

PI3K γ als ein Mediator der septischen Enzephalopathie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Ingenieur und Master of Engineering

Adrian Frister

geboren am 16.11.1980 in Großröhrsdorf

Gutachter:

1. Prof. Dr. Reinhard Wetzker (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
2. Prof. Dr. Michael Bauer (Friedrich-Schiller-Universität Jena)
3. Prof. Dr. Harald Loppnow (Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg)

Datum der öffentlichen Disputation: 16.02.2016

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Zusammenfassung	VI
Abstract.....	VIII
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis	XII
Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen.....	XIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Aktuelle Vorstellungen zur Pathogenese der Sepsis	1
1.1.1. Reaktionen des angeborenen Immunsystems.....	1
1.1.2. Begriffsdefinitionen zu SIRS und Sepsis	4
1.1.3. Tiermodelle zur Untersuchung systemischer Entzündungsreaktionen <i>in vivo</i> ...	6
1.2. Aktuelle Vorstellungen zur Pathogenese der septischen Enzephalopathie	8
1.3. Das zentrale Nervensystem und die Blut-Hirn-Schranke	12
1.3.1. Zelluläre Komponenten des ZNS.....	12
1.3.2. Aufbau und Funktion der BHS	15
1.4. Die Rolle von MMP bei akuter Neuroinflammation.....	19
1.5. Die Phosphoinositid-3-Kinasen der Klasse I	23
1.5.1. Einteilung und Funktionen der Phosphoinositid-3-Kinasen	23
1.5.2. Funktionen von PI3K γ	25
1.6. Zielstellung der Arbeit	29
2. Materialien und Methoden.....	31
2.1. Verwendete Materialien und Versuchstiere	31
2.1.1. Chemikalien	31
2.1.2. Puffer und Lösungen	31
2.1.3. Inhibitoren und Agonisten.....	31
2.1.4. Tiere und Primärzellen	32
2.2. Methoden.....	33

2.2.1.	Kultivierung von Mikroglia und BV2-Zellen	33
2.2.2.	Präparation von primären Mikroglia	33
2.2.3.	Posttranskriptionale Geninaktivierung von p110 γ mittels RNA-Interferenz... 34	34
2.2.4.	Tierexperimentelles Modell zur Induktion eines SIRS	34
2.2.5.	Quantifizierung der BHS-Permeabilität	35
2.2.6.	Beurteilung der Morbidität	35
2.2.7.	Histologie und Immunhistochemie	36
2.2.8.	Immunzytochemie	38
2.2.9.	Western Blot	39
2.2.10.	Zymographie	42
2.2.11.	MMP-2/-9-Aktivitäts-Assay	42
2.2.12.	Quantifizierung von cAMP	43
2.2.13.	RNA-Präparation und quantitative <i>real-time</i> PCR	43
2.2.14.	Statistische Auswertungen	45
3.	Ergebnisse	46
3.1.	Der Verlust von PI3K γ erhöht die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke.....	46
3.2.	Der Verlust von PI3K γ führt zu einer erhöhten MMP-Expression im Hirngewebe	50
3.2.1.	Nachweis von MMP im Hirngewebe von Mäusen	50
3.2.2.	Residente Immunzellen produzieren MMP im Gehirn	52
3.3.	Der Verlust von PI3K γ in Mikroglia bewirkt eine Erhöhung der MMP- Sezernierung infolge einer LPS-Stimulation	56
3.3.1.	Die LPS-Stimulation von Mikroglia erhöht die Expression von PI3K γ	56
3.3.2.	Erhöhte cAMP-Konzentration und verstärkte CREB-Phosphorylierung in PI3K γ -KO-Mikroglia	57
3.3.3.	Erhöhte LPS-induzierte mRNA-Expression von MMP beim PI3K γ -KO.....	58
3.3.4.	Erhöhte CREB-Phosphorylierung und verstärkte Expression von MMP-mRNA in BV2 nach dem <i>Knockdown</i> von p110 γ	59
3.3.5.	Modulation des cAMP-PKA-Signalweges beeinflusst die MMP-mRNA- Expression	62
3.3.6.	Erhöhte MMP-Expression in PI3K γ -KO-Mikroglia	65
3.3.7.	Erhöhte MMP-Aktivität in den Kulturüberständen von PI3K γ -KO-Mikroglia	67

3.3.8.	Aktivierung von cAMP führt zu verstärkter Produktion von MMP-9 durch BV2	69
3.3.9.	Zusammenfassung der <i>in-vitro</i> -Daten	72
4.	Diskussion	73
4.1.	Entwicklung einer systemischen Entzündungsreaktion durch LPS	73
4.2.	LPS-induzierte Schädigung der BHS	75
4.3.	Verminderung der BHS-Integrität durch MMP aus Mikroglia	79
4.4.	Der Verlust von PI3K γ führt zu erhöhter MMP-Expression in Mikroglia	83
4.5.	Die Phosphodiesterase-Aktivität hat Einfluss auf die Expression von MMP durch Mikroglia	88
4.6.	Zusammenfassung und Ausblick	90
	Literaturverzeichnis	93
	Lebenslauf.....	108
	Publikationen	109
	Danksagung	110
	Eidesstattliche Erklärung.....	111

Zusammenfassung

Die septische bzw. sepsis-assoziierte Enzephalopathie (SE) ist eine häufig auftretende frühe Organmanifestation einer systemischen Entzündungsreaktion durch Infektion des Säugetierorganismus. Sie äußert sich beim Menschen initial in Form von Wahrnehmungs- und Konzentrationsstörungen, die progredient sein können bis hin zu Stupor, Delirium und Koma. Der Verlust der Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) infolge der verstärkten Aktivität von Matrixmetalloproteasen (MMP) spielt eine entscheidende Rolle während der frühen Pathogenese der SE. Durch die gestörte BHS-Funktion, verstärkten Übertritt pro-inflammatorischer Zytokine aus dem Blut und Invasion aktivierter Leukozyten kommt es zu einer gesteigerten neuroinflammatorischen Aktivität und Aktivierung der Mikroglia-Zellen als residenten immunkompetenten Zellen des Gehirns. Daneben ist die durch pro-inflammatorische Zytokine verursachte afferente Signalvermittlung über den *Nervus vagus* bei peripherer Inflammation bedeutsam. Ferner kann auch ein Eintritt pro-inflammatorischer Mediatoren an den zirkumventrikulären Organen des Gehirns, die keine BHS ausbilden, lokal zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine und Diffusion in das Hirnparenchym führen. Insgesamt bewirken diese Vorgänge eine gesteigerte neuroinflammatorische Aktivität, die neuronale Funktionen entscheidend beeinflusst und so zu Wahrnehmungs- und Konzentrationsstörungen führt. Außerdem kann es aufgrund der gestörten BHS-Funktion zur Bildung eines Hirnödems und der Auslösung pro-apoptotischer Veränderungen im Hirnparenchym kommen, die zum Verlust neuronaler Zellen führen können.

Das Signalmolekül PI3K γ wird unter anderem von Immunzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle inflammatorischer Reaktionen. Der Einfluss von PI3K γ auf die Entwicklung der septischen Enzephalopathie, insbesondere auf die Integrität der BHS, war bislang nicht bekannt und wurde deshalb in einem *in-vivo*-Modell untersucht. Als mechanistisches Modell für ein systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) als initialer überschießender Wirtsreaktion bei der Pathogenese einer Sepsis wurde eine intraperitoneale Injektion von Lipopolysaccharid (LPS, 10 mg/kg KG) angewandt. Es wurden drei Mausstämme verwendet, die sich in

der Expression der katalytischen PI3K γ -Untereinheit p110 γ unterscheiden. Der C57BL6/J-Wildtyp-Stamm verfügt über die natürliche Variante von p110 γ , während im PI3K γ -KO-Stamm die Expression genetisch deaktiviert ist. Der PI3K γ -KD-Stamm exprimiert eine kinase-inaktive p110 γ -Mutante.

In Tieren des PI3K γ -KO-Stammes kam es infolge der LPS-Injektion zu einer im Vergleich zum Wildtyp und zum PI3K γ -KD-Stamm erhöhten BHS-Permeabilität für Plasmaproteine als Merkmal einer gestörten BHS-Integrität, die auf eine verstärkte MMP-Expression durch Mikroglia zurückgeführt werden konnte. Bei *in-vitro*-Untersuchungen an primären Mikroglia-Zellen, die aus Gehirnen von PI3K γ -KO-Mäusen gewonnen wurden, war im Vergleich zu Mikroglia aus Wildtyp- bzw. PI3K γ -KD-Mäusen eine verstärkte LPS-induzierte MMP-Expression und -Aktivität nachweisbar. Weitere Hinweise auf den Einfluss der kinase-unabhängigen Funktion der PI3K γ auf die cAMP-Konzentration und damit auf die Expression von MMP, insbesondere MMP-9, konnten mit Hilfe der pharmakologischen Beeinflussung der PDE-Funktion und des cAMP-PKA-Signalweges gewonnen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit haben gezeigt, dass die kinase-unabhängige Funktion von PI3K γ durch Moderation der mikroglialen MMP-9 Produktion entscheidend an der LPS-induzierten Störung der BHS bei SIRS-induzierter SE beteiligt ist. Diese Ergebnisse bestätigen und erweitern aktuelle Resultate über regulatorische Auswirkungen von PI3K γ auf die cAMP-abhängige Signaltransduktion in Zellen des Immunsystems.

