch in vivo zu vermitteln. Somit wird es mit Hilfe von Lentivirusvektoren möglich, eine stabile Expression der TSAd-shRNA-Gene in Zielzellen zu vermitteln und konsequenterweise eine Herunterregulierung vom TSAd-Spiegel herbeizuführen. Lentivirale Vektoren werden typischerweise in HEK 293T-Zellen produziert.

2.2.1 Vorbereitung der HEK-293T-Zellen für die Transfektion

Für die Produktion der TSAd-shRNA-kodierenden Lentiviren wurden zuerst 3 Millionen HEK-293T-Zellen/Platte in 10 cm-Kulturschalen mit DMEM-(10 % FCS, 1 % pen/ strep) ausgesät. Es wurde gewartet bis die Zellen eine Konfluenz von ungefähr 80 % aufwiesen. Dann wurden die Zellen für die Transfektion und Virus-Produktion verwendet.

2.2.2 Transfektion von HEK-Zellen

Zuerst wurde mit einem NanoDrop™ die Konzentration der verschiedenen lentiviralen Vektorklone gemessen. Es wurden dann in neue 1,5µl-Röhrchen folgende Bestandteile des Transfektionsgemisches pipettiert:

- 500 µl OPTIMEM
- 7,5 µg lentiviraler Vektor (enthält das Gen für TSAd-shRNA)
- 4,875 µg Verpackungsplasmid pCMVR8.74 (Addgene plasmid #22036)
- 2,625µg Verpackungsplasmid pMD2.G (Addgene plasmid #12259)

Das Verpackungsplasmid pCMVR8.74 enthält die Gene (gag) und (pol) unter der Kontrolle des CMV-Promoters. Diese Gene kodieren für virale Strukturproteine und sind normalerweise im HIV-1-Genom kodiert. Das Verpackungsplasmid pMD2.G kodiert für das Glykoprotein VSV-G (aus dem vesicular stomatitis virus) unter Kontrolle des CMV-Promoters. Das VSV-G ist ein Protein in der Virushülle, das nach Bindung an der Zelloberfläche, die Aufnahme des Virus in die Zelle erleichtert.

Nach einer kurzen Mischung mit dem Vortex wurden zu jedem Röhrchen 45 µl FuGENE® HD Transfection Reagent (E2311, Promega) hinzugefügt. Die Röhrchen wurden nochmal mit dem Vortex gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur liegen gelassen, bevor sie für die Transfektion von HEK-Zellen verwendet wurden. Danach wurde das Transfektionsgemisch vorsichtig mit einer Pipette aufgezogen und auf die HEK-293T-Zellen pipettiert, die in 6 ml Medium inkubiert wurden. Nach vorsichtiges Wirbeln der Zellkulturschalen wurden sie bei 37 °C und 5 % CO₂ für 14 Stunden inkubiert. Am nächsten Tag wurden zu jeder Platte zusätzlich 4 ml Medium zupipettiert und die Zellen wurden nochmal bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht inkubiert. Danach wurde das virushaltige Medium zweimal gerntet (48h und 72h nach der Transfektion).

2.2.3 Ernte der Lentiviren

Bei jeder Ernte wurde das virushaltige Medium in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und bei 4 °C und 1800 rcf für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in aerosoldichte 1,5 ml-Röhrchen aliquotiert. Diese Röhrchen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Puromycin-Kill-Kurve

Puromycin ist ein Aminonukleosid-Antibiotikum, das spezifisch den Peptidyltransfer sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Ribosomen hemmt. Der Zielvektor (pGLTR-X-PURO) enthält unter der Kontrolle des SFFV-Promoters ein Gen, das den transduzierten Zielzellen (in diesem Fall b.End.3-Zellen) Puromycinresistenz verleiht (Abbildung.13). Somit können transgene Zellen durch Puromycin-Exposition gegen nicht-transgenen Zellen selektiert werden (Puromycinslektion). In diesem Fall würden die Zellen, die keine Resistenz besitzen (nicht-transgen) durch die Unterdrückung der Proteinsynthese sterben.

Um die optimale Puromycinkonzentration zu bestimmen, die zur effektiven Selektion von transduzierten Endothelzellen führt, wurde eine Puromycin-Kill-Kurve an b.End.3-Zellen bestimmt.

Es wurden dafür 100,000 b.End.3-Zellen/Kammer in 12 Kammern einer 12-Kammern-Platte ausplattiert. In jeder Kammer wurden 2 ml Medium (DMEM 10 % FCS) pipettiert und die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Es wurde gewartet bis die Zellen vollständig adhären und mindestens zu 80 % konfluent waren. Dann wurde das Medium ausgesaugt und die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ mit Medien inkubiert, die verschiedene Puromycinkonzentrationen enthalten. Es wurden Konzentrationen getestet, die von 1 µg/mL bis 10 µg/mL reichten. Außerdem wurde eine Kammer mit 20 µg/mL als die maximale Konzentration inkubiert und eine zusätzliche Kammer wurde als negative Kontrolle gar nicht mit Puromycin inkubiert (nur DMEM 10 % FCS).

Es wurde die optimale Konzentration gewählt, bei der nicht mehr als die Hälfte der Zellen starben. Diese lag bei 4 µg/mL.

2.2.5 Transduktion von b.End.3-Zellen mit shRNA-kodierenden Lentiviren

Es wurde für die Transduktion der b.End.3-Zellen mit Lentiviren, die TSA-shRNA kodieren eine 6-Kammer-Platte verwendet. In jeder Kammer wurden 70,000 Zellen in 2 mL Medium (DMEM 10 % FCS, 1 % pen/ strep) ausplattiert und die jeweilige Platte wurde über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium ausgesaugt und die Zellen wurden mit 2 mL/Kammer der folgenden Mischung über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert:

1- 1mL Virusüberstand (Medium aus transfizierten HEK-Zellen, siehe 2.2.2/3)

2- 1 mL (DMEM 10 % FCS, 1 % pen/ strep)

3- 8 µg/mL Polybrene

Am nächsten Tag wurde das Medium ausgesaugt und durch (DMEM 10 % FCS, 1 % pen/ strep) ersetzt.

48 Stunden nach der Transduktion wurde die Puromycinselektion angefangen, um nicht-transgene Zellen zu töten. Es wurde die Konzentration $4\mu\text{g/mL}$ verwendet, die durch die Puromycin-Kill-Kurve bestimmt wurde (Siehe 2.2.4).

Nach 3 Tage Puromycinexposition, wurde zu jeder Kammer $1\mu\text{g/mL}$ Doxycyclin für 3 Tage zugegeben um die TSAd-shRNA-Expression zu induzieren.

2.2.6 Regulation der TSAd-shRNA-Expression (induzierbares System)

Die TSAd-shRNA-Expression unterliegt der Kontrolle eines modifizierten H1-Promoters. Dieser Promoter enthält eine Tetracyclin-Operatorsequenz (Abbildung.13). Diese Modifikation macht die konstitutive Expression des Promoters nicht zunichte; In Gegenwart eines Repressorproteins (TetR), das unter Kontrolle des SFFV Promoters ständig exprimiert wird, wird der H1 Promoter jedoch durch die Bindung von TetR an die Tet-Operator (TetO) -Sequenz deprimiert. Sobald Doxycyclin (Dox) zugegeben wird, bindet es das TetR-Protein, das dann von dem Promoter freigesetzt wird, wodurch die Expression der TSAd-shRNA fortschreiten kann (Abbildung.13).

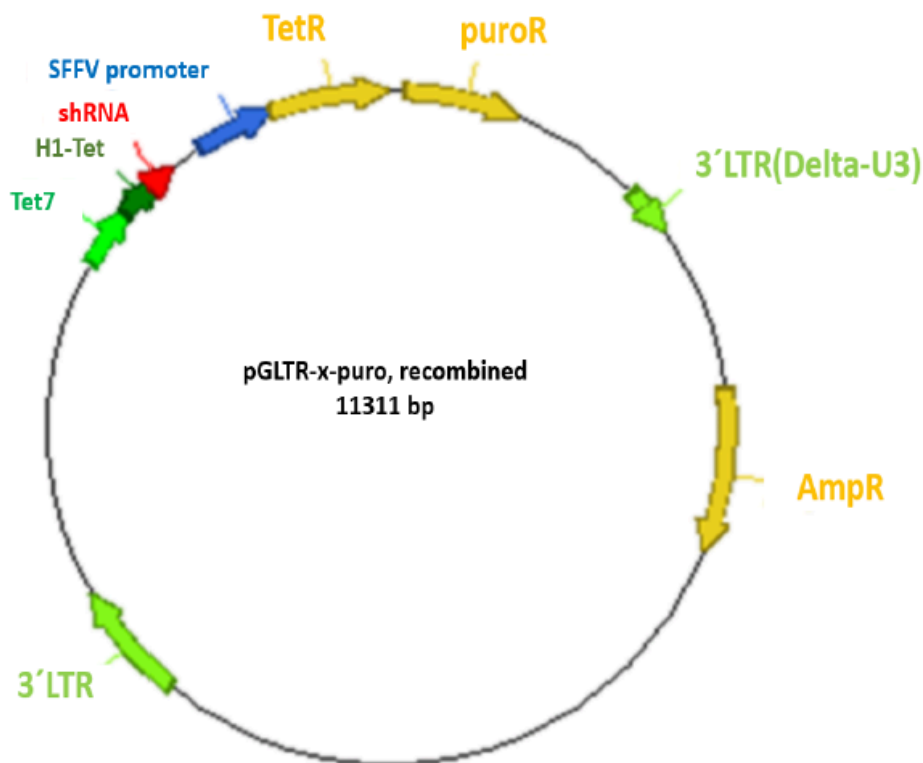


Abbildung 13: Zeigt den Aufbau der lentiviralen TSAd-shRNA-Expressionskonstrukte. Die Expression des TSAd-shRNA-Gens (Rot) unterliegt der Kontrolle des H1-Promoters (Dunkelgrün). Die Expression des Repressorproteins TetR (Gelb) unterliegt der Kontrolle des SFFV-Promoters (Blau). Das TetR-Protein bindet an dem Tet-Operatorsequenz Tet7 (Hellgrün) in der Promoteregion in der Abwesenheit von Doxycyclin und hemmt die Transkription der TSAd-shRNA. Doxycyclin führt zur Ablösung des Repressors von der Operatorsequenz und ermöglicht dadurch die Transkription der TSAd-shRNA. Unter der Kontrolle des SFFV-Promoters liegt auch das Gen für eine Puromycinresistenz (Gelb).

2.3 Zellkulturmodell der Sepsis

Es wurden für die Zellkultur Endothelzellen aus der Mauslungen (primäre MLECs), oder b.End.3-Zellen verwendet. Die MLECs wurden freundlicherweise von Farah Abdel-Rahman aus WT-Mäusen isoliert.

500,000 Zellen/Kammer wurden in einer 6 Kammern-Platte mit 2ml Medium/Kammer (DMEM/F-12, 20% FCS, 1% pen/strep für MLECs und DMEM 10 % FCS, 1 % pen/strep für b.End.3-Zellen) ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 Stunden inkubiert. Nach der Haftung der Zellen auf der Unterseite der Platte wurde gewartet bis sie eine Konfluenz von mindestens 80% aufwiesen. Danach wurde das Medium abgesaugt und ein Teil der Zellen wurde mit 1 mL konditioniertem Medium (CM) für verschiedene Zeitpunkte bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Das CM wurde durch die Gabe von 10 µg/mL LPS zu RAW 264.7 Makrophagen hergestellt. Nach der Stimulation der Makrophagen mit LPS für 24h wurde das Medium geerntet und für die Inkubation der Endothelzellen verwendet. Ein anderer Teil der Endothelzellen wurde mit einem Medium inkubiert, das aus nicht-aktivierten Makrophagen geerntet wurde (Keine LPS-Gabe zu den Makrophagen).

Am Anfang wurden die Endothelzellen mit CM für Stunden bis Tage inkubiert. Da die Western Blotting-Ergebnisse nach längerer Inkubation (12-24h) keinen Unterschied zur Kontrolle zeigten und unter dem Verdacht, dass der proinflammatorische Effekt des CM mit der Zeit nachlässt wurde die Inkubationszeit auf 1-30 min verkürzt.

In einem weiteren Ansatz wurden die Endothelzellen nicht mit CM, sondern mit verschiedenen Entzündungsmedien inkubiert, um den Effekt von einzelnen proinflammatorischen Zytokinen auf die Zellen zu untersuchen.

Nach Inkubation der Endothelzellen mit CM oder mit anderen proinflammatorischen Medien wurden sie mit 1xPBS gewaschen und sofort auf Eis gelegt. Danach wurden sie mit RIPA-Buffer auf Eis für 5 min lysiert. Die Lysate wurden für Western Blotting verwendet. Außerdem wurden Zellen in einem anderen Ansatz nicht lysiert, sondern für Färbungen mit PFA 4 % fixiert.

2.4 Western Blotting

Mithilfe von Western Blotting können spezifische Proteine aus einer komplexen Mischung von Proteinen identifiziert werden, die aus Zellen extrahiert werden. Durch Trennung nach Molekulargewicht, Übertragung auf eine feste Membran und Markierung des Zielproteins unter Verwendung von geeigneten primären und sekundären Antikörper, können Proteinbanden sichtbar gemacht werden.

Nach Inkubation der Zellen mit verschiedenen inflammatorischen Medien, wurden sie mit RIPA lysis Buffer lysiert, das sowohl einen Protease- als auch einen Phosphataseinhibitor enthält. Die Lyse dauerte 5 min während die Platte auf Eis lag. Danach wurden die Lysate in 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und für 10 Minuten

bei 4 °C und 14000 rpm zentrifugiert. Es wurde der Überstand aufgezogen und in weitere 2 mL Eppendorf-Tubes überführt und in flüssigen Stickstoff gefroren. Danach wurden die Proben bei -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

Mithilfe eines BCA-Assay und eines Plattenlesers wurde die Proteinkonzentration in den Proben bestimmt. Für alle Proben wurde eine Proteinmenge von insgesamt 7µg in ein vorgefertigtes Gel geladen und durch Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Die Gelelektrophorese wurde bei 120 V durchgeführt, gefolgt von einem Blotting-Prozess, der bei 400 mA für 90 Minuten durchgeführt wurde. Es wurde für das Blotting eine PVDF-Membran verwendet, die zuvor mit Methanol für eine Minute aktiviert wurde.

Nach dem Blotting wurde die Membran für 5 Minuten in TBS-T-0.1 % eingetaucht um Reste des Blottingpuffers zu waschen und danach wurde die Membran in 5 % BSA-Lösung für 30 Minuten geblockt (5 % BSA in TBS-T-0.1 %). Danach wurde die Membran mit einem Primärantikörper (verdünnt in 5 % BSA in TBS-T-0.1 %) bei 4 °C auf einem Shaker über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran für 3x15 Minuten mit TBS-T-0.1 % gewaschen und mit einem passenden HRP-konjugierten-Sekundärantikörper (verdünnt in 5 % BSA in TBS-T-0.1 %) für eine Stunde in Raumtemperatur auf einem Shaker inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift, wurde die Membran in einem ECL-Reagenz für 5 Minuten im Dunklen inkubiert und wurde direkt danach für die Entwicklung eines Films verwendet.

2.5 Immunfluoreszenz-Färbungen in Zellkultur

Die Färbung in der Zellkultur wurde an b.End.3-Zellen durchgeführt. Diese Zellen wurden in 8 Kammern-Zellkulturobjektträgern in DMEM mit 10 % FCS und 1 % pen/strep ausgesät (20,000-Zellen/Kammer). Es wurde gewartet bis die Zellen eine Konfluenz von 80% aufwiesen. Direkt danach wurden Zellen unterschiedlich lang mit CM behandelt (siehe 2.3).

Als nächstes wurden die Zellen mit 1xPBS von der Restmedia gewaschen und danach in 4% PFA für 15 Minuten bei 4 °C fixiert. Nach der Fixierung wurden sie drei Mal mit PBS vom noch verbliebenen PFA freigewaschen und mit einer Blockierlösung (3 % BSA, 0.1 % Triton-x-100 in PBS) für 30 min geblockt. Danach wurde die Blockierlösung aufgezogen und die Zellen wurden mit einem Primärantikörper (verdünnt in einer Blockierlösung) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper aufgezogen und die Zellen wurden 3 Mal mit PBS gewaschen und mit dem Sekundärantikörper (verdünnt in einem Antibody diluent mit Hintergrund-reduzierender Wirkung) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Objektträger bei Raumtemperatur getrocknet und in einem Mounting Medium, welches den Kernfarbstoff DAPI enthält unter einem Deckglas eingebettet.

2.6 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden 3 Gruppen von C57BL/6J-Mäusen verwendet. Die erste Gruppe war WT, die zweite Gruppe war durch den absoluten Mangel an TSAd charakterisiert ``TSAd knock out`` (TSAd^{-/-}) und die dritte Gruppe trug eine Funktionsverlustmutation in der VEGFR2-Phosphorylierungsstelle Y949 (Y951 im Menschen) (VEGFR2-Y949F/Y949F). Es wurde eine systemische Entzündung in allen Tieren durch intraperitonealer LPS-Injektion verursacht (siehe 2.8).

2.7 Tierversuchsablauf

Der Versuchsablauf für die drei Tiergruppen wird in Abbildung 14 dargestellt. Im Alter von 6 Wochen begannen die Versuche zunächst mit einer Messung des basalen systemischen Mitteldrucks (siehe 2.10). Am Folgetag dieser Messung wurden alle Mäuse intraperitoneal mit LPS behandelt (siehe 2.8 und Abbildung.14). 12 Stunden nach der LPS-Injektion wurde eine nicht-invasive Blutdruckmessung unter Narkose (siehe 2.9/10) durchgeführt. Nach Beendigung der Narkose wurde zu den Zeitpunkten 12, 24, 36, 48, und 72 Stunden nach der LPS-Injektion anhand eines ``Sepsis severity score Systems`` der Sepsis-Schweregrad bestimmt (siehe Tabelle.1/2.8). Im Anschluss wurden Organe zur Aufbereitung entnommen und der Versuch wurde beendet (siehe 2.11).

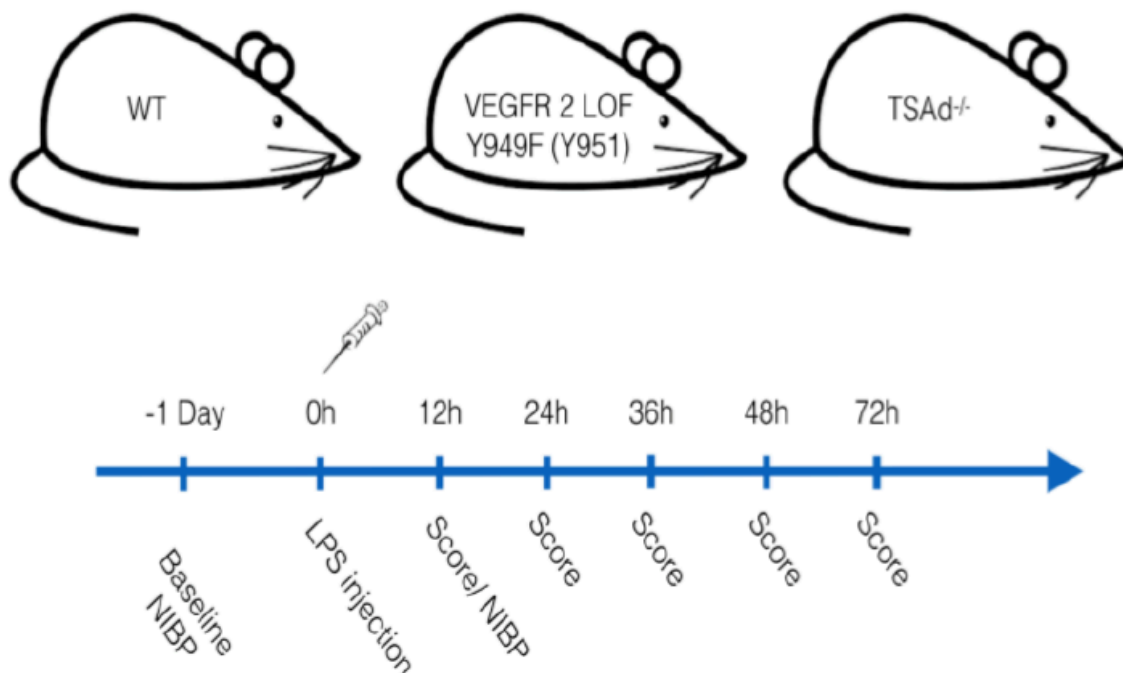


Abbildung 14: Darstellung des Versuchsablaufs für die drei Gruppen der Versuchstiere. Nach einer initialen Messung des Blutdrucks wurden die drei Tiergruppen mit einer intraperitonealen LPS-Injektion behandelt. Neben der Beurteilung des Sepsis-Schweregrades zu den angegebenen Zeitpunkten, wurde eine nicht-invasive Blutdruckmessung 12h nach LPS-Gabe durchgeführt. WT=Wild type, LOF= Loss of function, NIBP= Non-invasive blood pressure, LPS= Lipopolysaccharide, Score= Sepsis severity score

2.8 Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis

Um die TSAd-VEGFR2-Interaktion unter septischen Bedingungen in einem Mausmodell zu untersuchen, wurde in drei Gruppen von Mäusen (TSAd^{-/-}, VEGFR2-Y949F/Y949F, WT) durch eine intraperitoneale Injektion von Lipopolysacchariden aus *E. coli* (20 mg/ kg KG) eine systemische Entzündung induziert. Alle Mäuse erhielten Buprenorphin i.p. zu Beginn der Sepsis und die Buprenorphingabe wurde in einem Zeitintervall von 12 Stunden durch das ganze Experiment wiederholt. Ab dem Zeitpunkt des Sepsisbeginns, wurden alle 12 Stunden Tiere zur Beurteilung ihrer Sepsisschwere untersucht (siehe Abbildung.14). Hierzu wurde ein Punktesystem verwendet, welches die Parameter Gewicht, Verhalten, Schmerz, Dyspnoe und Aszites beinhaltet (Tabelle. 1). Wenn ein Tier eine Gesamtpunktzahl von 20 oder mehr erreicht hatte, so wurde der Versuch beendet und das Tier wurde als verstorben angesehen.

