

Aus der Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Gernot Marx)

**Der Einfluss des synthetisch hergestellten
antimikrobiellen Peptids 19.2-5 auf die Expression
von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in
einem murinen Sepsismodell**

Von der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen
Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen
Grades eines Doktors der Medizin genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Lukas Benjamin Martin

aus Karlsruhe

Berichter: Univ.-Prof Dr. med. Gernot Marx

Priv.-Doz. Dr. med. Christoph Raspé

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2013

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

In Dankbarkeit

meinen Eltern und Großeltern

gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Sepsis	1
1.1.1	Definitionen	2
1.1.2	Epidemiologie und ökonomische Aspekte	3
1.1.3	Pathophysiologie der Sepsis	3
1.1.4	Multiorganversagen und septischer Schock	8
1.1.5	Therapeutische Optionen	10
1.2	Antimikrobielle Peptide	11
1.2.1	Polypeptidantibiotikum Polymyxin B	13
1.2.2	Synthetisch hergestellte antimikrobielle Peptide	13
1.3	Glykokalyx des Endothels	15
1.3.1	Heparansulfat-Proteoglykane	17
1.3.2	Heparanase	18
1.3.3	Syndekan-1	19
1.3.4	Perlekan	22
2	Zielsetzung	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Randomisierung der Tiere in vier Gruppen	26
3.2	<i>Teil 1:</i> Implantation des zentralvenösen Katheters	27
3.3	<i>Teil 2:</i> Sepsisinduktion und Medikamentenapplikation	28
3.4	<i>Teil 3:</i> Gewinnung der Organe und des Blutplasmas	29
3.5	<i>Teil 4:</i> Molekularbiologische Untersuchungen	29
3.5.1	Bestimmung der Zytokinkonzentration	29
3.5.2	RNA-Extraktion	30
3.5.3	RNA-Agarosegelelektrophorese	31

3.5.4	Photometrische Ermittlung der RNA-Konzentration	31
3.5.5	Reverse Transkriptase (RT)	32
3.5.6	Real-Time-PCR	32
3.5.7	Primer - Auswahl und Design	33
3.5.8	Durchführung der Real-Time-PCR	35
3.6	Auswertung der Real-Time-PCR	36
3.6.1	Endogene Kontrolle und relative Quantifizierung	38
3.7	Statistik und graphische Darstellung	41
4	Ergebnisse	42
4.1	mRNA Expression der Heparanase in den untersuchten Organen . . .	42
4.2	mRNA Expression von Syndekan-1 in den untersuchten Organen . . .	44
4.3	mRNA Expression von Perlekan in den untersuchten Organen	46
4.4	Zytokinexpressionen im Plasma	48
5	Diskussion	53
5.1	Regulierung von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in der Sepsis .	53
5.2	Regulierung von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan unter der Therapie mit Peptid 19.2-5	57
5.3	Zytokinspiegel und die Expression von Heparanase, Syndekan-1, Per- lekan	60
6	Zusammenfassung	61
7	Abstract	63
	Abbildungsverzeichnis	65
	Tabellenverzeichnis	66
	Abkürzungsverzeichnis	67
	Literaturverzeichnis	69

Anhang	84
A Danksagung	85
B Erklärung zur Datenaufbewahrung	86
C Erklärung über den Eigenanteil	87

1 Einführung

Sepsis ist die dritthäufigste Todesursache nach koronarer Herzkrankheit und akutem Myokardinfarkt (Engel et al. 2007). Derzeit versterben in Deutschland jährlich ca. 60.000 Menschen an der Sepsis und ihren Folgen (Engel et al. 2007). Die antimikrobielle Therapie stellt neben der Herdsanierung einen der wichtigsten Eckpfeiler der kausalen Therapie der Sepsis dar. Synthetisch hergestellte antimikrobielle Peptide gewinnen dabei als neue additive Therapeutika bei wachsenden Resistenzen von Bakterien gegenüber konventionellen Antibiotika (Kresken et al. 2009) an Bedeutung. Die Heparanase und Heparansulfat-Proteoglykane Syndekan-1 und Perlekan agieren als Modulatoren in inflammatorischen Prozessen (Li und Vlodavsky 2009). Die Regulierung ihrer Genexpression in der polymikrobiellen Sepsis und die Auswirkungen antimikrobieller Peptide auf diese ist bisher nicht geklärt. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Genexpression von Heparanase und der Heparansulfat-Proteoglykane Syndekan-1 und Perlekan in einem murinen Modell der Sepsis ohne spezifische Behandlung und unter der Therapie mit dem synthetisch hergestellten antimikrobiellen Peptid 19.2-5 in mehreren Organen zu untersuchen.

1.1 Sepsis

Der von Hippokrates ca. 400 vor Chr. definierte medizinische Terminus “Sepsis” beschreibt eine bis in die Gegenwart gefürchtete Komplikation von Infektionserkrankungen. Um 1000 n. Chr. konnte Ibn Sina die von Hippokrates beschriebene “Fäulnis” in Zusammenhang mit Fieber beobachten. Robert Koch erkannte Bakterien als Erreger der Sepsis und Hugo Schottmüller zeigte 1914 deren Toxinwirkung (Schottmüller 1914).

1.1.1 Definitionen

Grundlage der aktuell gültigen Definition einer Sepsis stellen die Kriterien der Konsensuskonferenz aus dem Jahre 1992 des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) dar. Demnach bezeichnet der Begriff Sepsis eine systemische Immunantwort des Organismus als Reaktion auf Infektionen. Kommt es zu einer „Sepsis-ähnlichen“ Immunantwort, auch aufgrund einer anderen Ursache, so wird dies als SIRS („Systemic Inflammatory Response Syndrome“) bezeichnet. Das Krankheitskontinuum Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock wird über eine Kombination aus Vitalparametern, hämodynamischen Daten und Organfunktionen definiert, die in Tabelle 1.1 im Überblick dargestellt sind (Bone et al. 1992, Reinhart 2007, Reinhart et al. 2010).

Tabelle 1.1: Definitionen SIRS, Sepsis und septischer Schock nach Reinhart et al. 2010.

Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)
- Körperkerntemperatur $\geq 38^{\circ}\text{C}$ oder $\leq 36^{\circ}\text{C}$ - Tachykardie $\geq 90/\text{min}$ - Tachypnoe $\geq 20/\text{min}$ oder $\text{paCO}_2 \leq 30\text{mmHg}$ - Leukozyten $\geq 12.000/\mu\text{l}$, $\leq 4.000/\mu\text{l}$ oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile
Sepsis
- 2 oder mehr SIRS-Kriterien mit vermuteter oder nachgewiesener Infektion
Schwere Sepsis (Sepsis mit wenigstens einer Organdysfunktion)
- Akute Enzephalopathie (eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit) - Kardiovaskulär (Hypotension, Katecholaminpflicht) - Renal (Diurese $\leq 0,5\text{ml/kg/h}$ für mindestens 2 Stunden) - Respiratorisch ($\text{paO}_2/\text{FiO}_2 \leq 250$) - Hepatisch - Hämatologisch (Thrombozyten $\leq 80\text{G/L}$ oder Abfall um $> 30\%$) - Metabolisch ($\text{pH} \leq 7,30$ oder Basendefizit $\geq 5\text{mmol/l}$ & Laktat $\geq 1,5\text{fach}$)
Septischer Schock
Sepsis-induzierte Hypotension (systolischer art. Blutdruck $\leq 90\text{mmHg}$ oder mittlerer arterieller Blutdruck $\leq 60\text{mmHg}$) über wenigstens eine Stunde trotz adäquater Volumenzufuhr, zusammen mit Veränderungen der Perfusion (Laktazidose, Oligurie, Verwirrtheit) oder Vasopressoreinsatz

1.1.2 Epidemiologie und ökonomische Aspekte

Die Inzidenz der Sepsis auf deutschen Intensivstationen beträgt derzeit etwa 154.000 Fälle pro Jahr (Engel et al. 2007). Bei etwa 75.000 Fällen handelt es sich um eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock. Die Mortalität der schweren Sepsis liegt bei ca. 47% (Angus et al. 2001), die des septischen Schocks bei über 60% (Engel et al. 2007). Die Behandlungskosten der Sepsis stellen eine erhebliche ökonomische Last für das Gesundheitssystem dar. In Deutschland fallen etwa 30% der Gesamtkosten der Intensivmedizin für die Sepsisbehandlung an (Brunkhorst 2006, Moerer und Burchardi 2006).

1.1.3 Pathophysiologie der Sepsis

Der Krankheitsverlauf der Sepsis zeigt klinisch und immunologisch einen biphasischen Verlauf. Der Prozess der Sepsis beginnt mit der generalisierten Reaktion des Körpers auf ein lokales Pathogen. In der dann initial ablaufenden Phase kommt es zur unkontrollierten Freisetzung von Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten sowie pro-inflammatorischen Mediatoren wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6), Komplementfaktoren (C3, C5a), Interferon- γ (IFN- γ), reaktiven Sauerstoffspezies und Stickstoffmonoxid (NO) (Cohen 2002). In der sich anschließenden Phase folgt die Freisetzung anti-inflammatorischer Mediatoren wie Interleukin-10 (Cohen 2002, Kox et al. 1997).

Entscheidend ist das Ausmaß der Reaktion des Patienten auf die auslösende Noxe. Nach initial sinnvoller Abwehrreaktion des Körpers auf den pathogenen Stimulus sowie den Versuch seiner Elimination entsteht beim Versagen dieser Mechanismen konsekutiv eine unkontrollierte und überschießende Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, die neben ihrer eigentlichen Aufgabe, den Keim zu eliminieren, auto-destruktive Schädigungen körpereigener Zell- und Organsysteme verursachen (Hotchkiss und Karl 2003).

Das Spektrum bakterieller Erreger, die einer Sepsis zugrunde liegen, weist etwa zur Hälfte Gram-positive und Gram-negative Bakterien auf (Angus et al. 2001, O'Neill et al. 2012). Weitere ursächliche Erreger sind Viren und Pilze, darunter hauptsächlich *Candida* Spezies (Angus et al. 2001). Jedoch sind generell alle Erreger in der Lage, eine Sepsis zu induzieren. Beim Zerfall Gram-negativer Bakterien werden Endotoxine (Lipopolysaccharide «LPS») freigesetzt (Morrison 1998). Gram-positive Bakterien besitzen keine Endotoxine. Bestandteile ihrer Zellwand (Peptidoglykane, Lipoteichonsäure) können jedoch ebenfalls über eine Bindung von Zelloberflächenrezeptoren pro-inflammatorische Kaskaden induzieren (Cohen 2002).

Lipopolysaccharide (LPS) von Gram-negativen Bakterien bilden als Hauptkomponenten der Außenseite der äußeren Membran mit ihren Lipid-A Anteilen einen der potentesten Virulenzfaktoren in Bezug auf die Aktivierung des Immunsystems. Freigesetztes LPS bindet nach Komplexbildung mit Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP) an einen membrangebundenen (mCD14) oder löslichen Rezeptor (sCD14) (Cohen 2002, Couturier et al. 1991). CD14 negative Zellen (Dendritische Zellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen) sind somit ebenfalls in der Lage, über den löslichen Rezeptor (sCD14) mit LPS in Kontakt zu treten (Frey et al. 1992). Zu den mCD14 exprimierenden Zielzellen zählen Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Granulozyten und Lymphozyten. Nach Bindung des LPS-LBP-Komplexes über den CD14-Rezeptor erfolgt die Signaltransduktion über einen Toll-like-Rezeptorkomplex (TLR4-MD2-Komplex). Über weitere intrazelluläre Schritte resultiert der Signalweg in der Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Zellkern. Die hierdurch aktivierten Makrophagen und Monozyten sezernieren sowohl direkt zytotoxische Komponenten (Proteinasen, freie Radikale, Stickstoffmonoxid «NO») als auch pro-inflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6). Diese Zytokine induzieren die Synthese und Expression verschiedener Mediatoren und aktivieren ihrerseits zusätzlich Makrophagen und Monozyten (Cohen 2002). Die beschriebenen Abläufe sind zusammenfassend in Abbildung 1.1 dargestellt.

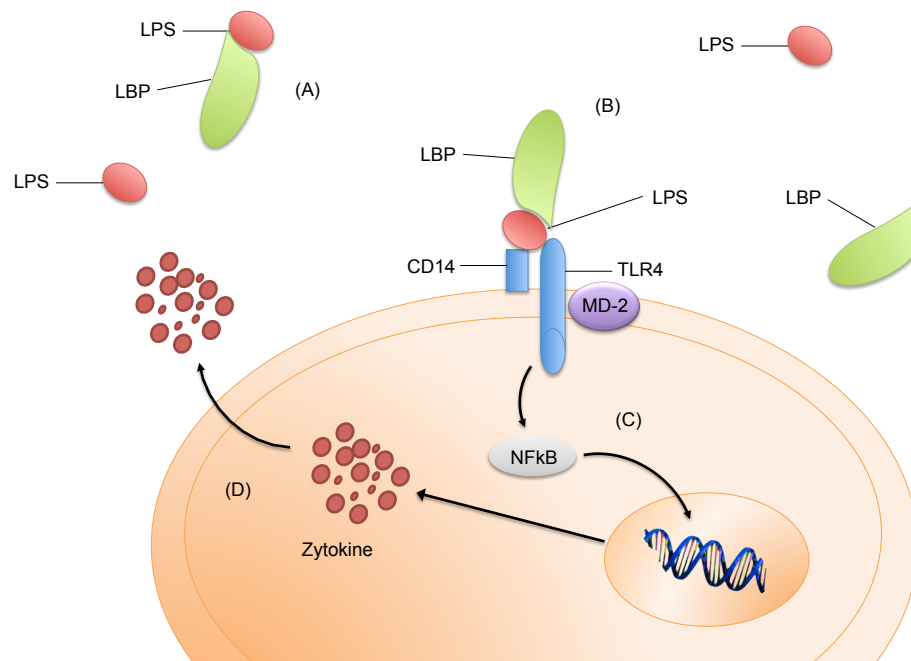


Abbildung 1.1: Signalweg nach Bindung des LPS-LBP-Komplexes. (A) Komplexbildung von Lipopolysaccharid (LPS) und Lipopolysaccharid-Bindungs-Protein (LBP). (B) Bindung des LPS-LBP-Komplexes über CD14 an den Toll-like-Rezeptorkomplex (TLR4-MD2-Komplex). (C) Aktivierung und Translokation in den Zellkern des Transkriptionsfaktors NFκB. (D) Produktion und Freisetzung von Zytokinen.

Die in dieser Arbeit im Plasma gemessenen Zytokine und Chemokine werden nun im Folgenden im Hinblick auf ihre Eigenschaften während der Sepsis näher beschrieben:

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) bewirkt als pro-inflammatorisches Zytokin die klinischen Symptome der Sepsis (Fieber, Tachykardie, Vasodilatation) und induziert aus aktivierten Immunzellen die Ausschüttung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine. Er wirkt somit als Multiplikator des Endotoxineffekts (Damas et al. 1989). TNF- α fördert die Adhärenz der Granulozyten am Endothel und stimuliert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Zelloberflächen zur interzellulären Kommunikation (Cohen 2002, Damas et al. 1989). In klinischen Studien konnten erhöhte Spiegel von TNF- α im Plasma septischer Patienten gemessen und eine Korrelation zwischen TNF- α -Spiegel und schlechterem Outcome der Patienten nachgewiesen

werden (Casey et al. 1993, Zanotti et al. 2002). TNF- α stimuliert gemeinsam mit IL-1 unter Mitbeteiligung des “Platelet Activating Factors” die gesteigerte Bildung der NO-Synthase, die über endogenes NO eine Vasodilatation hervorruft (Cohen 2002). In vitro Untersuchungen konnten zeigen, dass die Exposition von TNF- α einen Einfluss auf die mRNA- und Proteinexpression von Heparanase und das Heparansulfat-Proteoglykan Syndekan-1 hat (Edovitsky 2006, Haywood-Watson et al. 2011).

Interferon- γ (IFN- γ) zählt ebenfalls zu den pro-inflammatorischen Zytokinen und wird überwiegend von stimulierten T-Lymphozyten produziert. IFN- γ hat eine antivirale und antiproliferative Aktivität und verstärkt die Zytotoxizität von TNF- α . Des Weiteren aktiviert IFN- γ Makrophagen zur Tumorerstörung oder Phagozytose von Bakterien und verstärkt die Zytotoxizität von Natürlichen Killerzellen (Leng et al. 2012). Aus in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass die Exposition mit IFN- γ zu einer Erhöhung der mRNA Expression von Heparanase (Edovitsky 2006) und einer dosisabhängigen Suppression der mRNA Expression des Heparansulfat-Proteoglykans Perlekan (Ramasamy et al. 1995, Tufvesson und Westergren-Thorsson 2000) führt.

Interleukin-6 wirkt als weiteres pro-inflammatorisches Zytokin synergistisch mit TNF- α . An Endothelzellen bewirkt es die Expression spezifischer endothelialer Adhäsionsmoleküle, die zusammen mit der stimulierten Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche von Leukozyten zur Diapedese dieser in das Interstitium führt (Couturier et al. 1991, Rothlein und Mainolfi 1991). Auf neuroendokriner Ebene induziert IL-6 im Thalamus eine Temperaturerhöhung sowie die Freisetzung von Corticotropin Releasing-Hormon (CRH), was zu einer Ausschüttung von Cortisol aus der Nebenniere führt (Heinrich et al. 1990). Auch hohe Spiegel von IL-6 korrelieren mit schlechterem Outcome von Patienten in der Sepsis (Zanotti et al. 2002).

Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1) ist ein pro-inflammatorisches Chemokin der Klasse CC (CCL-2) und wirkt chemotaktisch auf Makrophagen, Monozyten und T-Lymphozyten (Tsutsumi 2003, Carr et al. 1994). Der Rezeptor für MCP-1 (CCR2) wird konstitutiv auf basophile Granulozyten, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Gabe von transfizierten Zellen, die eine inaktive Form von MCP-1 exprimieren, die renale Entzündung in einem Modell der Lupusnephritis unterdrücken kann (Hasegawa et al. 2003). Bei MCP-1-defizienten Mäusen kommt es in einem Modell des Typ 1 und Typ 2 Diabetes zu einer Verlangsamung der Progression der diabetischen Nephropathie mit Reduktion der Glomerulosklerose und der interstitiellen Fibrose (Chow et al. 2006a, Chow et al. 2006b). In der Sepsis ist MCP-1 im Plasma von Patienten erhöht (Bossink et al. 1995).

Interleukin-10 gehört zu den anti-inflammatorischen Zytokinen und wird von aktivierten Monozyten, Makrophagen und T-Zellen produziert. Entscheidend für die anti-inflammatorische Wirkung von IL-10 ist die Hemmung der Synthese und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, und TNF- α durch Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten und neutrophile Granulozyten (Kaur et al. 2006, Wang et al. 1994). Daneben hemmt IL-10 die pro-koagulatorische Wirkung von TNF- α (Zanotti et al. 2002).

1.1.4 Multiorganversagen und septischer Schock

Der Begriff Multiorganversagen (MOV) wurde 1992 in der Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine (SCCM) als das gleichzeitige Auftreten von Funktionsstörungen von zwei oder mehr Organen, welche nur durch therapeutische Interventionen beseitigt werden können, beschrieben (Bone et al. 1992). Im Rahmen einer schweren Sepsis kommt es häufig zu einem Multiorganversagen von Lunge, Niere, Leber, Herz und Gehirn in unterschiedlicher Reihenfolge. Die entscheidenden Faktoren in der Entstehung dieser Organfunktionsstörungen sind die Mangelperfusion und Hypoxie der Gewebe. Ursächlich bedingt sind diese durch das Zusammenspiel mehrerer pathologischer Prozesse (Cohen 2002, Landry und Oliver 2001). In Abbildung 1.2 dieser Arbeit sind die Zusammenhänge der folgend näher erläuterten pathologischen Prozesse zusammenfassend dargestellt.

(1) *Koagulation*: Durch Freisetzung Plättchen-aktivierender Faktoren (PAF) und die Expression des “tissue-factors” auf Endothelzellen kommt es zur Aktivierung des Gerinnungssystems. Die daraus entstehenden Mikrothromben führen zur Okklusion der kleinen Gefäße und dem klinischen Bild der disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) (Williams und Hellewell 1992).

(2) *Hämodynamik*: Durch Stimulation der endothelialen NO-Synthase entsteht vermehrt der vasodilatatorische Mediator Stickstoff (NO), der die vaskuläre glatte Muskulatur relaxiert. Es resultiert eine arterielle Hypotension, ein septischer Schock (De Kock et al. 2010). Die hohen zirkulierenden Spiegel von NO bedingen des Weiteren eine reduzierte myokardiale Kontraktionskraft und ein reduziertes Schlagvolumen (De Kock et al. 2010).

(3) *Endotheliale Permeabilität*: Durch Modulation der endothelialen Glykokalyx entsteht eine verminderte Barrierefunktion des Endothels. Die erhöhte vaskuläre Permeabilität resultiert in einem Kapillarleck und führt zu einer massiven Volumenverschiebung ins Interstitium mit Ödembildung. Die Folge ist ein intravasaler Volumenmangel, der die Entstehung des septischen Schocks weiter aggraviert (De Kock et al. 2010, Lee und Slutsky 2010).

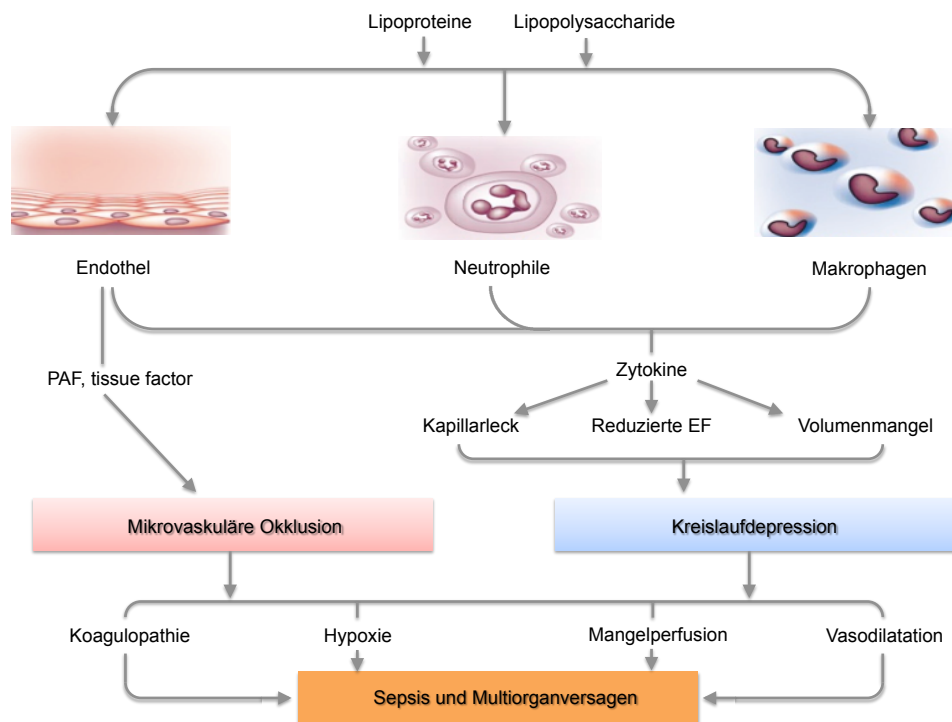


Abbildung 1.2: Pathophysiologie der Sepsis und des Multiorganversagens. Die Exposition von Lipopolysacchariden und Lipoproteinen stimuliert die Freisetzung von Zytokinen aus Neutrophilen und Makrophagen, die durch Bildung eines Kapillarlecks mit resultierendem intravasalem Volumenmangel und einer Reduktion der kardialen Pumpfunktion (EF) maßgeblich zur Kreislaufdepression beitragen. Das Endothel exprimiert pro-koagulatorische Faktoren (PAF, tissue factor). Mikrovaskuläre Okklusionen und die Kreislaufdepression resultieren in der Mangelperfusion und Hypoxie der Organe. (Modifiziert nach Cohen 2002).