Abstract

Sepsis associated or septic encephalopathy (SE) is a frequent complication of a systemic inflammation caused by severe infection. Initial symptoms in patients are cognitive and perceptive deficiencies and may progress to delirium, stupor or coma. Loss of blood brain barrier (BBB) integrity as a consequence of increased matrix metalloprotease (MMP) activity is an important aspect during the pathogenesis of SE. Disturbed BBB function, increased influx of pro-inflammatory cytokines from the blood compartment and invasion of activated leukocytes trigger an increased neuroinflammatory activity and activation of microglia as the local immunocompetent cells of the central nervous system. Additionally, afferent signaling via the *nervus vagus* stimulated by pro-inflammatory cytokine release in peripheral inflammation due to abdominal and visceral infection is of importance. Furthermore permeation of pro-inflammatory mediators at the brain's circumventricular organs, which do not possess a BBB, activates the release of pro-inflammatory cytokines and their diffusion into brain parenchyma. Overall these processes result in an increased neuroinflammatory response crucially affecting neuronal function, thus resulting in cognitive and perceptive deficiencies. Additionally the disturbed BBB function may cause brain edema and activation of pro-apoptotic alterations in brain parenchyma, resulting in loss of neuronal cells.

The signaling molecule PI3K γ is mainly expressed in immune cells and is involved in controlling inflammatory reactions. The influence of PI3K γ in the pathogenesis of SE, especially concerning BBB integrity, was unknown and has been investigated in an *in vivo* model. The mechanistic model of a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) used for this investigation was the intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (LPS, 10 mg/kg body weight). Three mouse strains on the C57BL6/J background differing in expression of the catalytic PI3K γ subunit p110 γ were utilized. The wildtype strain possesses the natural version of p110 γ , while its expression is genetically deactivated in the PI3K γ -KO-strain. The PI3K γ -KD-strain has a kinase-inactive p110 γ .

In comparison to animals of the wildtype- and PI3K γ -KD-strain animals of the PI3K γ -KO-strain after LPS injection showed an increased BBB permeability for plasma

proteins, an indicator of BBB impairment. This loss of BBB integrity was attributed to an enhancement of MMP expression by microglia. *In vitro* investigations using primary microglia showed an increased LPS-induced MMP expression and activity in cultures of microglia obtained from mice of the PI3K γ -KO-strain in comparison to cells from wildtype- and PI3K γ -KD-strain. Additional evidence of the PI3K γ kinase independent function to influence cAMP and in this way the expression of MMP, especially MMP-9, was found by pharmacologic inhibition of PDE function and cAMP-PKA-signaling.

The data presented in this thesis elucidate the kinase independent function of PI3K γ as a crucial mediator in the pathogenesis of SE in LPS-induced SIRS by moderating the microglial production of MMP-9. These results confirm and extend recent findings regarding the regulatory functions of PI3K γ on cAMP-dependent signaling in cells of the immune system.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklung einer septischen Enzephalopathie	9
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke.....	17
Abbildung 3: Aktivierung des Zymogens von MMP-1	20
Abbildung 4: Kaskade der MMP-Aktivierung	21
Abbildung 5: Übersicht über <i>Scaffold</i> - und Kinase-Funktion von PI3K γ	28
Abbildung 6: Der Verlust von PI3K γ führte zu erhöhter BHS-Permeabilität in Mäusen	46
Abbildung 7: Die LPS-Injektion führte zur Erhöhung des CSS und zu Gewichtsverlust der Mäuse	48
Abbildung 8: Erhöhte BHS-Permeabilität 4 h nach LPS-Injektion	49
Abbildung 9: Nachweis von p110 γ im Gewebe des Großhirns von Mäusen	50
Abbildung 10: Nachweis von MMP-9 im Großhirn von Mäusen	51
Abbildung 11: Nachweis von MMP-2 und MMP-13 im Großhirn von Mäusen.....	51
Abbildung 12: Iba-1-positive Zellen exprimieren MMP-9.....	54
Abbildung 13: Mikroglia exprimieren MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13	55
Abbildung 14: Erhöhte Expression von PI3K γ in Mikroglia nach LPS-Stimulation.....	56
Abbildung 15: Höhere cAMP-Konzentration in PI3K γ -KO-Mikroglia	57
Abbildung 16: Erhöhte Phosphorylierung von CREB in PI3K γ -KO-Mikroglia.....	58
Abbildung 17: Das Fehlen von PI3K γ führt zu einer Erhöhung der LPS-induzierten mRNA-Expression von MMP-2, MMP-9 und MMP-13	59
Abbildung 18: Erhöhte CREB-Phosphorylierung in p110 γ -shRNA exprimierenden BV2-Zellen.....	60
Abbildung 19: p110 γ -shRNA in BV2-Zellen führt zu erhöhter LPS-induzierter mRNA- Expression verschiedener MMP.....	61
Abbildung 20: Manipulation des cAMP-PKA-Signalweges beeinflusst die LPS- induzierte Expression von mRNA für MMP-9 und MMP-13.....	62
Abbildung 21: Die Inhibition der PDE-Aktivität erhöht die LPS-induzierte Expression von mRNA für MMP-9 und MMP-13	63
Abbildung 22: MMP-mRNA-Expression in unstimulierten BV2-Zellen.....	64

Abbildung 23: MMP-mRNA-Expression in unstimulierten Mikroglia.....	64
Abbildung 24: Expression von MMP-9 und MMP-2 in Mikroglia 3 h nach einer LPS- Stimulation	65
Abbildung 25: Erhöhte Expression von MMP-9 und MMP-13 in PI3K γ -KO-Mikroglia	66
Abbildung 26: Verstärkte MMP-9-Sezernierung in den Kulturüberstand von PI3K γ -KO- Mikroglia.....	68
Abbildung 27: Verstärkte MMP-9-Sezernierung in den Kulturüberstand von p110 γ - shRNA exprimierenden BV2	70
Abbildung 28: Aktivierung der Adenylatzyklase bzw. Inhibition von PDE erhöht die MMP-9-Sezernierung in LPS-behandelten BV2-Zellen	71
Abbildung 29: Modell des moderierenden Einflusses von PI3K γ auf die MMP- Expression	87
Abbildung 30: Möglicher Wirkmechanismus der kinase-unabhängigen Funktion von PI3K γ zur Reduzierung der MMP-9-Expression in Mikroglia.	91

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inhibitoren und Agonisten	32
Tabelle 2: Einteilung der CSS-Grade	36
Tabelle 3: Antikörper für die Immunhisto- und Immunocytochemie.....	37
Tabelle 4: Zusammensetzung für ein SDS-PAGE-Gel.....	40
Tabelle 5: Für die Western-Blot-Analyse verwendete Antikörper.....	41
Tabelle 6: Sequenzen der für die RT-qPCR verwendeten Primer	44
Tabelle 7: Verstärkte MMP-9-Expression im Hirngewebe LPS-behandelter Mäuse.....	52
Tabelle 8: MMP-9-positive PMN in Hirnschnitten	53
Tabelle 9: Erhöhte MMP-2/-9-Aktivität in den Kulturüberständen von PI3K γ -KO- Mikroglia	69

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

ACh	Azetylcholin
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
APS	Ammoniumpersulfat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Rinderserum-Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
CARS	kompensatorisches anti-inflammatorisches Response-Syndrom
CREB	cAMP-Response-Element-bindendes Protein
CSS	klinischer Schweregrad (<i>clinical severity score</i>)
CVO	zirkumventrikuläre Organe (<i>circumventricular organs</i>)
DAMP	schaden-assoziierte molekulare Muster (<i>damage-associated molecular patterns</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
ICC	Immunzytochemie (<i>immunocytochemistry</i>)
IHC	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin-1 (andere Interleukine analog, wie: IL-6 – Interleukin-6)
IL-1RA	IL-1-Rezeptorantagonist
KD	<i>kinase-dead</i> (PI3K γ -KD-Stamm exprimiert kinase-inaktive PI3K γ)
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
KO	<i>Knockout</i> (PI3K γ -KO-Stamm exprimiert PI3K γ nicht)
Ktrl-shRNA	ungerichtete Kontroll-shRNA
LPS	Lipopolysaccharid (Endotoxin gram-negativer Bakterien)
MMP	Matrixmetalloproteasen
MPO	Myeloperoxidase