	0	5	10	20
Verhalten	Maus bewegt sich normal im Käfig, klettert, Fluchtreflexe vorhanden	Maus verlangsamt sich leicht und bewegt sich von alleine	Bewegung an einem Punkt, Tippen wird benötigt um die Maus zu bewegen	Maus liegt apathisch oder im Koma bewegungslos
Gewichtsverlust	0-5%	5-10%	10-15%	>15%
Aszites	kein	mild	moderat	schwer
Dyspnoe	ruhige ständig regelmäßige Atmung	vertiefte Atemzüge unregelmäßig	Stridor, angespanntes Atmen, Piepstöne	Agonale Atmung (evtl. terminal mit Zyanose)
Schmerz	keine Anzeichen von Schmerz	Maus sitzt mit gekrümmten Rücken, beschränkt auf Reinigungsverhalten	geänderte Gangart, zitternd	auf Zehenspitze langsames und schwerfälliges Gehen

Tabelle 1: Zur Beurteilung der Sepsisschwere wurde ein Punktesystem verwendet, in dem in fünf Kategorien Punkte zwischen 0 und 20 vergeben wurden. Ab einer Punktzahl von 20 oder mehr wurde der Versuch abgebrochen und das Tier wurde als verstorben registriert.

2.9 Narkose

Für die Narkose der Tiere wurde eine Mischung aus Midazolam, Medetomidin und Fentanyl verwendet („MMF“). Die Tiere wurden gewogen und die Mischung wurde gewichtsadaptiert i.p. injiziert.

Nach Durchführung der Blutdruckmessung wurde die Wirkung der MMF-Narkose durch eine gewichtsadaptierte Injektion einer Antagonistenmischung aufgehoben. Unter Berücksichtigung der längeren Halbwertszeit der Narkosemittel, wurden 2/3 der

Antagonistenmischung i.p. und 1/3 subkutan injiziert. die unten dargestellte Tabelle.2 zeigt die Zusammenfassung der Antagonistenmischung.

Agonist	Dosierung in mg/ kg KG	Antagonist	Dosierung in mg/ kg KG
Medetomidin	0,5	Atipamezol	2,5
Midazolam	0,05	Flumazenil	0,5
Fentanyl	0,005	Naloxon	1,2

Tabelle 2: Zeigt die Zusammensetzung der Narkosemittel in Grün sowie die Antagonistenmischung in Rot. Die Dosierung wurde gewichtsadaptiert berechnet.

2.10 Nicht-invasive Blutdruckmessung

Die Messung erfolgte mit Hilfe einer Schwanzmanschette eines nicht-invasiven CODA-Blutdruck-Systems. Zu Beginn der Messung wurden die Mäuse narkotisiert (siehe 2.9/ Tabelle.2) und auf eine Wärmeplatte gelegt. Danach wurde eine sog. O-Manschette (O-Cuff) um den Schwanz der Maus bis zur Schwanzbasis gestreift (Abbildung.15 A, B). Das O-Cuff wurde dann aufgeblasen, um den Blutfluss zum Schwanz zu behindern. Danach wurde eine zweite Manschette mit einem Volume-Pressure-Recording-Sensor (VPR-Sensor) um den Schwanz distal vom O-Cuff gestreift. Wie bei den Blutdruckmessgeräten für Menschen, wurde das O-Cuff langsam entleert und es wurden durch den VPR-Sensor die physiologischen Eigenschaften des zurückfließenden Blutes registriert (Abbildung.15 C). Mithilfe einer Software im CODA-Blutdruck-System wurden der systolische, der diastolische und der Mitteldruck bestimmt.

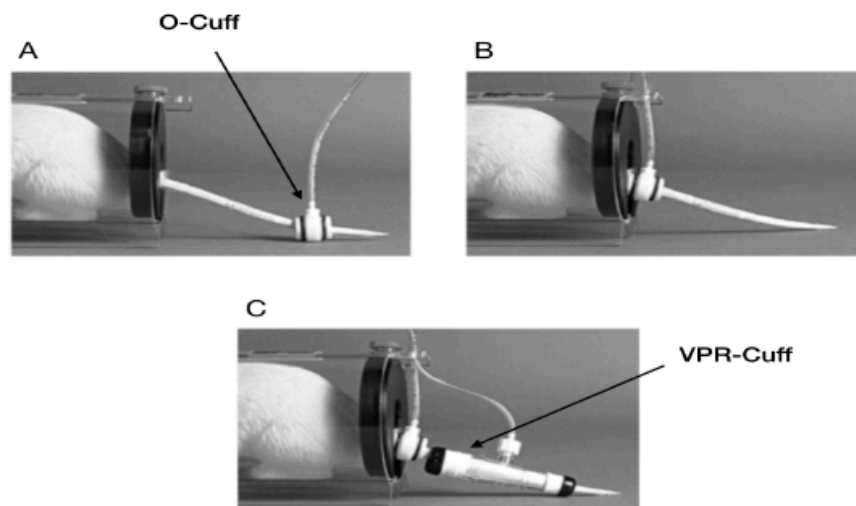


Abbildung 15: Darstellung der nicht-invasiven Blutdruckmessung. A, B Mithilfe eines O-Cuff wird der Blutfluss zum Schwanz durch Aufblasen der Manschette unterbrochen. C Mithilfe eines VPR-Cuff werden der systolische Blutdruck, der diastolische Blutdruck und der Mitteldruck bestimmt (Von CODA™, non-invasive blood pressure system, owner's manual © 2013 Kent Scientific Corporation, Documentation Version 1.01.07, For Software Version 4.1).

2.11 Organernte und Aufbereitung

Bei allen Tieren wurden nach erfolgreichen Messungen oder dem Tod der Tiere und dem Abschluss des Experiments das Herz und der M. quadriceps femoris entnommen. Die Organe wurden für die Anfertigung von Kryoschnitten in Tissue Tek eingebettet und sofort auf Trockeneis gelegt. Danach wurden alle Organe bei -80 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Organe, die für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet wurden, wurden in einem Mikrotom bei -20 °C für 30 min vor dem Schneiden gelagert und später wurden sie in 6µm dicke Schnitte geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Bis zu ihrer Färbung wurden die Schnitte in Objektträgerboxen bei -20 °C gelagert oder transient auf Trockeneis und danach sofort für die Fixierung und die Färbung verwendet.

2.12 Histologie/Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz ist eine Methode, bei der Zellen in Kultur oder Gewebe primäre Antikörper gegen bestimmte Proteinmoleküle ausgesetzt werden. Nach einer zusätzlichen Inkubation mit fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper, die gegen die primären Antikörper gerichtet sind, können Informationen über die Standorte der Proteinmoleküle und die Struktur der Zelle geliefert werden.

Durch die gezielte Verwendung von Antikörper gegen Zellmarkermolekülen, die von spezifischen Zellen oder Gewebe exprimiert werden, wird es leicht, Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop vom restlichen Gewebe zu unterscheiden oder die Expression von bestimmten Proteinen zu verfolgen und ihre Lokalisation in einem Gewebe oder in der Zelle zu bestimmen.

Es wurden in der vorliegenden Arbeit Doppelfärbungen an Kryoschnitten vom peripheren Muskel (M. quadriceps femoris) für die Antigene PECAM-1 und NG2 durchgeführt. PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, auch CD31) wird als Endothelzellmarker angesehen, während NG2 (neuron-gial antigen 2) als Perizytenmarker angesehen wird. Dadurch könnten in den Kryoschnitten Kapillaren und Perizyten unter dem Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden.

Ebenfalls, wurden an Kryoschnitten Färbungen für phosphoryliertes c-Src (Tyr416), STAT3 und VE-Cad durchgeführt. Bei c-Src handelt es sich um ein zytosolisches Protein aus der Familie der Tyrosinkinase (siehe 1.3). STAT3 ist ein zytosolischer Transkriptionsfaktor, der nach Aktivierung in den Kern transloziert (siehe 1.4). VE-Cad ist ein Protein, das in Endothelzellen strikt an endothelialen Verbindungen lokalisiert ist. Es scheint der Hauptvermittler von Zell-Zell-Kontakten zu sein (siehe 1.6).

Für alle histologischen Färbungen wurden die bei -20 °C gelagerten Kryopräparate (Herz oder Muskelschnitte) 10 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut und dann in PFA 4% für 15 Minuten bei 4 °C fixiert. Danach wurden die Schnitte in 1xPBS von dem Rest-PFA gewaschen (3x5 Minuten) und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur in einer 5% BSA-Lösung geblockt um unspezifische

Antikörperbindungen zu reduzieren. Diese wurde durch Abklopfen entfernt und der Primärantikörper (verdünnt in 5% BSA) wurde auf die Schnitte pipettiert bis der ganze Gewebeschnitt vollständig bedeckt war. Danach wurden die Schnitte bei 4 °C in einer feuchten Kammer über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper durch Waschen mit 1xPBS (3x5 Minuten) entfernt und die Gewebeschnitte wurden mit einem Sekundärantikörper (verdünnt in antibody diluent mit hintergrundreduzierender Wirkung) für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach einem letzten Waschschrift wurden die Schnitte in Raumtemperatur getrocknet und in einem Mounting Medium, welches den Kernfarbstoff DAPI enthält unter einem Deckglas eingebettet.

2.13 Mikroskopie

Für die Aufnahmen der PECAM-1/NG2 Doppelfärbung und für die Färbung in der Zellkultur, wurde ein Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 6000 B) verwendet. Die Bildverarbeitung wurde an der systemeigenen Software (LAS AF version 4.0.0) sowie an (Image J 1.50c4) durchgeführt.

Die Aufnahmen für c-Src (Tyr416) und STAT3 und VE-Cad wurden mit einem Konfokalmikroskop (Leica TCS SP8) durchgeführt. Die Bildverarbeitung wurde an der systemeigenen Software (LAS X Version 3.3.0) sowie an (Image J 1.50c4) durchgeführt.

2.14 Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt (\pm Standardfehler für Western Blot). Die statistische Signifikanz wurde durch ungepaarten t-tests berechnet. Es wurde ein P-Wert von $<0,05$ als Grenzwert für die Signifikanz angesehen. Alle signifikanten Ergebnisse wurden mit einem Stern (*) markiert, während nicht signifikante Ergebnisse mit (n.s.) markiert wurden. Die Überlebenswahrscheinlichkeit wurde nach Kaplan-Meier beurteilt und wurde in Prozentangaben dargestellt.

2.15 Tabellen zur Zusammenfassung der verwendeten Materialien und Zubehör

2.15.1 Antikörper

Bezeichnung	Bestell-Nr.	Hersteller
CD31/PECAMI	BM4086	Acris, Herford, DE
Cy3 Donkey Anti-Rat	712-165-153	Jackson ImmunoResearch, Cambridgeshire, UK
Donkey anti-Rabbit, HRP	A16023	Invitrogen GmbH, Carlsbad, USA
Donkey anti-Goat, HRP	A16005	Invitrogen GmbH, Carlsbad, USA
Donkey Anti-Mouse Alexa 488	A21202	Invitrogen GmbH, Carlsbad, USA
Donkey anti-Sheep, HRP	A16047	Invitrogen GmbH, Carlsbad, USA

Goat Anti-Rabbit Alexa 488	A11008	Invitrogen GmbH, Carlsbad, USA
Mouse anti-goat IgG-R (TRITC)	sc-2490	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
NG2	AB5320	Merck, Millipore, Massachusetts, USA
Phospho-Src (Tyr416)	2101	Cell Signalling Technology, Massachusetts, USA
Phospho-Stat3 (Tyr705)	9145	Cell Signalling Technology, Massachusetts, USA
STAT3	MAB1799	R&D Systems, Minneapolis, USA
TSAd	AF6265	R&D Systems, Minneapolis, USA
p-VE-Cadherin	Ab119785	Abcam
VE-Cadherin	AF1002	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.15.2 Chemikalien

Substanz	Bestell-Nr.	Hersteller
Bromphenol blue	B0126	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Ethidium bromide (Etbr)	2218.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Glycerol	G9012	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Glycin	G8898	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
HEPES	H3375	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
KCl	6781.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
KH ₂ PO ₄	3904.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Na ₂ HPO ₄	T877.2	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
NaCl	S7653	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Paraformaldehyde	158127	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
SDS	862010	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tris hydrochlorid	9090.3	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Triton™ X-100	X100	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Trizma® base	T4661	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Tween ® 20	P2287	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
UltraPure™ 0.5M EDTA	15575020	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
β-Mercaptoethanol	M3701	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

2.15.3 Geräte

Bezeichnung	Bestell-Nr.	Hersteller
CODA-Blutdruck-Systems Version 4.1		Kent Scientific corporation, Torrington, USA
Plate Reader	MR5000	Dynatech, DE
PowerPac™ Basic Power Supply	164-5050	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Eppendorf® Thermomixer	T1317	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
DNA Thermal Cycler	Model 480	PerkinElmer Cellular Technologies, Waltham, USA
Eppendorf Microcentrifuge	10755822	Eppendorf, Hamburg, DE
Inkubator shaker	M1320-0000	Eppendorf, Hamburg, DE
NanoDrop™ 2000 spektralphotometer	ND-2000	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA

UV plate	Z641359	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
----------	---------	------------------------------

2.15.4 Histiologie

Tissue Tek	SA62550-01	Sakura Finetek, USA
Objekträger	12164682	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
VECTASHIELD	H-1200	Vektor Laboratories, Burlingame, USA

2.15.5 Medien und Zusatzstoffe

BSA	A2153	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
FCS	16000-044	Biochrom AG, Berlin, DE
Gibco™ Penicillin-Streptomycin	15140122	Biochrom AG, Berlin, DE
Gibco® DMEM Medium	1813967	Biochrom AG, Berlin, DE
Gibco™ Trypsin-EDTA (0.25%)	25200056	Biochrom AG, Berlin, DE
LB Medium	10855001	Invitrogen™, Carlsbad, USA
SOC Outgrowth Medium	B9020S	New England BioLabs, Massachusetts, USA
Polybrene Reagent	TR-1003	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Opti-mem	31985070	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA

2.15.6 Substanzen und Materialien für die Klonierung

1 Kb Plus DNA Ladder	10787018	Invitrogen™, Carlsbad, USA
Agarose	3810.2	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Antarctic Phosphatase	M0289L	NewEnglandBioLabs, Massachusetts, USA
BgLI	R3104S	NewEnglandBioLabs, Massachusetts, USA
CutSmart® Buffer	B7204S	NewEnglandBioLabs, Massachusetts, USA
Eppendorf® PCR tubes 0.2mL	Z316121	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Eppendorf™ Microcentrifuge	10755822	Eppendorf, Hamburg, DE
Ethidium bromide solution	2218.1	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Fast-Link™ DNA Ligation Kit	LK11025, LK0750H, and LK6201H	Epicentre an Illumina company, USA
Gateway™ LR Clonase™ Enzyme mix	11791019	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Gel Loading Dye, Purple (6X)	B7024S	NewEnglandBioLabs, Massachusetts, USA
Gibco™ Ampicillin	11593027	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Gibco™ Gentamicin	15750060	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
HindIII	R0144S	NewEnglandBioLabs, Massachusetts, USA
Inkibator shaker	M1320-0000	Eppendorf, Hamburg, DE
LB Medium	10855001	Invitrogen™, Carlsbad, USA
NanoDrop™ 2000 spektralphotometer	ND-2000	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
NEB® 10-beta Competent E. coli	C3019H	NewEnglandBioLabs, Massachusetts, USA
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	740609.10	Machery-Nagel, Düren, DE
pENTR-THT III	55791	addgene, Massachusetts, USA
pGLTR-X-PURO	58246	addgene, Massachusetts, USA
QIAprep Spin Miniprep Kit	NC9260540	Quiagen, Hilden, DE

SOC Outgrowth Medium	B9020S	NewEnglandBioLabs, Massachusetts, USA
TBE Puffer	B52	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Tris-EDTA buffer solution	T9285	Sigma-Aldrich, Missouri, USA

2.15.7 Sequenzierprime

Bezeichnung	Sequenz.	Hersteller
THI-seq. Fw	CTG CAG GAA TTC GAA CGC TGA CG	Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

2.15.8 DNA-Sequenzen der TSAd-shRNA

shTSAd.1 fw

GATCCCCGCTCTGTCT GTCAATAATTTCAAGA GAATTATTGACAGACA GAGACTTTTTGGAAA

100pmol/ml Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

shTSAd.1 rev

AGCTTTTCCAAAAGT CTCTGTCTGTCAATAAT TCTCTTGAAATTATTGA CAGACAGAGACGGG

100pmol/ml Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

shTSAd.2 fw

GATCCCCGAAGGATATT AAGGTCAGATTCAAGA GATCTGACCTTAATATC CTTCTTTTTGGAAA

100pmol/ml Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

shTSAd.2 rev

AGCTTTTCCAAAAGA AGGATATTAAGGTCAG ATCTCTTGAATCTGACC TTAATATCCTTCGGG

100pmol/ml Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

shTSAd.3 fw

GATCCCCGCTGTTACC CCGATTTACTTTCAAG AGAAGTAAATCGGGGT AACAGCTTTTTGGAAA

100pmol/ml Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

shTSAd.3 rev

AGCTTTTCCAAAAGC TGTTACCCCGATTACT TCTCTTGAAAGTAAAT CGGGGTAACAGCGGG

100pmol/ml Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

shTSAd.4 fw

GATCCCCGGCCCAGCA TGCAAGTTATTTCAAG AGAATAACTTGCATGC TGGGCCTTTTTGGAAA

100pmol/ml Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

shTSAd.4 rev

AGCTTTTCCAAAAGG CCCAGCATGCAAGTTA TTCTCTTGAAATAACTT GCATGCTGGGCCGGG

100pmol/ml Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

shScr.1 fw

GATCCCCGCTGCAGGG CATTACCTATTCAAGA GAATAGGTAATGCCCT GCAGCTTTTTGGAAA

100pmol/ml Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

shScr.1 rev

AGCTTTTCCAAAAGC TGCAGGGCATTACCTAT TCTCTTGAAATAGGTAA TGCCCTGCAGCGGG

100pmol/ml Eurofins Genomics, Ebersberg, DE

2.15.9 Western Blotting

Bezeichnung	Bestell-Nr.	Hersteller
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	23227	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA
Falcon® U-Bottom Tissue Culture Plates	62406-121	VWR International GmbH, Ismaning, DE
BSA	A2153	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
PVDF Western Blotting membran	3010040001	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Precast Protein Gels, 10-well, 30 µl	4561023	Bio-Rad, Hercules, California, USA
Pierce™ ECL Substrate	32106	ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA

2.15.10 Zubereitung von Puffer/Lösungen

PBS	Substanz	Menge
	NaCl	8g
	Na ₂ HPO ₄	1,44g
	KCl	0,2g
	KH ₂ PO ₄	0,24g
	dH ₂ O	1000ml
		pH= 7,4
Ladefarbstoff für WB		
	Glycerol	20ml
	β-Mercaptoethanol	2ml
	Bromphenol blue	5mg
	Tris hydrochlorid	1,55g
	UltraPure™ 0.5M EDTA	4ml
	ddH ₂ O	Zu einem Gesamtvolumen von 50ml
10x Running-Puffer für WB		
	Glycine	144.4g
	Trizma® base	30.3g
	SDS	10g
	ddH ₂ O	1L
10x Transfer-Puffer für WB		
	Glycine	144.4g
	Trizma® base	30.3g
	ddH ₂ O	1L
Blockierlösung		
	BSA	5g/100ml (1x PBS)
	Triton™ X-100	0,1 %
		PH=6,9
10x TBS-T		
	Trizma® base	24g
	NaCl	88g

	Tween ® 20	1ml
	ddH ₂ O	1L
		PH=7,5
Annealing-Puffer		
	NaCl	100mM
	HEPES	50mM
		PH=7,4
Blockierlösung für WB		
	BSA	5g/100ml (1x TBS-T)
Fixierlösung (PFA 4%)		
	Paraformaldehyde	40g
	PBSx1	1L

2.15.11 Zellkultur

Bezeichnung	Bestell-Nr.	Hersteller
Falcon Chambered Slides	10234121	ThermoFisher Scientific, Massachusetts USA
Zellkulturschalen 147,8 cm ²	P 93150	Biochrom AG, Berlin, DE
Eppendorf Tubes 1,5 ml	T9661-1000EA	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Falcon Blue Max 15 ml	352096	BD GmbH, Heidelberg, DE
Falcon Blue Max 50 ml	352070	BD GmbH, Heidelberg, DE
RIPA Buffer	R0278	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Zellkulturplatten, 6-well	P 92006	Biochrom AG, Berlin, DE
Eppendorf Tubes 2 ml	T2795	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
1ml Insulinspritze mit Nadel	9151133	B. Braun Melsungen AG, DE

3. Ergebnisse

3.1 Modell der Sepsis in vitro

Endothelzellen (primäre MLECs oder b.End.3-Zellen) wurden in Kultur mit einem konditioniertem Medium (CM) oder mit einem CM, das 1:1 mit normalen Medium verdünnt wurde (CM/2) inkubiert, um eine hyperinflammatorische Situation nachzuahmen, die durch Pathogene und ihre Komponenten in vivo verursacht wird (siehe 2.3).

In einem weiteren Ansatz, wurden die Zellen mit verschiedenen inflammatorischen Medien inkubiert (siehe 2.3). Die Zellen wurden danach mit PFA 4% fixiert und gefärbt oder mit RIPA-Puffer lysiert und die Proteine geblottet (siehe 2.4).