1.1.5 Therapeutische Optionen

Ein möglichst frühzeitiger Behandlungsbeginn ist entscheidend für die Qualität der Sepsis-Therapie und damit für die Überlebenschance des Patienten. Die vollständige Sanierung der septischen Infektionsquelle stellt dabei die Grundvoraussetzung einer erfolgreichen Therapie dar (Barie et al. 2004, Wacha et al. 1999). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Zeitspanne zwischen dem Auftreten der septischen Symptomatik und der Beherrschung des septischen Fokus das Outcome des Patienten maßgeblich bestimmt (Kaiser und Cerra 1981, Koperna und Schulz 2000).

Die antimikrobielle Therapie stellt dabei neben der Herdsanierung einen der wichtigsten Eckpfeiler der kausalen Therapie der Sepsis dar. Ein wesentlicher Risikofaktor für die erhöhte Sterblichkeit an Sepsis ist die initial inadäquate antimikrobielle Therapie (Kumar et al. 2006). Wichtiges Grundprinzip ist hierbei, neben des frühzeitigen Einsatzes, die individuelle und den lokalen Resistenzen angepasste Gabe eines Breitspektrumantibiotikums in ausreichendem Wirkspiegel (Bodi et al. 2001). Nach mikrobiellem Keimnachweis wird im Sinne einer Deeskalationsstrategie der Wechsel auf ein Antibiotikum mit engerem Wirkspektrum empfohlen, um Resistenzentwicklungen zu verringern (Dellinger et al. 2008).

Die Erreger der Sepsis entwickeln konsekutiv neue Resistenzmechanismen gegenüber konventionellen Antibiotika (Kresken et al. 2009). In den letzten 10 Jahren entstanden unter anderem extended-spectrum β -Lactamase produzierende Enterobakterien (ESBL) und Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), sowie Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Kollef 2000, Kresken et al. 2009). Die Zunahme an resistenten Erregern bedingt eine zunehmend inadäquate empirische antibiotische Therapie, die einen negativen Einfluss auf das Überleben der Patienten hat (Cosgrove 2006, Kang et al. 2005).

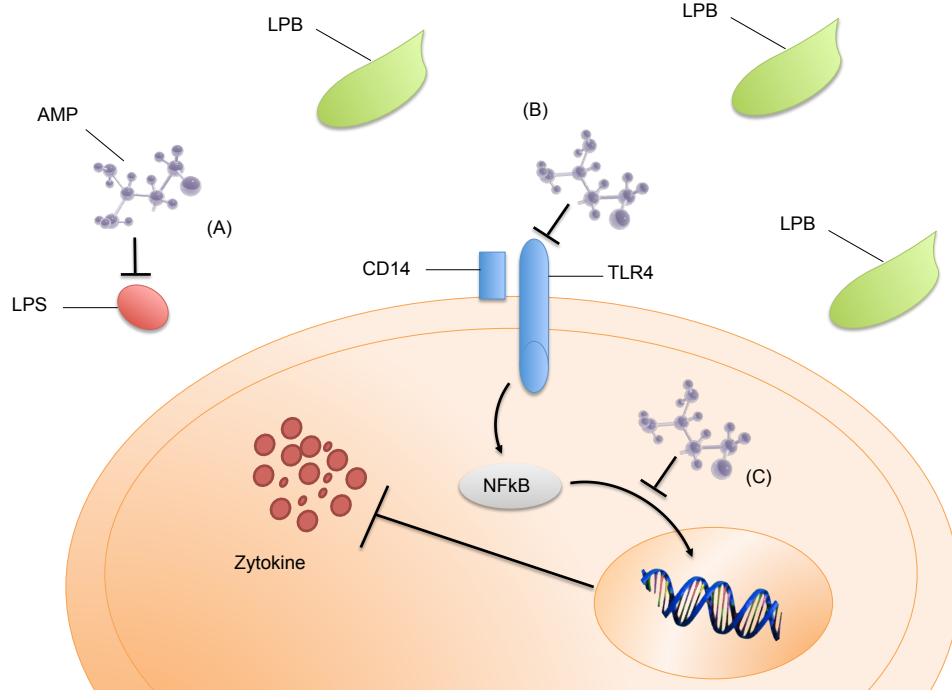
1.2 Antimikrobielle Peptide

Bereits 1957 wurde die Existenz antimikrobieller Substanzen in Gewebe, Blut und Lymphe beschrieben und ihnen eine Beteiligung an einer Vielzahl von Mechanismen der frühen Immunabwehr zugesprochen (Skarnes und Watson 1957). 1998 konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen nicht nur ein bedeutender Teil der angeborenen Immunität sind, sondern auch in direktem Kontakt mit der adaptiven Immunantwort stehen (Andreu und Rivas 1998).

Zu den natürlich vorkommenden Antimikrobiellen Peptiden (AMP) zählen die beiden Gruppen der Defensine: α - und β -Defensine (Schuerholz et al. 2012, Steinstraesser et al. 2009). Die Gruppe der α -Defensine (HAD) umfasst neben drei weiteren Mitgliedern die Familie der „human neutrophil peptides“ (HNP1-3). Diese Peptide werden von polymorphkernigen Leukozyten sezerniert und weisen neben ihrer antimikrobiellen Aktivität gegen Bakterien und Viren eine Funktion in der Regulierung von Zytokinen und Komplementfaktoren auf (Schuerholz et al. 2012, Steinstraesser et al. 2009). Epithelzellen sezernieren die Gruppe der β -Defensine (HBD1-3). Diese zeigen eine antimikrobielle Aktivität gegen Bakterien, Viren und Pilze. Daneben wird eine Runterregulierung der Expression pro-inflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6) in Makrophagen nach LPS-Exposition durch HBD3 in vivo und in vitro ausgelöst (Schuerholz et al. 2012, Steinstraesser et al. 2009).

In der schweren Sepsis und im septischen Schock sind Antimikrobielle Peptide (AMP) der Gruppe α -Defensine im Plasma von Patienten im Vergleich zu nicht-septischen Patienten erhöht (Berkestedt et al. 2010).

Konventionelle Antibiotika setzen durch ihre bakterizide Wirkung Wandbestandteile von Bakterien frei, die ihrerseits direkt eine pro-inflammatorische Kaskade induzieren (Morrison 1998). Im Gegensatz dazu besitzen AMP die Eigenschaft Bakterien zu töten und deren freigesetzte Wandbestandteile zu neutralisieren, was eine nachgeschaltete Inflammations-Kaskade verhindert (Brandenburg et al. 2011). AMP induzieren das "bacterial killing" durch das Inhibieren der Zellwand- und Nukleinsäu-



1.2.1 Polypeptidantibiotikum Polymyxin B

Polymyxin B gehört zur Gruppe der Polypeptidantibiotika und dient in den Untersuchungen zu vorliegender Arbeit als Vergleich zur Therapie mit Peptid 19.2-5. Wie auch Polymyxin E (Colistin) ist Polymyxin B ein hochpotentes Endotoxin-spezifisches Peptidantibiotikum. Eine hohe Neuro- und Nephrotoxizität limitiert jedoch den systemischen Einsatz in der Humanmedizin (Falagas und Kasiakou 2006). In den letzten Jahren ist es möglich geworden Hämoperfusionsfilter, welche mit Polymyxin B versehen sind, herzustellen. Bei deren Einsatz werden sowohl Endotoxine wie auch mit Endotoxin bestückte (und somit aktivierte) Monozyten von Polymyxin B gebunden und aus der Zirkulation entfernt, ohne dass Polymyxin selbst in die Blutbahn gelangt. Der Polymyxin B bestückte Filter kann mittels üblicher Hämofiltrationsgeräte parallel zur Hämofiltration verwendet werden (Cruz et al. 2009). Nebenwirkungen sind bisher, abgesehen von den üblichen Problemen extrakorporaler Therapieverfahren (Leitung, Antikoagulation, Hypothermie usw.), nicht beschrieben (Schmidig et al. 2011).

1.2.2 Synthetisch hergestellte antimikrobielle Peptide

Die wachsende Resistenz von Bakterien gegenüber konventionellen Antibiotika (Kresken et al. 2009) verstärkt Bestrebungen, AMP als additive Wirkstoffe im klinischen Einsatz zu entwickeln. Im Vergleich zu vorhandenen konventionellen anti-infektiven Therapeutika gibt es bislang keine Hinweise auf eine Resistenzentwicklung von Bakterien gegenüber AMP (Hancock und Sahl 2006).

Der systemische Einsatz von natürlich vorkommenden AMP als Therapeutika ist jedoch durch deren hohe Neuro- und Nephrotoxizität sowie die hämolysierende Eigenschaft limitiert (Gordon et al. 2005). 1996 gelingt es, ein Peptid (cLALF22) zu synthetisieren, das eine Affinität zu dem Lipid A Teil von LPS aufweist (Ried et al. 1996). In Weiterentwicklungen werden Peptide synthetisiert, die auch in geringerer Konzentration eine adäquate Affinität aufweisen. Jedoch zeigt sich bei diesen Pep-

tiden weiterhin eine hohe Zytotoxizität bei einer geringen Spezifität (Andra et al. 2007, Pan et al. 2007).

Das synthetisch hergestellte antimikrobielle Peptid 19.2-5 (siehe Tabelle 1.2) inhibiert bereits bei einem 3:1 Verhältnis von Peptid zu LPS die LPS induzierte Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine (Gutsmann et al. 2010). Der molekulare Wirkmechanismus der LPS-Neutralisation durch Peptid 19.2-5 beruht hierbei auf einer Konformationsänderung des Lipid-A Anteils von LPS. Die kubische Struktur des hydrophoben Lipid-A Teils konvertiert nach Bindung des Peptids in eine inaktive, multilamelläre Struktur (Gutsmann et al. 2010).

Weiterführende Untersuchungen belegen eine anti-inflammatorische Aktivität von Peptid 19.2-5 ebenfalls bei Gram-positiven Bakterien. In einem Zellversuch ist die Sekretion von $\text{TNF-}\alpha$ nach Exposition sowohl von *Staphylococcus aureus* als auch von *Mycobacterium tuberculosis* inhibiert (unveröffentlichte Daten, persönliche Korrespondenz mit Prof. K. Brandenburg, Forschungszentrum Borstel, Leibniz Zentrum für Medizin und Biowissenschaften).

Daneben hat Peptid 19.2-5 ebenfalls ein breites Spektrum anti-viraler Aktivität. In Zellversuchen inhibiert Peptid 19.2-5 den Eintritt des Humanen Immundefizienz Viruses 1 (HIV-1), des Herpes simplex Viruses 1 und 2 (HSV-1, HSV-2) und des Hepatitis B und C Viruses (Krepstakies et al. 2012).

In Versuchen, die der vorliegenden Arbeit vorangingen, konnte in einem murinen Sepsismodell gezeigt werden, dass unter intravenöser Applikation von Peptid 19.2-5 die Inflammation gehemmt und damit die Schwere der Sepsis limitiert wird (Döming et al. 2011).

Tabelle 1.2: Peptid 19.2-5

Peptid	Peptid-Sequenz	Molekulargewicht
Peptid 19.2-5	GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG	2771 kDa

1.3 Glykokalyx des Endothels

Dem Endothel obliegt, sowohl physiologisch in der erfolgreichen Infektabwehr einerseits als auch pathophysiologisch in der persistierenden und sich ausbreitenden Infektion andererseits, eine maßgebliche Funktion. Es bedeckt als einschichtige Barriere zwischen Gewebe und Blut eine Fläche von über 1000 m² (Jaffe 1987). Die endotheliale Glykokalyx wurde bereits vor über 70 Jahren beschrieben (Danielli 1940). Heute ist bekannt, dass diese kohlehydratreiche Schicht an der luminalen Seite des vaskulären Endothels mit gebundenen Plasmaproteinen eine Oberflächenschicht (“endothelial surface layer”) bildet, die mit etwa 1 µm die Dicke der eigentlichen Endothelzellen meist überschreitet (Pries und Kuebler 2006). Als Zuckerstruktur beinhaltet sie negativ geladene Proteoglykane, Glykoproteine und Glycosaminoglykane (Jackson et al. 1991, Noble et al. 2008, Reitsma et al. 2007).

Die Hauptvertreter dieser endothelialen Proteoglykane sind Heparansulfat-Proteoglykane, Chondroitinsulfat-Proteoglykane sowie Hyaluronane. Diese werden durch das Endothel gebildet und bauen eine basale Endothelschicht auf. Daneben tragen lösliche Moleküle endothelialer oder plasmatischer Herkunft zum Bau eines weiteren Teils der Glykokalyx bei. Durch diese löslichen Komponenten entstehen Kommunikationen unter den Proteoglykanen. Es resultiert ein dem Umbau fortwährend unterliegendes Netzwerk, das eine ständige Änderung der Dicke und Zusammensetzung der Glykokalyx bedingt (Lipowsky 2005, Raman et al. 2005). Die in Abbildung 1.4 zusammenfassend dargestellten Funktionen dieser endothelialen Glykolipidschicht sind vielfältig und hauptsächlich durch die Lage zwischen Blut und Gewebe bestimmt:

- (1) *Permeabilität*: Die Glykokalyx stellt eine Diffusionsbarriere für Plasmamoleküle dar und ist somit maßgeblich an der Regulierung der vaskulären Permeabilität beteiligt (Henry und Duling 1999, Reitsma et al. 2007).
- (2) *Adhäsion*: Durch ihre negative Ladung verhindert die Glykokalyx eine direkte Interaktion geladener Plasmaproteine mit der endothelialen Oberfläche. Erst nach modulierender Degradation der “isolierenden” endothelialen Glykokalyx werden die

Oberflächen der Endothelzellen zugänglich, wodurch Adhäsionsmoleküle (interzelluläre Adhäsionsmoleküle (ICAM) und vaskuläre Adhäsionsmoleküle (VCAM)) frei werden und mit Bestandteilen des Blutes in Kontakt treten können. Somit ist die Glykokalyx wesentlich an der Regulierung der Transmigration leukozytärer Zellen beteiligt (Reitsma et al. 2007).

(3) *Blutgerinnung*: Die Glykokalyx beinhaltet anti-thrombotische Oberflächenmoleküle (Antithrombin III), die pro-koagulatorische Proteine wie Thrombin oder Faktor Xa hemmen. Daneben kommt es nach Bindung von Heparansulfaten an Antithrombin III zur Freisetzung von Prostaglandin I₂, was eine potente Inhibierung der Plättchen-Aggregation bedingt (Mammen 1998). Die Glykokalyx nimmt somit eine wichtige Bedeutung für die Steuerung vasoprotektiver und thrombotischer Prozesse ein (Reitsma et al. 2007).

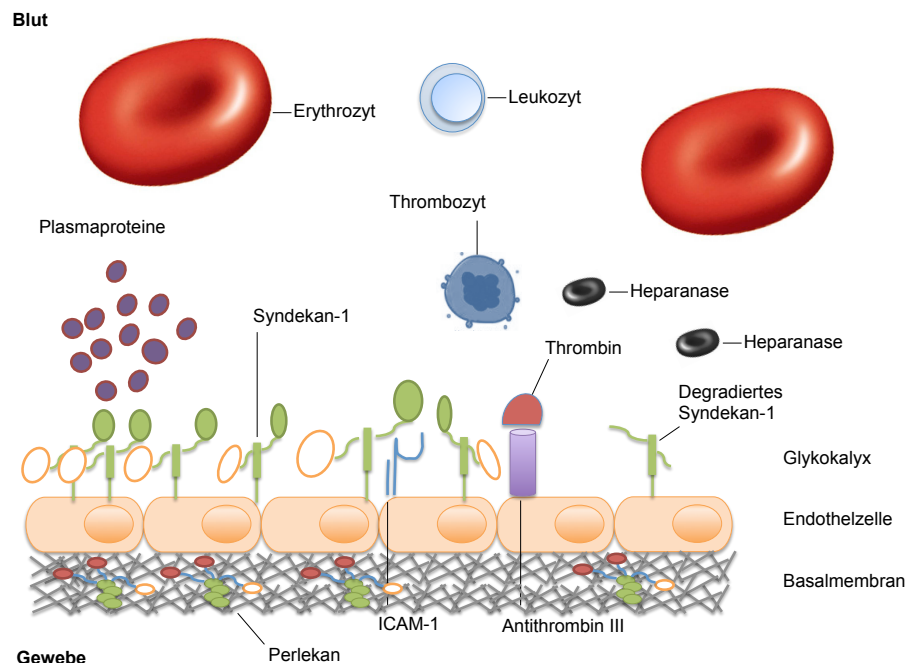


Abbildung 1.4: Die endotheliale Glykokalyx und ihre physiologischen Funktionen: Diffusionsbarriere für Plasmaproteine durch Basalmembran assoziierte Heparansulfat-Proteoglykane (Perlekan), Inhibition pro-koagulatorischer Proteine (Thrombin) durch Antithrombin III, Modulation von interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAM-1).

1.3.1 Heparansulfat-Proteoglykane

Proteoglykane bilden eine heterogene Gruppe von Proteinen, die durch unverzweigte Disaccharideinheiten (Glykosaminoglykane) modifiziert sind und als Zelloberflächen- und Extrazellulär-Matrix-Proteine ubiquitär vorkommen (siehe Abbildung 1.5). Je nach Struktur der Glykosaminoglykane (GAG) unterscheidet man verschiedene Gruppen: Chondroitinsulfat-Proteoglykane, Keratansulfat-Proteoglykane, Dermatansulfat-Proteoglykane und die Gruppe der Heparansulfat-Proteoglykane (HSPG) (Li und Vlodavsky 2009).

Heparansulfat-Proteoglykane werden weiter in fünf Klassen eingeteilt. Man unterscheidet HSPG, die auf Zelloberflächen exprimiert werden, zu denen die vier Gruppen der Syndekane (Syndekan 1-4) sowie die 6 Gruppen der Glypikane (Glypikan 1-6) zählen, von HSPG der extrazellulären Matrix (EZM), zu denen Perlekan, Agrin und Typ XVIII Kollagene gehören (Li und Vlodavsky 2009, Rops et al. 2004).

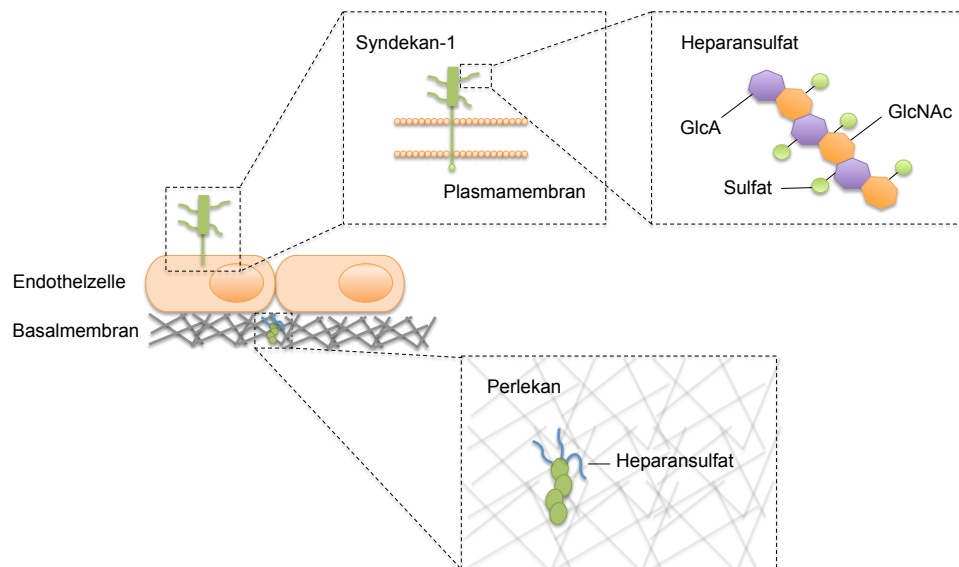


Abbildung 1.5: Syndekan-1, Perlekan und die Grundstruktur der Heparansulfate. Die Grundstruktur der Heparansulfate bilden β 1,4- und α 1,4-glykosidisch verbundene Glukuronsäuren (GlcA) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc). Die hohe Flexibilität ihrer Konformation resultiert aus Modifikationen dieser Struktur (O-Sulfatierung, N-Deacetylierung und N-Acetylierung). (Modifiziert nach Parish 2006).

1.3.2 Heparanase

Heparanasen (Endoglykosidasen) sind universelle Modulatoren der Heparansulfate und liegen als inaktive Pro-Heparanasen vor. 1999 gelingt die Klonierung der menschlichen Heparanase (Heparanase-1) aus Plazentagewebe (Vlodavsky et al. 1999). Im weiteren Verlauf der Arbeit wird zur vereinfachten Lesbarkeit Heparanase als Synonym der Heparanase-1 verwendet. Die Heparanase wird in Anwesenheit pro-inflammatorischer Zytokine sowohl aus Endothelzellen als auch aus Leukozyten und Thrombozyten freigesetzt und durch intrazelluläre Prozesse mittels Proteasen (Cathepsin-L) in ihre aktive Form überführt (Bartlett et al. 1995, Parish 2006).

Die Heparanase ist neben der Inflammation an Prozessen der Tumordinvasion und Metastasierung beteiligt (Li und Vlodavsky 2009). Eine Hochregulierung der Heparanase ist in autoimmunen inflammatorischen Prozessen beschrieben (Vlodavsky et al. 2011). In einem experimentellen Modell der “delayed type hypersensitivity” (Hypersensibilität Typ IV) in der Maus wird eine lokale Erhöhung der Heparanase-Expression in der Inflammation am Endothel festgestellt (Edovitsky 2006). Des Weiteren zeigt sich bei Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen (Waterman et al. 2007) sowie in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Rheumatischer Arthritis (Li et al. 2008) eine Erhöhung der Heparanase-Expression.

Eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie der Sepsis ist die Hypovolämie, bedingt durch eine erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität. Die Akkumulation von Gewebs- und interstitieller Flüssigkeit verschlechtert die Organfunktion durch Erhöhung der Diffusionstrecke für Sauerstoff und geht mit erhöhter Mortalität einher (Lee und Slutsky 2010). Die Heparanase induziert ein Kapillar-Leck durch die Degradation Zelloberflächen assoziierter HSPG (Syndekan-1) und erhöht somit die vaskuläre Permeabilität (Edovitsky 2006). Durch die Degradation von HSPG erleichtert die Heparanase die Transmigration leukozytärer Zellen in das Interstitium und fördert dadurch die pro-inflammatorische Kaskade (Edovitsky 2006).

Die Heparanase hat einen pro-thrombotischen Effekt durch die Runterregulierung von Antithrombin, was ebenfalls das Multiorganversagen in der Sepsis beeinflusst (Brudać und Cucuianu 2010). Des Weiteren gibt es in der Literatur Hinweise, dass die Heparanase in der Lage ist, Heparansulfat-Fragmente durch ihre degradierende enzymatische Aktivität zu generieren, die eine direkte Stimulation des TLR-4 und eine nachgeschaltete pro-inflammatorische Kaskade induzieren (Johnson et al. 2004).

Zusammenfassend ist somit festzuhalten, dass die Heparanase im Rahmen ihrer degradierenden Eigenschaften von Heparansulfaten an entscheidenden pathologischen Prozessen, die während der Sepsis vorherrschen, beteiligt ist.