Verzeichnis häufig verwendeter Abkürzungen

OD	optische Dichte
PAMP	pathogen-assoziierte molekulare Muster (<i>pathogen associated molecular patterns</i>)
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDE	Phosphodiesterasen
PEI	Polyethylenimin
PIP ₃	Phosphoinositid-3,4,5-triphosphat
PKA	Proteinkinase A
PMN	polymorph-nukleäre Leukozyten
PRR	Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (<i>pathogene recognition receptors</i>)
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RT-qPCR	quantitative <i>real-time</i> Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies (<i>reactive oxygen species</i>)
RNS	reaktive Stickstoff-Spezies (<i>reactive nitrogen species</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE	septische Enzephalopathie
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SGP	Sammelgelpuffer
SIRS	systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TBS/T	TBS mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGF- β	<i>transforming growth factor</i> β
TGP	Trenngelpuffer
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i> (beispielsweise: TLR4 – <i>toll like receptor</i> 4)
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
us	unstimuliert
ZNS	zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Aktuelle Vorstellungen zur Pathogenese der Sepsis

1.1.1. Reaktionen des angeborenen Immunsystems

Die Auseinandersetzung mit Pathogenen, welche durch die Infektion und Besiedlung eines Wirts dessen physiologischen Funktionen stören und Krankheiten auslösen können, hat im Laufe der Evolution in höheren Lebewesen zur Ausbildung eines Immunsystems zur Abwehr solcher Krankheitserreger geführt. Das Immunsystem von Säugetieren kann in zwei wesentliche Komponenten unterteilt werden, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie der Immunabwehr gegen eine Infektion dar. Darauf aufbauend ist das adaptive Immunsystem ein wesentlicher Bestandteil der Immunabwehr und kann durch eine Anpassung an Pathogene und deren Wiedererkennung eine erregerspezifische Abwehr ermöglichen (Schmidt *et al.* 2005). Der Fokus der vorliegenden Arbeit liegt auf Reaktionen des angeborenen Immunsystems, weshalb hier auf die detaillierte Erörterung der Funktionen des adaptiven Immunsystems nicht näher eingegangen werden soll. Das angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen Hauptkomponenten. Zunächst dienen epidermale, dermale und mucosale Barrieren zur Abgrenzung des Organismus gegenüber seiner Umwelt und sind die erste Hürde, die ein Pathogen überwinden muss. Es existieren mechanische und chemische Barrieren, die ein Eindringen erschweren. Daneben gibt es Mechanismen zum Ausschleusen eingedrungener Organismen (Aumüller 2007, Schmidt *et al.* 2005). Ein Beispiel ist die Bindung durch Schleim und der Transport durch Flimmerhärchen aus den Atemwegen. Zudem behindert die natürliche Besiedlung mit Organismen der Normalflora, beispielsweise auf der Haut oder im Darm ein Wachstum von Pathogenen. Ein zweiter Bestandteil der angeborenen Immunität sind humorale Komponenten. Hierzu gehören die Proteine des Komplementsystems, die eine Opsonisierung von Pathogenen anhand bestimmter universaler Oberflächenstrukturen bewirken. Dadurch werden eine chemotaktische Aktivierung von Immunzellen und die Phagozytose der Partikel

induziert. Die Komplementfaktoren des Membranangriffskomplexes können durch die Einlagerung in die Zellmembran einer Zielzelle und die Bildung von Poren die Zelllyse herbeiführen. Eine weitere wichtige Komponente der humoralen Abwehr ist das Lysozym, welches die Oberflächenstrukturen von Bakterien angreift. Durch die Aktivierung der Komplementkaskade wird zudem eine Immunreaktion ausgelöst, in deren Folge Signalproteine, wie Zytokine, sowie die Akut-Phase-Proteine ausgeschüttet werden. Die dritte Komponente des angeborenen Immunsystems sind die Zellen des Systems. Dazu gehören unter anderem Immunzellen wie Monozyten, Granulozyten, natürliche Killerzellen und Makrophagen. Zellen des Immunsystems sind in der Lage, pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP) mit Hilfe eines Spektrums an Pathogen-Erkennungs-Rezeptoren (*pathogen recognition receptors* – PRR) zu detektieren. Es existieren verschiedene PRR, die an entsprechende konservierte Strukturen unterschiedlicher Pathogene binden (Takeuchi & Akira 2010). Zu solchen PAMP-Strukturen gehören unter anderem Zellwandbestandteile von Bakterien, wie das über den *Toll-Like-Rezeptor 4* (TLR4) detektierte Endotoxin Lipopolysaccharid (LPS) gram-negativer Bakterien oder Lipoteichonsäuren aus den Zellwänden gram-positiver Bakterien, die mit dem TLR2 erkannt werden. Weitere durch TLR detektierbare PAMP-Strukturen sind beispielsweise spezifische Nukleinsäure-Sequenzen. Die TLR bilden eine Familie der PRR. Sie sind in der Lage, den extrazellulären Raum, Lysosomen und Endosomen zu überwachen und als Reaktion auf Pathogene oder deren Bestandteile eine unspezifische Immunantwort auszulösen. Die Erkennung von Pathogenen durch TLR spielt auch bei der Aktivierung von Zellen des adaptiven Immunsystems eine wichtige Rolle (de Jong *et al.* 2010).

Die Eliminierung von Krankheitserregern durch die Zellen des angeborenen Immunsystems erfolgt durch die Freisetzung verschiedener Enzyme und reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) bzw. reaktiver Stickstoff-Spezies (RNS), durch welche Zellstrukturen angegriffen werden, sowie durch die Phagozytose und den intrazellulären Verdau von Pathogenen und deren Bestandteilen (Schmidt *et al.* 2005). Die Aktivierung von Immunzellen durch PAMP führt zu einer Freisetzung von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, um weitere Komponenten des Immunsystems zu aktivieren bzw. zu rekrutieren. Dadurch kommt es zu einer lokalen Entzündungsreaktion in der Umgebung des Infektionsherdes. Zusätzlich kann aufgrund einer Freisetzung von schaden-assoziierten Molekülen (*damage-associated molecular*

pattern molecules – DAMP) durch geschädigte oder unter Stress stehende Zellen die Immunreaktion verstärkt werden. Hauptursache für die Entstehung einer Entzündungsreaktion infolge einer Infektion sind die Reaktionen des angeborenen Immunsystem (Takeuchi & Akira 2010). Um exzessive Entzündungsreaktionen zu vermeiden, die Zellen und Gewebe schädigen können, ist eine präzise Regulierung der Immunreaktion erforderlich. Ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mechanismen ist notwendig, um die Entzündungsreaktion zu begrenzen und im Anschluss den physiologischen Normalzustand wiederherzustellen.

Wird beispielsweise infolge einer Infektion die Immunantwort des Organismus derart massiv erhöht, dass aus einer lokal begrenzten Reaktion eine systemische Entzündungsreaktion hervorgeht, spricht man von einer Sepsis. Historisch wurde davon ausgegangen, dass die klinische Symptomatik der Sepsis auf die direkte Wirkung der infizierenden Mikroorganismen zurückzuführen sei. Im Verlauf des 20. Jahrhunderts wurde jedoch festgestellt, dass das klinische Krankheitsbild in erster Linie durch die Immunantwort des Patienten ausgelöst wird. Die Kriterien für die Diagnose einer Sepsis wurden 1991 auf einer Konsensuskonferenz festgelegt (Bone *et al.* 1992), sie sind im Kapitel 1.1.2 aufgeführt. Dabei wurde die systemische Entzündungsreaktion bzw. das systemische inflammatorische Response-Syndrom (SIRS) definiert, um die Kriterien zur Diagnose einer Sepsis zu vereinheitlichen. Aktuell wird die Anwendbarkeit des SIRS-Kriteriums zur Diagnose einer Sepsis in Frage gestellt, da es für eine Sepsis nicht pathognomonisch ist (Vincent *et al.* 2013). Während eine überschießende Immunantwort infolge einer Infektion zu einer Sepsis führen kann, ist es ebenfalls möglich, dass verschiedene nicht-infektiöse Prozesse, die eine massive Aktivierung des angeborenen Immunsystems nach sich ziehen, die klinische Symptomatik eines SIRS hervorrufen können. Dazu gehören beispielsweise Interventionen, die mit massiven Gewebeschädigungen einhergehen, wie schwere Traumata, massive chirurgische Eingriffe oder großflächige Verbrennungen aber auch nicht-infektiöse Erkrankungen wie eine Pankreatitis (Vollmar 2011, Rittirsch *et al.* 2008). Eine überschießende systemische Immunreaktion kann auch infolge einer entsprechend starken Exposition mit DAMP oder PAMP, wie beispielsweise durch eine intravenöse Injektion von Bakterienbestandteilen wie LPS, hervorgerufen werden. Die systemische Reaktion auf eine Aktivierung des Immunsystems mit der exzessiven Bildung und Freisetzung von humoralen und zellulären Entzündungsmediatoren ist die wesentliche Ursache für die

Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen, die im Verlauf eines SIRS auftreten (Bone *et al.* 1992, Werdan *et al.* 2005, Reinhart *et al.* 2010, Bauer *et al.* 2006, Rittirsch *et al.* 2008).