3.1.1 Immunfluoreszenzfärbung für VE-Cad/STAT3

Es wurden b.End3-Zellen in einem verdünnten CM (CM/2= 1:1 mit normalem Medium) für eine Stunde inkubiert und danach für VE-Cad, STAT3 und DAPI gefärbt. Ziel war es, die VE-Cad-Proteinexpression in der Zellmembran sowie die Proteinverteilung von STAT3 innerhalb der Zelle nach Inkubation mit einem inflammatorischen Medium zu beurteilen. Nach der Behandlung mit CM/2 zeigten die Zellen keinen Unterschied in der Expression von VE-Cad oder in der Verteilung von STAT3 innerhalb der Zelle im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung.16).

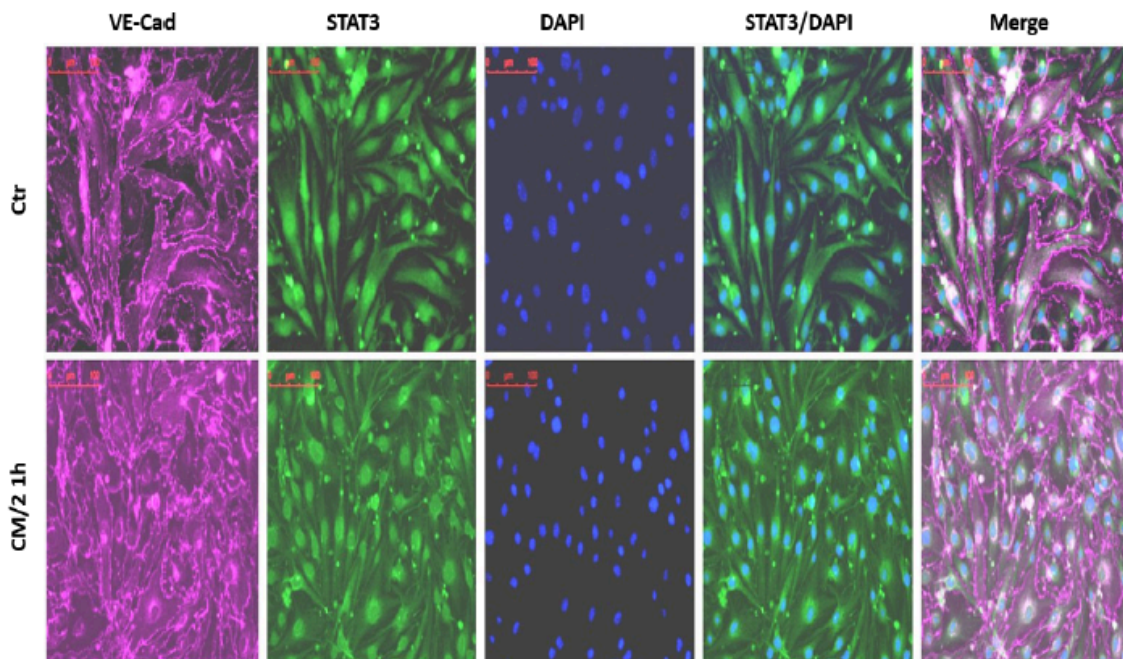


Abbildung 16: Zeigt die Immunfluoreszenzfärbung von b.End.3-Zellen in Kultur für VE-Cad (Magenta), STAT3 (Grün) und DAPI (Blau). Ctr=Medium aus nicht-aktivierten Makrophagen, CM/2= Konditioniertes Medium (Medium aus aktivierten Makrophagen) verdünnt 1:1 mit normalem Medium.

3.1.2 Signalproteine in MLECs-Lysate nach Inkubation mit CM/2

Nach Inkubation von MLECs mit CM/2 für 12 h, wurde die Proteinexpression von VE-Cad, p-Src(Tyr416) und TSAd per Western Blotting beurteilt (Abbildung.17AB). Die behandelten Proben zeigten im Vergleich zu deren Kontrollen eine erhöhte Proteindetektion für p-Src(Tyr416) nach 12 h der Behandlung mit CM/2 (Abbildung. 17A), während es keinen nennenswerten Unterschied in der Expression von VE-Cad und TSAd im Vergleich zur Kontrolle gab (Abbildung.17AB).

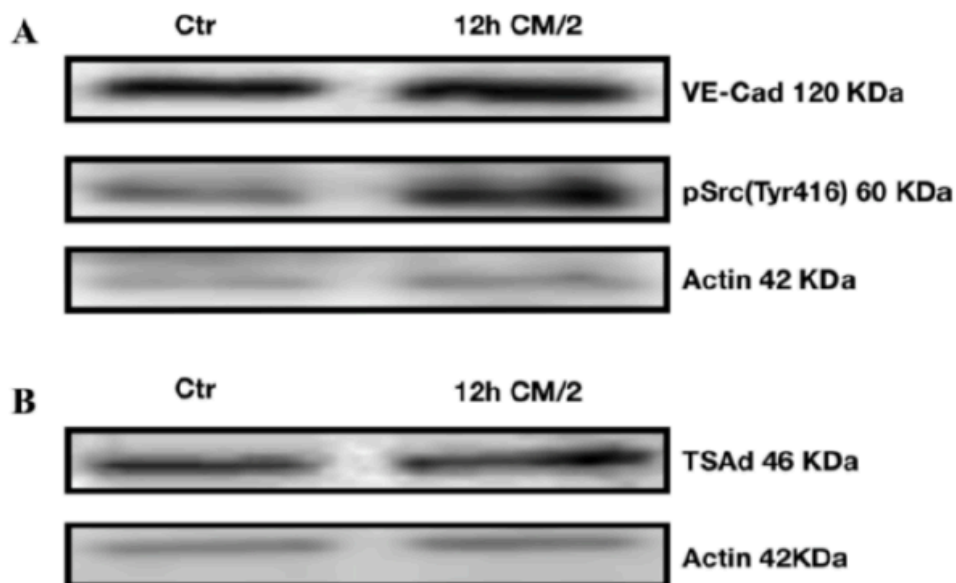


Abbildung 17: Zeigt in A und B die Proteindetektion von Signalmolekülen stromabwärts von dem VEGFR2 in Lysate aus MLECs in Western Blotting. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Molekulargewichte angegeben. Die Actin-Banden stellen eine Ladekontrolle für alle Banden dar, die darüber liegen. Ctr=Medium aus nicht-aktivierten Makrophagen, CM/2= Konditioniertes Medium (Medium aus aktivierten Makrophagen) verdünnt 1:1 in normlem Medium, h= Stunde.

3.1.3 Signalproteine in b.End.3-Zell-Lysate nach Inkubation mit vollem CM

Da es keinen Effekt der Inkubation mit CM/2 auf die Proteinexpression von VE-Cad gab (Abbildung.16 und 17A) und unter dem Verdacht, dass der proinflammatorische Effekt des CM mit der Zeit nachlassen könnte, wurden Endothelzellen im nächsten Schritt nach unterschiedlich langer CM-Inkubation innerhalb einer Stunde lysiert.

Weiterhin, wurden die nächsten Experimente mit vollem CM statt mit CM/2 durchgeführt, unter der Annahme, dass dadurch ein stärkerer Effekt auf die Expression von VE-Cad erreicht werden könnte.

Zum Vermeiden von interindividuellen Unterschieden der einzelnen Präparatorien in primären MLECs sowie zur Erstellung eines longitudinalen Vergleichs der Proteinexpression, wurde eine b.End.3-Zelllinie unterschiedlich lang mit vollem CM inkubiert (Abbildung.18AB).

Es wurde durch densitometrische Quantifizierung beobachtet, dass VE-Cad zeitabhängig herunterreguliert werden könnte (Abbildung.18B) und, dass bereits eine Inkubation für 10 min ausreichend wäre um eine Herunterregulierung zu verursachen (57% der Kontrolle) (Abbildung.18B). Deswegen wurden weitere Analysen nach einer Inkubationsdauer von maximal 10 min mit vollem CM durchgeführt und die statistische Signifikanz wurde für 10 min berechnet.

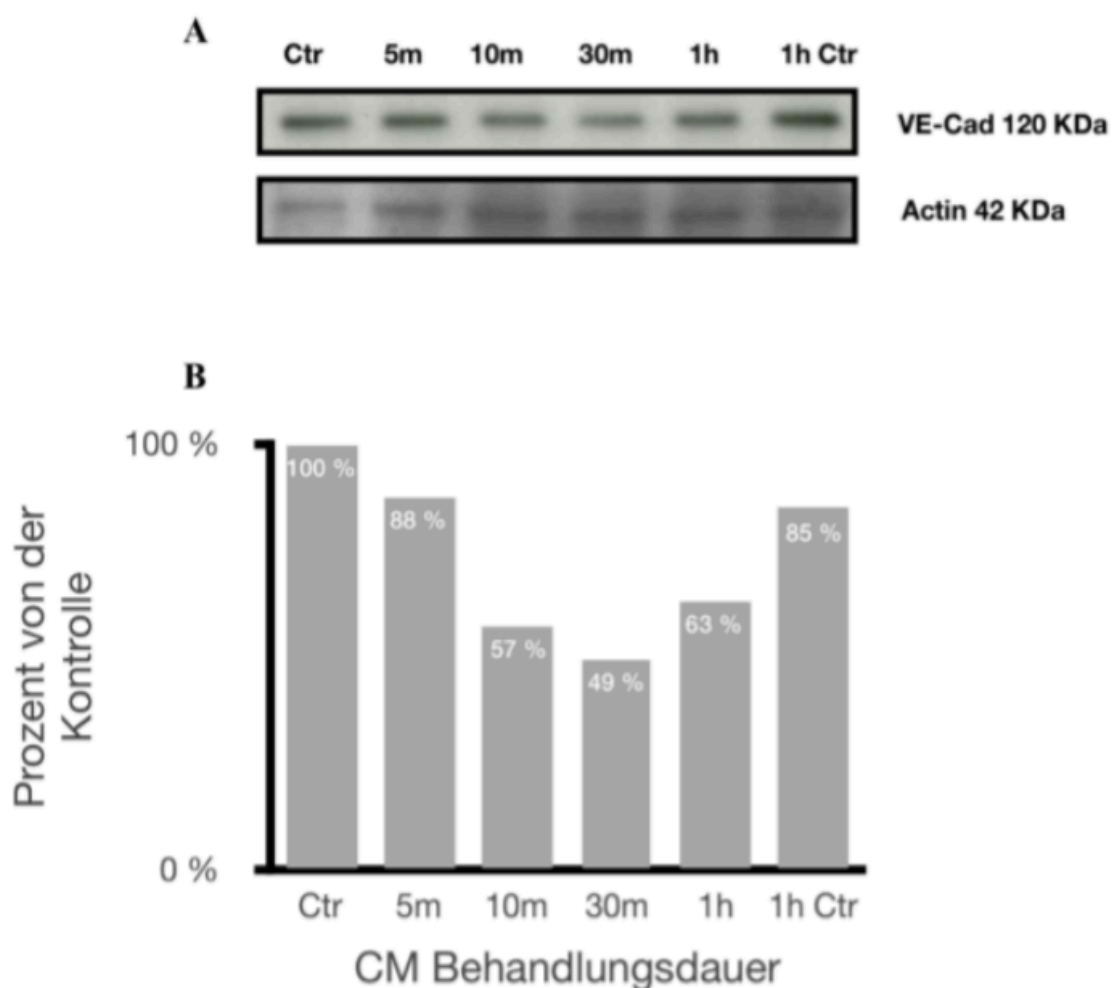


Abbildung 18: Zeigt in A die Proteindetektion nach Western Blotting für VE-Cad nach unterschiedlich langer Behandlung mit CM in Lysate aus b.End3-Zellen. Die entsprechenden Actin-Banden stellen eine Ladekontrolle für alle Banden dar, die darüber liegen. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Molekulargewichte in Kilo Dalton angegeben. In B, densitometrische Quantifizierung der VE-Cad-Banden in Prozent von der Kontrolle, die den Wert 100% trägt. Die Behandlungsdauer wird in der X-Achse in Minuten (m) angegeben (h=Stunde). Ctr=Medium aus nicht-aktivierten Makrophagen, CM= Konditioniertes Medium (Medium aus aktivierten Makrophagen).

Als nächstes wurde zusätzlich zur VE-Cad die Dynamik der Expression von p-VE-Cad (Tyr685), p-Src(Tyr416), STAT3 und p-STAT3(Tyr705) innerhalb von 10 Minuten in b.End.3-Zellen untersucht (Abbildung.19AB).

Nach Inkubation von b.End.3-Zellen mit CM für 1, 5 und 10 Minuten, zeigten die behandelten Zellen eine kontinuierliche Abnahme der Proteindetektion von VE-Cad mit einer signifikanten Herunterregulierung 10 min nach dem Behandlungsbeginn (Abbildung.19AB). Außerdem wurde eine erhöhte Phosphorylierung von VE-Cad an der Position Tyr685 5 Minuten nach dem Behandlungsbeginn beobachtet. Die Proteinexpression von p-VE-Cad(Tyr685) sank wieder nach 10 min (Abbildung.19A). Weiterhin wurde eine signifikante Erhöhung der c-Src-Phosphorylierung an der Position (Tyr416) erst nach 10 Minuten beobachtet (Abbildung.19AB). Zusätzlich führte die Inkubation mit CM bereits nach einer Minute zu einer Erhöhung des Spiegels des Transkriptionsfaktors STAT3, der ab einer Minute wieder kontinuierlich sank (Abbildung.19A).

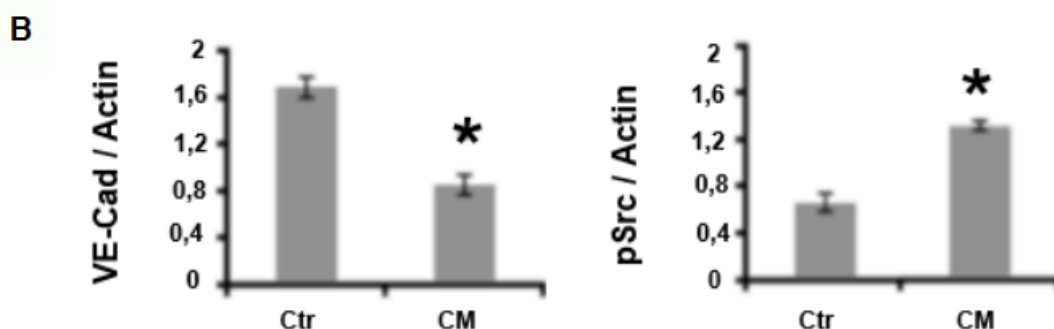
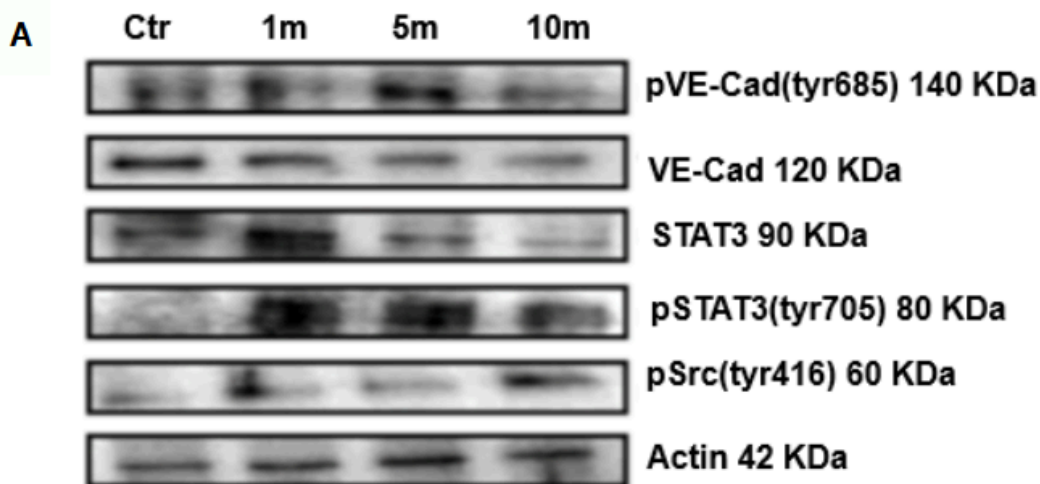


Abbildung 19: Zeigt in A die Proteindetektion nach Western Blotting für p-VE-Cad(Tyr685), VE-Cad, STAT3, pSTAT3(Tyr705) und p-Src(Tyr416) nach unterschiedlich langer Behandlung mit CM in Lysate aus b.End3-Zellen. Die entsprechenden Actin-Banden stellen eine Ladekontrolle für alle Banden dar, die darüber liegen. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Molekulargewichte in Kilo Dalton angegeben. In B, densitometrische Quantifizierung der VE-Cad- und p-Src-Banden als Ratio mit der Ladekontrolle. Die Behandlungsdauer mit CM beträgt 10 min. * = $P < 0,05$, $n = 3$ /Gruppe.

Alle mit CM behandelten Zellen zeigten eine erhöhte Proteindetektion für p-STAT3(Tyr705). Die Phosphorylierung von STAT3 an der Position Tyr705 war nach einer Minute signifikant erhöht und blieb während des gesamten Experiments im Vergleich zur Kontrolle erhöht (Abbildung.19A).

Die densitometrische Quantifizierung für VE-Cad zeigte eine signifikante Abnahme des VE-Cad/Actin-Verhältnisses nach einer Behandlungsdauer von 10 min mit CM (Verhältnis für die Kontrolle $1,683 \pm 0,127$; Verhältnis für 10 min nach CM $0,851 \pm 0,115$, P-Value = 0,008) (Abbildung.19B). Außerdem wurde eine signifikante Zunahme der Proteindetektion für Src(Tyr416) beobachtet ($p\text{-Src/Actin} = 0,6578 \pm 0,090$ für die Kontrolle; $p\text{-Src/Actin} = 1,316 \pm 0,049$ für 10 min nach CM, P-Value= 0,007) (Abbildung.19B).

In allen mit CM behandelten Zellen (MLECs/b.End.3-Zellen) konnte eine erhöhte Proteindetektion für p-STAT3(Tyr705) ab einer Minute nachgewiesen werden. Diese Phosphorylierung war unabhängig von der Konzentration der CM und wurde sowohl bei der Behandlung mit vollem CM als auch bei der Behandlung mit verdünntem CM (CM/2) beobachtet. Außerdem zeigten die Kontrollen nie eine Bande für p-STAT3(Tyr705) unabhängig von der Inkubationsdauer (siehe Abbildung.17/19).

Da das Junctionprotein ZO-1 mit der Permeabilität assoziiert ist (siehe 1.4), wurde auch der Effekt der Inkubation der b.End.3-Zellen mit CM auf die Expression von ZO-1 untersucht. Es wurde in diesem Fall die ZO-1-Expression 10 min nach CM-Behandlung analysiert (Abbildung.20A). Die densitometrische Analyse zeigte eine Abnahme der Proteindetektion für ZO-1 ($\text{ZO-1/GAPDH} = 0,700 \pm 0,037$ für die Kontrolle; $\text{ZO-1/GAPDH} = 0,487 \pm 0,018$ für 10 min CM, P-Value= 0,049) (Abbildung.20B).

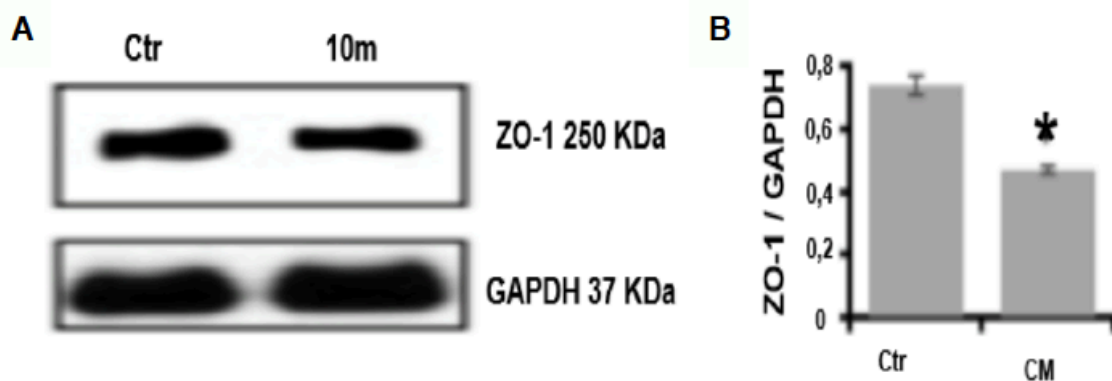


Abbildung 20: Zeigt in A die Proteindetektion nach Western Blotting für ZO-1 nach 10 min langer Behandlung mit CM in Lysate aus b.End3-Zellen. Die entsprechenden GAPDH-Banden stellen eine Ladekontrolle für alle Banden dar, die darüber liegen. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Molekulargewichte in Kilo Dalton angegeben. In B, densitometrische Quantifizierung der ZO-1-Banden als Ratio mit der Ladekontrolle. Die Behandlungsdauer mit CM beträgt 10 Minuten.*= P < 0,05, n=2/Gruppe.

3.1.4 Signalproteine in b.End.3-Zell-Lysate nach Inkubation mit LPS

Da die Makrophagen bei der Herstellung von CM mit LPS aktiviert wurden, könnte das CM aus aktivierten Makrophagen bei der Inkubation von b.End.3-Zellen mit CM auch LPS enthalten. Um den Effekt von LPS auf die Signalproteine sowie auf das Zielmolekül (VE-Cad) zu untersuchen, wurden b.End.3-Zellen unterschiedlich lang mit 10 µg/ml LPS (gelöst in DMEM 0,25 % FCS, 1 % pen/ strep) inkubiert. Es wurde die longitudinale Proteinexpression untersucht (Abbildung.21AB).

Es zeigte sich 5 min nach der LPS-Gabe eine erhöhte Phosphorylierung an der Position (Tyr685) im VE-Cad. Diese Phosphorylierung nahm kontinuierlich bis 1 Stunde nach der LPS-Gabe ab. Sie blieb aber höher als die Kontrolle (Abbildung.21A). Außerdem zeigte sich eine kontinuierliche Abnahme der Proteindetektion für VE-Cad mit einem Maximum 30 min nach der LPS-Gabe (Abbildung.21AB). Es wurde im Laufe des ganzen Experiments keine Bande für p-STAT3(Tyr705) nachgewiesen (Abbildung. 21A), sodass STAT3 nicht unbedingt erforderlich ist für das LPS-induzierte endotheliale Detachment.