1.3.3 Syndekan-1

Die Familie der Syndekane umfasst bei Säugetieren vier Mitglieder: Syndekan-1, Syndekan-2 (Fibroglykan), Syndekan-3 (N-Syndekan) und Syndekan-4 (Ryodukan). Alle Syndekane besitzen als transmembranäre HSPG ein Kernprotein mit einer membrandurchspannenden Domäne, einer kurzen zytoplasmatischen Domäne sowie einer extrazellulären Domäne. An das Kernprotein sind eine oder mehrere Heparansulfat-Seitenketten angeheftet (Rapraeger und Bernfield 1985, Rapraeger et al. 1985).

Syndekane kommen auf nahezu allen Zelltypen vor. Die vier Mitglieder weisen jedoch ein charakteristisches Expressionsausmaß auf. Syndekan-1 ist das vorherrschende Syndekan der Endothelzellen, Makrophagen und Plasmazellen, während Syndekan-2 das der Fibroblasten, Neuronalzellen und ebenfalls der Makrophagen ist. Die Expression von Syndekan-3 ist fast ausschließlich auf Neuronalzellen beschränkt, während Syndekan-4 ubiquitär auf Epithelien, Fibroblasten, Fettzellen und Neuronalzellen vorkommt (Parish 2006).

Syndekan-1 bindet, aktiviert, inhibiert und moduliert viele Mediatoren. Folgend werden die maßgeblichen Funktionen von Syndekan-1 in inflammatorischen Prozessen erläutert (Bartlett et al. 2007, Teng et al. 2012):

(1) *Hemmung leukozytär-vermittelter Inflammation*: Diverse experimentelle Arbeiten mit Veränderung der Syndekan-1-Expression belegen, dass Syndekan-1 die verschiedenen Schritte der Rekrutierung und Transmigration leukozytärer Zellen in der Inflammation hemmend reguliert (siehe Abbildung 1.6). Ursächlich hierfür scheint eine Hemmung der Interaktion zwischen leukozytärer Selektine (L-Selektin) und endothelialer Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1) durch Heparansulfat-Seitenketten von Syndekan-1 zu sein (Teng et al. 2012).

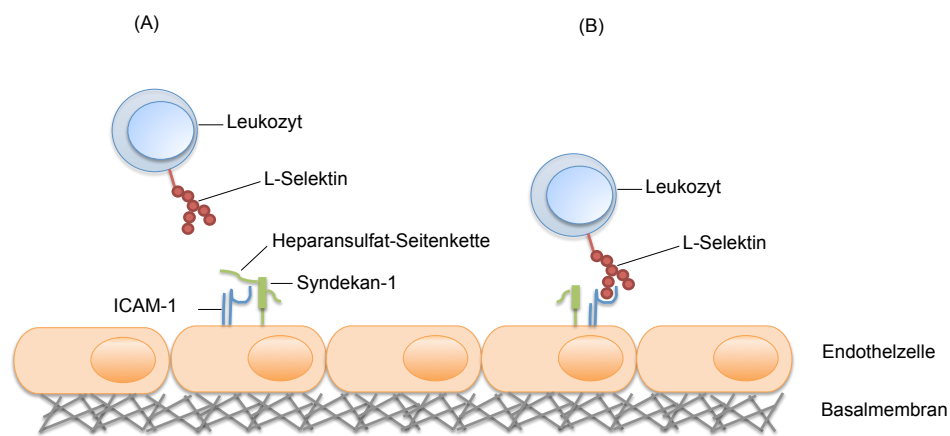


Abbildung 1.6: Hemmung der leukozytären Transmigration durch Syndekan-1. (A) Syndekan-1 hemmt die Interaktion zwischen L-Selektin und dem interzellulären Adhäsionsmolekül (ICAM-1) auf Endothelzellen. (B) Nach Degradation von Syndekan-1 kommt es zu einer Interaktion von L-Selektin und ICAM-1.

In mehreren Tiermodellen mit Syndekan-1 defizienten Mäusen (SDC $-/-$) konnte in der experimentellen Kontaktdermatitis (Kharabi Masouleh et al. 2009), der experimentellen Kolitis (Floer et al. 2010) und im okulären vaskulären System (Gotte et al. 2002) eine vermehrte Rekrutierung und Transmigration leukozytärer Zellen in SDC $-/-$ Mäusen, verglichen mit Mäusen vom Wildtyp, festgestellt werden. Eine erhöhte Transmigration von Leukozyten ist ebenfalls im experimentellen Myokardinfarkt bei SDC $-/-$ Mäusen beschrieben (Vanhoutte et al. 2007). Neben der gesteigerten Adhäsion und Transmigration von Leukozyten bei SDC $-/-$ Mäusen korreliert in einem experimentellen Modell von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ein

Anstieg des interzellulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und des vaskulären Adhäsionsmolekül VCAM-1 mit der Defizienz von Syndekan-1 (Day und Forbes 1999). Diese Ergebnisse belegen, dass eine wichtige anti-inflammatorische Funktion von Syndekan-1 in der negativen Regulierung der Adhäsion und Transmigration leukozytärer Zellen besteht.

(2) *Inhibierung von Zytokinen*: Eine weitere komplexe Funktion von Syndekan-1 in inflammatorischen Prozessen besteht in der Regulierung der Expression und Aktivität von Zytokinen. Nach Exposition von Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) zeigen SDC -/- Mäuse durch erhöhte Spiegel pro-inflammatorischer Zytokine neben einem erhöhten Leberschaden und einer erhöhten vaskulären Permeabilität eine erhöhte Mortalität, verglichen mit Wildtyp-Mäusen (Hayashida et al. 2008). In der Literatur gibt es Hinweise darauf, dass Syndekan-1 mit seinen Heparansulfat-Ketten pro-inflammatorische Interferone (IFN- α) bindet und hemmt und somit überschießende inflammatorische Reaktionen wie die Sepsis limitiert (Fritchley et al. 2000, Sarrazin et al. 2005, Hayashida et al. 2008, Teng et al. 2012).

(3) *Vaskuläre Barriere*: Syndekan-1 ist mit seinen negativ geladenen Heparansulfaten, als einer der Hauptbestandteile der Glykokalyx, an der Barrierefunktion des vaskulären Endothels und des intestinalen Epithels maßgeblich beteiligt (siehe Abbildung 1.7) (Henrich et al. 2010). Während der Sepsis kommt es zu einer Elevation von Syndekan-1-Produkten im Plasma (Nelson et al. 2008, Park et al. 2004), was auf ein Abspalten von Heparansulfaten von endotheliale Syndekan-1 schließen lässt. Dieses als „shedding“ bezeichnete Phänomen von Syndekan-1 trägt zu der Entstehung eines endothelialen Barrierschadens bei (Henrich et al. 2010). Ein Funktionsverlust von Syndekan-1 an der basolateralen Oberfläche intestinaler Zellen ist des Weiteren mit einer Aggravierung des intestinalen Eiweißverlustsyndroms (protein losing enteropathy) assoziiert (Bode et al. 2008). Diese Arbeiten beschreiben die dritte wichtige Funktion von Syndekan-1 als „Wächter“ der endothelialen Barrierefunktion im septischen Geschehen.

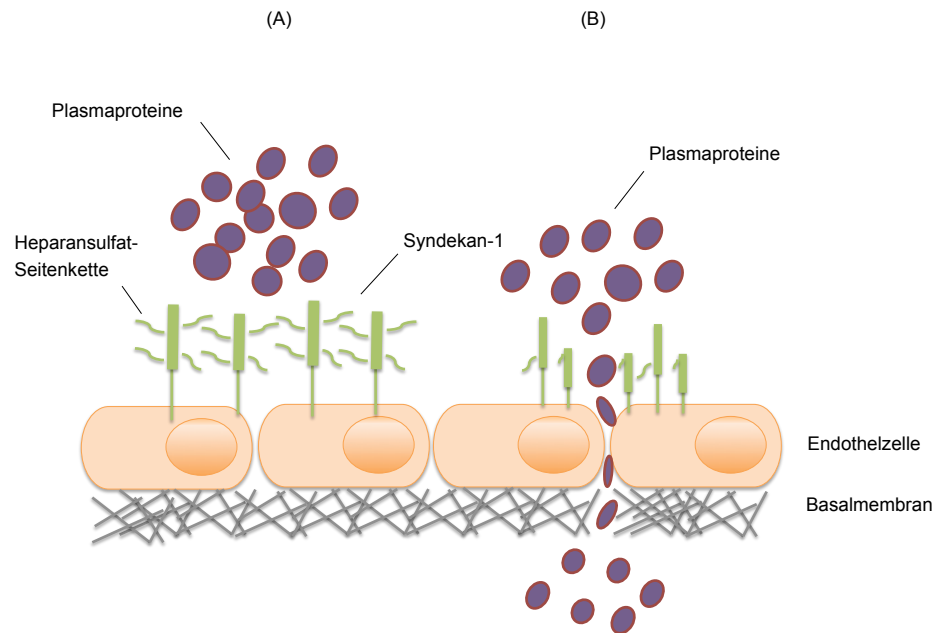


Abbildung 1.7: Vaskuläre Barrierefunktion von Syndekan-1. (A) Negativ geladene Heparansulfate, gebunden an Syndekan-1, bilden eine Barriere für Plasmaproteine. (B) Nach Degradation der Heparansulfate resultiert eine reduzierte Barrierefunktion, und Plasmaproteine passieren die endotheliale Barriere.

1.3.4 Perlekan

Perlekan ist ubiquitär in der extrazellulären Matrix exprimiert. Im vaskulären System ist es in der subendothelialen Basalmembran (Iozzo 2005) und in der Niere in der glomerulären Basalmembran (Rops et al. 2004) lokalisiert. Wie Syndekan-1 ist auch Perlekan mit komplexen Funktionen an der Pathophysiologie der Sepsis beteiligt (Parish 2006):

(1) *Vaskuläre Barrierefunktion*: Eine partizipierende Rolle in der Entstehung des kapillären Barrierschadens nimmt die Degradation Basalmembran assoziierter HSPG (Perlekan) durch die Heparanase ein. Ein „shedding“ von Perlekan führt zu einer Auflockerung vernetzter subendothelialer Matrixmoleküle, die sich in einer Reduktion der Barrierefunktion manifestiert (siehe Abbildung 1.8) (Edovitsky 2006). Des Weiteren verhindern Heparansulfat-Seitenketten durch ihre negative Ladung den

Übertritt von Plasma und Proteinen aus dem Intravasalraum in das Interstitium. Durch Degradation dieser Seitenketten geht diese Eigenschaft in der Inflammation verloren. Die Degradation des Basalmembran assoziierten HSPG Perlekan stellt somit einen der ersten Schritte in der Entstehung des Kapillarlecks mit resultierender interstitieller Ödembildung während der Sepsis dar (Henry und Duling 1999, Squire et al. 2001), die mit erhöhter Mortalität einhergeht (Marechal et al. 2008).

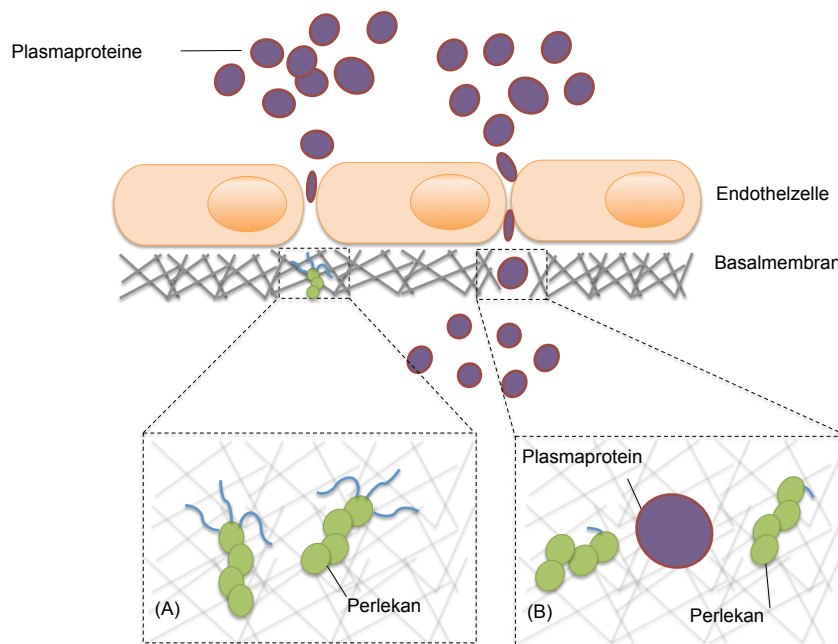


Abbildung 1.8: Barrierefunktion von Perlekan. (A) Perlekan verhindert die Migration von Plasmaproteinen. (B) Die Degradation von Heparansulfaten, gebunden an Perlekan, ermöglicht die Passage.

(2) *Transzytose von Chemokinen*: Perlekan vermittelt durch die Lokalisation in der subendothelialen Basalmembran die Präsentation und Transzytose von Chemokinen in abluminal-luminaler Richtung (siehe Abbildung 1.9). Interstitiell lokalisierte Makrophagen produzieren Chemokine, die von Perlekan-Seitenketten gebunden und transendothelial transportiert werden (Parish 2006). Diese Funktion beschreibt eine pro-inflammatorische Bedeutung von Perlekan in der Inflammation.

(3) *Transmigration von Leukozyten*: Die Degradation von Perlekan erleichtert die Diapedese leukozytärer Zellen aus dem Intravasalraum durch die subendotheliale Membran in das Interstitium (siehe Abbildung 1.9) (Butcher 1991, Parish 2006, Schenkel et al. 2004). Dies beschreibt die barrierebildende Funktion für Leukozyten als weitere anti-inflammatorische Wirkung von Perlekan (Iozzo 2005).

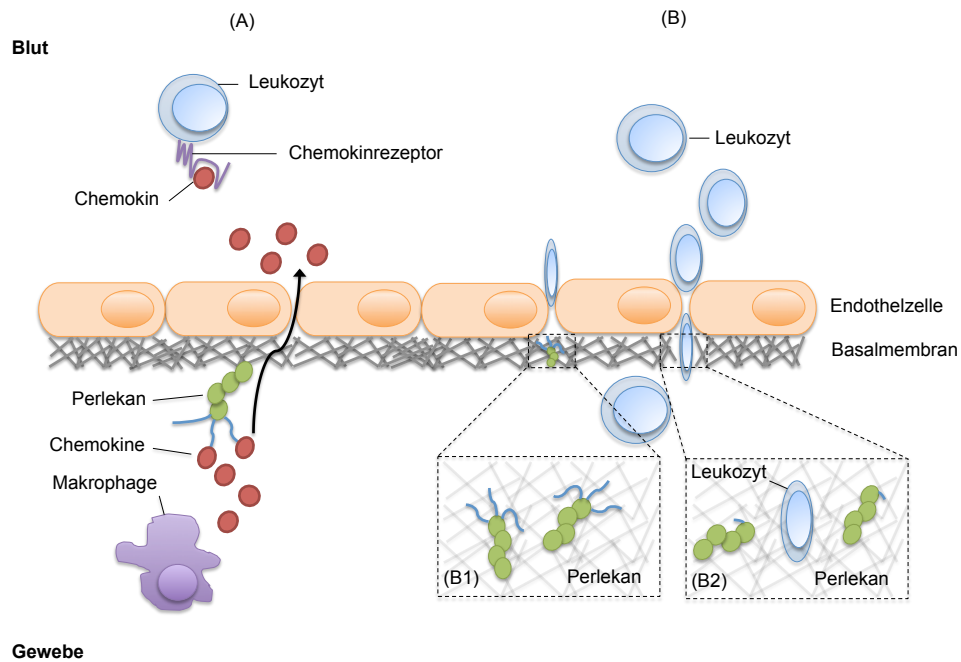


Abbildung 1.9: (A) Transzytose von Chemokinen. Perlekan ermöglicht die Transzytose von Chemokinen in abluminal-luminaler Richtung. (B) Transmigration leukozytärer Zellen. (B1) Perlekan verhindert die Migration von Leukozyten durch die subendotheliale Membran. (B2) Degradation von Heparansulfat-Seitenketten an Perlekan ermöglicht es Leukozyten, die subendotheliale Membran zu passieren.

2 Zielsetzung

Peptid 19.2-5 zeigt eine anti-inflammatorische Wirkung gegen unterschiedliche Erregergruppen (Viren, Pilze, Gram-positive und Gram-negative Bakterien) und kann die Schwere der Sepsis nach intravenöser Applikation im murinen Sepsismodell limitieren. Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan nehmen wichtige modulierende Funktionen in der Inflammation ein. Ihre Regulierung in der polymikrobiellen Sepsis in mehreren Organen ist bisher nicht untersucht, jedoch liefert die Literatur Hinweise auf deren Bedeutung im pathophysiologischen Prozess der Sepsis. Ziel dieser Arbeit ist es daher, die Regulierung der Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan während der Sepsis ohne spezifische Behandlung und unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 in der Lunge, der Leber, der Milz, im Herz und in der Niere zu untersuchen. Konkret stellen sich dabei folgende Teilfragen:

1. Sind die Genexpressionen von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in den untersuchten Organen während der Sepsis reguliert?
2. Hat die systemische Applikation von Peptid 19.2-5 einen Einfluss auf die Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in der Sepsis und wird diese im Sinne einer möglichen Inflammationshemmung verändert?
3. Unterscheidet sich der Einfluss von Peptid 19.2-5 zu dem von Polymyxin B auf die Regulierung der Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in der Sepsis?
4. Kommt es unter der systemischen Applikation von Peptid 19.2-5 parallel zur Veränderung der Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan auch zu einer Suppression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im Sinne einer Inflammationshemmung?

3 Material und Methoden

Nach Genehmigung durch das zuständige Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (Aktenzeichen 8.87-50.10.35.09.044) erfolgten die experimentellen Versuche zu dieser Arbeit an Mäusen des Stammes Naval Medical Research Institute (NMRI). Dabei gliederte sich die Durchführung in *vier* Teile.

Teil 1: Implantation eines zentralvenösen Katheters sowie einer arteriellen Messeinheit für weitere Untersuchungen

Teil 2: Induktion der Sepsis (Coekale Ligatur und Punktion «CLP») und Medikamentenapplikation

Teil 3: Entnahme und Aufbereitung von Organ- und Blutproben

Teil 4: Messung der Genexpression in den Organen von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan sowie der Zytokinspiegel im Plasma

3.1 Randomisierung der Tiere in vier Gruppen

Während der Versuchsvorbereitungen wurden 40 männliche NMRI-Mäuse in vier Gruppen randomisiert, die in Tabelle 3.1 dargestellt sind.

Gruppe 1 (*Peptid-Gruppe*) bildeten die Tiere, die das zu untersuchende Peptid 19-2.5 erhielten.

Gruppe 2 (*Polymyxin B-Gruppe*), der Vergleichsgruppe, wurde Polymyxin B verabreicht. Es gilt in der experimentellen Sepsis als Gold-Standard unter den antimikrobiellen Peptiden (Cirioni et al. 2006) und wird deshalb bei diesem Versuch als Vergleich zur Therapie mit Peptid 19.2-5 eingesetzt.

Gruppe 3 (*Sham-Gruppe*) bildeten die sham-operierten Tiere, die für die spätere

Auswertung die Referenzgruppe darstellten. Bei diesen erfolgte der operative Eingriff ohne Induktion einer Sepsis und ohne anschließende medikamentöse Behandlung.

Gruppe 4 (*Sepsis-Kontrollgruppe*) bildeten Tiere, bei denen der operative Eingriff durchgeführt und eine Sepsis induziert wurde, jedoch keine spezifische Behandlung mit einem Medikament stattfand.

Tabelle 3.1: Gruppen Sepsismodell

Gruppe	Operation	Infusion
Peptid 19.2-5	Sepsisinduktion durch CLP	Trägerlösung (NaCl 0,9%) + 0,2 $\mu\text{g/h}$ Peptid 19.2-5
Polymyxin B	Sepsisinduktion durch CLP	Trägerlösung (NaCl 0,9%) + 0,12 $\mu\text{g/h}$ Polymyxin B
Sham	OP ohne Induktion einer Sepsis	Trägerlösung (NaCl 0,9%)
Kontrolle	Sepsisinduktion durch CLP	Trägerlösung (NaCl 0,9%)

3.2 Teil 1: Implantation des zentralvenösen Katheters

Im ersten Teil des Versuchs wurde den Tieren ein zentralvenöser Katheter und für weitere Untersuchungen eine arterielle Messeinheit implantiert. Nach Einleitung einer Inhalationsnarkose mit Isofluran (1-3 Vol%, FiO_2 von 0,3) sowie einer Lokalanästhesie mittels 0,2 ml Lidocain 2% (Astra Zeneca, Wedel, Deutschland) erfolgte die Präparation des lateralen Halsdreiecks unter sterilen Bedingungen. Nach Freilegung und Katheterisierung der linken Vena jugularis wurde ein zentralvenöser Katheter zur kontinuierlichen Flüssigkeits- und Medikamentenapplikation implantiert. Hierbei wurde ein Plastikschauch (selbst hergestellt aus sterilisiertem Polyethylenschlauch, Durchmesser 0,61 mm) unter der Haut vom Hals zum Rücken und dann durch die Haut nach außen geleitet. Die eigentliche Drainage (flexibler Plastikschauch, Drai-

nobag 40, B.Braun, Melsungen, Deutschland) umgab den Katheter und diente damit als Beißschutz. Abschließend erfolgte der sorgfältige Wundverschluss. Des Weiteren wurde die ipsilaterale Arteria carotis freigelegt und durch Kanülierung eine Sonde (PA-C10, St. Paul, MN, USA) zur späteren Messung der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Blutdrucks implantiert. Die verbundene Messeinheit wurde abdominell subkutan platziert. Auf den chirurgischen Eingriff folgte eine erneute Lokalanästhesie und eine Ruhephase von 48 Stunden, in der eine kontinuierliche Volumensubstitution von 0,1 ml/h Natriumchlorid (NaCl) 0,9% stattfand.

3.3 Teil 2: Sepsisinduktion und Medikamentenapplikation

Im zweiten Teil des Versuchs erfolgte die Medikamentenapplikation (Peptid 19.2-5, Polymyxin B oder NaCl 0,9%) nach Induktion der Sepsis. Diese wurde durch das Verfahren der Coekalen Ligatur und Punktion (CLP) induziert. Das CLP-Modell stellt ein bereits seit über 30 Jahren etabliertes Modell zur Induktion enterogener abdominalen Infektionen an Nagetieren dar (Wichterman et al. 1980).

Hierfür wurde wiederum eine Allgemeinanästhesie mit Isofluran (1-3 Vol%, FiO₂ von 0,3)) eingeleitet. Nach medianer Laparatomie wurde vorsichtig das Zökum aufgesucht und unter Erhaltung eines geringen Restlumens ligiert. Anschließend folgte die einfache Punktion mittels einer 18G-Kanüle (CLP-Modell) und die Protusion einer geringen Menge Faeces, bevor das Zökum sorgfältig wieder zurückverlagert wurde. Der Wundverschluss und eine lokale Infiltration mit Xylocain 2% zur Schmerztherapie beendete den operativen Eingriff. Es erfolgte eine kontinuierliche Volumensubstitution über den zentralvenösen Katheter mit 100µl/h NaCl 0,9%.

3.4 Teil 3: Gewinnung der Organe und des Blutplasmas

24 Stunden nach Sepsisbeginn erfolgte die Tötung der Tiere und die Entnahme von Blut- und Organproben (Herz, Niere, Leber, Lunge, Milz). Die Organproben wurden unmittelbar nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80 °C gelagert. Die Blutproben wurden nach Entnahme bei 4 °C und 5000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert (Zentrifuge 5402, Eppendorf AG, Hamburg). Der Citrat-Plasma-Überstand wurde abpipettiert und sofort danach bei -80 °C bis zur Messung tiefgefroren.