Parallel zu der massiven Freisetzung pro-inflammatorischer Mediatoren in die systemische Zirkulation, dem sogenannten „Zytokin-Sturm“, wird auch eine anti-inflammatorische Reaktion ausgelöst, die der Entzündung entgegenwirkt. Dabei kann eine Überkompensation der Entzündungsreaktion zu einer Immunsuppression im Anschluss an die pro-inflammatorische Phase führen. Dieses kompensatorische anti-inflammatorische Response-Syndrom (*compensatory anti-inflammatory response syndrome* – CARS) kann eine erhöhte Anfälligkeit für Sekundärinfektionen bedingen (Adib-Conquy & Cavaillon 2009, Vollmar 2011).

1.1.2. Begriffsdefinitionen zu SIRS und Sepsis

Die Kriterien und Begriffsdefinitionen zu SIRS und Sepsis wurden 1991 auf einer Konsensuskonferenz festgelegt und 2001 auf einer Folgekonferenz im Wesentlichen bestätigt (Bone *et al.* 1992, Levy *et al.* 2003). Als Grundlage zur Identifikation von Patienten mit einem systemischen pro-inflammatorischen Geschehen wurden die SIRS-Kriterien so gewählt, dass mit schnell anwendbaren und gut verfügbaren diagnostischen Mitteln eine hohe Sensitivität erreicht wurde. Dabei ist die Spezifität jedoch gering, was die aktuell anhaltende Diskussion über die Notwendigkeit einer Überarbeitung dieser Kriterien auslöste (Vincent *et al.* 2013, Balk 2014). Im Folgenden sollen die Begriffe SIRS, Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock anhand ihrer derzeit gültigen Definitionen erläutert werden (Bone *et al.* 1992, Levy *et al.* 2003, Riedemann *et al.* 2003, Greten & Andrassy 2005, Reinhart *et al.* 2010).

Ein SIRS ist durch das Auftreten von mindestens zwei der folgenden Symptome definiert:

- Hypothermie $\leq 36\text{ °C}$ oder Hyperthermie $\geq 38\text{ °C}$
- Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90\text{ /min}$
- Tachypnoe $\geq 20\text{ /min}$ ohne Hyperventilation, Hypokapnie mit $p\text{CO}_2 \leq 33\text{ mmHg}$
- Leukozytose $\geq 12000\text{ /}\mu\text{l}$ oder Leukopenie $\leq 4000\text{ /}\mu\text{l}$ oder mehr als 10% unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Bei gleichzeitigem Nachweis einer Infektion, entweder durch den mikrobiologischen Erregernachweis oder anhand klinischer Kriterien, spricht man von einer Sepsis.

Eine Sepsis mit Organdysfunktion wird als schwere Sepsis bezeichnet und liegt vor, wenn zusätzlich eine akute Enzephalopathie, relative oder absolute Thrombozytopenie, arterielle Hypoxämie, renale Dysfunktion und / oder metabolische Azidose auftreten.

Ein septischer Schock liegt vor, wenn in einem Sepsispatienten trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution eine Hypotonie mit einem systolischen Blutdruck von weniger als 90 mmHg bzw. einem mittleren Blutdruck von weniger als 65 mmHg für mindestens 1 h auftritt und eine andere Ursache für diese Hypotonie ausgeschlossen werden kann.

Während eines SIRS bzw. einer Sepsis kann es aufgrund von Gewebeschäden, Ödembildung, verminderter Gewebsperfusion und Hypoxie zu Organdysfunktionen kommen. Beim Multiorgandysfunktionssyndrom (MODS) sind mehrere Organsysteme betroffen, wodurch der Erhalt der lebenswichtigen Körperfunktionen nur noch durch intensivmedizinische Intervention gewährleistet werden kann.

Der Verlauf einer Sepsis ist gekennzeichnet durch eine Hyperinflammation, in der eine überschießende Immunreaktion auf eine Infektion einen „Zytokin-Sturm“ mit hohen Serumkonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β und eine systemische Entzündungsreaktion (SIRS) auslöst. Je nach Schwere des Ereignisses kann es zur Entwicklung einer schweren Sepsis bis hin zum septischen Schock kommen (Cavaillon *et al.* 2003, Wiersinga & van der Poll 2007, Rittirsch *et al.* 2008, Bhatia *et al.* 2009).

Infolge der bei einem SIRS ablaufenden starken inflammatorischen Reaktionen ist das Auftreten von Gewebe- und Organschädigungen möglich, die aus verschiedenen Effekten resultieren können (Cinel & Opal 2009, Bhatia *et al.* 2009, Adam *et al.* 2013).

Zu diesen Effekten gehören:

- Auslösung von Apoptose
- Endothel-Aktivierung, die zu Mikrozirkulationsstörungen führen kann
- verstärkte Koagulation und erhöhtes Risiko der Thrombenbildung
- oxidativer Stress durch erhöhte Produktion von ROS und RNS
- Freisetzung proteolytischer Enzyme
- Freisetzung von cytotoxischen und neurotoxischen Substanzen

Während des komplexen Geschehens bei einer Sepsis werden anti-inflammatorische, den pro-inflammatorischen Vorgängen entgegenwirkende Mechanismen aktiviert, um lokalen und systemischen Gewebeschädigungen, die durch die Entzündungsreaktionen hervorgerufen werden können, vorzubeugen. Eine unangepasste anti-inflammatorische Reaktion kann jedoch eine Immunparalyse bedingen, die durch hohe Serumkonzentrationen anti-inflammatorischer Mediatoren, wie löslichem TNF-Rezeptor, IL-1RA, IL-10 und TGF- β , sowie eingeschränkte Funktion von Immunzellen gekennzeichnet ist (Andreasen *et al.* 2008, Adib-Conquy & Cavaillon 2009, Biswas & Lopez-Collazo 2009, Angus & van der Poll 2013). Das CARS ist somit ebenfalls ein Resultat unangepasster Immunreaktionen. Die erhöhte Anfälligkeit für eine Sekundärinfektion resultiert unter anderem aus einer verstärkten Apoptose von Lymphozyten, einer Endotoxintoleranz, verringerter HLA-DR-Expression und ROS-Bildung durch Monozyten. Aufgrund geschwächter Abwehrmechanismen besteht die erhöhte Gefahr einer Verschärfung der der Sepsis zugrunde liegenden Infektion und eine hohe Anfälligkeit der Patienten für eine nosokomiale Sekundärinfektion (Adib-Conquy & Cavaillon 2009).

1.1.3. Tiermodelle zur Untersuchung systemischer Entzündungsreaktionen *in vivo*

Für die Untersuchung von SIRS bzw. Sepsis werden verschiedene *in-vivo*-Tiermodelle genutzt. Die bei der Entstehung und im Verlauf einer Sepsis ablaufenden komplexen Abläufe in einem standardisierten Tiermodell zu simulieren, stellt eine große Herausforderung dar (Dyson & Singer 2009). Es existieren verschiedene Ansätze, in Versuchstieren eine Immunreaktion zu induzieren, deren Verlauf einen Teil der bei einer Sepsis ablaufenden Vorgänge modellhaft nachbilden kann: Eine Vorgehensweise ist die Verabreichung von Toxinen oder Pathogenbestandteilen, die zu einer systemischen Aktivierung des Immunsystems führt. Ein zweiter Weg ist eine Infektion mit exogenen Erregern. Daneben existieren Modelle, die durch eine Störung körpereigener Barrieren eine Infektion mit endogenen Bakterien herbeiführen (Buras *et al.* 2005).

Durch die Injektion von Pathogenbestandteilen, wie beispielsweise LPS, wird eine starke Aktivierung des angeborenen Immunsystems hervorgerufen. Eine durch LPS-Injektion verursachte Endotoxämie stellt ein Modell zur Untersuchung eines SIRS dar. Durch direkt in die Blutbahn injiziertes oder in die Blutzirkulation diffundierendes LPS werden Zellen des Immunsystems aktiviert und eine pro-inflammatorische Reaktion ausgelöst. Verschiedene Symptome, die bei einer Sepsis auftreten, können auch bei einer akuten Endotoxämie infolge einer Bolus-Injektion von LPS beobachtet werden, wie beispielsweise erhöhte Plasmakonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine, verringerte Myokard-Kontraktilität, Laktat-Azidose oder Schock (Fink 2014). Allerdings unterscheiden sich diese Symptome während einer Endotoxämie von den während einer Sepsis beobachteten in Intensität und zeitlichem Verlauf (Remick *et al.* 2000, Recknagel *et al.* 2013, Rittirsch *et al.* 2007). Tiermodelle, die eine Injektion von Pathogenbestandteilen nutzen, bieten eine gute Standardisierbarkeit und Replizierbarkeit. In Abhängigkeit der eingesetzten LPS-Dosis können mit entsprechenden Modellen die physiologischen und biochemischen Veränderungen simuliert werden, die insbesondere in der Anfangsphase einer Sepsis, wie sie infolge einer massiven Infektion mit gram-negativen Bakterien ausgelöst werden kann, auftreten (Fink 2014, Remick *et al.* 2000). Dementsprechend eignen sich Tiermodelle, bei denen eine Injektion von Pathogenbestandteilen erfolgt, für mechanistische Untersuchungen von systemischen Entzündungsreaktionen auf systemischer, organbezogener und zellulärer Ebene. Sie sind jedoch nicht geeignet, um die komplexe Pathogenese der Sepsis abzubilden. Hierfür sind Versuchsmodelle prädestiniert, die auf einer Infektion mit lebenden Pathogenen basieren. Dabei können exogene Bakterien zum Einsatz kommen oder die eigene Darmflora des Versuchstieres durch einen Eingriff freigesetzt werden. Beim Sepsismodell CLP (*cecal ligation and puncture*) erfolgt eine Perforation des *Caecum* und eine Freisetzung von Darminhalt, wobei allerdings ein operativer Eingriff nötig ist (Remick *et al.* 2000). Im Modell PCI (*peritoneal contamination and infection*) hingegen erfolgt eine Injektion einer exogenen Stuhl-Suspension ins Peritoneum (Seidel *et al.* 2009, Recknagel *et al.* 2013). Bei CLP und PCI kommt es jeweils zu einer polymikrobiellen Infektion des Peritoneums, wodurch diese Modelle die Verhältnisse bei einer Sepsis mit einem Infektionsherd im Bauchraum gut nachbilden können (Fink 2014, Buras *et al.* 2005).