Die densitometrische Quantifizierung für VE-Cad zeigte eine signifikante Abnahme des VE-Cad/Actin-Ratio nach einer Behandlungsdauer von 10 min mit LPS (Ratio für die Kontrolle $3,585 \pm 0,142$; Ratio für 10 min CM $0,674 \pm 0,050$, P-Value = 0,0005) (Abbildung.21C).

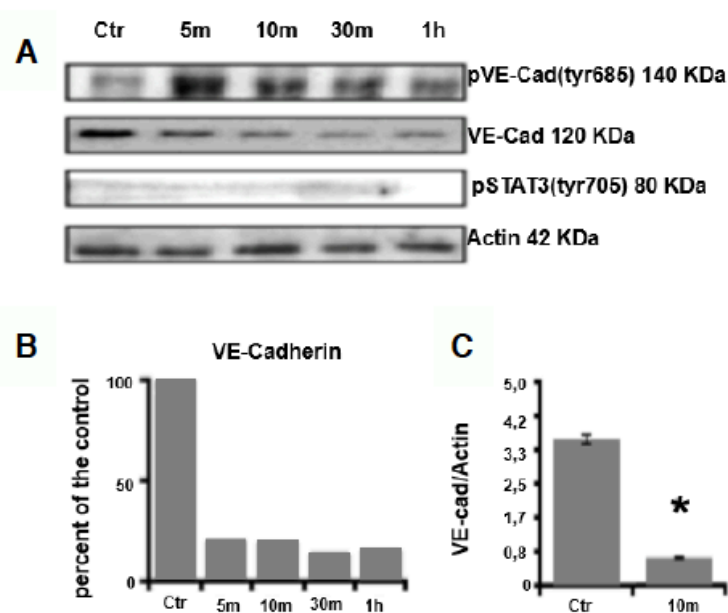


Abbildung 21: Zeigt in A die Proteinexpression nach Western Blotting für p-VE-Cad(Tyr685), VE-Cad und p-STAT3(Tyr705) nach unterschiedlich langer Behandlung mit LPS in Lysate aus b.End3-Zellen. Die entsprechenden Actin-Banden stellen eine Ladekontrolle für alle Banden dar, die darüber liegen. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Molekulargewichte in Kilo Dalton angegeben. In B, densitometrische Quantifizierung der VE-Cad-Banden in Prozent von der Kontrolle, die den Wert 100% trägt. In C, densitometrische Quantifizierung der VE-Cad-Banden als Ratio mit der Ladekontrolle. Die LPS-Behandlungsdauer wird in der X-Achse in Minuten (m) oder Stunden (h) angegeben. Ctr=kein LPS. Für C * = P < 0,05, n=3/Gruppe.

3.1.5 Signalproteine in b.End.3-Zell-Lysate nach Inkubation mit TNF α

B.End.3-Zellen wurden mit TNF α für 10 min inkubiert, weil aktivierte Makrophagen, die bei der Herstellung von CM verwendet werden, TNF α freisetzen könnten. Die Inkubation mit TNF α führte zu einer starken Herunterregulierung von VE-Cad, aber nicht zu einer erhöhten Tyrosinphosphorylierung von STAT3 an der Position (Tyr705) (Abbildung.22), sodass die STAT3-Phosphorylierung nach Inkubation mit CM nicht durch LPS oder TNF α vermittelt wurde (Siehe auch Abbildung. 21). Zusätzlich wird VE-Cad durch inflammatorische Zytokine unabhängig von STAT3 herunterreguliert.

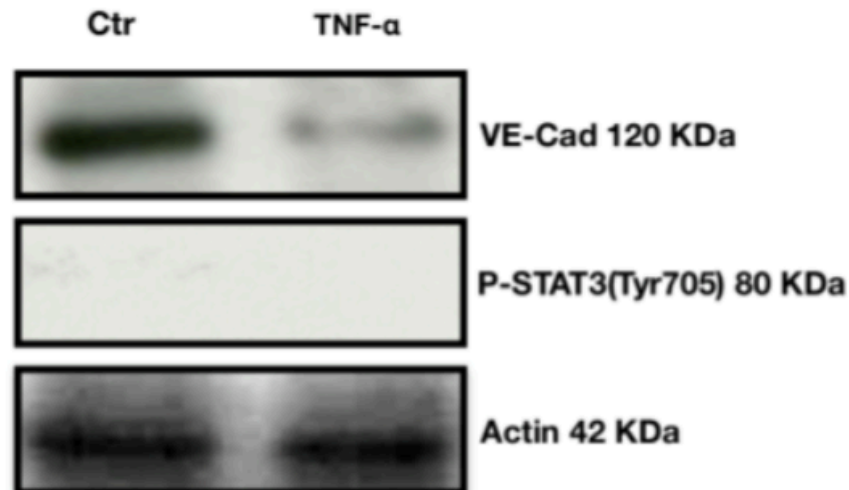


Abbildung 22: Zeigt die Proteinexpression nach Western Blotting für VE-Cad und p-STAT3(Tyr705) nach 10 Minuten langer Behandlung mit TNF α in Lysate aus b.End3-Zellen. Die entsprechenden Actin-Banden stellen eine Ladekontrolle für alle Banden dar, die darüber liegen. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Molekulargewichte in Kilo Dalton angegeben. n=1/Gruppe

3.1.6 Signalproteine in b.End.3-Zell-Lysate nach Inkubation mit CM/Flt-1

Sepsis ist mit einem zeitabhängigen Anstieg der zirkulierenden Spiegel von VEGF und PlGF in Tier- und Menschen-Sepsismodellen assoziiert. Da es in Endothelzellen zwischen Entzündungsmediatoren und VEGF-Sekretion sowie zwischen VEGF und STAT3 eine Wechselwirkung beschrieben wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Behandlung der Endothelzellen mit CM bei gleichzeitiger Gabe vom löslichen VEGFR1 (s-flt1) eine Neutralisierung (Trapping) von VEGF und somit eine Unterbrechung der Signalkaskade stromabwärts vom VEGFR2 erreicht werden könnte.

Die gleichzeitige Gabe von s-flt1 und CM zu b.End.3-Zellen führte zu einer leicht reduzierten Immunreaktivität für p-STAT3(Tyr705) im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit CM. Dies hat aber die Herunterregulierung von VE-Cad nach CM-Gabe nicht wesentlich beeinflusst (Abbildung.23). Somit ist die VEGF-Sekretion nach CM-Stimulation nicht essentiell für die VE-Cad-Herunterregulierung (Abbildung 23 siehe nächsten Seite).

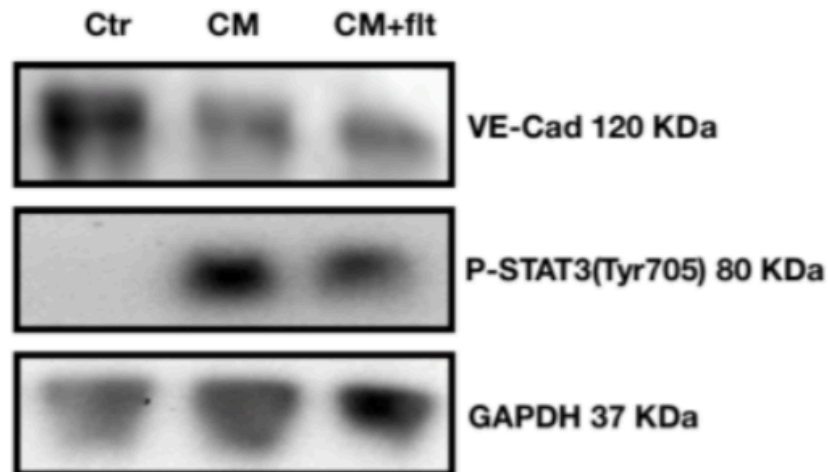


Abbildung 23: Zeigt die Proteinexpression nach Western Blotting für VE-Cad und p-STAT3(Tyr705) nach 10 Minuten langer Behandlung mit CM oder CM+s-flt in Lysate aus b.End3-Zellen. Die entsprechenden GAPDH-Banden stellen eine Ladekontrolle für alle Banden dar, die darüber liegen. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Molekulargewichte in Kilo Dalton angegeben. n=1/Gruppe

3.1.7 Induzierbares Lentivirus-vermitteltes knock down von TSAd

Es wurde mithilfe eines TSAd-shRNA-kodierenden Lentivirus eine stabile TSAd-knock down Zelllinie aus Endothelzellen hergestellt.

Die Transduktion der b.End.3-Zellen mit verschiedenen Versionen der shRNA-kodierenden Lentiviren führte bei Einzelvirustransduktion zu keiner wesentlichen Abnahme des Proteingehalts an TSAd (Abbildung.24AB). Aus diesem Grund wurden b.End.3-Zellen gleichzeitig mit zwei oder den drei zur Verfügung stehenden Viren transduziert. Nur die Triple-Transduktion (shRNA.1/3/4) führte zu einer wesentlichen Abnahme des TSAd-Proteingehalts (49% im Vergleich zur Kontrolle, die den Wert 100% trägt) (Abbildung.24AB).

Es wurden deswegen für den nächsten Versuch die Zellen verwendet, die triple-transduziert waren und bei denen ein 51%TSAd- knock down erreicht wurde (Abbildung 24 siehe nächste Seite).

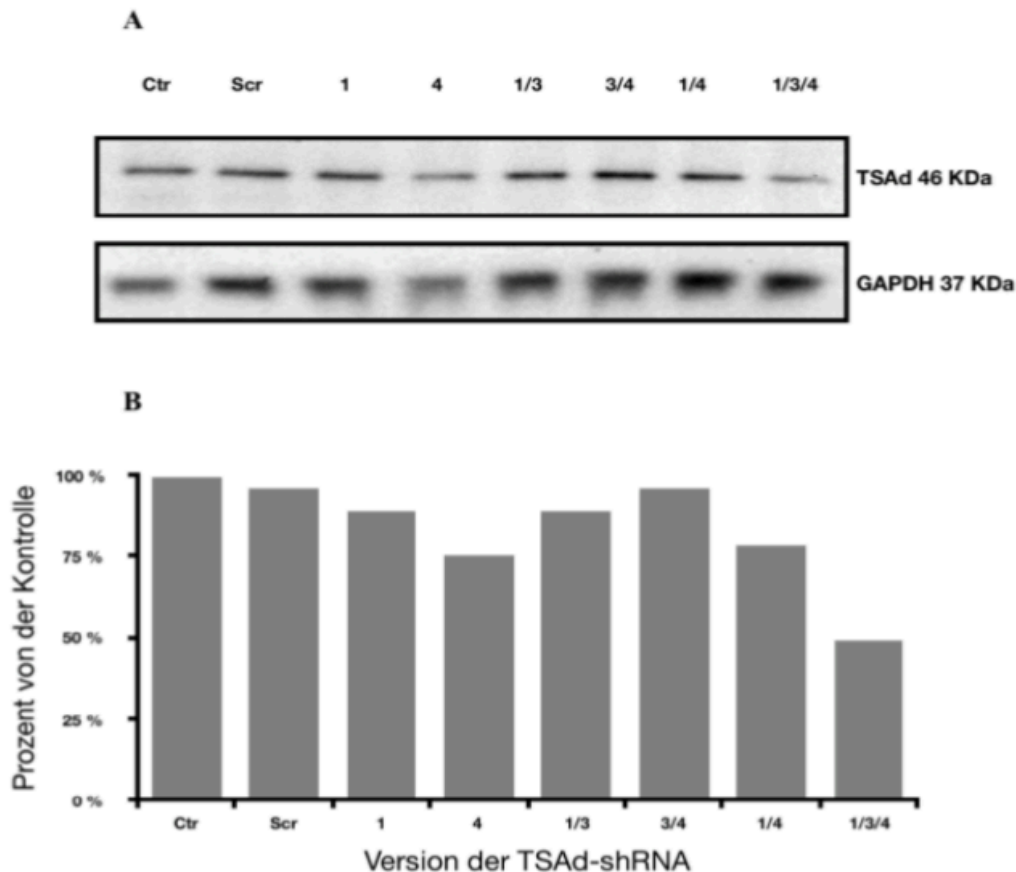


Abbildung 24: A Zeigt die Proteindetektion nach Western Blotting für TSAd in Lysate aus b.End3-Zellen nach der Transduktion mit verschiedenen Versionen der induzierbaren Lentiviren und Doxycyclingabe. Die entsprechenden GAPDH-Banden stellen eine Ladekontrolle für alle Banden dar, die darüber liegen. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Molekulargewichte in Kilo Dalton angegeben. in B, densitometrische Quantifizierung der TSAd-Banden in Prozent von der Kontrolle, die den Wert 100% trägt. n=1 / Gruppe.

3.1.8 Inkubation der knock down Zellen mit CM

Um den Effekt des TSAd-knock down auf die Proteinexpression von VE-Cad nach CM-Stimulation zu untersuchen, wurden b.End3-Zellen, die entweder mit der scrambled-shRNA (Scr) oder mit den drei Versionen der TSAd-shRNA (shRNA) triple-transduziert wurden für 10 min mit CM behandelt.

Es zeigte sich kein Unterschied in der Proteindetektion von VE-Cad nach Triple-Transduktion im Vergleich zur Kontrolle (Scr) (Abbildung.25, siehe nächste Seite). Somit ist es möglich, dass die Restaktivität von TSAd genügt, um den TSAd-abhängigen Signalweg zu aktivieren, der an der Regulation der VE-Cad-Expression beteiligt ist.

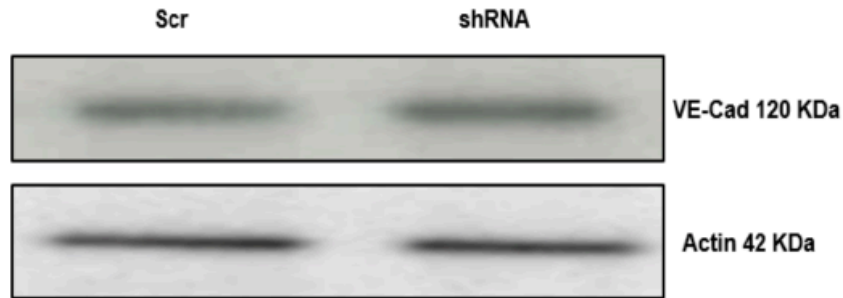


Abbildung 25: Zeigt die Proteindetektion nach Western Blotting für VE-Cad in Lysate aus b.End3-Zellen nach der Transduktion mit verschiedenen Versionen der induzierbaren Lentiviren und Doxycyclingabe. Die entsprechenden Actin-Banden stellen eine Ladekontrolle für alle Banden dar, die darüber liegen. Auf der rechten Seite sind die jeweiligen Molekulargewichte in Kilo Dalton angegeben. Scr=Scrambled. n=1 / Gruppe.

3.2 Nicht-invasive Blutdruckmessungen

Nach der Induktion einer systemischen Entzündung mittels intraperitonealer Injektion von LPS, wurde der Blutdruck der TSAd^{-/-}-Tieren, Y949F-Tieren und deren Kontrollen gemessen. Während die WT- und die Y949F-Tiere 12 Stunden nach dem Sepsisbeginn eine drastische Reduktion des Blutdrucks zeigten (MAP 59 ± 4 mmHg für WT und 57 ± 5 mmHg für Y949F), war dieser Effekt bei den TSAd^{-/-}-Tieren weniger ausgeprägt (MAP nach 12 Stunden 84 ± 12 mmHg) (Abbildung.26).

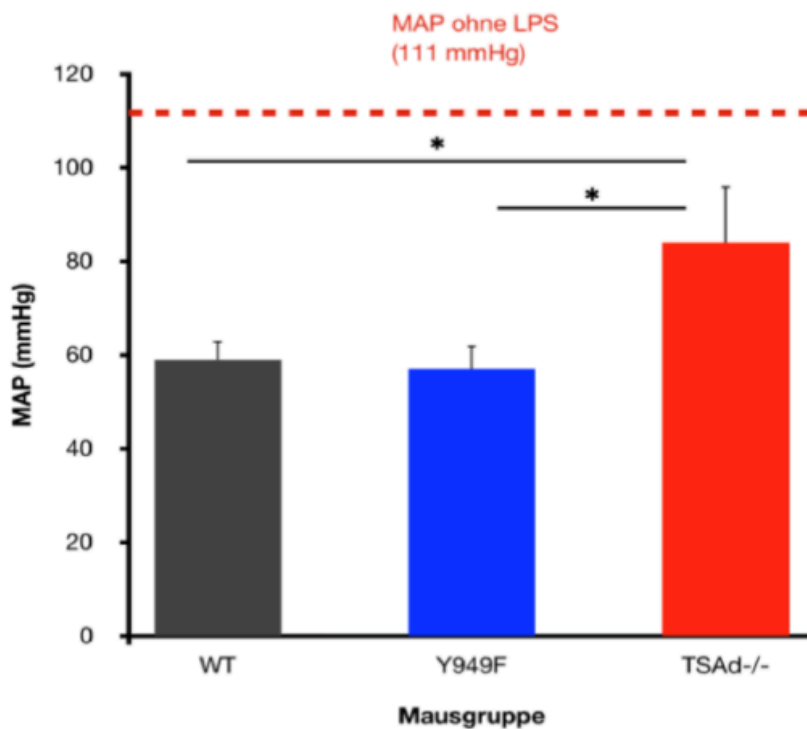


Abbildung 26: Darstellung der Blutdruckwerte für die WT, Y949F und TSAd^{-/-}-Tiere 12 Stunden nach der LPS-Injektion. Die TSAd^{-/-}-Tiere konnten höhere Blutdruckwerte aufrechterhalten (MAP nach 12 Stunden 84 ± 12 mmHg). n=4/ Gruppe, *P< 0,05.

3.3 Kapillar- und Perizytdichte im peripheren Muskel

Es wurden histologische Schnitte peripherer Muskeln (M. quadriceps femoris) angefertigt und für PECAM-1 und NG2 gefärbt.

Der M. quadriceps femoris der TSAd^{-/-} Tiere zeigte deutlich höhere Zahlen sowohl für PECAM-1 als auch für NG2 (TSAd^{-/-}: 113±9 für PECAM-1 und 101±10 für NG2) (Abbildung.27A, B). Der periphere Muskel der Y949F Tiere zeigte weder einen signifikanten Unterschied in der Endothelzellzahl noch in der Perizytenzahl im Vergleich zur Kontrolle (Y949F: 72±10 für PECAM-1, 69±9 für NG2; WT: 57±3 für PECAM-1, 51±2 für NG2) (Abbildung.27B).

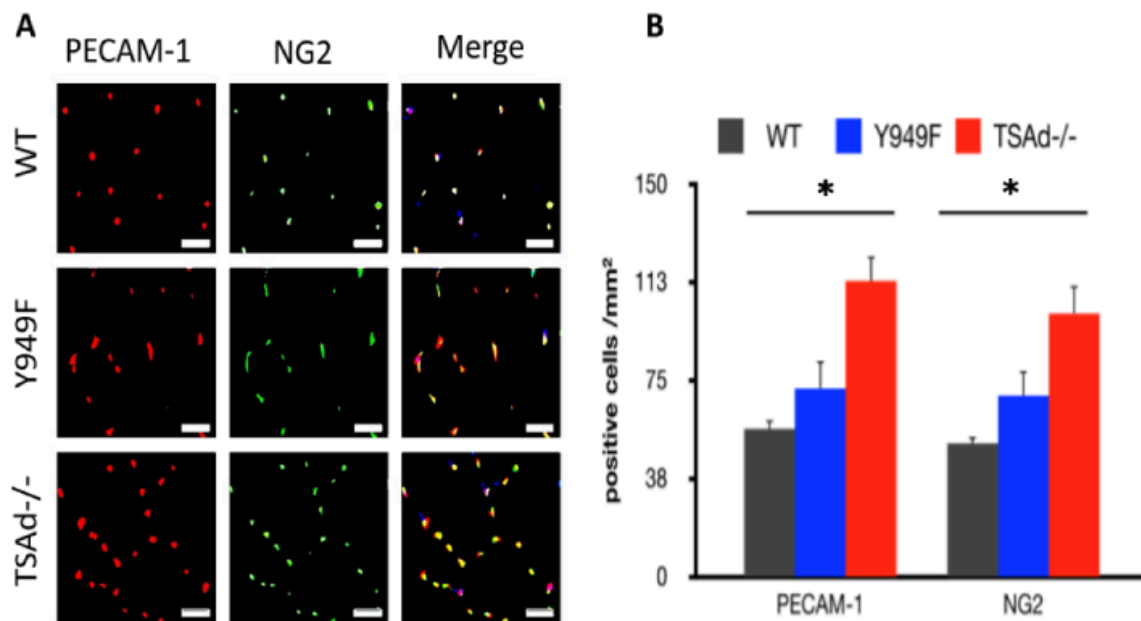


Abbildung 27: A Immunfluoreszenzfärbung für PECAM-1/NG2 im M.quadriceps femoris (Skala=100µm). B Quantifizierung der Perizyten- (NG2) und Endothelzellzahlen (PECAM-1) n=4/ Gruppe, *= P< 0,05

3.4 Immunfluoreszenzfärbungen der Signalkaskade

Es wurden in histologischen Schnitten Signaltransduktionswege stromabwärts von TSAd untersucht, die an der Regulation der endothelialen Zellpermeabilität beteiligt sein könnten. Dazu gehören das zytoplasmatische Signalmolekül c-Src, das durch Phosphorylierung TSAd-abhängig aktiviert wird und der Transkriptionsfaktor STAT3, der nach Phosphorylierung aktiviert wird und in den Zellkern transloziert. STAT3 und c-Src wurden im Herzmuskel untersucht. Ebenfalls wurde die Hauptkomponente der endothelialen Zell-Zell-Verbindungen (VE-Cad) in der Gefäßwand im peripheren Muskel histologisch untersucht.