3.5 Teil 4: Molekularbiologische Untersuchungen

Im abschließenden vierten Teil des Versuchs erfolgte neben der Bestimmung der Plasmaspiegel der Zytokine die molekularbiologischen Untersuchungen zur Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan, die folgend näher erläutert werden.

3.5.1 Bestimmung der Zytokinkonzentration

Die Bestimmung der Zytokinkonzentrationen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Im Rahmen dieses Versuchs wurden die Plasma-Proben mit den enthaltenen Zytokinen mit einem Cytometric Bead Array (BD Biosciences, USA) markiert und im Durchflusszytometer (BD FACScan™ BD Biosciences, USA) mit einer Wellenlänge von 488nm gemessen. Hierbei wurden Konzentrationen der Zytokine IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ und MCP-1 erfasst.

Der Cytometric Bead Array hat sich im Vergleich zum bisherigen Standard, der ELISA-Technik, als gleichwertig erwiesen und besitzt den großen Vorzug, mehrere

Analyten in geringer Menge gleichzeitig testen zu können, was bei begrenzten Probengrößen einen entscheidenden Vorteil darstellt (Young et al. 2008). Dabei werden zu den Plasma-Proben fünf unterschiedliche „Beads“ (7,5 μm große Partikel) gegeben, die spezifisch über Antikörper an die fünf Zytokinpopulationen binden. Ein „Sandwich Immunoassay“ entsteht nach Zugabe des Fluoreszenz-Farbstoffs Phycoerythrin, der quantitativ unterschiedlich an die fünf Bead-Populationen bindet. Dies ermöglicht später eine Unterscheidung der spezifischen fünf Zytokin-Profile am Durchflusszytometer, obwohl nur ein Farbstoff verwendet wird.

Um aus den gemessenen Dot-Plot-Wolken die Zytokin-Konzentrationen errechnen zu können, wurden vom Hersteller bereitgestellte Standards mit bekannten Zytokin-Konzentrationen im Durchflusszytometer gemessen. Aus den entstandenen Standardkurven konnten dann mit der herstellereitigen Software (BD CellQuest™ Pro, Version 5.1.1, BD Biosciences) die Zytokinkonzentrationen in den Proben bestimmt werden.

3.5.2 RNA-Extraktion

Gesamt-Ribonukleinsäure (RNA) wurde aus den zuvor gewonnenen Organproben in Zelllysaten mit dem Kit RNeasy® der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland) nach Herstellerprotokoll isoliert.

Bei dieser Methode handelt es sich um eine spezifische Aufreinigung von Gesamt-RNA durch Bindung dieser an hydrophile Silicanmembran-Säulen. Elutionspuffer ermöglichen dabei das Eluieren der RNA von der Membran.

Der erste Schritt bestand aus dem Lysieren des Gewebes in einem Guanidinisothiocyanat enthaltenden Puffer. Guanidinisothiocyanat denaturiert als chaotropes Salz sämtliche Proteine, inklusive RNAsen, und verhindert somit eine Degradierung der RNA. Nach Zugabe von Ethanol wurde die Lösung auf die Säulen gegeben, nach mehreren Waschschritten eluiert und mit dem entsprechenden Volumen Nuklease-freien Wassers bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.5.3 RNA-Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung nach Größe und Ladung im elektrischen Feld auf einem Agarosegel diente der Qualitätskontrolle der extrahierten RNA-Produkte. Beispielhaft ist in Abbildung 3.1 die Agarosegelelektrophorese der extrahierten RNA aus Herz-Proben und in Abbildung 3.2 die Agarosegelelektrophorese der extrahierten RNA aus Lungen-Proben dargestellt. Hierfür wurde ein 1%iges Agarosegel angefertigt. Die Gel-Herstellung erfolgte durch das Erhitzen von in Tris-Borat-EDTA-Puffer gelöster Agarose. Dieser wurde Gelred™ der Firma Biotium (Hayward, Kalifornien) im Verhältnis 1:10000 zugefügt. Das Gel wurde in Gel-Kammern gegossen, die mit Kämme versehen waren, welche die Taschen für die Proben bildeten. Das Beladen des Gels erfolgte in der Elektrophorese-Kammer. 3 µl RNA wurden mit 8 µl Ladepuffer gemischt. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 V und einer konstanten Stromstärke von 100 mA. Die Sichtbarmachung der GelRed™ gefärbten Banden erfolgte mit Hilfe von "LAS-3000 imaging system" der Firma Fujifilm Life science (Greenwood, USA).

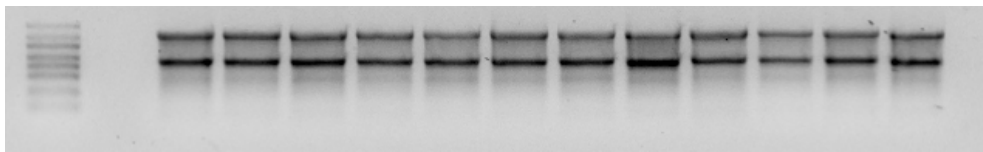


Abbildung 3.1: Agarosegelelektrophorese der extrahierten RNA aus Herz-Proben.

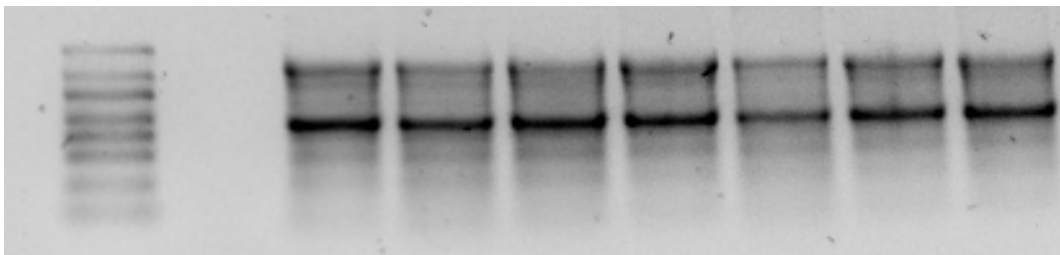


Abbildung 3.2: Agarosegelelektrophorese der extrahierten RNA aus Lungen-Proben.

3.5.4 Photometrische Ermittlung der RNA-Konzentration

Die Ermittlung der Konzentration der gewonnenen RNA erfolgte photometrisch mittels NanoDrop®-2000 der Firma Thermo-Fisher Scientific, (Wilmington, USA). Die

RNA-Konzentration wurde durch eine Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt. Um mögliche RNA-Verunreinigungen auszuschließen, wurde ein Absorptionsquotient A260/A280 gemessen, der für reine RNA zwischen 1,9 - 2,1 liegen sollte.

3.5.5 Reverse Transkriptase (RT)

Das Umschreiben von RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) erfolgte mit dem Reverse Transkription Kit QuantiTec® der Firma Qiagen (Hilden, Deutschland). Im ersten Schritt wurde genomische DNA eliminiert. Hierfür wurde die Ausgangsmenge von 1µg Gesamt-RNA mit 2µl gDNA Wipeout Puffer und RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 14µl gebracht und nach zweiminütiger Inkubation bei 42 °C auf Eis gelagert. Dem Ansatz wurde der Reverse Transkriptase Master Mix hinzugefügt. Dieser beinhaltet 1µl Reverse Transkriptase, 4µl Reverse Transkriptase Puffer (beinhaltet Mg^{2+} und die Nukleosidtriphosphate) und den Reverse Transkriptase Primer Mix (1µl). Nach Mixen erfolgte für 15 Minuten eine Inkubation bei 42 °C sowie eine Erhitzung für 3 Minuten auf 95 °C zur Denaturierung der reversen Transkriptase.

3.5.6 Real-Time-PCR

Die Forschungen zur Polymerasekettenreaktion (PCR) begannen 1985 (Saiki et al. 1985). Seither nimmt die PCR in der molekularbiologischen medizinischen Diagnostik eine Schlüsselrolle ein. Sie stellt ein sensitives molekulargenetisches Nachweisverfahren für die in vitro Vervielfältigung spezifischer Genabschnitte dar. Die quantitative Real-Time PCR dient als Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren, mit der sich selbst minimale Unterschiede in Genexpressionen detektieren lassen. Zyklisch wird die von den Primerpaaren gerahmte Gensequenz amplifiziert. Dies erfolgt unter der Verwendung der vier Desoxyribonukleosidtriphosphate Desoxyadenosintriphosphat (dATP), Desoxycytidintriphosphat (dCTP), Desoxythymidintriphosphat

(dTTP) und Desoxyguanosintriphosphat (dGTP) bei Anwesenheit von Magnesium-Ionen.

Die Amplifikation beinhaltet drei Schritte: Im ersten Schritt werden die Wasserstoffbrückenbindungen der DNA-Doppelstränge einer Probe bei 95 °C getrennt (*Denaturierung*). Nach Senkung der Temperatur unter die Schmelztemperatur der Primer können diese an die für sie spezifische Sequenz binden (*Annealing*). Die Temperatur wird auf das Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase erhöht, die in 3'-Richtung den zweiten Strang elongiert (*Elongation*). Alle neu gebildeten Amplikons dienen in nachfolgenden Zyklen als Matrize, so dass die Zielsequenz (nahezu) exponentiell vervielfältigt wird.

Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgt über die Nutzung eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR[®]-Green), der an die doppelsträngige DNA bindet, wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Die Zunahme der Target-DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus (siehe Abbildung 3.3). Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die geringe Spezifität, da sich der Farbstoff an alle doppelsträngigen DNA-Moleküle anlagert, also auch an Primer-Dimere oder nicht-spezifische PCR-Produkte. Mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse können die verschiedenen PCR-Produkte differenziert werden, da jedes PCR-Produkt aufgrund der Länge und des GC-Gehaltes eine charakteristische Schmelztemperatur aufweist (siehe Abbildung 3.4). Hierfür wird am Ende des PCR-Laufs die Temperatur langsam schrittweise bis auf ca. 95°C erhöht, so dass die DNA-Stränge wieder denaturieren, der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt wird und eine Abnahme der Fluoreszenz registriert werden kann (Bangsow et al. 2002).

3.5.7 Primer - Auswahl und Design

Als Primer werden Oligonukleotide mit einer Länge von 18–30 Basenpaaren bezeichnet, die paarweise zur Amplifikation von DNA als Startpunkt für die DNA-

Polymerase dienen. Die in den Untersuchungen zu dieser Arbeit verwendeten Primerpaare wurden auf der Basis von in der Literatur beschriebenen Sequenzen und nach theoretischen Überlegungen (siehe Abschnitt 1.3) mit Hilfe des Tools Primer-Blast des National Center for Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) entwickelt. Hierbei wurden mehrere Qualitätskriterien berücksichtigt: Zum einen sollte die durchschnittliche Länge bei 16-22 Basenpaaren liegen und zum anderen die Sequenz einen Anteil von 40-60% Guanidin und Cytosin (G + C) besitzen, um eine ausreichende Spezifität der Primer und gleichzeitig gute Bindungseigenschaften zu ermöglichen. Die Schmelztemperatur sollte 55-80 °C betragen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen zu erlauben (Mülhardt 2009). Alle verwandten Primerpaare wurden durch Eurofins MWG GmbH (Ebersberg, Deutschland) hergestellt und nach dem Gen, das sie amplifizieren, benannt. In Tabelle 3.2 sind die Sequenzen der verwandten Primerpaare gelistet. Spalte "Referenz" gibt die Literatur an, die Grundlage der Primerentwicklung darstellte.

Tabelle 3.2: Verwendete Primerpaare. Forward (Fw), Reverse (Rv), Adenin (A), Cytosin (C), Guanin (G), Thymin (T)

Zielgen	Sequenz	Referenz
Syndekan-1 Fw	AGGATGGAAGTGTCAATCAG	(Stanford et al. 2009)
Syndekan-1 Rv	ATCCGGTACAGCATGAAAGC	(Stanford et al. 2009)
Perlekan Fw	GGAGAGTCCTCCATATGCCA	eigenes Design
Perlekan Rv	GGATGGAAGTGTCAAGGAGA	eigenes Design
Heparanase Fw	TTTGCAGCTGGCTTTATGTG	(Berk et al. 2004)
Heparanase Rv	GTCTGGGCCTTTCACCTCTTG	(Berk et al. 2004)
β -Aktin Fw	GCTCTTTTCCTTCCTT	eigenes Design
β -Aktin Rv	CGGATGTGTCAAACACTT	eigenes Design

3.5.8 Durchführung der Real-Time-PCR

Für die Real-Time-PCR wurde das StepOnePlus™ Real-Time-PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und der Power SYBR®-Green Master Mix (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Es wurden jeweils drei Ansätze der gleichen cDNA-Matrize pipettiert. Die Proben wurden randomisiert auf die Platten verteilt. Als endogene Kontrolle diente β -Aktin, da es unter den gegebenen Bedingungen selbst nicht transkriptionell reguliert wird und somit in konstanter Menge vorhanden ist. Als Negativkontrollen wurden Proben ohne cDNA (Leerproben) und ohne Reverse Transkriptase (RT-Proben) verwendet. 10 μ l Gesamtvolumen des Real-Time-PCR-Reaktionsansatzes (siehe Tabelle 3.3) wurden auf eine 96-Well Platte (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) pipettiert. Die Platte wurde anschließend mit einer Folie (Optical Adhesive Cover, Applied Biosystems) abgedeckt und vor dem PCR-Lauf 15 sec bei 1500 rpm zentrifugiert, 5 Sekunden gemischt und anschließend erneut zentrifugiert.

Tabelle 3.3: PCR-Ansatz

5,0 μ l	Power SYBR-Green® Master Mix
0,2 μ l	Forward Primer (10 μ M Verdünnung)
0,2 μ l	Revers Primer (10 μ M Verdünnung)
4,6 μ l	cDNA
10 μ l	Gesamtvolumen

Der methodische Ablauf der PCR wurde wie folgt gewählt: Nach einem initialen Denaturierungsschritt (10 Minuten) bei 95 °C folgten 40 Amplifikationszyklen. Diese beinhalteten jeweils eine Denaturierung bei 95 °C über 30 Sekunden, eine Annealingzeit von 30 Sekunden bei 57 °C und eine Elongation bei 60 °C über 30 Sekunden. Am Ende des letzten PCR-Zyklus erfolgte die abschließende Erstellung einer Schmelzkurve. Dabei wurden die Proben langsam um 3 °C pro Minute von 55 °C auf 95 °C erhitzt (siehe Abbildung 3.4).

3.6 Auswertung der Real-Time-PCR

Die Auswertung der PCR-Ergebnisse erfolgte mit der StepOne™ Software Version 2.2.2 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Während der Real-Time-PCR werden verschiedene Phasen durchlaufen. Ein nachvollziehbarer Zusammenhang zwischen Produktmenge und Templatemenge zeigt sich in der Phase der exponentiellen Amplifikation (Pfaffl et al. 2002, Mülhardt 2009).

Um den Zyklus zu bestimmen, ab dem eine exponentielle Fluoreszenzzunahme und damit eine exponentielle Amplifikation zu messen ist, wurde der Schwellenwert auf ein Fluoreszenzniveau gelegt, das signifikant über der Hintergrund-Fluoreszenz lag (siehe Abbildung 3.3). Die Quantifizierung erfolgte über den threshold cycle (Ct-Wert), der die Anzahl von Zyklen, bei der das Fluoreszenzsignal der neu gebildeten DNA-Stränge ("Reporter-Signal") erstmals diesen Schwellenwert erreicht, beziffert.

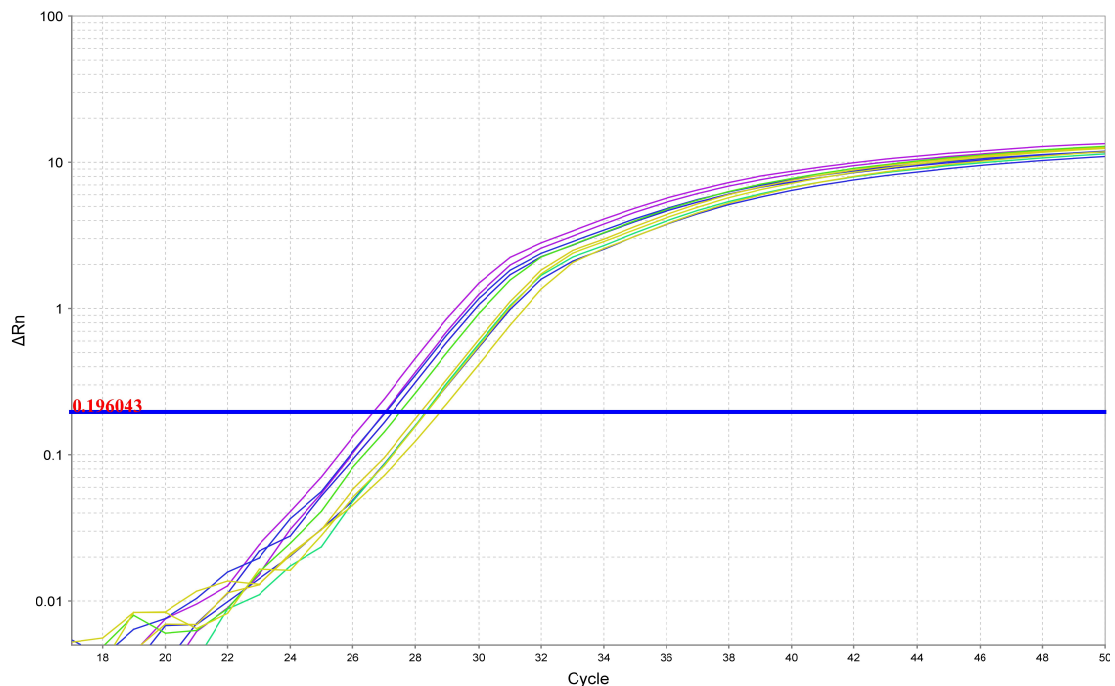


Abbildung 3.3: Exemplarisch dargestellt sind die Fluoreszenzkurven der Amplifikation von Heparanase cDNA in verschiedenen Organen über 40 Amplifikationszyklen. Beginn der exponentiellen Phase am Ct-Wert und Übergang in die Plateau-Phase am Ende der Amplifikation.

Im Rahmen der Schmelzkurvenanalyse wurde kontinuierlich die Fluoreszenzintensität gemessen und mit Hilfe der ersten Ableitung die Fluoreszenzänderung pro Zeitintervall angegeben. Dies diente der Überprüfung der Spezifität der PCR-Reaktion. Da verschiedene PCR-Produkte spezifische Schmelzpunkte aufweisen, ist hiermit eine Differenzierung zwischen den gewünschten spezifischen PCR-Produkten und unspezifischen Nebenprodukten (Primerdimere etc.) möglich.

Abbildung 3.4 stellt exemplarisch die Schmelzkurven für Heparanase in verschiedenen Proben dar. Aufgetragen ist die erste negative Ableitung des Reporter-Farbstoffs SYBR[®]-Green (Derivative Reporter (-Rn')) gegen die Temperatur mit einem einheitlichen Peak bei ca. 77 °C.

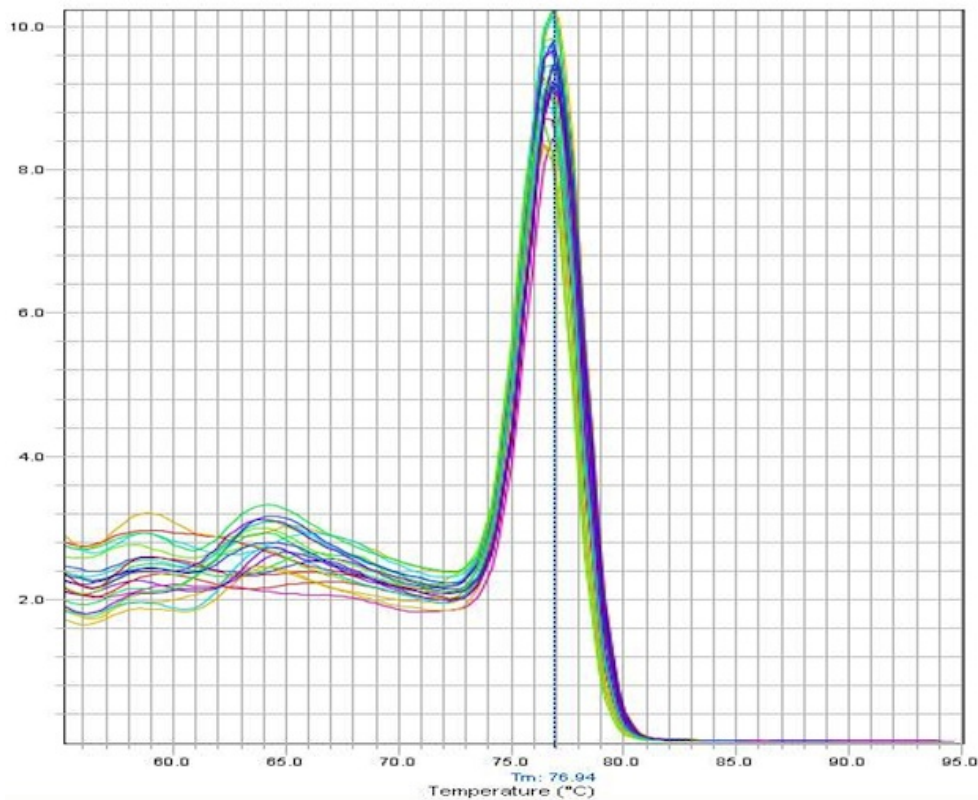


Abbildung 3.4: Schmelzkurvenanalyse von Heparanase unterschiedlicher Proben. Aufgetragen ist die erste negative Ableitung des Reporter-Farbstoffs SYBR[®]-Green (Derivative Reporter (-Rn')) gegen die Temperatur. Der Peak der spezifischen Schmelztemperatur liegt hier bei 77 °C.

3.6.1 Endogene Kontrolle und relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung wurde mit der "Relative Expression Software"(REST-MCS®) durchgeführt (Pfaffl et al. 2002). Als Maß der Expression der Zielgene wurden die gemessenen Ct-Werte herangezogen. Die weitere Berechnung erfolgte über eine relative Quantifizierung.

Hierfür wurde die gemessene Expression der zu untersuchenden Zielgene mit der einer nicht regulierten endogenen Kontrolle („housekeeping-Gen“) normalisiert. In dieser Arbeit wurde hierfür β -Aktin gewählt, da es mit den Zielgenen coexprimiert, jedoch unter den vorherrschenden Versuchsbedingungen selbst nicht transkriptionell verändert wurde. Im ersten Schritt wurde für jede untersuchte Probe der Ct-Wert des Kontrollgens vom Ct-Wert des zu untersuchenden Zielgens subtrahiert.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Kontrollgen}}$$

Nach dieser Normalisierung erfolgte die Relativierung mittels des $\Delta\Delta Ct$ -Modells. Hierbei wurde von dem normalisierten Ct-Wert des Gens in der zu untersuchenden Probe (Tiergruppen Peptid 19.2-5, Polymyxin B, Kontrolle) der normalisierte Ct-Wert des Zielgens in einer Referenzprobe (Sham-Gruppe) subtrahiert.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Zielgen})_{\text{Probe}} - \Delta Ct(\text{Zielgen})_{\text{Referenzprobe}}$$

Um PCR-bedingte Abweichungen der Amplifikationseffizienz zwischen Zielgen und endogener Kontrolle ausgleichen zu können, erfolgte die weitere Berechnung auf der Grundlage des effizienz-korrigierten relativen Quantifizierungsmodells. Hierbei wurden für die Effizienz (E) des Zielgens und der endogenen Kontrolle Eichkurven erstellt und daraus die Steigung (m) berechnet.

$$E = 10^{\frac{-1}{m}}$$

In Abbildung 3.5 sind exemplarisch die Ct-Werte der einzelnen Verdünnungen von Perlekan in der Lunge gegen den dekadischen Logarithmus ihrer jeweiligen cDNA Konzentration über mehrere Verdünnungsstufen aufgetragen. Dabei erhält man eine Gerade, deren Steigung m mittels linearer Regression berechnet werden kann. Diese Steigung steht in direktem Zusammenhang mit der Effizienz (E).