Zwischen den Modellen gibt es Unterschiede in der Ausprägung der systemischen Entzündungsreaktion. Eine LPS-Injektion führt zu einer stärkeren systemischen Freisetzung von Zytokinen, als in den Infektionsmodellen (Galanos & Freudenberg 1993, Remick *et al.* 2000). Die Infektionsmodelle simulieren hingegen den Verlauf einer Sepsis besser, sind dabei allerdings schlechter standardisierbar (Freise *et al.* 2001, Bhatia *et al.* 2009). Prinzipiell kann jedoch kein Tiermodell die im Sepsispatienten ablaufenden Vorgänge exakt simulieren (Buras *et al.* 2005, Rittirsch *et al.* 2007). So gibt es starke Unterschiede in Genexpressionsmustern und im zeitlichen Verlauf der Erkrankung. Patienten erhalten in der Regel eine der Schwere der Erkrankung angepasste medizinische Behandlung, wie beispielsweise Flüssigkeitsinfusionen, maschinelle Beatmung und Antibiotikatherapie. Im Tiermodell sind solche Maßnahmen in der Regel schwierig umzusetzen und werden nur sehr selten angewandt. Als Versuchstiere werden meist junge, gesunde Exemplare verwendet, wohingegen die Inzidenz der Sepsis beim Menschen mit steigendem Alter zunimmt und zudem meist eine Komorbidität vorliegt. Ein weiterer Unterschied ist eine im Vergleich zum Menschen wesentlich höhere Toleranz verschiedener Versuchstierspezies gegenüber LPS (Fink 2014, Dyson & Singer 2009, Rittirsch *et al.* 2007, Buras *et al.* 2005). Abhängig vom Fokus der Untersuchung ist somit eine spezifische Auswahl und Anpassung eines *in-vivo*-Modells notwendig.

1.2. Aktuelle Vorstellungen zur Pathogenese der septischen Enzephalopathie

Die septische bzw. sepsis-assoziierte Enzephalopathie (SE) oder auch sepsis-assoziiertes Delirium ist eine mit SIRS bzw. Sepsis assoziierte Symptomatik, die sich als eine diffuse Störung der Funktion des zentralen Nervensystems (ZNS) mit eingeschränkten mentalen Fähigkeiten und Bewusstseinsstörungen bis hin zum Koma zeigt (Terborg 2012). Die SE ist eine häufige Komplikation in der frühen Phase einer Sepsis und kann bei bis zu 70% der Patienten mit einer schweren Sepsis auftreten. Dabei stellt die SE einen Indikator für eine erhöhte Mortalität bei Sepsispatienten dar (Eidelman *et al.* 1996). In der Regel ist eine SE als eine der ersten sepsis-assoziierten Organschädigungen feststellbar (Pytel & Alexander 2009). Charakteristisch zeigen sich

dabei eine akute Beeinträchtigung der kognitiven Funktion, eine Verlangsamung der mentalen Aktivität, Unaufmerksamkeit, Verwirrung, Unruhe bzw. Stupor oder Koma. Eine direkte Infektion des ZNS, Kopfverletzungen, Fettembolie oder pharmakologische Einwirkung sind hingegen Ausschlusskriterien (Ebersoldt *et al.* 2007).

Eine SE wird durch Entzündungsprozesse ausgelöst, die außerhalb des Gehirns ablaufen. Aufgrund massiver Entzündungsreaktionen können jedoch, vermittelt durch die Wirkung verschiedener Entzündungsmediatoren, pathologische Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke (BHS) und der neurovaskulären Einheit hervorgerufen und somit die Homöostase im Gehirn gestört werden (Abbildung 1, Jacob *et al.* 2011). Dabei können verschiedene Immunzellen an inflammatorischen Reaktionen im Gehirn beteiligt sein, neben den residenten Mikroglia sind auch einwandernde Neutrophile bzw. Monozyten/Makrophagen dazu in der Lage (Takeuchi *et al.* 2006, Yawata *et al.* 2008, Comim *et al.* 2011, Jacob *et al.* 2011). Eine überschießende Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren kann zu einer Minderung oder dem Verlust der BHS-Funktion, zu Störungen des Stoffwechsels im Gehirn, zur Ödembildung durch erhöhten Wassereintritt und zu zytotoxischen Effekten bis hin zum Verlust von Neuronen und Gliazellen führen (Bogdanski *et al.* 1999, Papadopoulos *et al.* 2000, Nag *et al.* 2009).

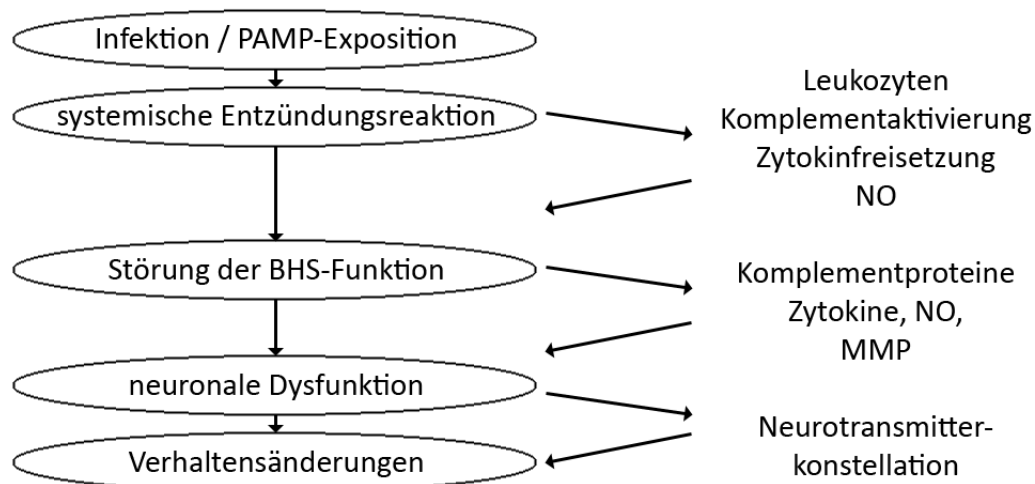


Abbildung 1: Entwicklung einer septischen Enzephalopathie

(modifiziert nach Jacob *et al.* 2011)

Die septische Enzephalopathie kann sich infolge einer systemischen Entzündungsreaktion, beispielsweise ausgelöst durch eine massive Infektion bzw. PAMP-Exposition entwickeln. Der dabei auftretende Verlust der Blut-Hirn-Schranken-Integrität kann durch die Störung der Homöostase im Hirngewebe die neuronale Funktion beeinträchtigen und Verhaltensänderungen verursachen.

Die periphere Entzündungsreaktion kann das ZNS über zwei Wege beeinflussen. So werden durch Zytokinrezeptoren des Vagusnervs und durch die zirkumventrikulären Organe (*circumventricular organs* – CVO) Entzündungsreaktionen detektiert, wodurch Krankheitsgefühl, Fieber und die Expression pro-inflammatorischer Zytokine im ZNS ausgelöst werden (Adam *et al.* 2013, Konsman *et al.* 1999, Dantzer *et al.* 2000). Unabhängig davon kommt es zur Aktivierung des neurovaskulären Endothels durch pro-inflammatorische Mediatoren. Dabei werden durch die Endothelzellen pro-inflammatorische Zytokine und NO gebildet sowie Adhäsionsmoleküle exprimiert. Aufgrund der Wirkung verschiedener pro-inflammatorischer Faktoren und von oxidativem Stress kann es zu einer Schädigung der BHS und der Ablösung von Perizyten von der Basallamina kommen. Die dadurch erhöhte trans- und parazelluläre Permeabilität der BHS führt zu unkontrolliertem Stoffaustausch und dem Verlust der für die neuronale Funktion notwendigen Homöostase (Adam *et al.* 2013, Berg *et al.* 2011, Green *et al.* 2004).