3.4.1 C-Src-Phosphorylierung

Sowohl in septischen WT- als auch in Y949F-Tieren war in der Innenschicht der Gefäßwand (markiert durch PECAM-1-Antikörper) des Herzmuskels Phospho-c-Src Tyr416 gut darstellbar. Dieses konnte in den TSAd^{-/-} Tieren fast gar nicht bzw. nur sehr schwach nachgewiesen werden (Abbildung.28).

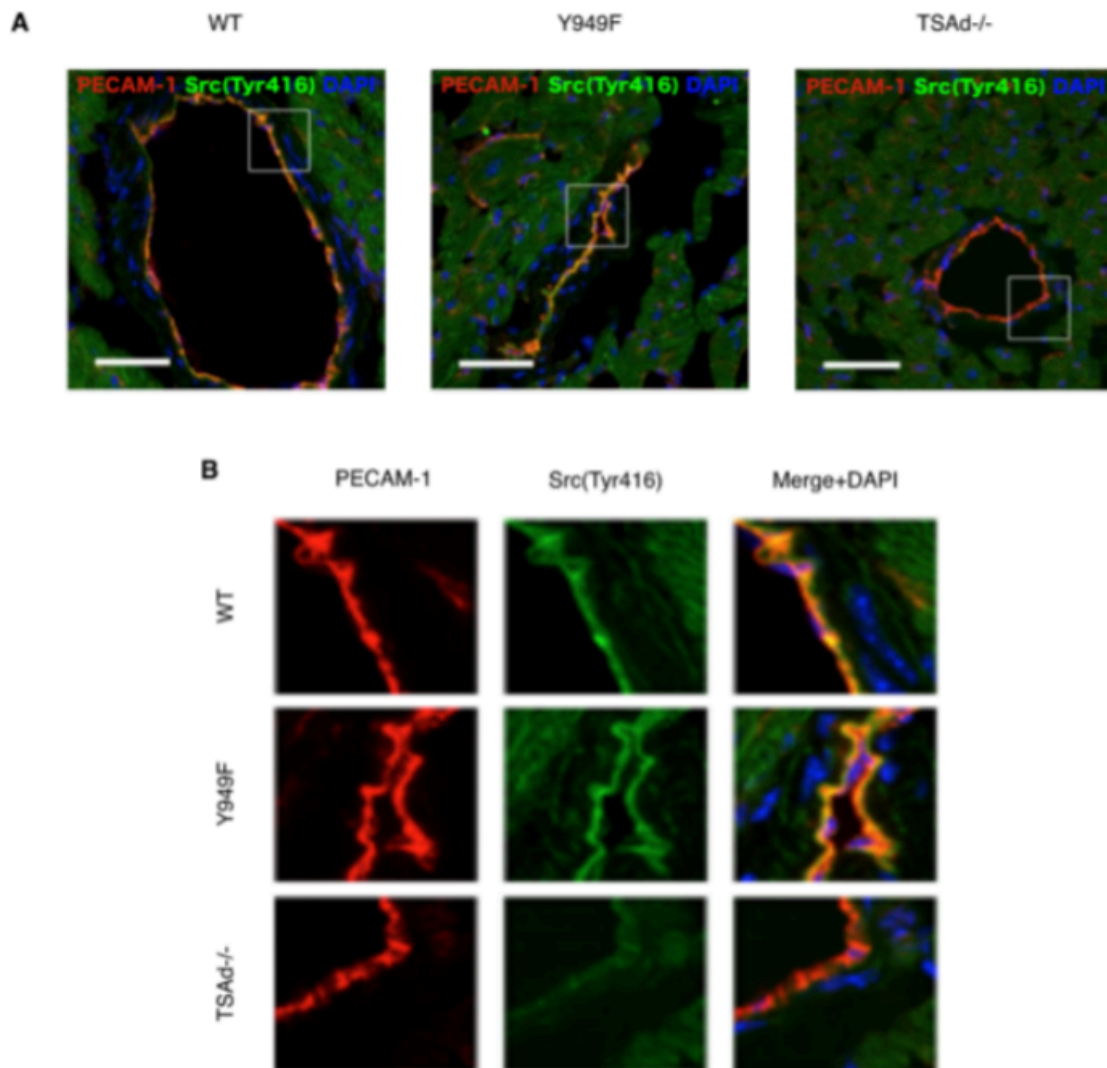


Abbildung 28: Schnitte aus dem Herzmuskel mit einer Immunfluoreszenzfärbung für PECAM-1, Src(Tyr416) und DAPI. A zeigt die Gefäßwand der drei Gruppen in Merge. Hervorgehoben ist die Region der Gefäßwand, die in B größer dargestellt wird (Skala=50µm). B Deutliche Src(Tyr416) positive Gefäßwand der WT- und Y949F-Gruppen. Weniger ausgeprägte Src(Tyr416)-Färbung in der TSAd^{-/-} Gruppe. n=4/Gruppe

3.4.2 STAT3-Translokation

Desweiteren, wurde die Aktivierung mit nachfolgender Translokation von dem Transkriptionsfaktor STAT3 in den Zellkern beurteilt. Es wurde die Überlappung von STAT3 mit DAPI positiven Kernen in der Gefäßwand im Herz untersucht. Es zeigte

sich eine deutliche Überlappung von DAPI positiven Kernen mit STAT3 in WT- und Y949F-Tieren. STAT3 wurde in allen septischen Tiergruppen nah an den Kern nachgewiesen, aber die Überlappung mit dem Kern war in den TSAd^{-/-} Tieren weniger ausgeprägt (Abbildung.29).

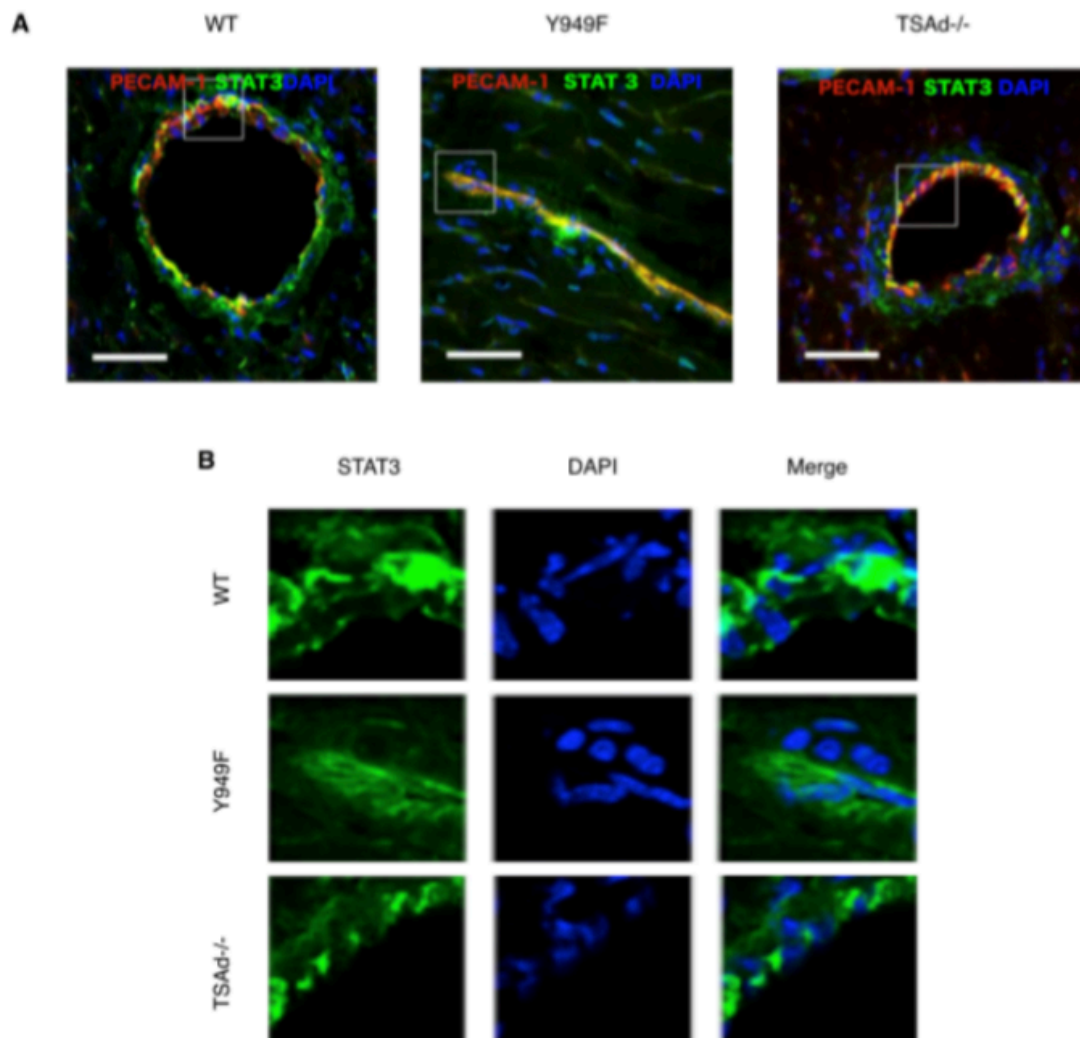


Abbildung 29: Schnitte aus dem Herzmuskel mit einer Immunfluoreszenzfärbung für PECAM-1 STAT3 und DAPI. A zeigt die Gefäßwand der drei Gruppen in Merge. Hervorgehoben ist die Region der Gefäßwand, die in B für STAT3 und DAPI größer dargestellt wird (Skala=50µm). B Deutliche Überlappung von STAT3 mit DAPI-positiven Kernen in der Gefäßwand der WT- und Y949F-Gruppen. Weniger ausgeprägte Überlappung in der TSAd^{-/-} Gruppe. n=4/Gruppe

3.4.3 VE-Cadherin-Herunterregulierung

Da es bereits bekannt ist, dass STAT3 an der Regulation von Endothelzellverbindungen beteiligt ist (siehe 1.4). wurde die Hauptkomponente der Endothelzellverbindungen, nämlich VE-Cad, untersucht. Es wurden Schnitte von M.quadriceps femoris für VE-Cad und PECAM-1 gefärbt, um den Grad der Expression von VE-Cad in der Gefäßwand der drei Tiergruppen nach der LPS-Injektion zu beurteilen.

In den Gefäßen der TSAd^{-/-} Mäusen war VE-Cad deutlich stärker vorhanden als in WT- und Y949F-Mäusen (Abbildung.30A, B). Außerdem zeigte sich in den Gefäßen der TSAd^{-/-} Mäusen eine kontinuierliche, entlang der gesamten Gefäßwand regelmäßig verteilte PECAM-1 Färbung, während die Gefäße der WT- und Y949F-Mäusen Unterbrechungen und Unregelmäßigkeiten der PECAM-1 Färbung mit punktförmigen Konzentrationen aufwiesen (Abbildung.30B).

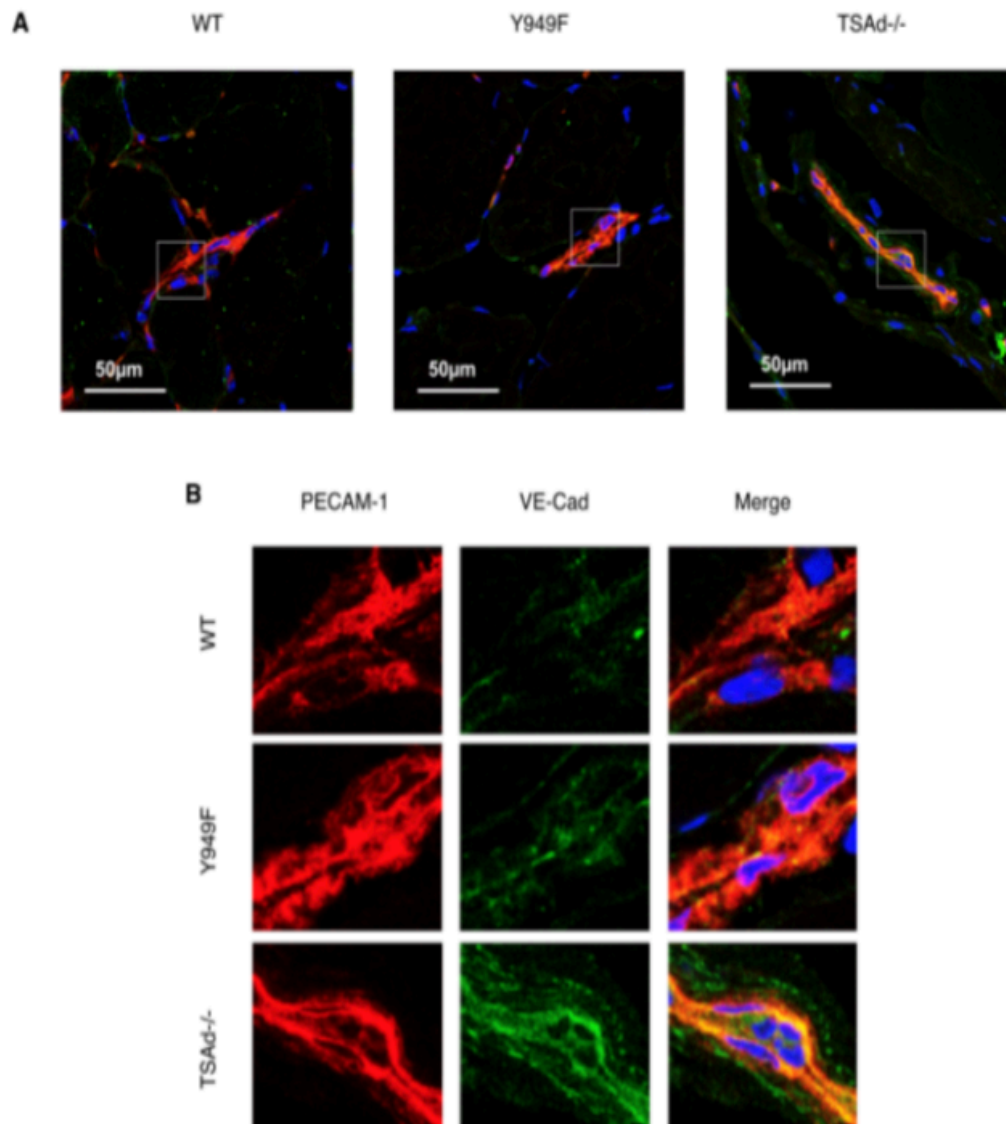


Abbildung 30: Schnitte aus dem *M. quadriceps femoris* mit einer Immunfluoreszenzfärbung für PECAM-1, VE-Cad und DAPI. A Zeigt die Gefäßwand der drei Gruppen in Merge. Hervorgehoben ist die Region der Gefäßwand, die in B größer dargestellt wird (Skala=50µm). B deutlich stärkere VE-Cad-Färbung in der Gefäßwand der TSAd^{-/-} Gruppe. VE-Cad war weniger vorhanden in den WT- und Y949F-Gruppen. Kontinuierlich organisierte PECAM-1-Färbung in der TSAd^{-/-} Gruppe. Unterbrechungen mit Desorganisation der PECAM-1-Färbung in den WT- und Y949F- Gruppen. n=4/Gruppe

3.5 Überlebenswahrscheinlichkeit der Tiere nach der LPS-Behandlung

Es wird die Überlebenskurve der Mausgruppen gezeigt mit Beginn der Analyse direkt nach der LPS-Injektion. Es wurde mit 10 WT-, 9 TSAd^{-/-} und 8 Y949F-Tieren begonnen. 48 Stunden nach der LPS-Injektion waren alle Tiere der WT- und Y949F-Gruppen bereits verstorben oder sie erreichten im Sepsisschwergrad-Punktesystem (siehe Tabelle.1) eine gesamte Punktzahl von 20 oder mehr. Zu diesem Zeitpunkt überlebten noch 15% der Tiere der TSAd^{-/-} Gruppe, die bis zum Ende des Beobachtungszeitraums noch lebten (Abbildung.31).

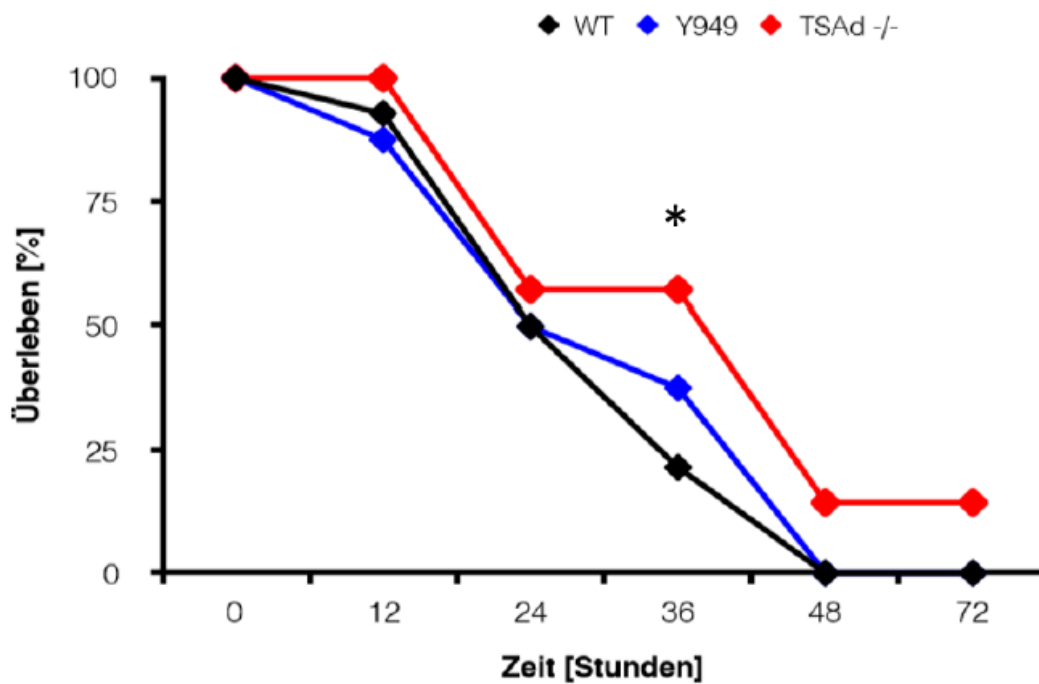


Abbildung 31: Darstellung der Überlebenskurve der drei Tiergruppen. Auf der x-Achse wird die Zeit im Abstand von 12h angegeben. Auf der y-Achse das prozentuale Anteil der Tiere, die vom Gesamtzahl der Tiere zu Beginn der LPS-Injektion überlebten. n= 10 für WT, 9 für TSAd^{-/-} und 8 für Y949F zum Zeitpunkt 0h.

4. Diskussion

4.1 Signaltransduktion unter septischen Bedingungen in vitro

Durch eine systemische Analyse der Signalmoleküle mittels Zellkulturfärbung (Abbildung. 16) und Western Blotting (Abbildungen. 17-20), die eine potentielle Rolle in der Regulation der vaskulären Permeabilität spielen (VE-Cad, c-Src, STAT3, ZO-1), konnten Veränderungen an dieser Moleküle nach CM-Stimulation festgestellt werden.

Die Stimulation von primären Zellen (MLECs) oder b.End.3-Zellen mit CM führt zu einer erhöhten Phosphorylierung von c-Src an der Position Tyr416. Diese Phosphorylierung findet nach 10 Minuten statt (Abbildung.19) und könnte auch länger persistieren (Abbildung.17). Da die Phosphorylierung an dieser Position zu einer Aktivierung von c-Src führt²⁶, gibt dies Aufschluss über die Rolle von c-Src als zentrales Molekül in der Signalkaskade, die die Endothelzellreaktion auf septischen Bedingungen vermittelt.

Ebenfalls, führt die Stimulation der b.End.3-Zellen mit CM zu einer erhöhten STAT3-Phosphorylierung an der Position Tyr705. Die STAT3-Phosphorylierung findet sehr früh statt (Eine Minute nach CM-Gabe) und kann auch länger (bis zu 10 Minuten nach CM-Gabe) persistieren (Abbildung.19). Trotz den Berichten über die direkte Phosphorylierung von STAT3 durch aktiviertes c-Src und die dadurch erhöhte DNA-Bindungsaffinität von STAT3^{32, 33}, findet die STAT3-Phosphorylierung in CM-stimulierten b.End.3-Zellen früher als die signifikante c-Src-Aktivierung (Abbildung. 19). Das zeigt, dass die STAT3-Phosphorylierung in CM-stimulierten b.End.3-Zellen unabhängig von c-Src stattfindet.

Außerdem, wurde bereits beschrieben, dass die STAT3-Phosphorylierung von einer Herabregulation von ``Junction-Proteinen`` begleitet wird³⁴. Da die Stimulation mit CM eine Phosphorylierung von VE-Cad an der Position Tyr685 zur Folge hat und davor eine STAT3-Phosphorylierung verursacht hat (Abbildung.19), lässt sich vermuten, dass STAT3 an der Phosphorylierung von VE-Cad beteiligt sein könnte. Ebenfalls führte die alleinige direkte LPS-Gabe (ohne CM) zu einer STAT3-unabhängigen VE-Cad-Phosphorylierung (Abbildung.21A). Dies führt zum Schluss, dass die VE-Cad-Phosphorylierung nach CM-Stimulation nicht unbedingt STAT3 abhängig ist und durch LPS im CM vermittelt werden könnte (Siehe 2.3, Herstellung von CM).

Die Stimulation mit CM oder LPS führte zu einer Herabregulation vom ``Junction-Protein`` VE-Cad (Abbildung.19AB und 21ABC). Diesem ging eine Phosphorylierung von VE-Cad an der Position Tyr685 voraus (Abbildung.19A und 21A). Da die VE-Cad-Phosphorylierung an dieser Position mit einer VE-Cad-Internalisierung verbunden ist¹⁰⁸, wird hier angenommen, dass die CM- oder LPS-Stimulation eine VE-Cad-Herabregulation durch Internalisierung verursacht.