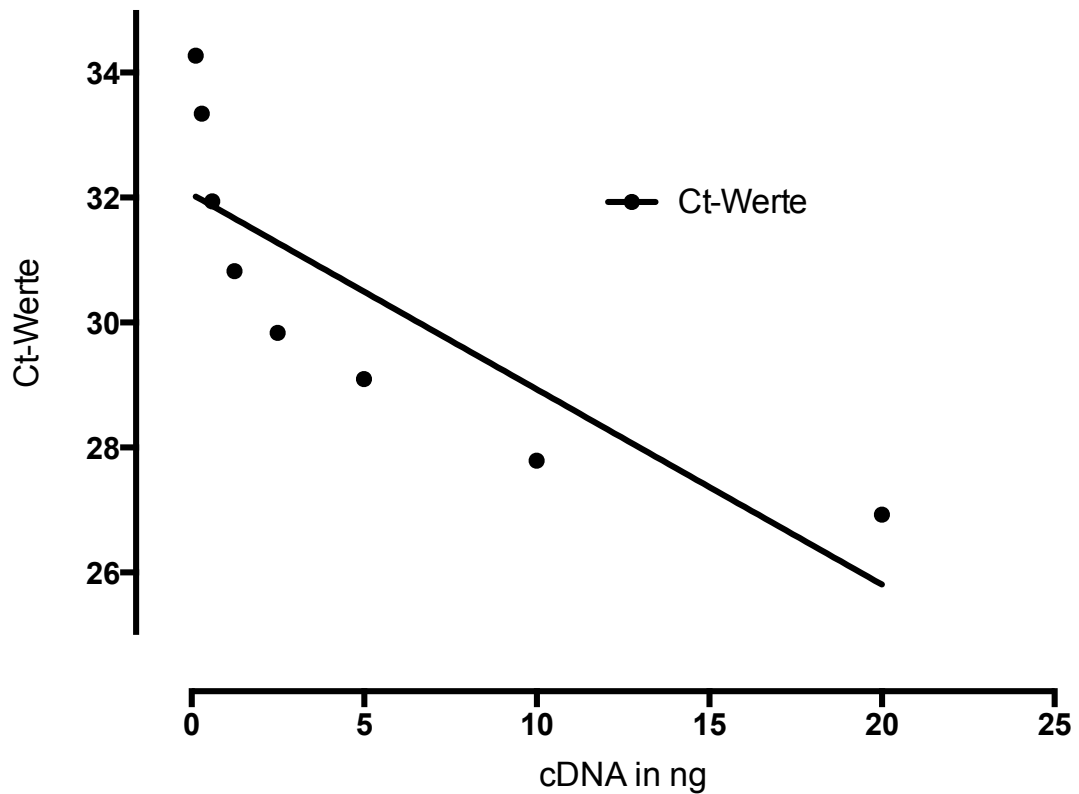


Abbildung 3.5: Dargestellt sind die Ct-Werte der einzelnen Verdünnungen von Perlekan in der Lunge gegen den dekadischen Logarithmus ihrer jeweiligen cDNA Konzentration und die Regressionsgerade.

Tabelle 3.4 zeigt die berechneten Effizienzen der verwendeten Primer in den untersuchten Organen.

Tabelle 3.4: Berechnete Effizienzen der einzelnen Primer in den untersuchten Organen.

	Heparanase	Syndekan-1	Perlekan	β -Aktin
Niere	1,81	1,91	1,86	1,81
Herz	1,98	1,91	1,80	1,95
Lunge	1,93	1,81	1,97	2,0
Milz	1,98	1,87	1,91	1,90
Leber	1,95	1,80	1,93	1,89

Ausgehend vom $\Delta\Delta$ Ct-Modell ergibt sich mittels folgender Formel das relative Expressionsausmaß des Zielgens (Ratio). Das Modell setzt sich dabei aus der Berechnung des Expressionsunterschiedes zwischen der Expression des Zielgens im Proben- gewebe und der Expression des Zielgens im Referenzgewebe im Zähler und zwischen der Expression des Kontrollgens im Probengewebe und der Expression des Kontroll- gens im Referenzgewebe im Nenner zusammen.

$$Ratio = \frac{E(Zielgen)^{\Delta Ct(Zielgen)_{Referenzprobe} - \Delta Ct(Zielgen)_{Probe}}}{E(Kontrollgen)^{\Delta CP(Kontrollgen)_{Referenzprobe} - \Delta Ct(Kontrollgen)_{Probe}}}$$

3.7 Statistik und graphische Darstellung

Zur weiterführenden statistischen Auswertung und zur graphischen Darstellung der Daten wurde die Software GraphPad Prism (GraphPad, Inc., San Diego, CA) und SigmaPlot (SPSS Inc., USA) verwendet. Die Ct-Werte der PCR wurden mittels des “Reallocation randomisation test” (REST-MCS®) (Pfaffl et al. 2002) ausgewertet. Die relativen Expressionen der Zielgene sind als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler dargestellt. Die Zytokinspiegel der Plasmaproben sind als Mittelwerte der jeweiligen Gruppe mit zugehöriger Standardabweichung angegeben. Dabei wurden die Werte der Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe auf statistische Signifikanz mittels des Dunnett-T-Tests geprüft. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Messungen zur mRNA-Expression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan und zu den Zytokinspiegeln beschrieben. Die relativen Expressionen der untersuchten Gene und die Zytokinspiegel der Plasma-proben werden als Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler bzw. Standardabweichung und, falls statistisch signifikant, mit p-Wert im Text angegeben.

4.1 mRNA Expression der Heparanase in den untersuchten Organen

In unseren Untersuchungen kam es bei der Sepsis-Kontrollgruppe, im Vergleich zu den sham-operierten Tieren, in allen untersuchten Organen zu einer Hochregulierung der Heparanase mRNA Expression (siehe Abbildung 4.1). Statistisch signifikant zeigte sich diese in der Niere ($5,7 \pm 1,9$; $p < 0,001$). In der Lunge konnten wir eine Erhöhung der Heparanase mRNA Expression um das 2,2-fache ($\pm 2,2$), in der Leber um das 2,0 fache ($\pm 1,7$), in der Milz um das 1,1-fache ($\pm 0,7$) und im Herz um das 1,3 fache ($\pm 1,5$) messen.

In der Gruppe der Tiere, die mit Peptid 19.2-5 behandelt wurden, kam es, bezogen auf die Sham-Gruppe, zu einer Runterregulierung der Heparanase mRNA Expression in der Lunge ($-2,5 \pm 0,3$) und in der Leber ($-1,2 \pm 0,7$), die jedoch nicht statistisch signifikant war. In der Milz ($-7,5 \pm 0,1$, $p = 0,004$) und im Herz ($-5,7 \pm 0,2$, $p = 0,007$) zeigte sich diese hingegen statistisch signifikant. In der Niere dagegen konnten wir eine statistisch nicht signifikante Erhöhung der Heparanase mRNA Expression um das 1,2 fache ($\pm 0,51$) beobachten. Die relative Expression der Heparanase mRNA unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 unterschied sich statistisch signifikant, mit Ausnahme der Leber, in allen Organen im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe.

Unter der Therapie mit Polymyxin B kam es, im Vergleich zur Sham-Gruppe, zu einer Runterregulierung der Heparanase mRNA Expression in der Lunge ($-2,4 \pm 0,3$), in der Leber ($-1,2 \pm 0,7$) und statistisch signifikant in der Milz ($-13,1 \pm 0,04$, $p < 0,001$) und im Herz ($-24,6 \pm 0,04$, $p < 0,001$). In der Niere ($1,3 \pm 0,5$) hingegen zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Hochregulierung. Des Weiteren unterschied sich die relative Expression der Heparanase mRNA unter der Therapie mit Polymyxin B statistisch signifikant, mit Ausnahme der Niere, in allen Organen im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe.

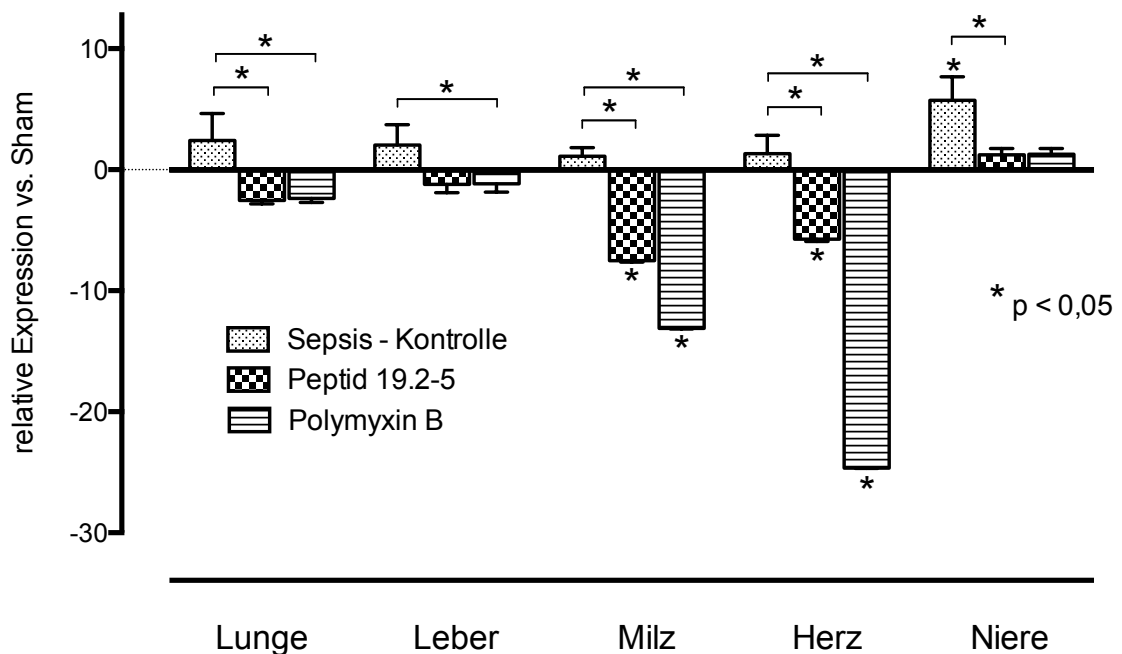


Abbildung 4.1: Relative mRNA Expression von Heparanase bezogen auf die Referenzgruppe der sham-operierten Tiere (operativer Eingriff ohne Sepsisinduktion und ohne Medikamentenapplikation). Angegeben sind die Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler.

Die in Abbildung 4.1 dargestellten relativen Expressionen der Heparanase mRNA zeigen zusammenfassend, dass die Induktion einer Sepsis ohne spezifische Behandlung, im Vergleich zu den sham-operierten Tieren in allen Organen zu einer Hochregulierung der Heparanase mRNA führt (statistisch signifikant in der Niere). Durch die Gabe von Peptid 19.2-5 ergibt sich eine Suppression in der Niere und eine Run-

terregulierung der Heparanase mRNA Expression in Lunge, Leber, Milz, Herz und Lunge (statistisch signifikant in Milz und Herz).

4.2 mRNA Expression von Syndekan-1 in den untersuchten Organen

Die relative mRNA Expression von Syndekan-1 (siehe Abbildung 4.2) zeigte in unseren Untersuchungen, bezogen auf die Gruppe der sham-operierten Tiere, bei der Sepsis-Kontrollgruppe in der Milz ($-2,8 \pm 0,2$), im Herz ($-2,5 \pm 0,6$) und statistisch signifikant in der Lunge ($-20,6 \pm 0,1$, $p = 0,016$) eine Runterregulierung der mRNA Expression von Syndekan-1. In der Leber ($2,9 \pm 3,0$) und in der Niere ($1,4 \pm 0,6$) konnten wir dagegen eine statistisch nicht signifikante Hochregulierung beobachten.

Bei den Tieren, die mit Peptid 19.2-5 behandelt wurden, zeigte sich statistisch signifikant in der Leber ($29,0 \pm 30,2$, $p < 0,001$), statistisch signifikant in der Milz ($8,8 \pm 7,01$, $p = 0,006$) und statistisch signifikant in der Niere ($17,6 \pm 6,1$, $p < 0,001$) eine Hochregulierung der mRNA Expression von Syndekan-1. Auch im Herz ($4,7 \pm 6,8$) konnte eine Erhöhung beobachtet werden, die jedoch statistisch nicht signifikant war. In der Lunge kam es dagegen zu einer statistisch nicht signifikanten Runterregulierung der Syndekan-1 mRNA Expression ($-1,1 \pm 0,5$). Des Weiteren unterschied sich die relative Expression der mRNA von Syndekan-1 unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 statistisch signifikant in allen Organen von der zur Sepsis-Kontrollgruppe.

Die Behandlung mit Polymyxin B führte zu einer statistisch signifikanten Hochregulierung der mRNA Expression von Syndekan-1 in der Leber um das 15-fache ($\pm 14,9$, $p = 0,004$) und in der Niere statistisch signifikant um das 12,9-fache ($\pm 4,2$, $p < 0,001$). In der Milz zeigte sich ebenfalls eine Hochregulierung, die jedoch statistisch nicht signifikant ausfiel ($1,7 \pm 0,9$). In der Lunge ($-2,6 \pm 0,3$) und im Herz ($-3,3 \pm 0,4$) kam es dagegen zu einer statistisch nicht signifikanten Runterre-

gulierung der mRNA Expression von Syndekan-1. Wie auch unter der Therapie mit Peptid 19.2-5, unterschied sich die relative Expression der mRNA von Syndekan-1 unter der Therapie mit Polymyxin B statistisch signifikant in allen Organen von der zur Sepsis-Kontrollgruppe.

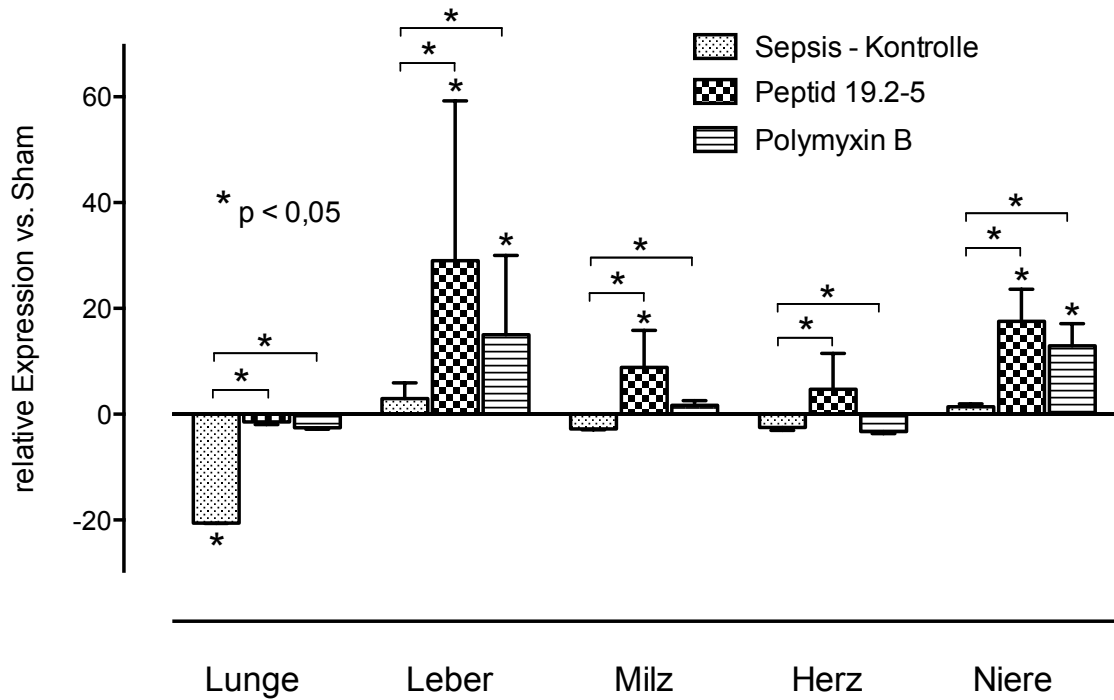


Abbildung 4.2: Relative mRNA Expression von Syndekan-1 bezogen auf die Referenzgruppe der sham-operierten Tiere (operativer Eingriff ohne Sepsisinduktion und ohne Medikamentenapplikation). Angegeben sind die Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler.

Zusammenfassend zeigt sich, wie in Abbildung 4.2 dargestellt, dass es bei der Sepsis-Kontrollgruppe zu einer Runterregulierung der Syndekan-1 mRNA Expression in der Lunge (statistisch signifikant), in der Milz und im Herz kommt. Die Behandlung mit Peptid 19.2-5 führt zu einer reduzierten Suppression von Syndekan-1 in der Sepsis in der Lunge und zu einer Hochregulierung in der Leber, in der Milz, im Herz und in der Niere (statistisch signifikant in Leber, Milz und Niere).

4.3 mRNA Expression von Perlekan in den untersuchten Organen

In unseren Untersuchungen zur mRNA Expression von Perlekan zeigte sich bei der Sepsis-Kontrollgruppe im Vergleich zur Sham-Gruppe eine Runterregulierung in allen untersuchten Organen (siehe Abbildung 4.3). In der Lunge kam es zu einer statistisch signifikanten Runterregulierung um das 26,6-fache ($\pm 0,1$, $p = 0,010$), in der Leber um das 1,8-fache ($\pm 0,4$), in der Milz um das 1,5-fache ($\pm 0,4$), im Herz um das 1,9-fache ($\pm 0,6$) sowie statistisch signifikant in der Niere um das 7,0-fache ($\pm 0,1$, $p < 0,001$).

Unter der Behandlung mit Peptid 19.2-5 kam es, verglichen mit der Gruppe der sham-operierten Tiere, zu einem Anstieg der mRNA Expression von Perlekan in allen untersuchten Organen. Statistisch signifikant zeigte sich dieser in der Leber ($16,0 \pm 12,9$, $p = 0,002$), in der Milz ($15,4 \pm 11,7$, $p < 0,001$) und in der Niere ($3,6 \pm 1,7$, $p = 0,014$). In der Lunge ($1,6 \pm 1,1$) und im Herz ($4,3 \pm 4,9$) kam es ebenfalls zu einer Hochregulierung, die jedoch statistisch nicht signifikant ausfiel. Des Weiteren unterschied sich die relative Expression der mRNA von Perlekan unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 statistisch signifikant in allen Organen im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe.

Die Behandlung mit Polymyxin B führte in der Lunge ($-2,2 \pm 0,3$) und im Herz ($-1,8 \pm 0,5$) zu einer statistisch nicht signifikanten Runterregulierung der mRNA Expression von Perlekan. In der Leber ($3,5 \pm 2,7$), in der Milz ($3,3 \pm 2,2$) und statistisch signifikant in der Niere ($3,4 \pm 1,93$, $p=0,04$) kam es dagegen zu einem Anstieg der mRNA Expression von Perlekan unter der Behandlung mit Polymyxin B. Die relative Expression der mRNA von Perlekan unterschied sich des Weiteren unter der Therapie mit Polymyxin B statistisch signifikant in allen untersuchten Organen von der in der Sepsis-Kontrollgruppe.

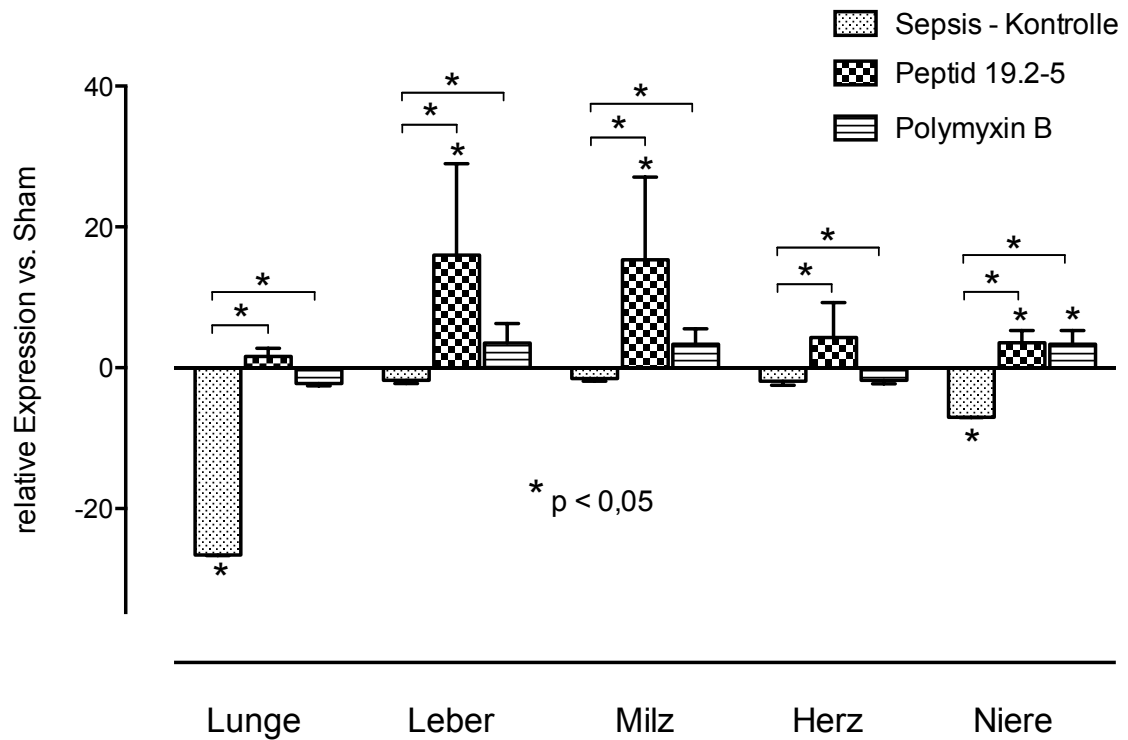


Abbildung 4.3: Relative mRNA Expression von Perlekan bezogen auf die Referenzgruppe der sham-operierten Tiere (operativer Eingriff ohne Sepsisinduktion und ohne Medikamentenapplikation). Angegeben sind die Mittelwerte mit zugehörigem Standardfehler.

Abbildung 4.3 stellt diese Ergebnisse noch einmal systematisch dar. Festzuhalten ist dabei eine Runterregulierung der mRNA Expression von Perlekan in der Sepsis-Kontrollgruppe in allen untersuchten Organen (statistisch signifikant in der Lunge und Niere). Die Behandlung mit Peptid 19.2 5 führt dagegen zu einer Hochregulierung der mRNA Expression von Perlekan in allen untersuchten Organen (statistisch signifikant in Leber, Milz und Niere).

4.4 Zytokinexpressionen im Plasma

In unseren Untersuchungen kam es unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 zu einer statistisch signifikanten Reduktion von Interleukin-6 (IL-6) ($1214,2 \text{ pg/ml} \pm 1237,5 \text{ pg/ml}$) im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe ($8191,3 \text{ pg/ml} \pm 5971,8 \text{ pg/ml}$, $p < 0,001$). Die Gabe von Polymyxin B führte zu einem mittleren IL-6-Wert von $2927,2 \text{ pg/ml} (\pm 3853,6 \text{ pg/ml})$, der im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe statistisch signifikant niedriger war ($p = 0,005$). Des Weiteren zeigte sich in der Gruppe der sham-operierten Tiere ein mittlerer IL-6-Wert von $12,9 \text{ pg/ml} (\pm 11,4 \text{ pg/ml})$, der sich ebenfalls statistisch signifikant von dem der Sepsis-Kontrollgruppe unterschied ($p < 0,001$).