Die der BHS-Schädigung zugrunde liegenden molekularen Vorgänge wurden an Tiermodellen untersucht, bei denen Hirnverletzungen induziert bzw. Reperfusionsschädigungen nach transienter Hirnischämie untersucht wurden. Die Öffnung der BHS läuft danach in zwei Phasen ab (Nag *et al.* 2011). Die erste Phase der Öffnung wird durch direkte Wirkungen von inflammatorischen Mediatoren auf die Endothelzellen der BHS hervorgerufen (Adam *et al.* 2013). Dabei werden in den Endothelzellen verstärkt Caveolen gebildet, durch welche ein verstärkter Stoffaustausch zwischen luminaler und abluminaler Membran ermöglicht wird (Abbott 2000, Nag *et al.* 2011). Die Expression von Adhäsionsmolekülen durch aktiviertes Endothel fördert die Einwanderung von Leukozyten und Neutrophilen (Hofer *et al.* 2008, Omari & Dorovini-Zis 2003, Zhou *et al.* 2006, Zhou *et al.* 2009). Zudem kann eine Überexpression von iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) und eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*) und die damit verbundene erhöhte NO-Freisetzung zum Verlust der BHS-Integrität beitragen (Mayhan 1998, Handa *et al.* 2008, Adam *et al.* 2013). Auch erhöhter Scherstress infolge von Vasodilatation oder verändertem Blutfluss kann zu einer transienten Verringerung der BHS-Integrität führen (Nag *et al.* 2011). Störungen der zerebralen Mikrozirkulation und eine damit verbundene Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen können ebenfalls die Pathogenese der SE fördern (Semmler *et al.* 2008, Taccone *et al.* 2010).

Während der zweiten Phase der fortschreitenden Öffnung der BHS werden, hauptsächlich durch die Wirkung von Matrixmetalloproteasen (MMP), die molekularen Komponenten der BHS abgebaut (Hawkins & Davis 2005, Yang *et al.* 2007, Nag *et al.* 2011). Hierbei spielen insbesondere MMP-9 und MMP-2 eine Rolle, deren Aktivität im Verlauf der Entzündungsreaktion ansteigt (Dal-Pizzol *et al.* 2013). MMP-2 wird von Astroglia konstitutiv exprimiert, zur Aktivierung ist die Interaktion der membrangebundenen MT1-MMP (MMP-14) und von TIMP-2 (*tissue inhibitor of metalloproteinase 2*) mit der Proform von MMP-2 nötig (Candelario-Jalil *et al.* 2009). Die Expression von MMP-9 im Hirngewebe ist unter normalen Bedingungen gering, kann aber durch verschiedene pathogene Einflüsse herauf reguliert werden (Nag *et al.* 2011).

Infolge einer erhöhten Permeabilität der BHS kann beispielsweise der Übergang von Proteinen oder als Neurotransmitter wirksamen Substanzen wie Glutamat oder GABA zu Störungen der Signalübertragung zwischen Neuronen führen. In Patienten mit septischem Schock bewirken Störungen des Stoffwechsels einen Abbau von Muskelsubstanz, welcher in Verbindung mit einer sepsis-assoziierten Leberdysfunktion ein erhöhtes Verhältnis von aromatischen Aminosäuren (Phenylalanin, Tryptophan) zu verzweigtkettigen Aminosäuren (Isoleucin) im Plasma hervorruft (Sprung *et al.* 1991). Aminosäuren stellen die Basis zur Synthese verschiedener Neurotransmitter dar. Ein verändertes Verhältnis der Aminosäurekonzentrationen im Gehirn hat ein gestörtes Neurotransmitterprofil zur Folge. Die Konzentrationen an Norepinephrin, Dopamin oder Serotonin sind in Ratten während einer schweren Sepsis verringert (Freund *et al.* 1985). Eine infolge entzündlicher Prozesse gestörte Konstellation der Neurotransmitterkonzentrationen trägt zur Entwicklung der Enzephalopathie bei (Eggers *et al.* 2003, Wilson & Young 2003).

Eine weitere Auswirkung der systemischen Entzündungsreaktion, die zur Pathogenese der septischen Enzephalopathie beiträgt, ist die Bildung von Hirnödemen (Jacob *et al.* 2011). Infolge einer TNF-Rezeptor-1-medierten Expressionserhöhung des Wassertransportproteins Aquaporin-4 in den Zellen der BHS, kann ein verstärkter Wassereintritt ins Hirngewebe erfolgen (Alexander *et al.* 2008).

Die Störungen der BHS-Funktion in Verbindung mit einer veränderten zerebralen Mikrozirkulation, welche durch eine überschießende systemische Entzündungsreaktion

ausgelöst werden können, führen zu einem Verlust der Neurotransmitter- und Elektrolythomöostase, Hirnödemen, Diffusion von Plasmaproteinen ins Hirngewebe sowie gegebenenfalls zu einer Unterversorgung des neuronalen Energiestoffwechsels (Papadopoulos *et al.* 2000, Jacob *et al.* 2011). Die Beeinträchtigung der Funktion des ZNS ist ein Anzeichen für den problematischeren Verlauf einer Sepsis. Damit einhergehend ist die Symptomatik der SE mit einer höheren Mortalität und Morbidität der Sepsispatienten assoziiert (Eidelman *et al.* 1996, Adam *et al.* 2013). Die SE ist potentiell reversibel. Allerdings behalten bis zu 25% der Überlebenden einer schweren Sepsis kognitive oder physische Einschränkungen (Chavan *et al.* 2012, Iwashyna *et al.* 2010, Yende & Angus 2007).

1.3. Das zentrale Nervensystem und die Blut-Hirn-Schranke

1.3.1. Zelluläre Komponenten des ZNS

Die Zellen des ZNS können grundsätzlich in zwei Klassen eingeteilt werden: Neuronen und Gliazellen. Es gibt verschiedene Typen von Gliazellen, darunter Astroglia, Mikroglia, Oligodendrozyten und Ependymzellen, die entsprechend unterschiedliche Funktionen ausüben.

Die Neuronen sind die Zellen, in denen die Erregungsleitung und –übertragung stattfindet. Sie bestehen aus dem Perikaryon, einem Axon und meist mehreren Dendriten. Während im Perikaryon die wesentlichen Stoffwechselvorgänge stattfinden, dienen Dendriten und Axon der Erregungsweiterleitung. Die Erregungsweiterleitung erfolgt sowohl elektrisch als auch chemisch. Durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen von K^+ , Na^+ , Cl^- und organischen Anionen zwischen der Umgebung der Zelle und dem Zytoplasma besitzen Neuronen im Ruhezustand ein negatives Membranpotential, welches die Grundlage der elektrischen Erregungsleitung darstellt. Wird durch aktivierende Impulse ein Schwellenpotential erreicht, kommt es zur Depolarisation, wodurch ein positives Aktionspotential entsteht. Entlang des Axons wird dieser Impuls zu den Synapsen weitergeleitet, wo die chemische Erregungsweiterleitung durch die Ausschüttung von Neurotransmittern ausgelöst wird. Neurotransmitter diffundieren durch den synaptischen Spalt und binden an Rezeptoren

auf der Membran der nachgeschalteten Zelle, was zur transienten Öffnung unterschiedlicher Ionenkanäle und somit zu Förderung oder Hemmung eines Aktionspotentials führt. Die Repolarisation des auslösenden Neurons und die Wiederherstellung des Ruhepotentials erfolgt mittels aktiven Ionentransports durch entsprechende Kanäle der Zellmembran. Die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des Ruhepotentials an den Neuronen ist die Ursache des hohen Energieverbrauchs des ZNS und macht es gleichzeitig anfällig gegenüber einer Unterversorgung mit Sauerstoff und Stoffwechseledukten.

Astroglia haben verschiedene Funktionen im ZNS. Sie sind am Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut beteiligt, können Neurotransmitter aus ihrer Umgebung aufnehmen und haben Einfluss auf die Ionenkonzentrationen im Interzellularraum (Gucek *et al.* 2012). Zudem haben Astroglia eine Struktur- und Stützfunktion im ZNS und können auch narbenähnliche Strukturen bilden, vergleichbar mit Bindegewebszellen. Astroglia spielen aber auch eine Rolle bei der immunologischen Immunabwehr und können mit T-Zellen interagieren (Barcia *et al.* 2013). Mit einem Anteil von 20-50% der Gesamtpopulation bilden sie die Mehrzahl der Gliazellen im Gehirn.

Oligodendrozyten haben ähnliche Aufgaben wie die Schwannzellen im peripheren Nervensystem. Sie bilden Markscheiden zur elektrischen Isolierung der Nervenzellfortsätze und verbessern so die Erregungsweiterleitung. Ependymzellen bilden eine monozelluläre Schicht um die Ventrikel und stellen somit die Grenze zum Liquorraum dar.