Von den beschriebenen Beobachtungen lässt sich ableiten, dass einer signifikanten Abnahme der VE-Cad-Expression als Reaktion auf die Stimulation mit CM Modifikationen an vorgeschalteten Signalmolekülen vorausgegangen sind, die in der

Zellkultur innerhalb von 10 Minuten stattfinden und alle mit der Erhöhung der Permeabilität verbunden sind. Diese sind eine c-Src-Phosphorylierung¹², eine STAT3-Phosphorylierung³²⁻³⁴ und eine VE-Cad-Phosphorylierung und Internalisierung¹⁰⁸.

Weiterhin, führte die Inkubation von b.End.3-Zellen mit CM für 10 Minuten zu einer Herabregulation von dem "Junction-Protein" ZO-1 (Abbildung.20AB). Von dieser Beobachtung sowie von der Herbaregulation von VE-Cad nach 10 Minuten lässt sich ableiten, dass das in der vorliegenden Arbeit verwendete CM zu einem Zusammenbruch der endothelialen Barriere durch die Herabregulation von Zell-Zell-Verbindungen führt.

4.2 Beteiligung von LPS an dem Zusammenbruch der endothelialen Barriere

Da es bereits beschrieben wurde, dass die LPS-Stimulation von Endothelzellen mit einer erhöhten Permeabilität verbunden ist¹¹⁷, und da bei der Herstellung vom CM Makrophagen mit LPS stimuliert wurden, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich der Effekt von LPS auf die VE-Cad-Expression, die STAT3-Phosphorylierung und die VE-Cadherin Phosphorylierung untersucht.

Es zeigte sich hierbei eine zeitabhängige Herabregulation von VE-Cad, die bereits 5 Minuten nach der LPS-Gabe ausgeprägt war und später noch stärker geworden ist (Abbildung.21AB). Wie nach der Inkubation mit CM, war die Herabregulation von VE-Cad nach 10 min signifikant (Abbildung.21C). Außerdem zeigte sich bereits nach 5 Minuten eine erhöhte Phosphorylierung von VE-Cad an derselben Position (Tyr685) wie nach Behandlung mit CM (Abbildung.21A). Im Gegensatz zur CM-Behandlung, zeigte sich während der gesamten Behandlungsdauer keine Phosphorylierung von STAT3 nach der LPS-Gabe (Abbildung.21A). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass LPS im Gegensatz zu CM eine Herabregulation von VE-Cad verursachen könnte, ohne die Beteiligung von STAT3 und, dass das LPS, das in der vorliegenden Arbeit zur Herstellung von CM verwendet wurde an der Herabregulation von VE-Cad nach CM Behandlung beteiligt sein könnte, weil es im CM enthalten ist. Es lässt sich außerdem vermuten, dass bestimmte Faktoren, die von Makrophagen freigesetzt werden, für die STAT3-Phosphorylierung nach CM-Behandlung verantwortlich sind.

4.3 Beteiligung von TNF α an dem Zusammenbruch der endothelialen Barriere

Auf der Suche nach Faktoren, die nach der Aktivierung von Makrophagen freigesetzt werden könnten und einen direkten Effekt auf VE-Cad haben, wurde TNF α schnell zu einem Kandidat mit der Eigenschaft, in Endothelzellen eine Herabregulation von VE-Cad zu verursachen¹¹⁸.

Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, führte die Inkubation mit TNF α zu einer starken Herunterregulierung von VE-Cad im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Ein Effekt, der wiederum unabhängig von STAT3 stattfindet. Dies bestätigte die Annahme, dass im CM verschiedene Faktoren enthalten sein könnten, die eine additive Wirkung auf die VE-

Cad-Expression haben könnten und, dass das Zellkulturmodell in der vorliegenden Arbeit den septischen Zustand *in vivo* nachahmt, bei dem die Gesamtwirkung der einzelnen Entzündungsfaktoren zu einem Zusammenbruch der endothelialen Barriere führt. Die fehlende STAT3-Phosphorylierung nach der LPS- und TNF α -Gabe könnte daran liegen, dass die verschiedenen permeabilitätssteigernden Faktoren verschiedene Transduktionswege aktivieren und somit unterschiedlich die VE-Cad-Expression regulieren.

4.4 VEGF-Vermittelte Aktivierung von STAT3

Da Sepsis mit einem zeitabhängigen Anstieg der zirkulierenden Spiegel von VEGF und PlGF in Tier- und Menschen-Sepsismodellen assoziiert ist und da dieser Anstieg bei der Erhöhung der vaskulären Permeabilität und zumindest teilweise beim septischen Schock eine Rolle spielen kann^{12, 105}, wurde in dieser Arbeit versucht, durch die gleichzeitige Inkubation von b.End.3-Zellen mit dem löslichen VEGFR1 (s-flt1) und CM, den Effekt von VEGF zu neutralisieren.

Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, lindert die Behandlung mit s-flt1 für 10 Minuten die STAT3-Phosphorylierung, aber nicht wesentlich die CM-vermittelte Herunterregulierung von VE-Cad. Davon lässt sich ableiten, dass eine mögliche VEGF-Sekretion in dem verwendeten Zellkulturmodell zumindest teilweise an der Aktivierung von STAT3 beteiligt ist.

Um die Quelle von VEGF in diesem System zu identifizieren, wurden in einem weiteren Ansatz die Proteine aus dem CM durch Acetonperzipitation isoliert und geblottet. Hierbei konnte kein VEGF nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wird angenommen, dass VEGF als Reaktion auf das CM auf autokrine Art und Weise von den Endothelzellen oder Makrophagen in minimalen Mengen freigesetzt wird, die mit Western Blotting nach Acetonperzipitation schwer zu detektieren sind.

Die fehlende Linderung der VE-Cad-Herunterregulierung durch s-flt1 wird wahrscheinlich auf die anderen Faktoren wie LPS und TNF α zurückgeführt, die im CM enthalten sein könnten. Diese Faktoren führen nämlich zu einer Herunterregulierung von VE-Cad unabhängig vom STAT3 (Abbildungen. 21 und 22).

4.5 TSAd-Restaktivität und VE-Cadherin

Es wurde durch Sun et al. bereits gezeigt, dass TSAd in Endothelzellen für die VEGF-vermittelte Erhöhung der vaskulären Permeabilität wichtig ist. Durch die Verwendung von TSAd knock out Mäusen konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von TSAd die VEGF-vermittelte Erhöhung der Permeabilität für einen *i.v.* injizierten Farbstoff gelindert werden kann¹².

Wie in Abbildung 25 zu sehen ist, kann das shRNA-vermittelte TSAd-knock down um 51% die CM-vermittelte Herunterregulierung von VE-Cad nicht lindern. Da 49% vom

Protein in den transduzierten Zellen noch exprimiert wird, kann die fehlende Erhaltung der VE-Cad-Expression nach CM-Behandlung auf die Restfunktion von TSAd zurückgeführt werden.

Um die Rolle von TSAd in der Erhaltung der VE-Cad-Expression unter septischen Bedingungen *in vitro* zu bestimmen, sollten Versuche an TSAd knock out Zellen nach CM-Behandlung durchgeführt werden.

4.6 Aufrechterhalten eines höheren Blutdrucks in Abwesenheit von TSAd

Es konnte durch Sun et al. gezeigt werden, dass TSAd ein Adapterprotein ist, das an den VEGFR2 bindet und eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität durch c-Src-Phosphorylierung vermittelt¹². Trotzdem, fanden sie keinen signifikanten Unterschied in den Blutdruckwerten von TSAd knock out Mäusen im Vergleich zu WT-Kontrollen nach intradermaler Injektion von VEGF, ein Faktor, der bei die Erhöhung der vaskulären Permeabilität eine potente Rolle spielt³⁶. Das könnte auf der einen Seite daran liegen, dass die VEGF-Dosierung, die in dieser Studie verwendet wurde (100 ng) und die Art der Verabreichung (intradermal) nicht ausreichend waren, um die systemischen Blutspiegel von VEGF zu erreichen, die während der Sepsis erreicht werden. Auf der anderen Seite könnten die ähnlichen Blutdruckwerten für die TSAd knock out und die WT-Mäuse (85mmHg) damit zusammenhängen, dass die Erhöhung der vaskulären Permeabilität durch die alleinige Verabreichung von VEGF nicht ausreichend war, um eine septische Hyperzirkulation mit einem typischen ``Zytokin-burst`` und einem Kreislaufzusammenbruch im eigentlichen Sinne zu verursachen⁸³⁻⁸⁵.

In der vorliegenden Arbeit wurde im Gegensatz zu den publizierten Daten von Sun et al. kein VEGF, sondern LPS intraperitoneal verabreicht (20 mg/Kg KG). Diese Injektion könnte septischen Bedingungen in einem Mausmodell besser nachahmen und führte bereits nach 12 Stunden zu einem signifikanten Blutdruckabfall sowohl in der WT- als auch in der Y949F-Mutationsgruppe, während ein starker Blutdruckabfall durch die TSAd-Defizienz verhindert werden konnte (Abbildung.26). Hier entsteht ein septisches Krankheitsbild als Manifestation der Reaktion des Wirts auf die Bestandteile von Pathogenen mit einer systemischen Entzündung.

Die Beobachtung, dass kein Unterschied in den Blutdruckwerten von Y949F und WT vorlag, führt zum Schluss, dass die VEGFR-Mutation in dieser Bindungsstelle von TSAd am VEGFR2 (Y951) für die Unterdrückung einer Restaktivität von TSAd nicht ausreicht. Dies könnte an einer VEGFR-Heterodimerisierung liegen⁵, die eine mutierte und eine nicht-mutierte Bindungsstelle für TSAd anbieten würde, sowie an anderen Bindungsstellen in der intrazellulären Domäne vom VEGFR2, die nicht der Position Y951 entsprechen. Dort kann TSAd wenn auch schwächer binden und dadurch trotz der Y949F-Mutation aktiviert werden¹². Dies steht im Einklang mit dem Zellkulturversuch, bei dem gezeigt wird, dass eine 49 prozentige Restaktivität von TSAd ausreicht, um die Signalisierung zu ermöglichen, die die VE-Cad-Expression reguliert (Abbildung.25).

Außerdem könnte TSAd auch unabhängig vom VEGF durch andere Entzündungsfaktoren direkt aktiviert werden.

Da die VEGF/TSAd-vermittelte Erhöhung der Permeabilität mit einer Komplexbildung unter VEGFR2, TSAd, c-Src und VE-Cadherin verbunden ist¹², sollte auch die Notwendigkeit dieser Komplexbildung für die Phosphorylierung und die damit einhergehende Herunterregulierung von VE-Cad unter septischen Bedingungen noch näher erforscht werden.

Ob die Möglichkeit bestünde, dass TSAd in Sepsis unabhängig vom VEGFR2 aktiviert werden kann und dadurch mit anderen Signalproteine interagieren kann, muss ebenfalls noch näher erforscht werden.

4.7 TSAd-Effekt auf Kapillaren und Perizyten im peripheren Muskel

Es wurde der Status der Perizyten und Kapillaren im M. quadriceps femoris histologisch untersucht. Hier war die Anzahl der Kapillaren und Perizyten in der TSAd-knock out Gruppe höher (Abbildung.27). Diese Beobachtung weist auf einen TSAd-abhängigen Rückzug der mikrovaskulären Einheit im peripheren Muskel während der Sepsis hin.

Die niedrigeren Zahlen für Kapillaren und Perizyten in der Gruppe, die eine Funktionsverlustmutation im VEGFR2 trägt (Y949F) im Vergleich zur TSAd-/- Gruppe (Abbildung.27) könnten durch eine Restaktivität von TSAd verursacht werden, die durch die Funktionsverlustmutation nicht vollständig oder gar nicht aufgehoben werden konnte (siehe auch 3.1.8 und 4.6).

Während es noch nicht genug Daten über die Kontraktilität der Perizyten und ihren Einfluss auf den systemischen Blutdruck gibt, liegen bereits genug Daten über die glatten Muskelzellen der Gefäßwand und ihre Rolle in der Aufrechterhaltung der peripheren vaskulären Resistenz vor. Außerdem stellen Rezeptoren, die von glatten Muskelzellen exprimiert werden z.B. der Mineralkortikoidrezeptor (MR) Zielstrukturen der antihypertensiven Therapie dar^{110, 111}. Da Perizyten und glatte Muskelzellen ontogenetisch voneinander schwer zu unterscheiden sind und da ihnen die Expression von strikt spezifischen molekularen Markern fehlt, könnte man vermuten, dass der in unserem Sepsismodell beobachtete Perizytenchwund der mikrovaskulären Einheit einen indirekten Hinweis auf das Schicksal der vorgeschalteten glatten Muskelzellen gibt. Der Blutdruckabfall in Anwesenheit von TSAd könnte nämlich auf einen zusätzlichen Rückzug der vorgeschalteten glatten Muskelzellen zurückgeführt werden.

4.8 Unterdrückung der Signalkaskade durch TSAd-Defizienz in vivo

Aufgrund der Rolle von TSAd bei der Vermittlung der endothelialen Reaktion auf Permeabilitätsfaktoren stromabwärts von VEGFR2^{5, 12}, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die bereits beschriebenen Signalmoleküle wie c-Src und STAT3, die mit der Permeabilität assoziiert sind tatsächlich durch posttranslationale Modifikation wie

Phosphorylierung während der Sepsis *in vivo* verändert werden und, wie diese Moleküle in septischen TSAd- knock out und VEGFR2-LOF-Mutation beeinflusst werden.

Es wurde bereits beschrieben, dass die zytoplasmatische Tyrosinkinase c-Src durch Tyrosinphosphorylierung an der Position Tyr416 (p-Tyr416) aktiviert werden kann²⁶. Zusätzlich wurde eine Phosphorylierung von c-Src an Tyr418 (p-Tyr418) mit der Erhöhung der Gefäßpermeabilität in Verbindung gebracht^{12, 54}.

Außerdem, führt die Stimulierung der Endothelzellen in der Zellkultur mit CM zu einer STAT3-Phosphorylierung (Abbildung.19). Da die STAT3-Phosphorylierung in Endothelzellen mit einer STAT3-Translokation in den Kern assoziiert ist⁴³, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob STAT3 während der Sepsis in den Kern transloziert. Weiterhin wurde untersucht, ob ein bestimmter Signalweg für die Sepsis induzierte Gefäßleckage in einem Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis definiert werden kann.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass sowohl in den WT- als auch in den Y949F-Tieren in der Innenschicht der Gefäßwand im Herzmuskels eine erhöhte c-Src-Phosphorylierung an dem Tyrosinrest Tyr416 (p-Tyr416) während der Sepsis stattfindet. Dieses konnte in den TSAd-/- Tieren fast gar nicht bzw. nur sehr schwach nachgewiesen werden (Abbildung.28). Diese Beobachtung zusammen mit den *in vitro* Daten zur c-Src-Phosphorylierung nach CM-Stimulation (Abbildung.17 und 19) zeigt eine TSAd-abhängige Aktivierung von c-Src durch Phosphorylierung unter septischen Bedingungen. Die c-Src-Phosphorylierung in der LOF-Mutationssgruppe gibt einen Hinweis auf eine mögliche Restaktivität von TSAd, die durch die LOF-Mutation am VEGFR2 nicht aufgehoben werden konnte.

Weiterhin, zeigten die Myokargefäße eine deutlich erhöhte Überlappung von DAPI positiven Kernen mit STAT3 in den WT- und Y949F-Tieren im Vergleich zur TSAd-/- Gruppe (Abbildung.29). Da die Zellkulturversuche eine STAT3-Phosphorylierung vor der c-Src-Phosphorylierung zeigten, bleibt es unklar, ob die STAT3-Translokation mit einer c-Src-abhängigen STAT3-Phosphorylierung zusammenhängt.

Da es bereits beschrieben wurde, dass die Aktivierung von STAT3 mit der Herabregulation von ``Junction-Proteinen`` assoziiert ist³⁴, wurde die Hauptkomponente der interendothelialen Kontakte (VE-Cad) in peripheren Muskelschnitte histologisch beurteilt. In den Gefäßen von septischen TSAd-/- Mäusen war VE-Cad deutlich stärker vorhanden als in septischen WT- und Y949F-Mäusen (Abbildung.30). Dies weist auf eine TSAd-vermittelte VE-Cad-Herabregulation in Sepsis hin.

Da in Zellkulturversuche die Inkubation der Endothelzellen mit inflammatorischen Medien wie TNF-alpha und LPS (Siehe 3.1.4/5) zu einer Herabregulation von VE-Cad führt, die unabhängig von STAT3 ist, kann die VE-Cad-Herabregulation *in vivo* nicht unbedingt auf die STAT3-Translokation zurückgeführt werden.

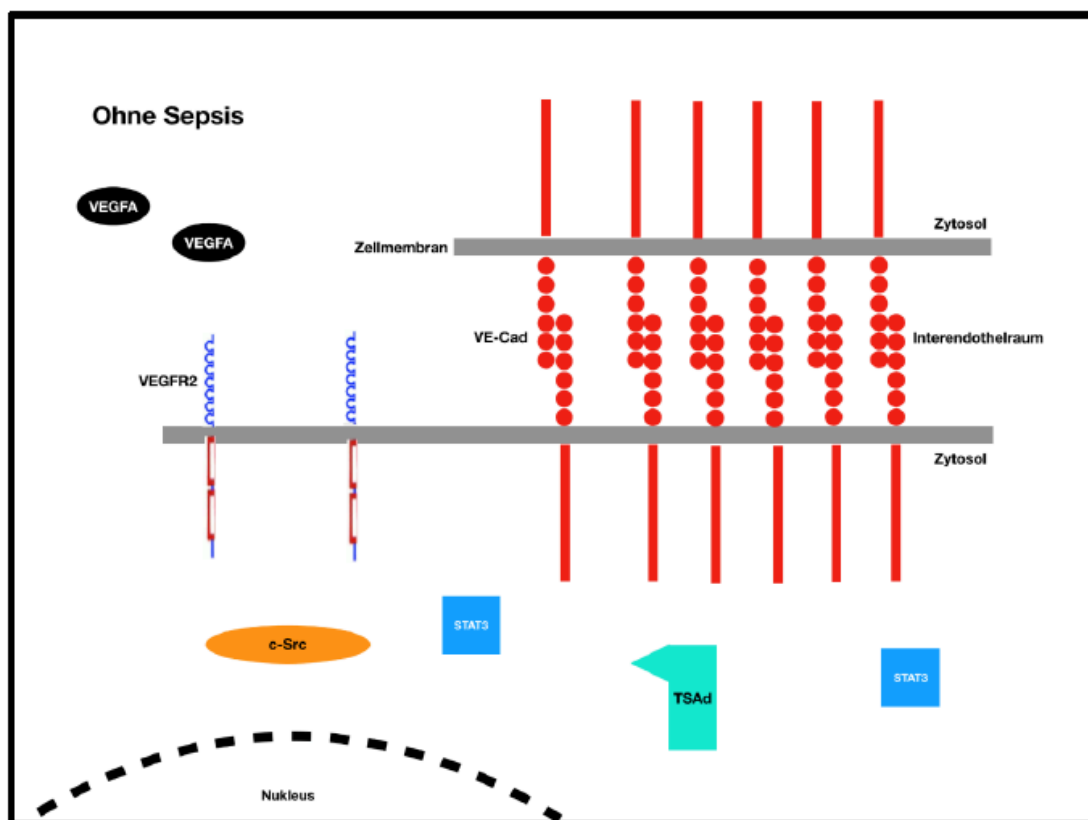
Überdies, zeigte sich in den Gefäßen von TSAd-/- Mäusen eine kontinuierliche, entlang der gesamten Gefäßwand gleichmäßig verteilte PECAM-1 Färbung, während die

Gefäße der WT- und Y949F-Mäusen Unterbrechungen der PECAM-1 Färbung mit punktförmigen Konzentrationen aufwiesen (Abbildung.30). Diese Beobachtung weist auf eine TSAd-abhängige Desorganisation der endothelialen Zellschicht in Sepsis hin, die durch die Herabregulation von interendothelialen Verbindungen zustande kommt.

Es ist immer noch nicht klar, inwieweit die Herabregulation von VE-Cad den systemischen Blutdruck während der Sepsis beeinflusst. Die VE-Cad-Herabregulation könnte zumindest teilweise mit den beobachteten Werten für den Blutdruck zusammenhängen (Abbildung.26), weil der Verlust von VE-Cad eine erhöhte Gefäßleckage mit Volumenverlust verursachen könnte.

Zudem, könnte die Herabregulation von den "Junction-Proteinen" wie VE-Cad und ZO-1 die Interaktion der Endothelzellen mit den Perizyten stören. Der Perizytenverlust der Mikrozirkulation in Sepsis könnte ein Hinweis auf eine Störung der Integrität der glatten Muskelzellen in den vorgeschalteten Arteriolen sein, wo die Blutdruckregulation stattfindet. Dies und die erhöhte Gefäßleckage könnten den Abfall des Blutdrucks in Sepsis erklären.

In der nächsten Abbildung wird das Zusammenspiel der einzelnen Signalmoleküle in der Endothelzelle in Sepsis schematisch dargestellt. Der erste Teil der Abbildung zeigt eine Endothelzelle mit den beteiligten Signalmolekülen und ihre Verteilung in den Zellkompartimenten vor dem Beginn der Sepsis, und der zweite Teil zeigt die Modifikationen an diesen Proteinen und die Interaktion mit anderen Signalmolekülen in der Zelle nach dem Beginn der Sepsis.