Die in Abbildung 4.4 dargestellten mittleren Werte der Gruppen für IL-6 zeigen, dass sowohl die Behandlung mit Peptid 19.2-5 als auch die Behandlung mit Polymyxin B im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe zu einer statistisch signifikanten Reduktion von IL-6 führt.

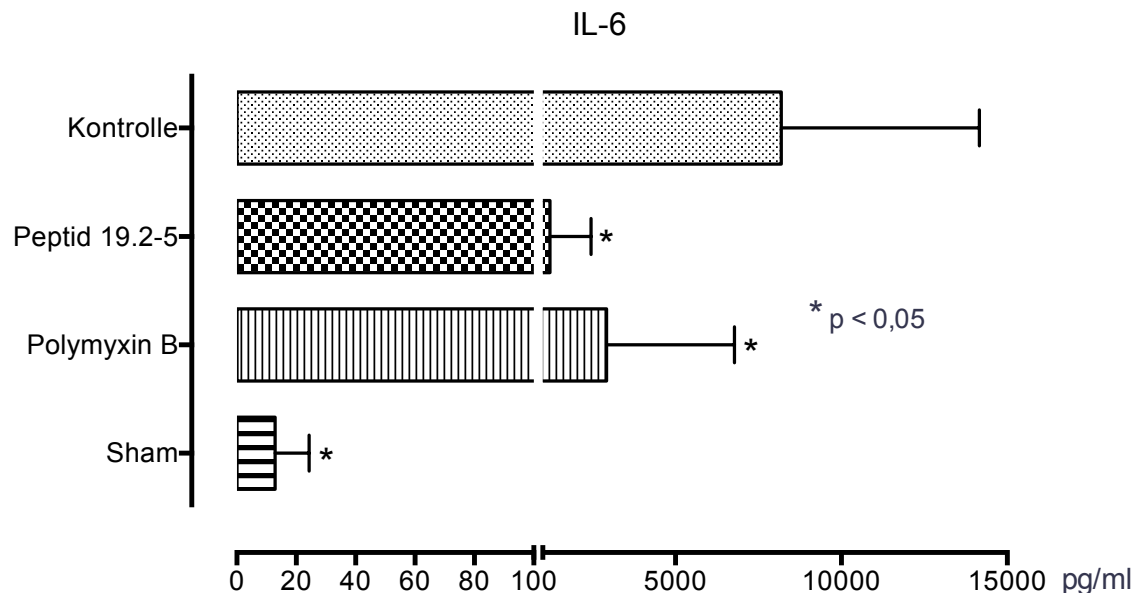


Abbildung 4.4: Mittlere Werte für IL-6 und die dazugehörigen Standardfehler in pg/ml.

Die Bestimmung der Werte für Interleukin-10 (IL-10) zeigte in der mit Peptid 19.2-5 behandelten Gruppe von Tieren einen statistisch signifikant niedrigeren mittleren Spiegel von IL-10 im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe ($89,1 \text{ pg/ml} \pm 91,9 \text{ pg/ml}$ vs. $1356,8 \text{ pg/ml} \pm 1777,5 \text{ pg/ml}$; $p = 0,002$). In der Polymyxin B-Gruppe konnten wir einen mittleren IL-10-Wert von $474,7 \text{ pg/ml} \pm 1052,3 \text{ pg/ml}$ messen, der im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe statistisch signifikant niedriger war ($p = 0,032$). Der IL-10-Spiegel in der Gruppe der sham-operierten Tiere lag bei $4,3 \text{ pg/ml} \pm 5,7 \text{ pg/ml}$ und unterschied sich ebenfalls statistisch signifikant von dem der Sepsis-Kontrollgruppe ($p < 0,001$).

Die Ergebnisse für IL-10 sind in Abbildung 4.5 noch einmal systematisch dargestellt. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es sowohl unter der Behandlung mit Peptid 19.2-5 als auch unter der Behandlung mit Polymyxin B, verglichen mit der Sepsis-Kontrollgruppe, zu einer statistisch signifikanten Reduktion von IL-10 kommt.

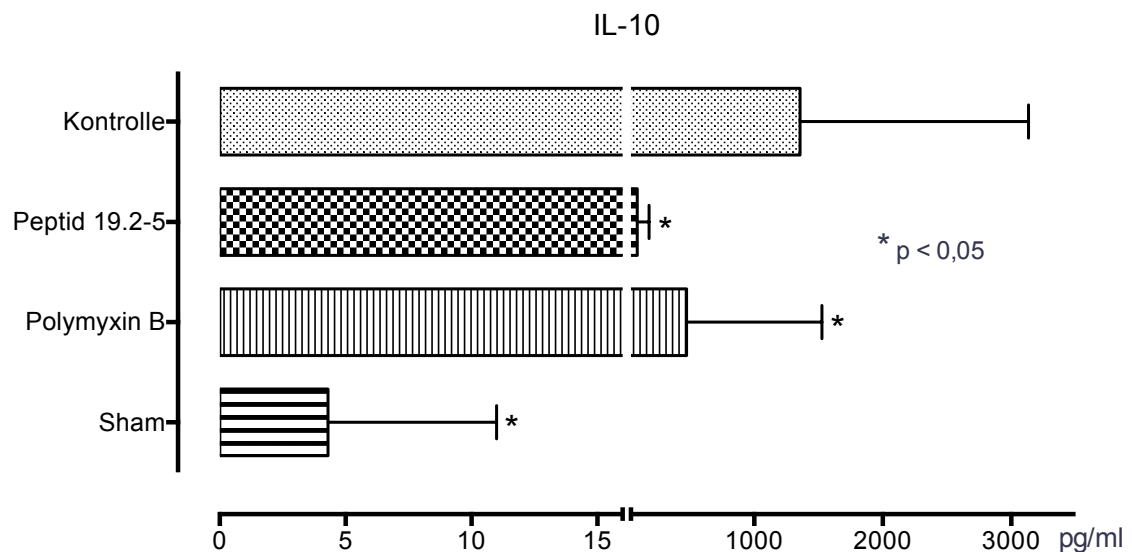


Abbildung 4.5: Mittlere Werte für IL-10 und die dazugehörigen Standardfehler in pg/ml.

Die dritte Messung bestimmte den Spiegel für das Monocyte Chemoattractant Protein (MCP-1). Die Tiere mit Peptidtherapie zeigten einen statistisch signifikant niedrigeren mittleren MCP-1-Wert im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe ($907,0 \text{ pg/ml} \pm 690,1 \text{ pg/ml}$ vs. $3273,3 \text{ pg/ml} \pm 2457,8 \text{ pg/ml}$, $p < 0,001$). Der mittlere MCP-1-Wert der Tiere, die mit Polymyxin B behandelt wurden, lag bei $1285,4 \text{ pg/ml}$ ($\pm 960,2 \text{ pg/ml}$) und unterschied sich statistisch signifikant von dem der Sepsis-Kontrollgruppe ($p = 0,002$). Die Sham-Gruppe zeigte einen mittleren MCP-1-Wert von $45,5 \text{ pg/ml} \pm 62,1 \text{ pg/ml}$, der sich ebenfalls von dem der Sepsis-Kontrollgruppe statistisch signifikant unterschied ($p < 0,001$).

Die in Abbildung 4.6 dargestellten Werte für MCP-1 zeigen zusammenfassend, dass es sowohl in der Gruppe der Tiere, die mit Peptid 19.2-5 behandelt wurden, als auch in der Gruppe der Tiere, die mit Polymyxin B behandelt wurden, zu statistisch signifikanten niedrigeren mittleren Werten von MCP-1 im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe kommt.

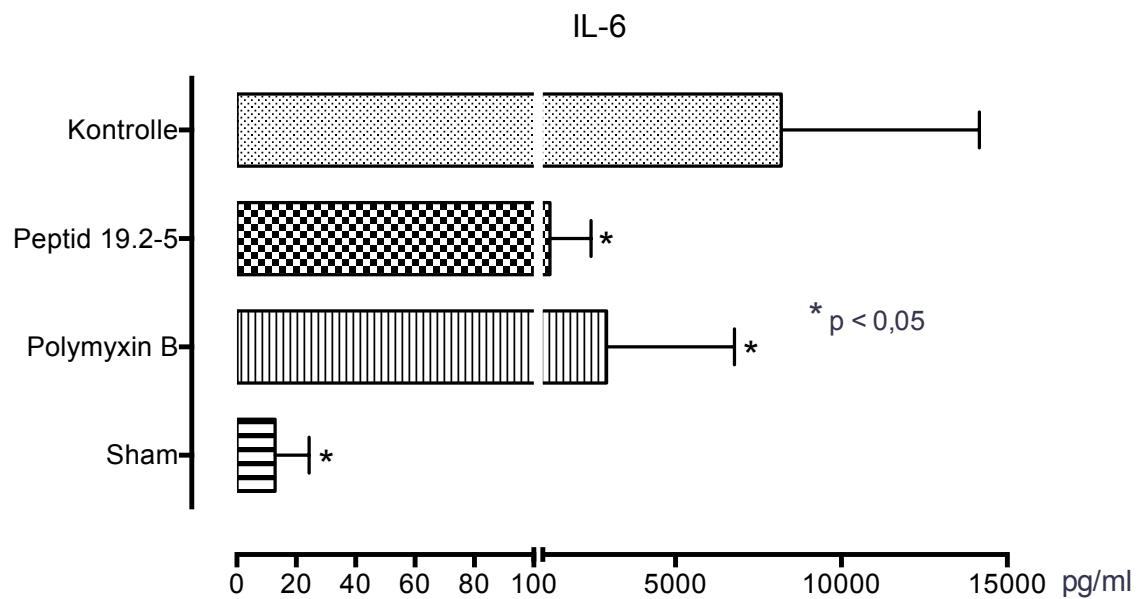


Abbildung 4.6: Mittlere Werte für MCP-1 und die dazugehörigen Standardfehler in pg/ml.

Die mittleren Werte für Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) sind in Abbildung 4.7 dargestellt. Die Gruppe der Tiere, die mit Peptid 19.2-5 behandelt wurde, hatte im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe einen statistisch signifikant niedrigeren TNF- α -Spiegel ($37,3 \text{ pg/ml} \pm 26,6 \text{ pg/ml}$ vs. $222,1 \text{ pg/ml} \pm 250,0 \text{ pg/ml}$, $p = 0,02$). In der Polymyxin B-Gruppe lag der mittlere TNF- α -Wert bei $85,5 \text{ pg/ml}$ ($\pm 98,8 \text{ pg/ml}$). Der mittlere TNF- α -Wert der Sham-Gruppe lag bei $5,4 \text{ pg/ml}$ ($\pm 8,1 \text{ pg/ml}$) und unterschied sich statistisch signifikant von der Sepsis-Kontrollgruppe ($p = 0,005$).

Zusammenfassend zeigt sich in der Gruppe der Tiere, die mit Peptid 19.2-5 behandelt wurden, im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe ein statistisch signifikant niedrigerer mittlerer Wert von TNF- α .

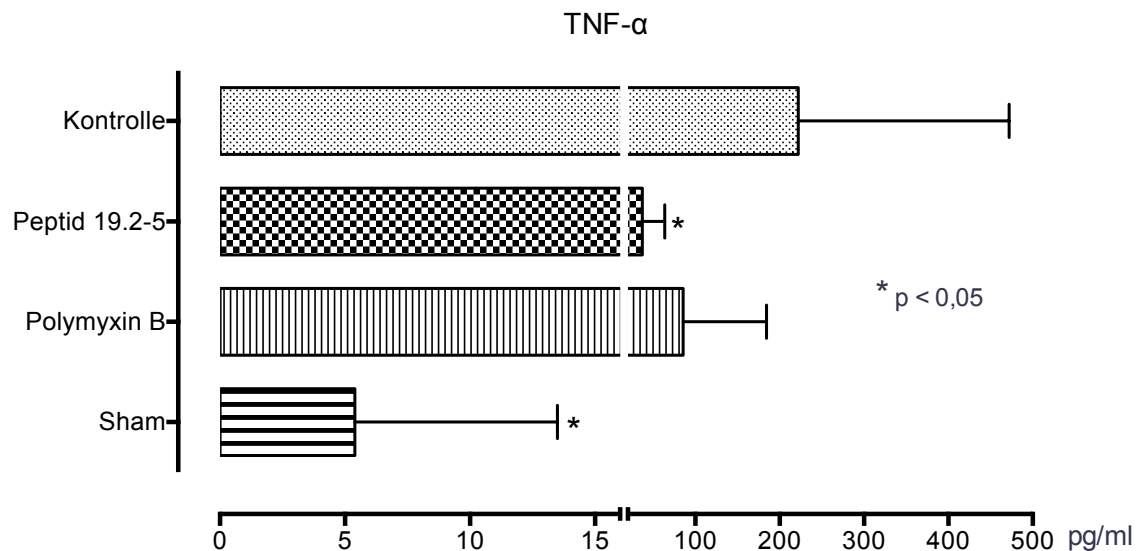


Abbildung 4.7: Mittlere Werte für TNF- α und die dazugehörigen Standardfehler in pg/ml.

Abbildung 4.8 zeigt die mittleren Werte der Gruppen für Interferon- γ (IFN- γ). Tiere, die mit Peptid 19.2-5 behandelt wurden, hatten einen niedrigeren mittleren IFN- γ -Wert im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe ($3,0 \text{ pg/ml} \pm 3,9 \text{ pg/ml}$ vs. $7,0 \text{ pg/ml} \pm 10,4 \text{ pg/ml}$). Der mittlere IFN- γ -Wert der Tiere, die mit Polymyxin B behandelt wurden, lag bei $9,6 \text{ pg/ml}$ ($\pm 16,5 \text{ pg/ml}$). Die Sham-Gruppe zeigte einen mittleren IFN- γ -Wert von $2,7 \text{ pg/ml} \pm 5,9 \text{ pg/ml}$. Zwischen den Gruppen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Zusammenfassend kommt es unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 zu einer Reduktion der Plasmaspiegel von IFN- γ im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe, die sich jedoch nicht statistisch signifikant unterscheidet.

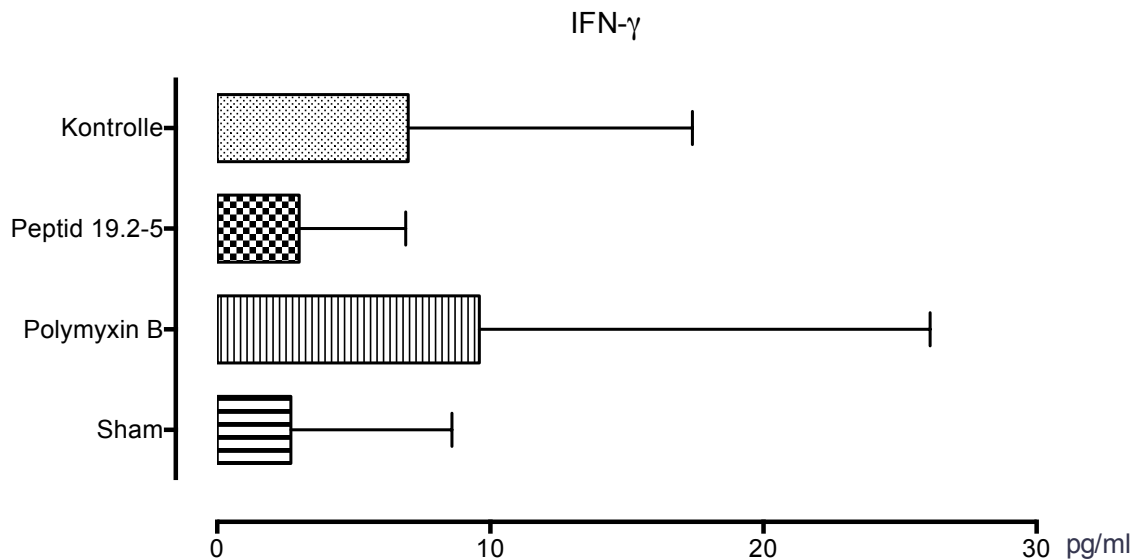


Abbildung 4.8: Mittlere Werte für IFN- γ und die dazugehörigen Standardfehler in pg/ml.

5 Diskussion

In unserem murinen Modell der experimentellen Sepsis konnten wir erstmalig eine Regulierung der Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in der polymikrobiellen Sepsis in mehreren untersuchten Organen messen. Statistisch signifikant zeigte sich in der Sepsis-Kontrollgruppe eine Regulierung der Genexpression von Heparanase in der Niere, von Syndekan-1 in der Lunge und von Perlekan in der Lunge und in der Niere.

Daneben konnten wir einen Einfluss von Peptid 19.2-5 auf die Regulierung der Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan beobachten. Im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe zeigte sich unter der Therapie mit Peptid 19.2-5, außer bei der Genexpression von Heparanase in der Leber, ein statistisch signifikanter Unterschied in allen untersuchten Organen.

Im statistischen Vergleich des Einflusses der beiden Therapeutika Peptid 19.2-5 und Polymyxin B auf die Regulierung der Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan ergab sich in allen untersuchten Organen kein statistisch signifikanter Unterschied.

Des Weiteren konnten wir in unseren Untersuchungen eine Reduktion der Plasmaspiegel der Zytokine unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 messen.

5.1 Regulierung von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in der Sepsis

Eine Hochregulierung der Heparanase in inflammatorischen Prozessen, die nicht durch eine Infektion bedingt sind, ist in der Literatur beschrieben (siehe Abschnitt 1.3.2 auf Seite 18). In unserem murinen Modell konnten wir in

der Niere nun auch eine statistisch signifikante Hochregulierung in der Inflammation zeigen, die durch eine polymikrobielle Sepsis bedingt war (siehe Abbildung 4.1 auf Seite 43). Untersuchungen an kultivierten Podozyten aus Ratten stützen zusätzlich dieses Ergebnis durch eine beschriebene Erhöhung der glomerulären Heparanase mRNA- und Proteinexpression unter dem Einfluss von Reaktiven Sauerstoffspezies, die wiederum während der Sepsis erhöht sind (van den Hoven et al. 2009, Galley 2011). Die Hochregulierung der Heparanase Genexpression könnte in der Pathophysiologie der Sepsis von Bedeutung sein, da gezeigt werden konnte, dass die Heparanase durch ihre Degradation von Heparansulfaten einen Barrierschaden der glomerulären Basalmembran der Niere verursacht. Dieser geht mit Proteinurie einher, die wiederum mit einer erhöhten Mortalität während Infektionserkrankungen assoziiert ist (van den Hoven et al. 2007, Wang et al. 2011).

Eine Runterregulierung der Syndekan-1 Expression, wie sie in histologischen Untersuchungen nach Exposition von Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) in der Leber (Hayashida et al. 2008) und in einem Sepsismodell der Ratte in Immunfluoreszenz-Untersuchungen in der Niere (Adembri et al. 2011) beschrieben ist, konnten wir in unserem Modell der polymikrobiellen Sepsis nicht messen. In unseren Versuchen kam es in der Leber und in der Niere zu einer statistisch nicht signifikanten Hochregulierung der Syndekan-1 mRNA Expression in der Sepsis-Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4.2 auf Seite 45). Diese gegenteiligen Beobachtungen könnten in den unterschiedlichen Methodendesigns begründet sein. Sowohl Hayashida et al. als auch Adembri et al. untersuchten die Proteinexpression. Wir hingegen untersuchten die Genexpression. Des Weiteren unterscheiden sich die Zeitpunkte der Beobachtungen. Hayashida et al. maßen die Expression 7 und 11 Stunden nach SEB-Injektion und Adembri et al. 3 (50% Reduktion) und 7 Stunden (80% Reduktion) nach Induktion der Sepsis im CLP-Modell. In unseren Versuchen wurde die Genexpression 24 Stunden nach Sepsisinduktion gemessen. Des Weiteren war unser Modell auf 100% Letalität nach 36 Stunden eingestellt. Da der Krankheitsverlauf der Sepsis immunologisch biphasisch verläuft und diese dynamische Phasenfolge einer organ- und

substratspezifischen Zeitspanne unterliegt (Cohen 2002, Zanotti et al. 2002), könnte die in unseren Versuchen gemessene statistisch nicht signifikante Hochregulierung von Syndekan-1 in der Niere und in der Leber eventuell ein Zeichen dafür sein, dass die Expression von Syndekan-1 24 Stunden nach Sepsisbeginn bereits durch eine immunologisch hypodynamische Phase geprägt ist.

Diese Zusammenhänge verweisen auf die Limitationen unserer Untersuchungen. Zum einen beziehen sich unsere Messungen ausschließlich auf die Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan. Eine Aussage der Expression auf Proteinebene kann daher erst durch anschließende Untersuchungen gemacht werden. Des Weiteren erfolgte eine einmalige Messung 24 Stunden nach Sepsisbeginn. Um Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Regulierung machen zu können, müssen in weiterführenden Untersuchungen Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgen.

In der Milz zeigte sich in unserem Modell eine statistisch nicht signifikante Runterregulierung der mRNA Expression von Syndekan-1 in der Sepsis-Kontrollgruppe um das 2,8-fache (siehe Abbildung 4.2 auf Seite 45). Über eine Regulierung von Syndekan-1 in der Milz finden sich in der Literatur, trotz intensiver Suche, keine Angaben. Ein möglicher Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen könnte der hohe Anteil von B-Zellen (50% aller im Körper vorhandenen) in diesem Organ (Altamura et al. 2001) sein, die ein hohes Maß an Syndekan-1 Expression aufweisen (Kim et al. 1994, Sanderson und Børset 2002).

In der Sepsis-Kontrollgruppe sank in unserem Modell im Herz die mRNA Expression von Syndekan-1 statistisch nicht signifikant um das 2,5-fache (siehe Abbildung 4.2 auf Seite 45). Einen möglichen Einfluss auf die Regulierung der Expression von Syndekan-1 im Herz könnte der durch klinische Studien belegte erhöhte Oxidative Stress bei Patienten mit Sepsis (Galley 2011) haben. In einem murinen Modell konnte gezeigt werden, dass unter Oxidativem Stress die mRNA Expression von Syndekan-1 im linken Ventrikel supprimiert ist (Kliment und Oury 2011). Auch für diese Zusammenhänge könnten Untersuchungen auf Proteinebene weiterführende Hinweise geben.

In unseren Versuchen zeigte sich in der Lunge eine statistisch signifikante Runterregulierung der mRNA Expression von Syndekan-1 in der Sepsis-Kontrollgruppe um das 20,6-fache (siehe Abbildung 4.2 auf Seite 45). Analog beschreiben Hayashida et al. 2008 in einem Mausmodell des Gram-positiven toxischen Schocks histologisch eine reduzierte Expression von Syndekan-1 auf Typ II Pneumozyten 7 Stunden nach Injektion von SEB. Des Weiteren wird im hämorrhagischen Schock eine ausgeprägte reduzierte mRNA Expression von Syndekan-1 auf der alveolären Zelloberfläche beschrieben (Kozar et al. 2011). Durch unsere Ergebnisse konnte nun auch, neben den Erkenntnissen aus dem Modell des Gram-positiven Schocks und des hämorrhagischen Schocks, eine Regulierung der Syndekan-1 Expression in der Lunge in einem Modell der polymikrobiellen Sepsis gezeigt werden.

Die anatomischen Gegebenheiten des bronchopulmonalen Systems könnten ein möglicher Grund für den starken Einfluss der Sepsis auf die Genexpression von Syndekan-1 sein. Syndekan-1 ist als Zelloberflächen assoziiertes HSPG in hohem Maß auf Makrophagen und Epithelien exprimiert (Parish 2006), und das bronchopulmonale System stellt somit mit seinen Alveolarmakrophagen und einem Oberflächenepithel von über 70 m² (Meyer 2002) Fläche ein Organ mit einer großen Menge an Syndekan-1 dar.