Die Endothelzellen der das Hirnparenchym versorgenden Kapillargefäße sind ein Teil der BHS. Die Eigenschaften dieser Endothelzellen werden im Abschnitt 1.3.2 näher beschrieben. Auf der abluminalen Seite der Endothelzellen sind die Kapillargefäße von einer nicht vollständig geschlossenen Lage aus Perizyten umgeben. Die Perizyten sind in die Basalmembran eingebettet und haben Anteil an deren Bildung. Als murale Zellen spielen Perizyten eine Rolle bei der Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus aber auch bei der Angiogenese und der vaskulären Remodellierung von Kapillargefäßen (Armulik *et al.* 2005, Armulik *et al.* 2011, Daneman 2012).

Mikroglia sind die residenten Immunzellen des ZNS. Zwar stellt das ZNS einen immunprivilegierten Bereich im Körper dar, dennoch finden sowohl angeborene als auch

adaptive Immunreaktionen statt. Immunzellen aus der systemischen Zirkulation sind in gewissem Maße fähig, die BHS zu passieren und in das Hirnparenchym einzuwandern (Zlokovic 2008). Die erste Linie der Verteidigung stellen jedoch die im ZNS residenten Mikroglia dar. Gemeinsam mit den anderen Gliazellpopulationen tragen Mikroglia zur Erhaltung der Homöostase im ZNS bei, um die optimalen Bedingungen für die neuronalen Funktionen aufrecht zu erhalten. Zu ihren Funktionen gehören unter anderem die unspezifische Immunabwehr, die Phagozytose von Pathogenen sowie von geschädigten Neuronen und Gliazellen, die Antigenpräsentation für T-Zellen und die Bildung neurotropher Faktoren (Hellwig *et al.* 2013, Tambuyzer *et al.* 2009).

Bei Mikroglia sind, abhängig vom Aktivierungszustand, verschiedene Phänotypen unterscheidbar. Im gesunden, vollständig entwickelten ZNS kommen sie in der Regel im ramifizierten Zustand vor. Dieser ist durch ein kleines Soma und eine Vielzahl stark verzweigter, sich bewegender Fortsätze gekennzeichnet. Ramifizierte Mikroglia bleiben lokal und überwachen ihre zelluläre Umgebung, ohne dabei die fragilen neuronalen Verbindungen zu stören. Infolge einer Aktivierung können Mikroglia in einen beweglichen Phänotyp wechseln und zur Quelle einer Entzündungsreaktion bzw. zu einer Läsion migrieren. Es gibt unterschiedliche Aktivierungsstadien von Mikroglia, wobei nicht nur zwischen inaktiv bzw. vollständig aktiv unterschieden werden kann. Vielmehr treten situationsabhängig diverse Veränderungen auf, so bei der Form der Zelle, den Expressionsmustern von Rezeptoren oder der Sezernierung von Agonisten. Beispielsweise kommen während der Entwicklungsphase des ZNS oder bei einer Störung der Homöostase migrierende und phagozytierende Mikroglia vor, die keine Antikörper präsentieren oder pro-inflammatorische Zytokine exprimieren. Infolge einer inflammatorischen Aktivierung bzw. pathologischer Bedingungen, wie beispielsweise durch Infektion, Trauma, Ischämie, abnormale Proteinaggregation oder demyelinisierende Erkrankungen, können Mikroglia in einen amöboiden, pro-inflammatorischen, makrophagenartigen Phänotyp übergehen. Dieser Aktivitätszustand ist durch eine hohe Expression von Iba-1 (*ionized calcium binding adaptor molecule 1*) gekennzeichnet. Infolge einer solchen Aktivierung werden durch Mikroglia Zytokine, Chemokine, Proteasen und ROS gebildet. Die Mikroglia-Zellen proliferieren und es finden Migration, Phagozytose und die Präsentation von Antigenen statt. Dabei können durch Mikroglia auch neurotoxische Effekte hervorgerufen werden, wodurch es zur Schädigung bzw. zum Verlust von Neuronen bzw. Gliazellen kommen kann (Hellwig *et*

al. 2013, Kettenmann *et al.* 2011, Lehnardt 2010, Monk & Shaw 2006, Tambuyzer *et al.* 2009).

Im Gegensatz zu Neuronen und Makroglia, die einen neuroektodermalen Ursprung haben, gehen Mikroglia aus mesodermalen Vorläuferzellen hervor, die insbesondere im Zeitraum um die Geburt in das ZNS einwandern. Somit stellen sie eine organspezifische Makrophagenpopulation, ähnlich beispielsweise den Kupfferzellen der Leber, dar. Sie stellen etwa 5-20% der Zellen im Gehirn und haben somit eine ähnlich hohe Zellzahl, wie die Neuronen (Kierdorf *et al.* 2013, Kettenmann *et al.* 2011, Tambuyzer *et al.* 2009).

1.3.2. Aufbau und Funktion der BHS

Um in den Geweben des ZNS die für die Nervenfunktionen optimalen Bedingungen aufrecht zu erhalten, sind diese Gewebe durch eine schützende Struktur, die BHS, von der systemischen Zirkulation getrennt (Abbildung 2). Somit werden äußere Einflüsse minimiert, wie die variable Zusammensetzung des Blutes mit schwankenden Elektrolyt- oder Blutzuckerkonzentrationen und potentiell neurologisch aktiven Substanzen, welche die Nervenfunktion beeinflussen könnten (Engelhardt & Sorokin 2009, Schmidt *et al.* 2005). Die Kapillargefäße, über die die hauptsächliche Versorgung des ZNS erfolgt, sind durch die BHS vom Hirngewebe abgegrenzt. Die Grenze zwischen systemischer Zirkulation und Liquorraum bildet die Blut-Liquor-Schranke.

Die BHS wird durch mehrere parallele Barrieren gebildet und besteht aus verschiedenen in Wechselwirkung stehenden Komponenten. Die Blutgefäße werden von einer monozellulären Endothelschicht umgeben, die sich auf einer Basalmembran befindet. Der Kontakt der Endothelzellen zu den Pseudopodien von Astroglia induziert die Bildung von *Tight Junctions* im Endothel der Hirnkapillaren (Aumüller 2007). Durch ein komplexes Netz verschiedener *Tight Junctions* ergibt sich eine parazelluläre Diffusionsbarriere für Wasser und wasserlösliche Substanzen bzw. polare Moleküle. Gleichzeitig bilden sich durch die Unterbindung der lateralen Diffusion von Membranproteinen an den Endothelzellen zwei in ihrer Zusammensetzung und Funktion unterschiedliche Membranen. Die transzelluläre Diffusion wird durch das Fehlen von *Fenestrae* und eine stark eingeschränkte Pinozytose verhindert. Zur

Erhaltung optimaler Bedingungen für die Nervenfunktion ist jedoch ein selektiver Stoffaustausch zwischen Blut und Hirnparenchym notwendig. Dieser Stoffaustausch, der unter anderem die Nährstoffversorgung, den Abtransport von Stoffwechselprodukten und den Wasserhaushalt sicherstellt, wird durch spezifische Transportsysteme gewährleistet. Die für den Energiestoffwechsel des Gehirns notwendige Zufuhr von Glukose wird durch den Glukosetransporter GLUT-1 gewährleistet. Aquaporine sind Proteine, die sich in Membranen zu Tetrameren zusammenlagern und Poren für den bidirektionalen Wassertransport bilden. Insbesondere Aquaporin-4 spielt für den Wasserhaushalt des Gehirns eine wichtige Rolle (Amiry-Moghaddam *et al.* 2004, Jacob *et al.* 2007, Nag *et al.* 2009). Aminosäuren können über mehrere Systeme transportiert werden. Der Transport aus der Zirkulation in das Hirnparenchym erfolgt über die Transporter L1 und γ^+ . Der Transport aus dem Hirnparenchym ins Blut verläuft in der Regel gegen den Konzentrationsgradienten und wird durch Na^+ -abhängige Transportsysteme durchgeführt, insbesondere sind die EAAT-Transporter zu nennen, die die potentiell neurotoxische Aminosäure Glutamat aus dem Hirngewebe in die Endothelzellen und von dort ins Blut befördern (Zlokovic 2008). Weitere Transportsysteme ermöglichen unter anderem den Transfer von Ionen, Vitaminen oder IgG. Auch inflammatorisch wirksame Zytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ können durch spezifische Transporter die BHS passieren (Banks 2005, Pan & Kastin 2008, Banks & Erickson 2010). Die BHS bildet eine dichte Barriere gegen die Diffusion hydrophiler Substanzen. Lipophile Moleküle können jedoch durch die Zellmembran der Endothelzellen diffundieren. Für eine Vielzahl solcher Substanzen gibt es entsprechende Efflux-Transporter, um die Passage durch die BHS zu verhindern bzw. um eingedrungene Stoffe auszuschleusen (Daneman 2012).