Für den zweiten Teil der Abbildung (Mit Sepsis) siehe nächste Seite(65)

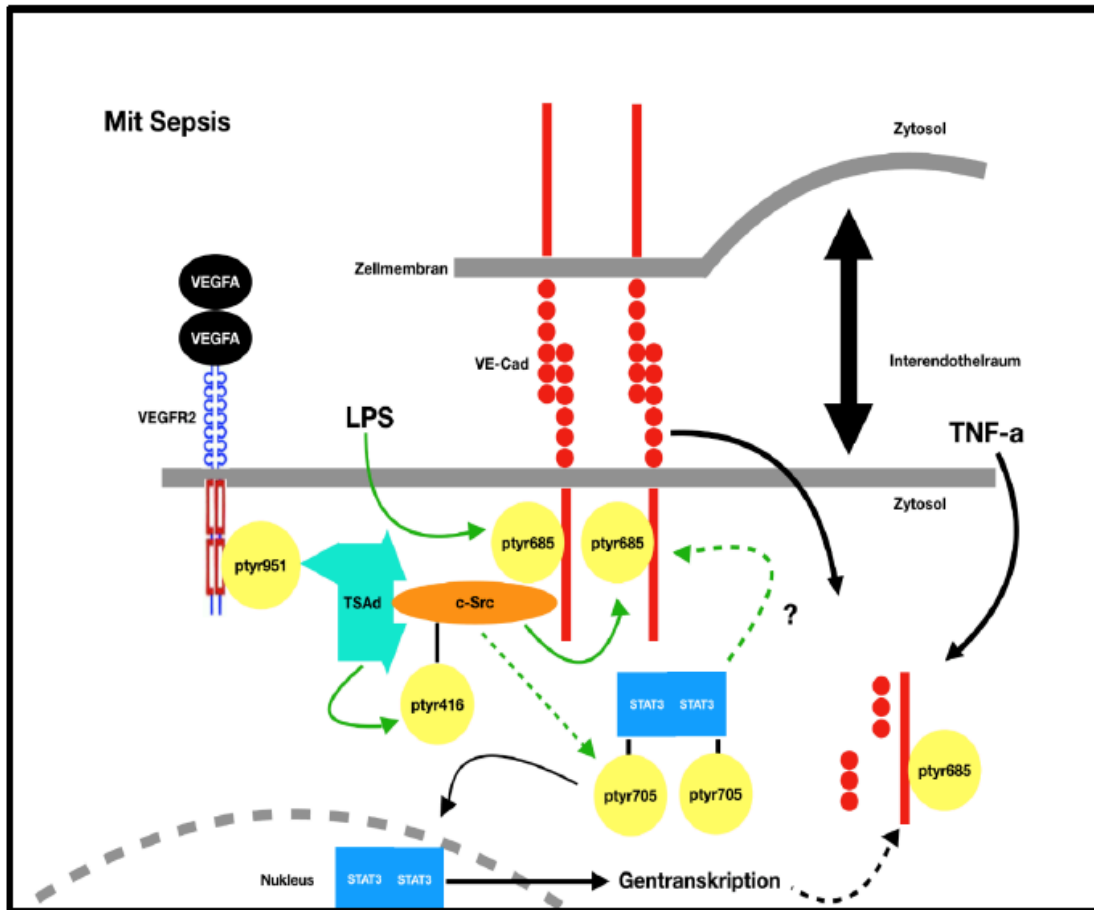


Abbildung 32: Zeigt den Zustand der Signalmoleküle, die an der erhöhten Permeabilität von Endothelzellen in Sepsis durch VE-Cad-Herunterregulierung durch Internalisierung beteiligt sind, einmal mit und einmal ohne Sepsis. Durch die Phosphorylierung von c-Src (Orange) an der Position Tyr416, kommt es während der Sepsis zu einer möglichen c-Src-abhängigen Phosphorylierung von STAT3 (Dunkelblau) an der Position Tyr705 sowie einer Phosphorylierung von VE-Cad (Rot) an der Position Tyr685. Eine STAT3-Phosphorylierung in Sepsis führt zu einer Translokation in den Nucleus mit einer erhöhten Transkription von Genen, die Zell-Zell-Kontakten regulieren. Es ist fraglich, ob p-STAT3 die direkte Phosphorylierung von VE-Cad vermittelt. LPS führt ebenfalls zu einer Phosphorylierung von VE-Cad. Dies geschieht aber indirekt durch die Aktivierung von Signalwege unabhängig von STAT3. TNF-a ist auch an der Herunterregulierung von VE-Cad beteiligt. VEGF kann über den VEGFR2 die Aktivierung von TSAd und konsequenterweise die Phosphorylierung von c-Src vermitteln. Die Phosphorylierung von VE-Cad an der Position Tyr685 führt zur Internalisierung mit nachfolgender Lockerung der interendothelialen Verbindungen und Erhöhung der Permeabilität. Die durchgezogenen grünen Pfeile zeigen eine erhöhte Phosphorylierung. Pfeile mit Unterbrechungen zeigen einen möglichen Effekt.

4.9 TSAd-Defizienz verbessert die Überlebensrate von Mäusen nach LPS-Injektion

Ein weiteres globales Problem der Sepsis unabhängig vom klinischen Aspekt des septischen Krankheitsbild ist die hohe Sterblichkeit, die mit der Sepsis verbunden

ist⁷⁵⁻⁷⁷. Deswegen wurde in dieser Arbeit durch die Verwendung von knock out-Mäusen, VEGFR2-LOF-Mutations- und WT-Mäusen die Korrelation der Überlebensrate in Sepsis mit der Funktion von TSAd untersucht. Hierbei zeigte sich eine Steigerung der Überlebensrate bei TSAd-Defizienz im Vergleich zur VEGFR2-LOF-Mutation oder zu den WT-Kontrollen. Das wurde sowohl in der Früh- (24-36h nach Sepsisinduktion) als auch in der Spätphase der Sepsis (72h) beobachtet (Abbildung.31).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass TSAd eine Rolle in der erhöhten Sterblichkeit spielt, die mit der Sepsis verbunden ist.

5. Zusammenfassung

Die Rolle des VEGF/VEGFR-Systems in Endothelzellen wurde in der Angiogenese und in der vaskulären Permeabilität intensiv erforscht.

Im Jahre 2000, beschrieben Wu et al. TSAd als VEGF-Rezeptor-assoziiertes Protein (VRAP) in Endothelzellen. Sie identifizierten seine Rolle als Adapterprotein, das zytoplasmatische Signalproteine für den VEGFR2 rekrutiert. Außerdem wurde eine Position am VEGFR2 beschrieben (Tyrosin 951), über die TSAd mit dem VEGFR2 wechselwirkt.

Zusätzlich, wurde 2006 durch Yano et al. gezeigt, dass der VEGF-Spiegel sowohl im Menschen- als auch im Mausmodell der LPS-induzierten Sepsis ansteigt und eine Korrelation mit der Sepsis-Mortalität hat. Seitdem nahm die Rolle von TSAd als VEGFR2-Adapterprotein, das Signalmoleküle stromabwärts vom VEGFR2 rekrutiert immer an Wichtigkeit zu.

2012 zeigten Sun et al., dass das Signalmolekül c-Src in Endothelzellen TSAd-abhängig nach der VEGFR2-Aktivierung durch VEGF-Gabe phosphoryliert wird. Zudem zeigten sie, dass bei TSAd-Defizienz eine Linderung der VEGF-vermittelten Erhöhung der Permeabilität erreicht wird. Der zugrunde liegende Mechanismus des VEGF-vermittelten Permeabilitätsanstiegs beinhaltet eine Komplexbildung unter VEGFR2, TSAd, c-Src und VE-Cadherin und eine damit verbundene Herunterregulierung von VE-Cadherin.

Da der VEGF-Spiegel unter septischen Bedingungen erhöht wird und da TSAd in der Vermittlung der VEGF-abhängigen Erhöhung der Permeabilität eine Rolle spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle der TSAd/VEGFR2-Interaktion in der Vermittlung der septischen Hyperzirkulation durch die Verwendung von septischen TSAd knock out- sowie VEGFR2-LOF-Mutations-Mäusen untersucht.

Da die Arbeiten, die bisher die Interaktion von TSAd mit dem VEGFR2 erforschten wiederholt die Wichtigkeit der Position Y951 (Y949 in Mäusen) am VEGFR2 für diese Interaktion betonten, und da andere Positionen am VEGFR2 potentielle Bindungsstellen mit niedrigerer Affinität für TSAd darstellen, wurden hier Y949F-Mäusen verwendet, um die Rolle dieser Bindungsstelle für den TSAd-Effekt unter septischen Bedingungen zu beurteilen.

Es wurden durch Zellkulturversuche und histologische Färbungen von Muskel- und Herzschnitte die Veränderungen an Signalmolekülen überprüft, die stromabwärts vom TSAd liegen. Hierbei konnten die molekularen Mechanismen und die Signaltransduktionswege erläutert werden, die TSAd-abhängig während der Sepsis an der Vermittlung des septischen Phänotyps beteiligt sind.

Um die Korrelation der beobachteten Veränderungen an Signalmolekülen stromabwärts von TSAd mit einer Störung des hämodynamischen Gleichgewichts zu untersuchen, wurde zusätzlich der Blutdruck der septischen Tiere gemessen. Außerdem wurde das

Überleben der Tiere nach der Sepsisinduktion kontrolliert, um den Effekt der TSAd-Defizienz oder der VEGFR2-Mutation auf das Überleben der Tiere zu bestimmen.

Auf der Suche nach strukturellen Veränderungen in der mikrovaskulären Einheit, die mit dem septischen Phenotyp korrelieren könnten, wurde der Kapillar- und der Perizytenstatus sowohl im Herz als auch im peripheren Muskel histologisch beurteilt.

Darüber hinaus, schenken die bereits verwendeten Zellkulturmodelle dem Versuch, die in vivo-Situation während der Sepsis nachzuahmen, wenig Aufmerksamkeit. Die meisten Arbeiten fokussieren nämlich auf Veränderungen nach Einzelfaktorgabe e.g. LPS, VEGF, TNF α und Interleukine, während die Sepsis ein Krankheitsbild mit einem "Zytokin-burst" darstellt, wo viele Faktoren und Entzündungsmediatoren gleichzeitig wirken. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Sepsismodell in Kultur verwendet, wo die Endothelzellen mit einem konditionierten Medium inkubiert werden, das aus aktivierten Makrophagen stammt. Somit können zwar nur die Effekte der Aktivierung von Makrophagen auf die Endothelzellen untersucht werden, aber das System gibt die Möglichkeit der Untersuchung von verschiedenen Entzündungsmediatoren und Zytokinen, und ihre Effekte auf die Endothelzellen, wenn sie gleichzeitig wie im Tiermodell vorhanden sind.

Sowohl in vivo als auch in vitro könnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass es unter inflammatorischen Bedingungen zu einer erhöhten c-Src-Phosphorylierung, einer STAT3-Aktivierung und einer Herunterregulierung der VE-Cad-Expression kommt. Da diese Veränderungen durch die TSAd-Defizienz im Tiermodell gelindert wurden, wird hier angenommen, dass sie durch TSAd vermittelt werden.

Der Blutdruckabfall in Sepsis wird zumindest teilweise auf die VE-Cad-Herunterregulierung mit nachfolgender erhöhter Gefäßleckage zurückgeführt, weil das ein Volumenverlust zur Folge hat. Der Abbau der mikrovaskulären Einheit mit Perizytenverlust der Kapillaren unter septischen Bedingungen könnte als indirekter Marker der Destabilisierung der glatten Muskelzellen in den vorgeschalteten Arteriolen angesehen werden, wo die Blutdruckregulation stattfindet. Dies hat zur Folge, dass die Tonusregulation der Arteriolen dadurch gestört wird und, dass der Blutdruck konsequenterweise sinkt.

Außerdem, wurde hier durch Zellkulturversuche gezeigt, dass VE-Cad unter septischen Bedingungen (CM oder LPS) an der Position Y685 phosphoryliert wird. Da es in einer anderen Arbeit gezeigt wurde, dass diese Phosphorylierungsstelle ein Ziel von c-Src ist, und da eine c-Src-Phosphorylierung unter septischen Bedingungen sowohl in vivo als auch in vitro stattfindet, wird hier zusätzlich angenommen, dass die Herunterregulierung von VE-Cad durch eine c-Src-vermittelte Phosphorylierung von VE-Cad an der Position Tyr685 mitverursacht wird.

Da die LOF-Mutation an der Position Y949 die TSAd-abhängige Signalgebung in Sepsis nicht stört, wird hier angenommen, dass andere TSAd-Bindungsstellen mit niedrigerer Affinität am VEGFR2 TSAd eine Möglichkeit der Interaktion mit dem VEGFR2 gewährleisten können (Restfunktion). Dies geht mit der Restfunktion einher,

die in der Zellkultur nach shRNA-vermitteltes knock down der TSAd-Expression beobachtet wird, wo die knock down-Zellen nach CM-Stimulation immer noch eine Herabregulation von VE-Cad und somit eine intakte Signalkaskade zeigen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass TSAd in der Sepsis die Aktivierung von Signalmolekülen stromabwärts vom VEGFR2 vermittelt mit der Konsequenz, dass endotheliale Verbindungsproteine herabreguliert werden. Dies hat zur Folge, dass die Permeabilität der Mikrozirkulation erhöht wird, die endotheliale Integrität zerstört wird und die mikrovaskuläre Einheit abgebaut wird. Zusätzlich kommt es zu einer Störung der Tonusregulation der Arteriolen. Insgesamt führt das zu einem Tonus- und Volumenverlust mit nachfolgender Abnahme des Blutdrucks und später zur Entstehung des septischen Schocks.

Literaturverzeichnis

1. D. I. Holmes, E. Zachary, 'The vascular endothelial growth factor (VEGF) family: angiogenic factors in health and disease' , *Genome Biol.* 2005; 6(2): 209.
2. A. K. Olsson, A. Dimberg, J. Kreuger, L. Claesson-Welsh, 'VEGF receptor signalling - in control of vascular function' , *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006 May;7(5): 359-71.
3. Y. A. Muller, B. Li, H. W. Christinger, J. A. Wells, B. C. Cunningham, A. M. de Vos, 'Vascular endothelial growth factor: Crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site' , *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jul 8; 94(14): 7192–7197.
4. Ursula A. Vitt, Sheau Y. Hsu, and Aaron J. W. Hsueh, 'Evolution and Classification of Cystine Knot-Containing Hormones and Related Extracellular Signaling Molecules' , *Mol Endocrinol.* 2001 May;15(5):681-94.
5. S. Koch, L. C. Welsh, 'Signal Transduction by Vascular Endothelial Growth Factor Receptors' , *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jul; 2(7): a006502.
6. F. Dehghanian, Z. Hojati, M. Kay, 'New Insights into VEGF-A Alternative Splicing: Key Regulatory Switching in the Pathological Process' , *Avicenna J Med Biotechnol.* 2014 Oct;6(4):192-9.
7. M. Shibuya, 'Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies' , *Genes Cancer.* 2011 Dec;2(12):1097-105.
8. K. Kappert, K. G. Peters, F. D. Böhmer, A. Östman, 'Tyrosine phosphatases in vessel wall signaling' , *Cardiovascular Research.* 2005 Feb;65(3):587–598.
9. N. Kabrun, H. J. Bühring, K. Choi, A. Ullrich, W. Risau, G. Keller, 'Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors' , *Development.* 1997 May;124(10):2039-48.
10. V. Tchaikovski, G. Fellbrich, J. Waltenberger, 'The Molecular Basis of VEGFR-1 Signal Transduction Pathways in Primary Human Monocytes' , *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Feb;28(2):322-8.
11. A. Spurkland, J. E. Brinchmann, G. Markussen, F. Pedeutour, E. Munthe, T. Lea, F. Vartdal, H. C. Aasheim, 'Molecular Cloning of a T Cell-specific Adapter Protein (TSAAd) Containing an Src Homology (SH) 2 Domain and Putative SH3 and Phosphotyrosine Binding Sites' , *J Biol Chem.* 1998 Feb 20;273(8):4539-46.

12. Z. Sun, X. Li, S. Massena, S. Kutschera, N. Padhan, L. Gualandi, V. S. Gjerstad, K. Gustafsson, W. W. Choy, G. Zang, M. Quach, L. Jansson, M. Phillipson, M. R. Abid, A. Spurkland, L. C. Welsh, 'VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSAd', *J Exp Med.* 2012 Jul 2;209(7):1363-77
13. L. W. Wu, L. D. Mayo, J. D. Dunbar, K. M. Kessler, O. N. Ozes, R. S. Warren, D. B. Donner, 'VRAP Is an Adaptor Protein That Binds KDR, a Receptor for Vascular Endothelial Cell Growth Factor', *J Biol Chem.* 2000 Mar 3;275(9):6059-62.
14. V. S. Gjerstad, S. Granum, T. Mustelin, T. C. B. Andersen, T. Berge, M. J. Shapiro, V. S. Shapiro, A. Spurkland T. Lea, 'The C terminus of T cell-specific adapter protein (TSAd) is necessary for TSAd-mediated inhibition of Lck activity', *Eur J Immunol.* 2005 May;35(5):1612-20.
15. C. E. Rudd, J. M. Trevillyan, J. D. Dasgupta, L. L. Wong, S. F. Schlossman, 'The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988 Jul;85(14):5190-4.
16. E. K. Barber, J. D. Dasgupta, S. F. Schlossman, J. M. Trevillyan, C. E. Rudd, 'The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex', *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 May; 86(9):3277-3281.
17. J. Drappa, L. A. Kamen, E. Chan, M. Georgiev, D. Ashany, F. Marti, P. D. King, 'Impaired T Cell Death and Lupus-like Autoimmunity in T Cell-specific Adapter Protein-deficient Mice', *J Exp Med.* 2003 Sep 1;198(5):809-21.
18. W. J. Fantl, D. E. Johnson, L. T. Williams, 'Signalling by receptor tyrosine kinases', *Annu Rev Biochem.* 1993;62:453-81.
19. F. Sicheri, I. Moarefi, J. Kuriyan, 'Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck', *Nature.* 1997 Feb 13;385(6617):602-9.
20. D. R. Robinson, Y. M. Wu, S. F. Lin, 'The protein tyrosine kinase family of the human genome', *Oncogene.* 2000 Nov 20;19(49):5548-57.
21. Y. Yamanashi, T. Tezuka, K. Yokoyama, 'Activation of receptor protein-tyrosine kinases from the cytoplasmic compartment', *J Biochem.* 2012 Apr;151(4):353-9.
22. T. J. Boggon, M. J. Eck, 'Structure and regulation of Src family kinases', *Oncogene.* 2004 Oct 18;23(48):7918-27.
23. W. Xu, S. C. Harrison, M. J. Eck, 'Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src', *Nature.* 1997 Feb 13;385(6617):595-602.

24. F. Sicheri, J. Kuriyan, 'Structures of Src-family tyrosine kinases' , *Curr Opin Struct Biol.* 1997 Dec;7(6):777-85.
25. R. R. Roussel, S. R. Brodeur, D. Shalloway, A. P. Laudano, 'Selective binding of activated pp60c-src by an immobilized synthetic phosphopeptide modeled on the carboxyl terminus of pp60c-src' , *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Dec 1;88(23):10696-700.
26. M. T. Brown, J. A. Cooper, 'Regulation, substrates and functions of src' , *Biochim Biophys Acta.* 1996 Jun 7;1287(2-3):121-49.
27. J. E. Darnell Jr, 'STATs and Gene Regulation' , *Science.* 1997 Sep 12;277(5332):1630-5.
28. D. E. Levy, J. E. Darnell Jr, 'Stats: transcriptional control and biological impact' , *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Sep;3(9):651-62.
29. K. Takeda, T. Kaisho, N. Yoshida, J. Takeda, T. Kishimoto, S. Akira, 'Stat3 Activation Is Responsible for IL-6-Dependent T Cell Proliferation Through Preventing Apoptosis: Generation and Characterization of T Cell-Specific Stat3-Deficient Mice' , *J Immunol.* 1998 Nov 1;161(9):4652-60.
30. T. Hirano, K. Ishihara, M. Hibi, 'Roles of STAT3 in mediating the cell growth, differentiation and survival signals relayed through the IL-6 family of cytokine receptors' , *Oncogene.* 2000 May 15;19(21):2548-56.
31. M. Geletu, S. Guy, R. Arulanandam, H. Feracci, L. Raptis, 'Engaged for survival From cadherin ligation to STAT3 activation' , *JAKSTAT.* 2013 Oct 1;2(4):e27363.
32. S. J. Schreiner, A. P. Schiavone, T. E. Smithgall, 'Activation of STAT3 by the Src Family Kinase Hck Requires a Functional SH3 Domain' , *J Biol Chem.* 2002 Nov 22;277(47):45680-7.
33. H. Yu, D. Pardoll, R. Jove, 'STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3' , *Nat Rev Cancer.* 2009 Nov;9(11):798-809.
34. J. H. Yun, S. W. Park, K. J. Kim, J. S. Bae, E. H. Lee, S. H. Paek, S. U. Kim, S. Ye, J. H. Kim, C. H. Cho, 'Endothelial STAT3 Activation Increases Vascular Leakage Through Downregulating Tight Junction Proteins: Implications for Diabetic Retinopathy' , *J Cell Physiol.* 2017 May;232(5):1123-1134.
35. M. Fritzenwanger, K. Meusel, M. Foerster, F. Kuethe, A. Krack, H. R. Figulla, 'Cardiotrophin-1 induces interleukin-6 synthesis in human umbilical vein endothelial cells' , *Cytokine.* 2006 Nov;36(3-4):101-6.