In der Lunge ergaben unsere Messungen zur mRNA Expression von Perlekan eine statistisch signifikante Runterregulierung in der Sepsis-Kontrollgruppe um das 26,6-fache (siehe Abbildung 4.3 auf Seite 47). Dieses Ergebnis, analog zu Syndekan-1, lässt einen starken Einfluss der Sepsis auf die Regulierung von Zelloberflächen und Basalmembran assoziierten HSPG in der Lunge vermuten. Die pathophysiologische Bedeutung von Perlekan hierbei ist ungeklärt. Für weitere Untersuchungen könnten die Experimente von Hayashida et al. 2008 methodische Ansätze liefern, die bereits eine Bedeutung von Syndekan-1 in inflammatorischen Prozessen in der Lunge zeigen konnten.

5.2 Regulierung von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan unter der Therapie mit Peptid 19.2-5

In der Niere kam es unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe zu einer supprimierten mRNA Genexpression von Heparanase, die sich statistisch signifikant unterschied (siehe Abbildung 4.1 auf Seite 43). Eine mögliche therapeutische Bedeutung einer supprimierten Expression der Heparanase in der Sepsis könnte in dem folglich verminderten Barrierschaden der glomerulären Basalmembran zu sehen sein, der, wie bereits angemerkt, mit Proteinurie und erhöhter Mortalität einhergeht (van den Hoven et al. 2007, Wang et al. 2011).

Unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 kam es in der Milz und im Herz zu einer statistisch signifikanten Runterregulierung der Heparanase Genexpression (siehe Abbildung 4.1 auf Seite 43). Im Hinblick auf anschließende Untersuchungen stellt sich nun die Frage, ob Peptid 19.2-5 auch einen Einfluss auf die Expression der Heparanase in anderen Erkrankungen haben könnte, da bekannt ist, dass die Heparanase sowohl an Prozessen der Tumorerkrankung und Metastasierung (Vlodavsky et al. 2011) als auch an Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen (Waterman et al. 2007) beteiligt ist.

Vergleicht man in Bezug auf die Runterregulierung der mRNA Expression der Heparanase die Wirkung von Polymyxin B mit der des Peptids 19.2-5, so zeigt sich in der Lunge, in der Leber und in der Niere eine ähnliche Wirkung ohne statistisch signifikante Unterschiede.

In der Milz und im Herz fiel die Runterregulierung unter der Therapie mit Polymyxin B quantitativ stärker als unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 aus (siehe Abbildung 4.1 auf Seite 43). Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Regulierung unter beiden Therapeutika zeigte sich jedoch nicht. Weiterführende Untersuchungen zur Frage, ob Polymyxin B auch einen Einfluss auf die Genexpression von Heparanase in anderen Erkrankungen haben könnte, sind im Hinblick auf einen möglichen

klinischen Einsatz durch das hohe neuro- und nephrotoxische Potential (Falagas und Kasiakou 2006) jedoch eventuell limitiert.

Die mRNA Expression von Syndekan-1 unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 unterschied sich statistisch signifikant im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe in allen untersuchten Organen (siehe Abbildung 4.2 auf Seite 45). Eine Erhöhung von Syndekan-1 in der Sepsis könnte von therapeutischer Bedeutung sein, da in murinen *in vitro* und *in vivo* Modellen gezeigt werden konnte, dass Syndekan-1 die leukozytär vermittelte Inflammation hemmt, wodurch die pro-inflammatorische Kaskade abgeschwächt wird (Floer et al. 2010, Gotte et al. 2002, Kharabi Masouleh et al. 2009, Vanhoutte et al. 2007). Des Weiteren ist durch Hayasida et al. 2008 und 2009 beschrieben, dass SDC -/- Mäuse bei bakteriellen Infektionen eine höhere Mortalität aufweisen. Die intravaskuläre Hypovolämie, bedingt durch ein Defizit der vaskulären Barriere, ist maßgeblich an der Pathophysiologie der Sepsis beteiligt (Lee und Slutsky 2010), wobei Syndekan-1 als Hauptbestandteil der Glykokalyx hierbei eine Schlüsselrolle in der Erhaltung der vaskulären Barriere einnimmt (Edovitsky 2006). Peptid 19.2-5 scheint somit die Expression von Syndekan-1 im Sinne einer möglichen Inflammationshemmung zu beeinflussen.

Xu et al. und Hayashida et al. geben in ihren Arbeiten zur Lunge ebenfalls Hinweise auf eine eventuelle therapeutische Bedeutung einer erhöhten Expression von Syndekan-1. Murine Modelle zeigten bei Suppression oder Absenz von Syndekan-1 eine verstärkte Inflammation (Xu et al. 2005) und pulmonale Ödembildung (Hayashida et al. 2008). Da Inflammation und Ödembildung in der Lunge während der Sepsis vorherrschende pathologische Prozesse darstellen, könnte eine Erhöhung von Syndekan-1, wie wir sie unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe statistisch signifikant messen konnten, im Hinblick auf den klinischen Verlauf auch in der Sepsis von Bedeutung sein.

Auffallend in unseren Untersuchungen war, dass es in der Milz, Leber und Niere unter der Gabe von Peptid 19.2-5 zu einer statistisch signifikanten Hochregulierung der mRNA Expression von Syndekan-1 kam (siehe Abbildung 4.2 auf Seite 45). Auch

diese Ergebnisse werfen wie auch die zur Expression der Heparanase die Frage auf, ob eine Applikation von Peptid 19.2-5 auch bei anderen Erkrankungen einen Einfluss auf die Expression von Syndekan-1 haben könnte. Syndekan-1 spielt auch eine maßgebliche Rolle in der Tumorbilogie. Es moduliert verschiedene Schlüsselprozesse der Proliferation, Apoptose, Angiogenese und Metastasierung. Eine niedrige Expression von Syndekan-1 im Tumorgewebe ist mit schlechterer Prognose bei Tumoren der Lunge, des Kolon, der Leber und des Kopf-Halses beschrieben (Teng et al. 2012).

Die Therapie mit Peptid 19.2-5 führte in unseren Versuchen in der Leber zu einer statistisch signifikanten Hochregulierung der Syndekan-1 Genexpression (siehe Abbildung 4.2 auf Seite 45). Im Herz zeigte sich unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zur Sepsis-Kontrollgruppe. In der Literatur finden sich Hinweise, dass eine Erhöhung der Genexpression von Syndekan-1 in diesen Organen für die Sepsis relevante pathologische Prozesse attenuieren könnte. Bei SDC -/- Mäusen kommt es 7 und 11 Stunden nach Exposition von SEB zu einem fulminanten Leberschaden (Hayashida et al. 2008). In Untersuchungen von Vanhoutten et al. konnte in einem murinen Myokardinfarktmodell gezeigt werden, dass unter einer Erhöhung der Syndekan-1 mRNA- und Proteinexpression die Inflammation im Herzen reduziert und dieses vor Dilatation und Dysfunktion geschützt werden kann (Vanhoutte et al. 2007). Diese Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass Peptid 19.2-5 die Genexpression von Syndekan-1 im Hinblick auf eine mögliche Inflammationshemmung beeinflussen könnte.

In der Leber und in der Niere konnten wir unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 und Polymyxin B eine statistisch signifikante Hochregulierung der Syndekan-1 Genexpression nachweisen (siehe Abbildung 4.2 auf Seite 45). Ein statistisch signifikanter Unterschied in der Regulierung unter beiden Therapeutika zeigte sich jedoch nicht. Auch diese Ergebnisse werfen die Frage auf, ob eine Applikation von Peptid 19.2-5 oder Polymyxin B auch bei anderen Erkrankungen einen Einfluss auf die Expression von Syndekan-1 haben könnte.

5.3 Zytokinspiegel und die Expression von Heparanase, Syndekan-1, Perlekan

In unseren Messungen 24 Stunden nach Sepsisbeginn zeigte sich im Plasma, verglichen zur Sepsis-Kontrollgruppe, unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 eine statistisch signifikante Reduktion von Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1) und Interleukin-10 (IL-10) (siehe Abschnitt 4.4).

Aus in vitro Untersuchungen ist bekannt, dass eine Erhöhung der mRNA Heparanase Expression sowohl aus einer Exposition mit TNF- α (Chen et al. 2004, Edovitsky 2006) als auch aus einer Exposition mit IFN- γ (Edovitsky 2006) resultiert.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sowohl nach Zugabe von TNF- α (Day et al. 2003, Haywood-Watson et al. 2011, Kainulainen et al. 1996) als auch nach Zugabe von IFN- γ (Worapamorn et al. 2001) die mRNA Expression von Syndekan-1 supprimiert ist.

Auch für Perlekan ist eine dosisabhängige Suppression der mRNA Expression unter dem Einfluss von TNF- α in Endothelzellen beschrieben (Ramasamy et al. 1995, Tufvesson und Westergren-Thorsson 2000).

Durch die Ergebnisse unserer Untersuchungen stellt sich nun die Frage, ob der Einfluss von Peptid 19.2-5 auf die Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan nicht zumindest auch durch den Einfluss von Peptid 19.2-5 auf die Plasmalevel der Zytokine erklärt werden kann. Diese vermuteten Zusammenhänge können zum jetzigen Stand lediglich erste Ansatzpunkte zu dieser Fragestellung liefern. In weiteren Untersuchungen, die der Frage nachgehen, über welchen Mechanismus Peptid 19.2-5 die Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan reguliert, sollte unter der Berücksichtigung des Einflusses der Zytokine auf die Genexpression die Reduktion der Zytokine durch Peptid 19.2-5 beachtet werden.

6 Zusammenfassung

Trotz intensiver Forschung bleiben die Morbidität und Mortalität der Sepsis und des septischen Schocks hoch. Die wachsende Resistenz von Bakterien gegenüber konventionellen Antibiotika verstärkt Bestrebungen synthetisch hergestellte antimikrobielle Peptide als additive Wirkstoffe im klinischen Einsatz zu entwickeln. Das synthetisch hergestellte antimikrobielle Peptid 19.2-5 zeigt eine anti-inflammatorische Wirkung gegen Bakterien und Viren und limitiert im murinen Modell die Schwere der Sepsis. Heparanase und die beiden Heparansulfat-Proteoglykane Syndekan-1 und Perlekan sind ubiquitär exprimiert und agieren als Modulatoren in inflammatorischen Prozessen. Die Regulierung ihrer Genexpression in der polymikrobiellen Sepsis ist bisher nicht untersucht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher folgende Fragen zu beantworten:

- 1) Sind die Genexpressionen von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in mehreren Organen in einem murinen Modell der polymikrobiellen Sepsis reguliert?
- 2) Beeinflusst Peptid 19.2-5 die Regulierung im Sinne einer Inflammationshemmung?
- 3) Unterscheidet sich der Einfluss von Peptid 19.2-5 auf die Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan zu dem des Peptidantibiotikums Polymyxin B?
- 4) Kommt es unter der Therapie mit Peptid 19.2-5 parallel zur Veränderung der Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan zu einer Suppression pro- und anti-inflammatorischer Zytokine im Plasma?

Die Versuche zu dieser Arbeit gliederten sich in vier Teile:

40 männliche NMRI-Mäuse wurden in vier Gruppen randomisiert: (i) Sham-Operation und NaCl 0,9% Applikation (Sham), (ii) Induktion der Sepsis und NaCl 0,9% Applikation (Sepsis-Kontrollgruppe), (iii) Induktion der Sepsis und Applikation von Peptid 19.2-5 (Peptid 19.2-5) und (iv) Induktion der Sepsis und Applikation von Polymyxin B (Polymyxin B). Im ersten Teil wurde den Tieren in Narkose ein zentralnervöser Katheter zur kontinuierlichen Flüssigkeits- und Medikamentenapplikation implantiert. Nach 48 Stunden Ruhephase folgte im zweiten Teil die Induktion der Sepsis mittels zoekaler Ligatur und Punktion in Allgemeinanästhesie sowie der

Beginn der Medikamentenapplikation. Im dritten Teil wurden 24 Stunden nach Induktion der Sepsis die Tiere getötet. Lunge, Leber, Milz, Herz und Niere sowie Blutproben wurden entnommen und bis zur weiteren Verarbeitung tiefgefroren. Im vierten Teil erfolgten die Messungen der Genexpressionen von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in den Organen mittels Real-Time-PCR sowie der Zytokinspiegel im Plasma mittels Durchflusszytometrie.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- 1) Die Genexpressionen von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan sind in der polymikrobiellen Sepsis im Sinne einer pro-inflammatorischen Wirkung reguliert. Statistisch signifikant zeigt sich dies für Heparanase in der Niere, für Syndekan-1 in der Lunge und für Perlekan in der Lunge und in der Niere.
- 2) Peptid 19.2-5 hat einen Einfluss auf die Expression im Sinne einer Inflammationshemmung. Im Vergleich zur Sepsis ohne spezifische Behandlung zeigt sich unter der Therapie mit Peptid 19.2-5, mit Ausnahme der Regulierung der Genexpression von Heparanase in der Leber, ein statistisch signifikanter Unterschied in allen untersuchten Organen für Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan.
- 3) Im statistischen Vergleich des Einflusses der beiden Therapeutika Peptid 19.2-5 und Polymyxin B zeigt sich in allen untersuchten Organen kein statistisch signifikanter Unterschied.
- 4) Unter Therapie mit Peptid 19.2-5 kommt es parallel zur Regulierung der Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan zu einer statistisch signifikanten Suppression der Plasmaspiegel von $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-10 und MCP-1.

Die vorliegende Arbeit belegt eine Regulierung der Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in der polymikrobiellen Sepsis im Sinne einer pro-inflammatorischen Wirkung in mehreren Organen und zeigt die pleiotrope anti-inflammatorische Wirkung von Peptid 19.2-5 durch Regulierung der Genexpression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan im Sinne einer Inflammationshemmung sowie der Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine im Plasma. Diese Ergebnisse geben wichtige Erkenntnisse für das Verständnis der Wirkung von Peptid 19.2-5 in inflammatorischen Prozessen und für die Weiterentwicklung als additives anti-inflammatorisches Therapeutikum.

7 Abstract

Despite intense effort in basic and clinical research the morbidity and mortality of sepsis and septic shock remain high. The impending problem is the growing number of multiresistant bacteria against most commonly used antibiotics during the last years. Therefore, the challenge is to develop synthetic peptide-based drugs on the basis of naturally occurring antimicrobial peptides as new ant-infective agents in order to effectively treat septic patients. The synthetic antimicrobial peptide 19.2-5 shows anti-inflammatory activity against bacteria and viruses and limits the severity of septic shock in vivo. Heparanase and the heparan sulfat proteoglycans syndecan-1 and perlecan are ubiquitarily expressed and play important roles in inflammatory reactions. The regulation of their gene expressions in polymicrobial sepsis is still uninvestigated.

Aim of this study was to answer the following questions:

- 1) Are the gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan regulated in several organs in polymicrobial sepsis in a murine model?
- 2) Does peptide 19.2-5 influence the gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan in sepsis in an anti-inflammatory manner?
- 3) Do peptide 19.2-5 and the peptide antibiotic polymyxin B differ in the influence on gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan?
- 4) Does the therapy with peptide 19.2-5 lead to suppression of pro- and anti-inflammatory cytokines in plasma?

The experimental trial was structured in four parts:

40 male NMRI mice were randomized to the following four groups: (i) sham operation and NaCl 0.9% administration (sham); (ii) sepsis induction and NaCl 0.9% administration (sepsis-control); (iii) sepsis induction and infusion of the synthetic antimicrobial peptide 19.2-5 (peptide 19.2-5) or (iv) sepsis induction and polymyxin B infusion (polymyxin B). In the first part all animals underwent venous catheterization for continuous i.v. application of fluids and drugs in general anesthesia. After resting in the cage for 48h the induction of the sepsis by cecal

ligation and puncture in general anesthesia and the i.v. administration of fluids and drugs followed in the second part. After 24 hours of sepsis all animals were killed. In the third part lung, liver, spleen, heart and kidney were harvested as well as blood was sampled and frozen until measurement. During the fourth part gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan were measured in real time PCR and determination of plasma cytokine levels were performed using a cytometric bead array.

Summing up the results of this study are:

- 1) Gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan are regulated during polymicrobial sepsis in a pro-inflammatory manner. There is a statistically significant upregulation of heparanase in kidney, syndecan-1 in lung and perlecan in lung and kidney.
- 2) Administration of peptide 19.2-5 influences the gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan in sepsis in an anti-inflammatory manner. Compared to sepsis without specific treatment the administration of peptide 19.2-5 shows a statistically significant difference in the regulation of gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan in all organs except heparanase in the liver.
- 3) Peptide 19.2-5 and polymyxin B do not statistically significantly differ in the influence on gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan.
- 4) Parallel to the regulation of the gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan peptide 19.2-5 suppresses statistically significantly the plasma levels of TNF- α , IL-6, IL-10 und MCP-1.

Using a widely used mouse model of polymicrobial sepsis, the present study analyses a regulation of gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan during polymicrobial sepsis in several organs in a pro-inflammatory manner. Second the study indicates a pleiotropic anti-inflammatory activity of peptide 19.2-5 by regulating gene expressions of heparanase, syndecan-1 and perlecan in an anti-inflammatory manner and reducing plasma levels of pro-inflammatory cytokines. These results provide important information for the understanding of peptide's 19.2-5 activity in inflammatory reactions and for further development of peptide 19.2-5 as a tool in anti-infective treatment.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Signalweg nach Bindung des LPS-LBP-Komplexes	5
1.2	Pathophysiologie der Sepsis und des Multiorganversagens	9
1.3	Wirkmechanismen antimikrobieller Peptide in der Sepsis	12
1.4	Glykokalyx des Endothels	16
1.5	Syndekan-1, Perlekan und die Grundstruktur der Heparansulfate . . .	17
1.6	Hemmung der leukozytären Transmigration durch Syndekan-1	20
1.7	Vaskuläre Barrierefunktion von Syndekan-1	22
1.8	Barrierefunktion von Perlekan	23
1.9	Transzytose von Chemokinen durch Perlekan	24
3.1	RNA Agarosegelelektrophorese Herz	31
3.2	RNA Agarosegelelektrophorese Lunge	31
3.3	Amplifikation	36
3.4	Schmelzkurve	37
3.5	Verdünnungsreihe	39
4.1	Heparanase mRNA Expression	43
4.2	Syndekan-1 mRNA Expression	45
4.3	Perlekan mRNA Expression	47
4.4	IL-6 Plasmaspiegel	48
4.5	IL-10 Plasmaspiegel	49
4.6	MCP-1 Plasmaspiegel	50
4.7	TNF- α Plasmaspiegel	51
4.8	IFN- γ Plasmaspiegel	52

Tabellenverzeichnis

1.1	Definitionen SIRS, Sepsis, septischer Schock	2
1.2	Peptid 19.2-5	14
3.1	Gruppen Sepsismodell	27
3.2	Verwendete Primerpaare	34
3.3	PCR-Ansatz	35
3.4	Berechnete Effizienzen der verwendeten Primer	40

Abkürzungsverzeichnis

AMP	Antimikrobielle Peptide
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CLP	Coekale Ligatur und Punktion
Ct-Wert	threshold cycle-Wert
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIC	Disseminierte Intravasale Gerinnung
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESBL	extended-spectrum β -Lactamase produzierende Enterobakterien
EZM	Extrazelluläre Matrix
GAG	Glykosaminoglykane
GLcA	Glukuronsäure
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
HAD	Humane α -Defensine
HBD	Humane β -Defensine
HNP	Human Neutrophil Peptides
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6

LBP		Lipopolysaccharid-Bindungs-Protein
LPS		Lipopolysaccharid
MCP-1		Monocyte Chemoattractant Protein 1
MOV		Multiorganversagen
MRSA		Methicillin-resistente Staphylococcus aureus
NaCl		Natriumchlorid
NMRI		Naval Medical Research Institute
NO		Stickstoffmonoxid
PAF		Plättchen-aktivierender Faktor
PCR		Polymerasekettenreaktion
RNA		Ribonukleinsäure
RT		Reverse Transkriptase
SDC -/-		Syndekan-1 defiziente Mäuse
SEB		Staphylokokken Enterotoxin B
SIRS		Systemic Inflammatory Response Syndrome
SSCM		Society of Critical Care Medicine
TLR4		Toll-like-Rezeptor 4
TNF- α		Tumor-Nekrose-Faktor- α
VCAM		Vaskuläres Adhäsionsmolekül
VRE		Vancomycin-resistente Enterokokken

Literaturverzeichnis

- Adembri C, Sgambati E, Vitali L, Selmi V, Margheri M, Tani A, Bonaccini L, Nosi D, Caldini AL, Formigli L, De Gaudio AR. 2011. Sepsis induces albuminuria and alterations in the glomerular filtration barrier: a morphofunctional study in the rat. *Critical Care*, 15(6):R277.
- Altamura M, Caradonna L, Amati L, Pellegrino NM, Urgesi G, Miniello S. 2001. Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. *Immunopharmacology and immunotoxicology*, 23(2):153–161.
- Andra J, Howe J, Garidel P, Rössle M, Richter W, Leiva-León J, Moriyon I, Bartels R, Gutschmann T, Brandenburg K. 2007. Mechanism of interaction of optimized *Limulus*-derived cyclic peptides with endotoxins: thermodynamic, biophysical and microbiological analysis. *Biochemical Journal*, 406(2):297–307.
- Andreu D, Rivas L. 1998. Animal antimicrobial peptides: an overview. *Critical Care*, 47:415–433.
- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, 29(7):1303–1310.
- Bangsow T, Huch R, Male D. 2002. Polymerase-Kettenreaktion: Gentechnische Methoden. Verlag Berlin Heidelberg.
- Barie PS, Williams MD, McCollam JS, Bates BM, Qualy RL, Lowry SF, Fry DE. 2004. Benefit/risk profile of drotrecogin alfa (activated) in surgical patients with severe sepsis. *American journal of surgery*, 188(3):212–220.
- Bartlett AH, Hayashida K, Park PW. 2007. Molecular and cellular mechanisms of syndecans in tissue injury and inflammation. *Molecules and cells*, 24(2):153–166.

- Bartlett MR, Underwood PA, Parish CR. 1995. Comparative analysis of the ability of leucocytes, endothelial cells and platelets to degrade the subendothelial basement membrane: evidence for cytokine dependence and detection of a novel sulfatase. *Immunology and cell biology*, 73(2):113–124.
- Berk RS, Dong Z, Alousi S, Kosir MA, Wang Y, Vlodavsky I. 2004. Murine ocular heparanase expression before and during infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(4):1182–1187.
- Berkestedt I, Herwald H, Ljunggren L, Nelson A, Bodelsson M. 2010. Elevated plasma levels of antimicrobial polypeptides in patients with severe sepsis. *Journal of Innate Immunity*, 2(5):478–482.
- Bode L, Salvestrini C, Park PW, Li JP, Esko JD, Yamaguchi Y, Murch S, Freeze HH. 2008. Heparan sulfate and syndecan-1 are essential in maintaining murine and human intestinal epithelial barrier function. *Journal of Clinical Investigation*, 118(1):229–238.
- Bodi M, Ardanuy C, Olona M, Castander D, Diaz E, Rello J. 2001. Therapy of ventilator-associated pneumonia: the Tarragona Strategy. *Clinical Microbiology and Infection*, 7(1):32–33.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 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*, 101(6):1644–1655.
- Bossink AW, Paemen L, Jansen PM, Hack CE, Thijs LG, Van Damme J. 1995. Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood*, 86(10):3841–3847.
- Brandenburg K, Andra J, Garidel P, Gutschmann T. 2011. Peptide-based treatment of sepsis. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(3):799–808.

- Brandenburg K, Andra J, Müller M, Koch MHJ, Garidel P. 2003. Physicochemical properties of bacterial glycopolymers in relation to bioactivity. *Carbohydrate research*, 338(23):2477–2489.
- Brogden KA. 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3):238–250.
- Brudaúć I, Cucuianu M. 2010. Anticoagulant mechanisms are modulated by vascular endothelial cells. *Revista Român de Medicin de Laborator Vol*, 18(3/4).
- Brunkhorst FM. 2006. Epidemiology, economy and practice: results of the German study on prevalence by the competence network sepsis (SepNet). *Anästhesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie*, 41(1):43–44.
- Butcher EC. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell*, 67(6):1033–1036.
- Carr MW, Roth SJ, Luther E, Rose SS, Springer TA. 1994. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(9):3652–3656.
- Casey LC, Balk RA, Bone RC. 1993. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 119(8):771–778.
- Chen G, Wang D, Vikramadithyan R, Yagyu H, Saxena U, Pillarisetti S, Goldberg IJ. 2004. Inflammatory cytokines and fatty acids regulate endothelial cell heparanase expression. *Biochemistry*, 43(17):4971–4977.
- Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ma FY, Ozols E, Rollins BJ, Tesch GH. 2006a. Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice. *Diabetologia*, 50(2):471–480.
- Chow FY, Nikolic-Paterson DJ, Ozols E, Atkins RC, Rollin BJ, Tesch GH. 2006b. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic

- renal injury in streptozotocin-treated mice. *Kidney International*, 69(1):73–80.
- Cirioni O, Giacometti A, Ghiselli R, Bergnach C, Orlando F, Silvestri C, Mocchegiani F, Licci A, Skerlavaj B, Rocchi M, Saba V, Zanetti M, Scalise G. 2006. LL-37 protects rats against lethal sepsis caused by gram-negative bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(5):1672–1679.
- Cohen J. 2002. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*, 420(6917):885–891.
- Cosgrove SE. 2006. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clinical Infectious Diseases*, 42:82–89.
- Couturier C, Haeffner-Cavaillon N, Caroff M, Kazatchkine MD. 1991. Binding sites for endotoxins (lipopolysaccharides) on human monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 147(6):1899–1904.
- Cruz D, Antonelli M, Fumagalli R. 2009. Early use of polymyxin B hemoperfusion in abdominal septic shock. *Journal of the American Medical Association*, 301:2445–2452.
- Damas P, Reuter A, Gysen P, Demonty J, Lamy M, Franchimont P. 1989. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Critical Care Medicine*, 17(10):975–978.
- Danielli JF. 1940. Capillary permeability and oedema in the perfused frog. *The Journal of Physiology*, 98(1):109–129.
- Day R, Forbes A. 1999. Heparin, cell adhesion, and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Lancet*, 354(9172):62–65.
- Day RM, Mitchell TJ, Knight SC, Forbes A. 2003. Regulation of epithelial syndecan-1 expression by inflammatory cytokines. *Cytokine*, 21(5):224–233.
- De Kock I, Van Daele C, Poelaert J. 2010. Sepsis and septic shock: pathophysiological and cardiovascular background as basis for therapy. *Acta clinica Belgica*,

65(5):323–329.

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL. 2008. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Medicine*, 34(1):17–60.

Dömming S, Schürholz T, Brandenburg K, Marx G. 2011. Abstract. Synthetisch hergestelltes Lipopolysaccharid-bindendes Peptid hemmt bei intravenöser Gabe effektiv die Inflammation in einem murinen Sepsismodell. *Anästhesiologie & Intensivmedizin*, 7:466.

Edovitsky E. 2006. Role of endothelial heparanase in delayed-type hypersensitivity. *Blood*, 107(9):3609–3616.

Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Medicine*, 33(4):606–618.

Falagas ME, Kasiakou SK. 2006. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Critical Care*, 10(1):R27.

Floer M, Gotte M, Wild MK, Heidemann J, Gassar ES, Domschke W, Kiesel L, Luegering A, Kucharzik T. 2010. Enoxaparin improves the course of dextran sodium sulfate-induced colitis in syndecan-1-deficient mice. *American Journal of Pathology*, 176(1):146–157.

Frey EA, Miller DS, Jahr TG, Sundan A, Bazil V, Espevik T, Finlay BB, Wright SD. 1992. Soluble CD14 participates in the response of cells to lipopolysaccharide.

- The Journal of Experimental Medicine, 176(6):1665–1671.
- Fritchley SJ, Kirby JA, Ali S. 2000. The antagonism of interferon-gamma (IFN-gamma) by heparin: examination of the blockade of class II MHC antigen and heat shock protein-70 expression. *Clinical and experimental immunology*, 120(2):247–252.
- Galley HF. 2011. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *British Journal of Anaesthesia*, 107(1):57–64.
- Gordon YJ, Romanowski EG, McDermott AM. 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Current eye research*, 30(7):505–515.
- Gotte M, Joussen AM, Klein C, Andre P, Wagner DD, Hinkes MT, Kirchhof B, Adamis AP, Bernfield M. 2002. Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. *Investigative ophthalmology & visual science*, 43(4):1135–1141.
- Gutsmann T, Razquin-Olazarán I, Kowalski I, Kaonis Y, Howe J, Bartels R, Hornef M, Schürholz T, Rössle M, Sanchez-Gómez S, Moriyon I, de Tejada GM, Brandenburg K. 2010. New antiseptic peptides to protect against endotoxin-mediated shock. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(9):3817–3824.
- Hancock REW, Sahl HG. 2006. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature Biotechnology*, 24(12):1551–1557.
- Hasegawa H, Kohno M, Sasaki M, Inoue A, Ito MR, Terada M, Hieshima K, Maruyama H, Miyazaki Ji, Yoshie O, Nose M, Fujita S. 2003. Antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 ameliorates the initiation and progression of lupus nephritis and renal vasculitis in MRL/lpr mice. *Arthritis and rheumatism*, 48(9):2555–2566.
- Hayashida K, Chen Y, Bartlett AH, Park PW. 2008. Syndecan-1 is an in vivo suppressor of Gram-positive toxic shock. *The Journal of Biological Chemistry*,

283(29):19895–19903.

Haywood-Watson RJ, Holcomb JB, Gonzalez EA, Peng Z, Pati S, Park PW, Wang W, Zaske AM, Menge T, Kozar RA. 2011. Modulation of syndecan-1 shedding after hemorrhagic shock and resuscitation. *Public Library of Science one*, 6(8):e23530.

Heinrich PC, Castell JV, Andus T. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochemical Journal*, 265(3):621–636.

Henrich M, Gruss M, Weigand MA. 2010. Sepsis-Induced Degradation of Endothelial Glycocalix. *The Scientific World Journal*, 10:917–923.

Henry CB, Duling BR. 1999. Permeation of the luminal capillary glycocalyx is determined by hyaluronan. *American Journal of Physiology*, 277(2):508–514.

Hotchkiss R, Karl I. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *New England Journal of Medicine*, 348:138–150.

van den Hoven MJ, Rops AL, Vlodavsky I, Levidiotis V, Berden JH, van der Vlag J. 2007. Heparanase in glomerular diseases. *Kidney International*, 72(5):543–548.

van den Hoven MJ, Waanders F, Rops AL, Kramer AB, van Goor H, Berden JH, Navis G, van der Vlag J. 2009. Regulation of glomerular heparanase expression by aldosterone, angiotensin II and reactive oxygen species. *Nephrology, dialysis, transplantation*, 24(9):2637–2645.

Iozzo RV. 2005. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6(8):646–656.

Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. 1991. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiological reviews*, 71(2):481–539.

Jaffe E. 1987. Cell biology of endothelial cells. *Human Pathology*, 18(3):234–239.

Johnson GB, Brunn GJ, Platt JL. 2004. Cutting edge: an endogenous pathway to

- systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-like reactions through Toll-like receptor 4. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 172(1):20–24.
- Kainulainen V, Nelimarkka L, Jarvelainen H, Laato M, Jalkanen M, Elenius K. 1996. Suppression of syndecan-1 expression in endothelial cells by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(31):18759–18766.
- Kaiser RE, Cerra FB. 1981. Progressive necrotizing surgical infections—a unified approach. *The Journal of trauma*, 21(5):349–355.
- Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Choe KW. 2005. Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(2):760–766.
- Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK. 2006. Interplay of TNF-alpha and IL-10 in regulating oxidative stress in isolated adult cardiac myocytes. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 41(6):1023–1030.
- Kharabi Masouleh B, Ten Dam GB, Wild MK, Seelige R, van der Vlag J, Rops AL, Echtermeyer FG, Vestweber D, van Kuppevelt TH, Kiesel L, Gotte M. 2009. Role of the heparan sulfate proteoglycan syndecan-1 (CD138) in delayed-type hypersensitivity. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 182(8):4985–4993.
- Kim CW, Goldberger OA, Gallo RL, Bernfield M. 1994. Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. *Molecular biology of the cell*, 5(7):797–805.
- Kliment CR, Oury TD. 2011. Extracellular superoxide dismutase protects cardiovascular syndecan-1 from oxidative shedding. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(9):1075–1080.
- Kollef MH. 2000. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases*, 31 Suppl

4:S131–8.

- Koperna T, Schulz F. 2000. Relaparotomy in peritonitis: prognosis and treatment of patients with persisting intraabdominal infection. *World journal of surgery*, 24(1):32–37.
- Kox WJ, Bone RC, Krausch D, Döcke WD, Kox SN, Wauer H, Egerer K, Querner S, Asadullah K, von Baehr R, Volk HD. 1997. Interferon gamma-1b in the treatment of compensatory anti-inflammatory response syndrome. A new approach: proof of principle. *Archives of internal medicine*, 157(4):389–393.
- Kozar RA, Peng Z, Zhang R, Holcomb JB, Pati S, Park P, Ko TC, Paredes A. 2011. Plasma restoration of endothelial glycocalyx in a rodent model of hemorrhagic shock. *Anesthesia and analgesia*, 112(6):1289–1295.
- Krepstakies M, Lucifora J, Nagel CH, Zeisel MB, Holstermann B, Hohenberg H, Kowalski I, Gutschmann T, Baumert TF, Brandenburg K, Hauber J, Protzer U. 2012. A New Class of Synthetic Peptide Inhibitors Block Attachment and Entry of Human Pathogenic Viruses. *The Journal of Infectious Diseases*, 205(11):1654–1664.
- Kresken M, Hafner D, Schmitz F, Wichelhaus T, Studiengruppe F. 2009. Resistenzsituation bei klinisch wichtigen Infektionserregern gegenüber Antibiotika in Deutschland und im mitteleuropäischen Raum. *Antiinfectives Intelligence*, Rheinbach.
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*, 34(6):1589–1596.
- Landry DW, Oliver JA. 2001. The pathogenesis of vasodilatory shock. *New England Journal of Medicine*, 345(8):588–595.

- Lee WL, Slutsky AS. 2010. Sepsis and endothelial permeability. *New England Journal of Medicine*, 363(7):689–691.
- Leng FY, Liu JL, Liu ZJ, Yin JY, Qu HP. 2012. Increased proportion of CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells during the early-stage sepsis in ICU patients. *Journal of microbiology, immunology, and infection*.
- Li JP, Vlodavsky I. 2009. Heparin, heparan sulfate and heparanase in inflammatory reactions. *Thrombosis and haemostasis*, 102(5):823–828.
- Li RW, Freeman C, Yu D, Hindmarsh EJ, Tymms KE, Parish CR, Smith PN. 2008. Dramatic regulation of heparanase activity and angiogenesis gene expression in synovium from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 58(6):1590–1600.
- Lipowsky HH. 2005. Microvascular rheology and hemodynamics. *Microcirculation*, 12(1):5–15.
- Mammen EF. 1998. Antithrombin III and sepsis. *Intensive Care Medicine*, 24(7):649–650.
- Marechal X, Favory R, Joulin O, Montaigne D, Hassoun S, Decoster B, Zerimech F, Nevriere R. 2008. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Current Opinion in Lipidology*, 29(5):572–576.
- Meyer K. 2002. Inflammation and surfactant. *Paediatric respiratory reviews*, 3(4):308–314.
- Moerer O, Burchardi H. 2006. The cost of sepsis. *Anaesthesist*, 55 Suppl 1:36–42.
- Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistolic J, Powers JP, Bryan J, Brinkman FS, Hancock RE. 2006. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 176(4):2455–2464.

- Morrison DC. 1998. Antibiotic-mediated release of endotoxin and the pathogenesis of gram-negative sepsis. *Progress in clinical and biological research*, 397:199–207.
- Mülhardt C. 2009. *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*. Spektrum Akademischer Verlag.
- Nagaoka I, Hirota S, Niyonsaba F, Hirata M, Adachi Y, Tamura H, Heumann D. 2001. Cathelicidin family of antibacterial peptides CAP18 and CAP11 inhibit the expression of TNF- α by blocking the binding of LPS to CD14 $^{+}$ cells. *The Journal of Immunology*, 167(6):3329–2228.
- Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. 2008. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock*, 30(6):623–627.
- Noble MIM, Drake-Holland AJ, Vink H. 2008. Hypothesis: arterial glycocalyx dysfunction is the first step in the atherothrombotic process. *Quarterly journal of medicine (QJM)*, 101(7):513–518.
- O'Neill R, Morales J, Jule M. 2012. Early Goal-directed Therapy (EGDT) for Severe Sepsis/Septic Shock: Which Components of Treatment are More Difficult to Implement in a Community-based Emergency Department? *The Journal of emergency medicine*, 42(5):503–510.
- Pan CY, Chao TT, Chen JC, Chen JY, Liu WC, Lin CH, Kuo CM. 2007. Shrimp (*Penaeus monodon*) anti-lipopolysaccharide factor reduces the lethality of *Pseudomonas aeruginosa* sepsis in mice. *International immunopharmacology*, 7(5):687–700.
- Parish CR. 2006. The role of heparan sulphate in inflammation. *Nature reviews Immunology*, 6(9):633–643.
- Park PW, Foster TJ, Nishi E, Duncan SJ, Klagsbrun M, Chen Y. 2004. Activation of syndecan-1 ectodomain shedding by *Staphylococcus aureus* α -toxin and

- beta-toxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(1):251–258.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, 30(9):e36.
- Pries AR, Kuebler WM. 2006. Normal endothelium. *Handbook of experimental pharmacology*, (176 Pt 1):1–40.
- Raman R, Sasisekharan V, Sasisekharan R. 2005. Structural insights into biological roles of protein-glycosaminoglycan interactions. *Chemistry & Biology*, 12(3):267–277.
- Ramasamy S, Lipke DW, McClain CJ, Hennig B. 1995. Tumor necrosis factor reduces proteoglycan synthesis in cultured endothelial cells. *Journal of cellular physiology*, 162(1):119–126.
- Rapraeger A, Bernfield M. 1985. Cell surface proteoglycan of mammary epithelial cells. Protease releases a heparan sulfate-rich ectodomain from a putative membrane-anchored domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(7):4103–4109.
- Rapraeger A, Jalkanen M, Endo E, Koda J, Bernfield M. 1985. The cell surface proteoglycan from mouse mammary epithelial cells bears chondroitin sulfate and heparan sulfate glycosaminoglycans. *The Journal of Biological Chemistry*, 260(20):11046–11052.
- Reinhart K. 2007. S2-Leitlinie Diagnose und Therapie der Sepsis. Georg Thime Verlag KG.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Grundling M, John S, Kern W, Kreymann G, Kruger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Seifert H, Spies C, Stuber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T. 2010. Prevention, diagnosis, the-

- rapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). German medical science : GMS e-journal, 8:Doc14.
- Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MAMJ, Egbrink MGAo. 2007. The endothelial glycocalyx: composition, functions, and visualization. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, 454(3):345–359.
- Ried C, Wahl C, Miethke T, Wellnhofer G, Landgraf C, Schneider-Mergener J, Hoess A. 1996. High affinity endotoxin-binding and neutralizing peptides based on the crystal structure of recombinant Limulus anti-lipopolysaccharide factor. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(45):28120–28127.
- Rops AL, van der Vlag J, Lensen JF, Wijnhoven TJ, van den Heuvel, L P, van Kuppevelt TH, Berden JH. 2004. Heparan sulfate proteoglycans in glomerular inflammation. *Kidney International*, 65(3):768–785.
- Rosenfeld Y, Shai Y. 2006. Lipopolysaccharide (Endotoxin)-host defense antibacterial peptides interactions: role in bacterial resistance and prevention of sepsis. *Biochimica et biophysica acta*, 1758(9):1513–1522.
- Rothlein R, Mainolfi E. 1991. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 147(11):3788–3793.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350–1354.
- Sanderson RD, Børset M. 2002. Syndecan-1 in B lymphoid malignancies. *Annals of hematology*, 81(3):125–135.
- Sarrazin S, Bonnaffe D, Lubineau A, Lortat-Jacob H. 2005. Heparan sulfate mimicry: a synthetic glycoconjugate that recognizes the heparin binding domain

- of interferon-gamma inhibits the cytokine activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(45):37558–37564.
- Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. 2004. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nature Immunology*, 5(4):393–400.
- Schmidig D, Raimondi S, Meier H, Giambarba C. 2011. Polymyxin-B-Hämoperfusion bei septischem Schock. *Schweiz Med Forum*, 11(9):160–162.
- Schottmüller H. 1914. Wesen und Behandlung der Sepsis. *InnMed*, 31:257–280.
- Schuerholz T, Brandenburg K, Marx G. 2012. Antimicrobial peptides and their potential application in inflammation and sepsis. *Critical Care*, 16(2):207.
- Skarnes RC, Watson DW. 1957. Antimicrobial factors of normal tissues and fluids. *Bacteriological reviews*, 21(4):273–294.
- Squire JM, Chew M, Nneji G, Neal C, Barry J, Michel C. 2001. Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering? *Journal of structural biology*, 136(3):239–255.
- Stanford KI, Bishop JR, Foley EM, Gonzales JC, Niesman IR, Witztum JL, Esko JD. 2009. Syndecan-1 is the primary heparan sulfate proteoglycan mediating hepatic clearance of triglyceride-rich lipoproteins in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 119(11):3236–3245.
- Steinstraesser L, Kraneburg UM, Hirsch T, Kesting M, Steinau HU, Jacobsen F, Al-Benna S. 2009. Host defense peptides as effector molecules of the innate immune response: a sledgehammer for drug resistance? *International journal of molecular sciences*, 10(9):3951–3970.
- Teng YH, Aquino RS, Park PW. 2012. Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix biology: journal of the International Society for Matrix Biology*, 31(1):3–16.
- Tsutsumi C. 2003. The critical role of ocular-infiltrating macrophages in the develop-

- ment of choroidal neovascularization. *Journal of Leukocyte Biology*, 74(1):25–32.
- Tufvesson E, Westergren-Thorsson G. 2000. Alteration of proteoglycan synthesis in human lung fibroblasts induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *Journal of cellular biochemistry*, 77(2):298–309.
- Vanhoutte D, Schellings MW, Gotte M, Swinnen M, Herias V, Wild MK, Vestweber D, Chorianopoulos E, Cortes V, Rigotti A, Stepp MA, Van de Werf F, Carmeliet P, Pinto YM, Heymans S. 2007. Increased expression of syndecan-1 protects against cardiac dilatation and dysfunction after myocardial infarction. *Circulation*, 115(4):475–482.
- Vlodavsky I, Beckhove P, Lerner I, Pisano C, Meirovitz A, Ilan N, Elkin M. 2011. Significance of Heparanase in Cancer and Inflammation. *Cancer microenvironment*, 5(2):115–132.
- Vlodavsky I, Friedmann Y, Elkin M, Aingorn H, Atzmon R, Ishai-Michaeli R, Bitan M, Pappo O, Peretz T, Michal I, Spector L, Pecker I. 1999. Mammalian heparanase: gene cloning, expression and function in tumor progression and metastasis. *Nature Medicine*, 5(7):793–802.
- Wacha H, Hau T, Dittmer R, Ohmann C. 1999. Risk factors associated with intraabdominal infections: a prospective multicenter study. *Peritonitis Study Group. Langenbeck's archives of surgery*, 384(1):24–32.
- Wang HE, Gamboa C, Warnock DG, Muntner P. 2011. Chronic kidney disease and risk of death from infection. *American journal of nephrology*, 34(4):330–336.
- Wang P, Wu P, Anthes JC, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. 1994. Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils. *Blood*, 83(9):2678–2683.
- Waterman M, Ben-Izhak O, Eliakim R, Groisman G, Vlodavsky I, Ilan N. 2007. Heparanase upregulation by colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Modern pathology*, 20(1):8–14.

- Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. 1980. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. *The Journal of surgical research*, 29(2):189–201.
- Williams TJ, Hellewell PG. 1992. Endothelial cell biology. Adhesion molecules involved in the microvascular inflammatory response. *The American review of respiratory disease*, 146:S45–50.
- Worapamorn W, Haase HR, Li H, Bartold PM. 2001. Growth factors and cytokines modulate gene expression of cell-surface proteoglycans in human periodontal ligament cells. *Journal of cellular physiology*, 186(3):448–456.
- Xu J, Park PW, Kheradmand F, Corry DB. 2005. Endogenous attenuation of allergic lung inflammation by syndecan-1. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950), 174(9):5758–5765.
- Young SH, Antonini JM, Roberts JR, Erdely AD, Zeidler-Erdely, P C. 2008. Performance evaluation of cytometric bead assays for the measurement of lung cytokines in two rodent models. *Journal of immunological methods*, 331(1-2):59–68.
- Zanotti S, Kumar A, Kumar A. 2002. Cytokine modulation in sepsis and septic shock. *Expert opinion on investigational drugs*, 11(8):1061–1075.

A Danksagung

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Gernot Marx danke ich für die Möglichkeit der Promotion an seiner Klinik und die damit verbundene Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Arbeitsgruppenleiter Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Schürholz für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit selbstständiges wissenschaftliches Arbeiten zu erlernen. Seine Betreuung, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft während der gesamten Arbeit reichte weit über das normale Maß hinaus. Er stand mir jederzeit mit seiner fachlichen und persönlichen Kompetenz zur Seite.

Prof. Dr. rer. nat. Klaus Brandenburg, FZ Borstel, danke ich für die Überlassung des synthetischen Peptids 19.2-5.

Frau Sabine Dömming danke ich für die Einführung in das Thema und die engagierte Betreuung der Laborarbeiten.

Mein Dank gilt weiter allen Mitarbeitern des Labors, die zu einer produktiven Arbeitsatmosphäre beitrugen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben, sowie meiner ganzen Familie und meinen Freunden, die mich in dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

B Erklärung zur Datenaufbewahrung

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten bei meinem Betreuer, Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Schürholz, Klinik für Operative Intensivmedizin und Intermediate Care (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Gernot Marx), am Universitätsklinikum Aachen, hinterlegt sind.

C Erklärung über den Eigenanteil

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 10 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Herr Lukas Benjamin Martin an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Der Einfluss des synthetisch hergestellten antimikrobiellen Peptids 19.2-5 auf die Expression von Heparanase, Syndekan-1 und Perlekan in einem murinen Sepsismodell“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe:

Durchführung sämtlicher dargestellter Experimente sowie deren statistische Auswertung mit Ausnahme der unmittelbaren Tierversuche und Organ-/Blutentnahmen.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Dankagung angegeben sind:

A. Frau Sabine Dömming für die Organ-/Blutentnahmen und die engagierte Einweisung und Überwachung der Laborarbeiten.

B. Prof. Dr. rer. nat. Klaus Brandenburg, FZ Borstel für die Überlassung des synthetischen Peptids 19.2-5.

C. Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Schürholz für Studiendesign und Überwachung, Unterstützung beim Primerdesign, Korrektur der Dissertation.

Lukas Benjamin Martin

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Herrn Lukas Benjamin Martin.

Priv.-Doz. Dr. med. Tobias Schürholz