36. K. Heinolainen, S. Karaman, G. D'Amico, T. Tammela, R. Sormunen, L. Eklund, K. Alitalo, G. Zarkada, 'VEGFR3 Modulates Vascular Permeability by Controlling VEGF/VEGFR2 Signaling', *Circ Res.* 2017 Apr 28;120(9):1414-1425.
37. G. Niu, K. L. Wright, M. Huang, L. Song, E. Haura, J. Turkson, S. Zhang, T. Wang, D. Sinibaldi, D. Coppola, R. Heller, L. M. Ellis, J. Karras, J. Bromberg, D. Pardoll, R. Jove, H. Yu, 'Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis', *Oncogene.* 2002 Mar 27;21(13):2000-8.
38. D. Wei, X. Le, L. Zheng, L. Wang, J. A. Frey, A. C. Gao, Z. Peng, S. Huang, H. Q. Xiong, J. L. Abbruzzese, K. Xie, 'Stat3 activation regulates the expression of vascular endothelial growth factor and human pancreatic cancer angiogenesis and metastasis', *Oncogene.* 2003 Jan 23;22(3):319-29.
39. S. Loeffler, B. Fayard, J. Weis, J. Weissenberger, 'Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1', *Int J Cancer.* 2005 Jun 10;115(2):202-13.
40. M. Funamoto, Y. Fujio, K. Kunisada, S. Negoro, E. Tone, T. Osugi, H. Hirota, M. Izumi, K. Yoshizaki, K. Walsh, T. Kishimoto, K. Yamauchi-Takahara, 'Signal transducer and activator of transcription 3 is required for glycoprotein 130-mediated induction of vascular endothelial growth factor in cardiac myocytes', *J Biol Chem.* 2000 Apr 7;275(14):10561-6.
41. M. J. Gray, J. Zhang, L. M. Ellis, G. L. Semenza, D. B. Evans, S. S. Watowich, G. E. Gallick, 'HIF-1a, STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas', *Oncogene.* 2005 Apr 28;24(19):3110-20.
42. S. H. Chen, D. A. Murphy, W. Lassoued, G. Thurston, M. D. Feldman, W. M.F. Lee, 'Activated STAT3 is a mediator and biomarker of VEGF endothelial activation', *Cancer Biol Ther.* 2008 Dec;7(12):1994-2003.
43. M. Bartoli, D. H. Platt, T. Lemtalsi, X. Gu, S. E. Brooks, M. B. Marrero, R. B. Caldwell, 'VEGF differentially activates STAT3 in microvascular endothelial cells', *FASEB J.* 2003 Aug;17(11):1562-4.
44. P. Huber, J. Dalmon, J. Engiles, F. Breviario, S. Gory, L. D. Siracusa, A. M. Buchberg, E. Dejana, 'Genomic structure and chromosomal mapping of the mouse VE-cadherin gene (Cdh5)', *Genomics.* 1996 Feb 15;32(1):21-8.

45. C. W. Liaw, C. Cannon, M. D. Power, P. K. Kiboneka, L. L. Rubin, 'Identification and cloning of two species of cadherins in bovine endothelial cells' , *EMBO J.* 1990 Sep;9(9):2701-8.
46. M. G. Lampugnani, M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. P. Ruco, E. Dejana, 'A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts' , *J Cell Biol.* 1992 Sep;118(6):1511-22.
47. D. Salomon, O. Ayalon, R. P. King, R. O. Hynes, B. Geiger, 'Extrajunctional distribution of N-cadherin in cultured human endothelial cells' , *J Cell Sci.* 1992 May;102 (Pt 1):7-17.
48. S. Suzuki, K. Sano, H. Tanihara, 'Diversity of the cadherin family: evidence for eight new cadherins in nervous tissue' , *Cell Regul.* 1991 Apr;2(4):261-70.
49. D. Vestweber, 'VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation' , *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008 Feb;28(2):223-32.
50. U. Gotsch, E. Borges, R. Bosse, E. Böggemeyer, M. Simon, H. Mossmann, D. Vestweber, 'VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo' , *J Cell Sci.* 1997 Mar;110 (Pt 5):583-8.
51. D. Gulino, E. Delachanal, E. Concord, Y. Genoux, B. Morand, M. O. Valiron, E. Sulpice, R. Scaife, M. Alemany, T. Vernet, 'Alteration of endothelial cell monolayer integrity triggers resynthesis of vascular endothelium cadherin' , *J Biol Chem.* 1998 Nov 6;273(45):29786-93.
52. M. Corada, M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M. G. Lampugnani, I. M. Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D. M. McDonald, P. A. Ward, 'Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo' , *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 17;96(17):9815-20.
53. T. Matsumoto, S. Bohman, J. Dixelius, T. Berge, A. Dimberg, P. Magnusson, L. Wang, C. Wikner, J. H. Qi, C. Wernstedt, J. Wu, S. Bruheim, H. Mugishima, D. Mukhopadhyay, A. Spurkland, L. C. Welsh, 'VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis' , *EMBO J.* 2005 Jul 6;24(13):2342-53.
54. L. Schepke, E. Aguilar, R. F. Gariano, R. Jacobson, J. Hood, J. Doukas, J. Cao, G. Noronha, S. Yee, S. Weis, M. B. Martin, R. Soll, D. A. Cheresh, M. Friedlander, 'Retinal vascular permeability suppression by topical application of a novel VEGFR2/Src kinase inhibitor in mice and rabbits' , *J Clin Invest.* 2008 Jun;118(6):2337-46.

55. J. Gavard, J. S. Gutkind, 'VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin' , *Nat Cell Biol.* 2006 Nov; 8(11):1223-34.
56. B. P. Eliceiri, X. S. Puente, J. D. Hood, D. G. Stupack, D. D. Schlaepfer, X. Z. Huang, D. Sheppard, D. A. Cheresh, 'Src-mediated coupling of focal adhesion kinase to integrin $\alpha v \beta 5$ in vascular endothelial growth factor signaling' , *J Cell Biol.* 2002 Apr 1; 157(1): 149–160.
57. K. G. Birukov, C. Csontos, L. Marzilli, S. Dudek, S. F. Ma, A. R. Bresnick, A. D. Verin, R. J. Cotter, J. G. N. Garcia, 'Differential regulation of alternatively spliced endothelial cell myosin light chain kinase isoforms by p60(Src)' , *J Biol Chem.* 2001 Mar 16;276(11):8567-73.
58. K. Ando, S. Fukuhara, N. Izumi, H. Nakajima, H. Fukui, R. N. Kelsh, N. Mochizuki, 'Clarification of mural cell coverage of vascular endothelial cells by live imaging of zebrafish' , *Development.* 2016 Apr 15;143(8):1328-39.
59. P. Carmeliet, 'Developmental biology. One cell, two fates' , *Nature.* 2000 Nov 2;408(6808):43, 45.
60. A. Armulik, G. Genove , C. Betsholtz, 'Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises' , *Dev Cell.* 2011 Aug 16;21(2):193-215.
61. L. J. Mandarino, N. Sundarraj, J. Finlayson, J. R. Hassell, 'Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro' , *Exp Eye Res.* 1993 Nov;57(5):609-21.
62. D. M. Larson, M. P. Carson, C. C. Haudenschild, 'Junctional transfer of small molecules in cultured bovine brain microvascular endothelial cells and pericytes' , *Microvasc Res.* 1987 Sep;34(2):184-99.
63. A. Geevarghese, I. M. Herman, 'Pericyte-endothelial crosstalk: implications and opportunities for advanced cellular therapies' , *Transl Res.* 2014 Apr;163(4): 296-306.
64. H. Gerhardt, C. Betsholtz, 'Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis' , *Cell Tissue Res.* 2003 Oct;314(1):15-23.
65. E. A. Winkler, R. D. Bell, B. V. Zlokovic, 'Central nervous system pericytes in health and disease' , *Nat Neurosci.* 2011 Oct 26;14(11):1398-1405.
66. H. M. Eilken, R. D. Hurtado, I. Schmidt, M. Nakayama, H. W. Jeong, H. Arf, S. Adams, N. Ferrara, R. H. Adams, 'Pericytes regulate VEGF-induced endothelial sprouting through VEGFR1' , *Nat Commun.* 2017 Nov 17;8(1):1574.

67. F. F. Klett, N. Offenhauser, U. Dirnagl, J. Priller, U. Lindauer, 'Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain' , Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Dec 21;107(51):22290-5.
68. J. Feng, A. Mantesso, C. De Bari, A. Nishiyama, PT. Sharpe, 'Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair' , Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr 19;108(16):6503-8.
69. M. S. Davidoff, R. Middendorff, G. Enikolopov, D. Riethmacher, A. F. Holstein, D. Müller, 'Progenitor cells of the testosterone-producing Leydig cells revealed' , J Cell Biol. 2004 Dec 6; 167(5): 935–944.
70. N. G. Camboa, P. Cattaneo, Y. Sun, T. M. Morris, Y. Gu, N. D. Dalton, E. Rockenstein, E. Masliah, K. L. Peterson, W. B. Stallcup, J. Chen, S. M. Evans, 'Pericytes of multiple organs do not behave as mesenchymal stem cells in vivo' , Cell Stem Cell. 2017 Mar 2; 20(3): 345–359.e5.
71. M. Singer, C. S. Deutschman, C. W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G. R. Bernard, J. D. Chiche, C. M. Coopersmith, R. S. Hotchkiss, M. M. Levy, J. C. Marshall, G. S. Martin, S. M. Opal, G. D. Rubenfeld, T. van der Poll, J. L. Vincent, D. C. Angus, 'The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)' , JAMA. 2016 Feb 23; 315(8): 801–810.
72. Torio CM, Andrews RM. National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief #160. 2013 Aug. In: Healthcare Cost and Utilization Project (HCUP) Statistical Briefs [Internet]. Rockville (MD): Agency for Healthcare Research and Quality (US); 2006 Feb-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169005/>.
73. C Bone, R. (1992). 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 Journal. 101. 1644. 10.1378/chest.101.6.1644.
74. M. M. Levy, M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincet, G. Ramsay; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS, '2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference' , Crit Care Med. 2003 Apr;31(4):1250-6.
75. C. Fleischmann, A. Scherag, N. K. J. Adhikari, C. S. Hartog, T. Tsaganos, P. Schlattmann, D. C. Angus, K. Reinhart; on behalf of the International Forum of Acute Care Trialists, 'Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations' , Am J Respir Crit Care Med. 2016 Feb 1;193(3):259-72.

76. C. Fleischmann, M. Hartmann, CS. Hartog, T. Welte, S. Heublein, D. T. Rueddel, U. Dennler, K. Reinhart, 'Epidemiology of Sepsis in Germany: Incidence, Mortality And Associated Costs of Care 2007-2013' , *Intensive Care Med Exp*. 2015 Dec; 3(Suppl 1): A50.
77. C. Engel, FM. Brunkhorst, HG. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler, K. Reinhart, 'Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study' , *Intensive Care Med*. 2007 Apr;33(4): 606-18.
78. T. van der Poll, S. M. Opal, 'Host-pathogen interactions in sepsis' , *Lancet Infect Dis*. 2008 Jan;8(1):32-43.
79. T. Kawai, S. Akira, 'The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors' , *Nat Immunol*. 2010 May;11(5):373-84.
80. J. K. Chan, J. Roth, J. J. Oppenheim, K. J. Tracey, T. Vogl, M. Feldmann, N. Horwood, J. Nanchahal, 'Alarmins: awaiting a clinical response', *J Clin Invest*. 2012 Aug;122(8):2711-9.
81. W. J. Wiersinga, S. J. Leopols, D. R. Cranendonk, T. van der poll, 'Host innate immune responses to sepsis', *Virulence*. 2014 Jan 1;5(1):36-44.
82. T. Kawasaki, T. Kawai, 'Toll-Like Receptor Signaling Pathways', *Front Immunol*. 2014; 5: 461. doi: 10.3389/fimmu.2014.00461
83. H. Kumar, T. Kawai, S. Akira, 'Toll-like receptors and innate immunity', *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Oct 30;388(4):621-5.
84. M. Yamamoto, K. Takeda, S. Akira, 'TIR domain-containing adaptors define the specificity of TLR signaling', *Mol Immunol*. 2004 Feb;40(12):861-8.
85. T. Kaisho, O. Takeuchi, T. Kawai, K. Hoshino, S. Akira, 'Endotoxin-induced maturation of MyD88-deficient dendritic cells', *J Immunol*. 2001 May 1;166(9): 5688-94.
86. M. Chamaillard, M. Hashimoto, Y. Horie, J. Masumoto, S. Qiu, L. Saab, Y. Ogura, A. Kawasaki, K. Fukase, S. Kusumoto, M. A. Valvano, S. J. Foster, T. W. Mak, G. Nuñez N. Inohara, 'An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid', *Nat Immunol*. 2003 Jul;4(7):702-7.
87. N. Inohara, Y. Ogura, A. Fontalba, O. Gutierrez, F. Pons, J. Crespo, K. Fukase, S. Inamura, S. Kusumoto, M. Hashimoto, S. J. Foster, A. P. Moran, J. L. Fernandez-Luna, G. Nuñez, 'Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through

- NOD2. Implications for Crohn's disease', *J Biol Chem.* 2003 Feb 21;278(8):5509-12.
88. S. E. Girardin, I. G. Boneca, J. Viala, M. Chamaillard, A. Labigne, G. Thomas, D. J. Philpott, P. J. Sansonetti, 'Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection', *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):8869-72.
89. N. Inohara, T. Koseki, L. del Peso, Y. Hu, C. Yee, S. Chen, R. Carrio, J. Merino, D. Liu, J. Ni, G. Núñez, 'Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB', *J Biol Chem.* 1999 May 21;274(21):14560-7.
90. O. Gutierrez, C. Pipaon, N. Inohara, A. Fontalba, Y. Ogura, F. Prosper, G. Núñez, J. L. Fernandez-Luna, 'Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation', *J Biol Chem.* 2002 Nov 1;277(44):41701-5.
91. M. Hasegawa, Y. Fujimoto, P. C. Lucas, H. Nakano, K. Fukase, G. Núñez, N. Inohara, 'A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation', *EMBO J.* 2008 Jan 23;27(2):373-83.
92. S. E. Hardison, G. D. Brown, 'C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity', *Nat Immunol.* 2012 Sep;13(9):817-22.
93. M. J. Marakalala, S. Vautier, J. Potrykus, L.A. Walker, K. M. Shepardson, A. Hopke, H. M. Mora-Montes, A. Kerrigan, M. G. Netea, G. I. Murray, D. M. MacCallum, R. Wheeler, C. A. Munro, N. A. R. Gow, R. A. Cramer, A. J. P. Brown, G. D. Brown, 'Differential adaptation of *Candida albicans* in vivo modulates immune recognition by dectin-1', *PLoS Pathog.* 2013;9(4):e1003315.
94. C. del Fresno, D. Soulat, S. Roth, K. Blazek, I. Udalova, D. Sancho, J. Ruland, C. Ardavin, 'Interferon- β production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*', *Immunity.* 2013 Jun 27;38(6):1176-86.
95. M. Yoneyama, K. Onomoto, M. Jogi, T. Akaboshi, T. Fujita, 'Viral RNA detection by RIG-I-like receptors', *Curr Opin Immunol.* 2015 Feb;32:48-53.
96. J. Ahamed, F. Niessen, T. Kurokawa, Y. K. Lee, G. Bhattacharjee, J. H. Morrissey, W. Ruf, 'Regulation of macrophage procoagulant responses by the tissue factor cytoplasmic domain in endotoxemia', *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5251-9.
97. C. M. Tsao, S. T. Ho, C. C. Wu, 'Coagulation abnormalities in sepsis', *Acta Anaesthesiol Taiwan.* 2015 Mar;53(1):16-22.
98. I. Toshiaki, T. Jecko, 'Clinical significance of measuring plasminogen activator inhibitor-1 in sepsis', *J Intensive Care.* 2017; 5: 56.

99. Y. Kakihana, T. Ito, M. Nakahara, K. Yamaguchi, T. Yasuda, 'Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management', *J Intensive Care*. 2016 Mar 23;4:22.
100. E. de Montmollin, J. Aboab, A. Mansart, D. Annane, 'Bench-to bedside review: Beta-adrenergic modulation in sepsis', *Crit Care*. 2009;13(5):230.
101. J.L. Vincent, J. Bakker, G. Marécaux, L. Schandene, R. J. Kahn, E. Dupont, 'Administration of anti-TNF antibody improves left ventricular function in septic shock patients. Results of a pilot study', *Chest*. 1992 Mar;101(3):810-5.
102. A. Kumar, V. Thota, L. Dee, J. Olson, E. Uretz, J. E. Parrillo, 'Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum', *J Exp Med*. 1996 Mar 1;183(3): 949-58.
103. M. A. Titheradge, 'Nitric oxide in septic shock', *Biochim Biophys Acta*. 1999 May 5;1411(2-3):437-55.
104. A. O. Aliprantis, R. B. Yang, M. R. Mark, S. Suggett, B. Devaux, J. D. Radolf, G. R. Klimpel, P. Godowski, A. Zychlinsky, 'Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2', *Science*. 1999 Jul 30;285(5428):736-9.
105. K. Yano, P. C. Liaw, J. M. Mullington, S. C. Shih, H. Okada, N. Bodyak, P. M. Kang, L. Tolft, B. Belikoff, J. Buras, B. T. Simms, J. P. Mizgerd, P. Carmeliet, S. A. Karumanchi, W. C. Aird, 'Vascular endothelial growth factor is an important determinant of sepsis morbidity and mortality', *J Exp Med*. 2006 Jun 12; 203(6): 1447-1458.
106. O. van Ruler, B. Lamme, D. J. Gouma, J. B. Reitsma, M. A. Boermeester, 'Variables associated with positive findings at relaparotomy in patients with secondary peritonitis', *Crit Care Med*. 2007 Feb;35(2):468-76.
107. A. Hoeben, B. Landuyt, M. S. Highley, H. Wildiers, A. T. van Oosterom, E. A. De Bruijn, 'Vascular endothelial growth factor and angiogenesis', *Pharmacol Rev*. 2004 Dec;56(4):549-80.
108. F. Orsenigo, C. Giampietro, A. Ferrari, M. Corada, A. Galaup, S. Sigismund, G. Ristagno, L. Maddaluno, G. Y. Koh, D. Franco, V. Kurtcuoglu, D. Poulidakos, P. Baluk, D. McDonald, M. G. Lampugnani, E. Dejana, 'Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo', *Nat Commun*. 2012;3:1208. doi: 10.1038/ncomms2199.

109. M. Murakami, A. Sugita, T. Shimada, K. Nakamura, 'Surface view of pericytes on the retinal capillary in rabbits revealed by scanning electron microscopy', *Arch Histol Jpn.* 1979 Jul;42(3):297-303.
110. A. McCurley, P. W. Pires, S. B. Bender, M. Aronovitz, M. J. Zhao, D. Metzger, P. Chambon, M. A. Hill, A. M. Dorrance, M. E. Mendelsohn, I. Z. Jaffe, 'Direct Regulation of Blood Pressure by Smooth Muscle Cell Mineralocorticoid Receptors', *Nat Med.* 2012 Sep; 18(9): 1429–1433.
111. R. M. Touyz, R. Alves-Lopes, F. J. Rios, L. L. Camargo, A. Anagnostopoulou, A. Arner, A. C. Montezano, 'Vascular smooth muscle contraction in hypertension', *Cardiovasc Res.* 2018 Mar 15; 114(4): 529–539.
112. A. Piotrowski, W. Sobala, P. Krajewski, W. Fendler, I. Dabrowska-Wojciak, 'Ascites in infants with severe sepsis - treatment with peritoneal drainage', *Paediatr Anaesth.* 2006 Dec;16(12):1268-73.
113. J. Edman-Wallér, L. Ljungström, R. Andersson, G. Jacobson, M. Werner, 'Systemic symptoms as markers for severity in sepsis', *Crit Care.* 2015; 19(Suppl 1): P6.
114. Z.Chen, Z. C. Han, 'STAT3: a critical transcription activator in angiogenesis', *Med Res Rev.* 2008 Mar;28(2):185-200.
115. P. Carmeliet, 'Manipulating angiogenesis in medicine', *J Intern Med.* 2004 May; 255(5):538-61.
116. G. R. Bernard, J. L. Vincent, P. F. Laterre, S. P. Larosa, J. F. Dhainaut, A. L. Rodriguez, J. S. Steingrub, G. E. Garber, J. D. Helterbrand, E. W. Ely, C. J. Fisher, 'Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis', *N Engl J Med.* 2001 Mar 8;344(10):699-709.
117. A. Nooteboom, R. P. Bleichrodt, T. Hendriks, 'Modulation of endothelial monolayer permeability induced by plasma obtained from lipopolysaccharide-stimulated whole blood', *Clin Exp Immunol.* 2006 May; 144(2): 362–369.
118. Seynhaeve. AL, Rens. JA, Schipper. D, Eggermont. AM, Ten Hagen. TL, 'Exposing endothelial cells to tumor necrosis factor- α and peripheral blood mononuclear cells damage endothelial integrity via interleukin-1 β by degradation of vascular endothelial-cadherin', *Surgery.* 2014 Mar;155(3):545-53. doi: 10.1016/j.surg.2013.10.019. Epub 2013 Oct 15.
119. Van den Haute. C, Eggermont. K, Nuttin. B, Debyser. Z, Baekelandt. V, 'Lentiviral vector-mediated delivery of short hairpin RNA results in persistent knockdown of gene expression in mouse brain', *Hum Gene Ther.* 2003 Dec 10;14(18):1799-807.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich in besonderem Maße bei Herrn Prof. Dr. Christian Kupatt bedanken, der für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und die Begutachtung der vorliegenden Arbeit gesorgt hat sowie Herrn Dr. Tilman Ziegler, der mir im Laufe der vorliegenden Arbeit im wahrsten Sinne des Wortes zur Seite stand und eine große Hilfe für das Projekt geleistet hat.

Weiterhin danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe AG Kupatt/Laugwitz für die Zusammenarbeit. Dabei hervorzuheben ist Frau Dr. Tatjana Dorn, die mich in der Gesamtzeit der vorliegenden Arbeit sehr unterstützt hat und Dr. Tarik Bozoglu, der mir stets freundlich in Fragen Molekularbiologie geholfen hat und die Durchführung praktischer Arbeiten überwacht hat.

Für die Durchführung einiger praktischer Arbeiten danke ich Farah Abdelrahman.

Ein herzlicher Dank geht an meinen Eltern Jamila und Nizar Asadi, meine Großeltern Mohammad und Eisha Asadi und an Basel Asadi, die den Abschluss dieser Arbeit durch ständige Motivation und finanzielle Unterstützung erleichterten.

Eidesstattliche Versicherung

Asadi, Morad

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Das T-Zell-spezifische Adapterprotein (TSAd) in der Vermittlung septischer Hyperzirkulation

selbstständig 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 ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

New York, 4/10/2021

Ort, Datum

Morad Asadi

Unterschrift Doktorand