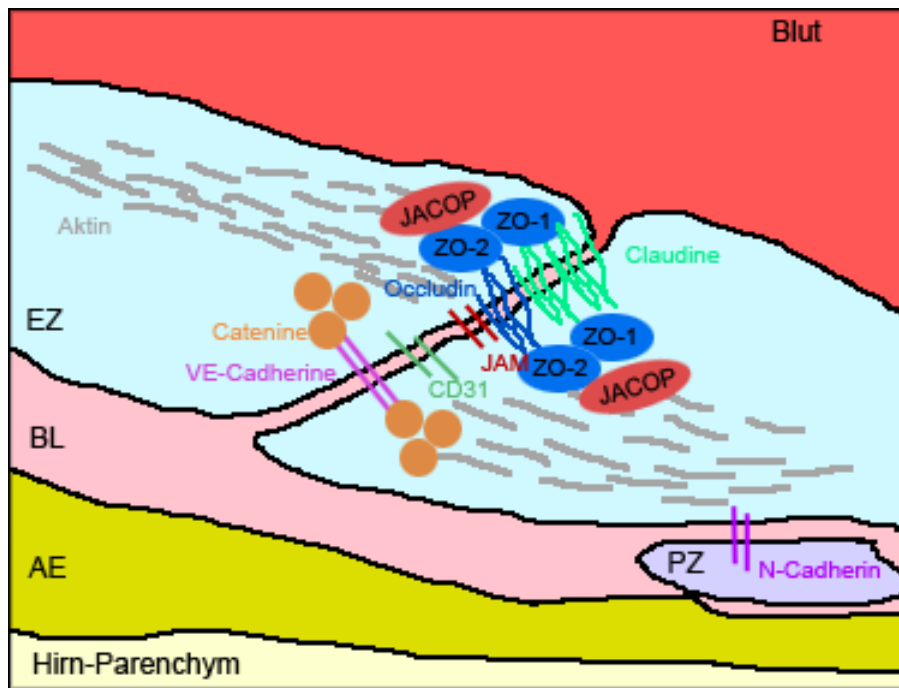


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Blut-Hirn-Schranke

(nach Daneman 2012)

Die Endothelzellen der BHS bilden untereinander *Tight Junctions* aus, welche durch Transmembranmoleküle wie die Claudine, das Occludin oder JAM-1 gebildet werden und über Adapterproteine wie die Zona-Occludens-Proteine oder JACOP mit dem Zytoskelett verknüpft sind. Die Endothelzellen sind an der abluminalen Seite über N-Cadherin mit Perizyten verbunden. Beide Zelltypen sind in eine Basallamina aus extrazellulärer Matrix eingebettet. Die Blutgefäße der BHS werden nahezu vollständig von Astroglia-Pseudopodien umhüllt.

AE Astroglia-Pseudopodium (Astroglia-Endfüßchen), BL Basallamina, EZ Endothelzelle, PZ Perizyt

Neben den zellulären Komponenten bildet extrazelluläre Matrix (EZM) in Form von Basalmembranen einen weiteren wichtigen Bestandteil der BHS. Die EZM kann im Wesentlichen in Basalmembranen und interstitielle Matrix unterschieden werden. Die interstitielle Matrix, die der Verbindung von Zellen im Gewebe dient, ist im Hirnparenchym nur schwach ausgeprägt, die Stützfunktion im Gewebe übernehmen maßgeblich die Astroglia (Engelhardt & Sorokin 2009). Die Basalmembranen im ZNS werden hauptsächlich aus Glykoproteinen gebildet, wobei Laminin und Kollagen IV parallel Netzwerke bilden, welche durch Nidogen und Heparansulfat-Proteoglykane verknüpft werden (Hallmann *et al.* 2005). Zusätzlich sind verschiedene andere Proteine mit spezifischen Funktionen in diese Netzwerke eingebaut. Im Gehirn können zwei unterschiedliche Typen von Basalmembranen, die kleine Hirngefäße umgeben, unterschieden werden. Die Endothel-Basalmembranen schließt sich direkt an das Endothel der Gefäße an. Die Astroglia-Basalmembran und die leptomeningeale

Basalmembran werden als Parenchym-Basalmembranen zusammengefasst und begrenzen das Hirnparenchym. Um Venolen und Postkapillar-Gefäße bilden diese Basalmembranen zwei parallele Schichten, zwischen denen sich ein meningeales Epithel befindet. Die verschiedenen Basalmembranen im Bereich der BHS unterscheiden sich in ihrer molekularen Zusammensetzung. So enthält die Endothel-Basalmembran die Laminin-Isoformen 411 und 511, deren Ketten vom Typ $\alpha 4$ und $\alpha 5$ durch Endothelzellen des ZNS produziert werden, während die Parenchym-Basalmembranen die Laminin-Isoformen 111 und 211 mit den Ketten $\alpha 1$ und $\alpha 2$ enthalten, die von leptomeningealen Zellen bzw. Astroglia-Pseudopodien gebildet werden. Auch die verknüpfenden Heparansulfat-Proteoglykane unterscheiden sich in den verschiedenen Basalmembranen (Engelhardt & Sorokin 2009, Sixt *et al.* 2001). Im Bereich der Hirn-Kapillaren verschmelzen die Endothel- und die Parenchym-Basalmembranen, was sich beispielsweise in der parallelen Expression von Laminin $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 1$ darstellt, und formen eine Basalmembran. Die Basalmembranen bilden die stützende Auflage des Endothels.

Die transzellularen Zwischenräume der Endothelzellen werden durch ein Netz aus *Tight Junctions* verschlossen. Dadurch entsteht eine Diffusionsbarriere zwischen Blut und Gewebe. Die *Tight Junctions* werden durch unterschiedliche Moleküle gebildet. Occludin, Claudin-5 und -12, JAM-1, JACOP sowie die *Zona-Occludens*-Proteine ZO-1 und ZO-2 sind die wesentlichen Moleküle zur Bildung der *Tight Junctions* und ihrer Verankerung am Aktin-Zytoskelett der Endothelzellen. Zusätzlich sind die Zellen durch *Adherens Junctions* aus Cadherinen und Cateninen miteinander verbunden.

Gemeinsam mit den Endothelzellen, der Basalmembran und den Perizyten bilden die Gliazellen und die Neuronen die neurovaskuläre Einheit. Diese funktionelle Einheit erhält die Homöostase für eine optimale neuronale Aktivität (Nag *et al.* 2011).

Nicht alle Bereiche des ZNS sind durch eine BHS abgeschlossen. An den CVO finden beispielsweise die Abgabe von Hormonen und die Detektion von Toxinen statt, was einen direkten Kontakt zur systemischen Zirkulation erfordert (Aumüller 2007). Zu den CVO gehören unter anderem die *Area postrema*, die *Ementia mediana* und die Neurohypophyse.

1.4. Die Rolle von MMP bei akuter Neuroinflammation

Die EZM bildet Strukturen mit besonderen mechanischen Eigenschaften aus. Sie trägt mit ihrer Stützfunktion zu Festigkeit, Stabilität, Elastizität und Formgebung von Geweben und Organen bei und beeinflusst die Kommunikation der Zellen mit ihrer Umgebung. In Form der Basalmembran bilden EZM-Moleküle einen wesentlichen Bestandteil der BHS. Um die Migration von Zellen oder physiologische Umbauprozesse in verschiedenen Geweben des Körpers zu ermöglichen, kann die EZM durch zahlreiche gewebeabbauende Enzyme wie MMP degradiert werden. MMP spielen eine wichtige Rolle bei der Öffnung der BHS während neuroinflammatorischer oder neurodegenerativer Prozesse (Rosenberg 2009, Daneman 2012).

MMP sind zink- und calciumabhängige Endopeptidasen, durch die die Spaltung verschiedener Peptidbindungen katalysiert wird. MMP sind strukturell und funktionell verwandt und gehören zur Metzinkin-Gruppe der Proteasen mit einem konservierten Methioninrest und einem Zinkion im aktiven Zentrum. Derzeit sind mehr als zwanzig verschiedene MMP bekannt, die in verschiedene Gruppen eingeteilt werden, darunter Kollagenasen, Gelatinasen, membrangebundene MMP und andere. MMP sind in der Lage, verschiedene Substrate zusätzlich zu den namensgebenden Substraten abzubauen. Beispielsweise degradieren die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 neben Gelatine auch Kollagen, Laminin, Aggrekan und weitere Bindegewebsproteine. Die wichtigsten Funktionen sind der Abbau von EZM und die Sheddase-Funktion zur Abspaltung und Aktivierung von Signalmolekülen auf der Zelloberfläche (Snoek-van Beurden & Von den Hoff 2005, Nag *et al.* 2009, Woessner & Nagase 2000, Page-McCaw *et al.* 2007).

Die verschiedenen MMP besitzen eine ähnliche Struktur mit vier funktionell wichtigen Hauptdomänen. Die katalytische Domäne enthält das aktive Zentrum, dessen Funktion zinkabhängig ist. Die Propeptid-Domäne enthält einen Cystein-Rest, der an das Zink des aktiven Zentrums bindet und die Aktivität inhibiert. Daneben gibt es eine hämopexinähnliche Domäne, die für die Bindung des Substrat oder von TIMP-Molekülen (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) wichtig ist, sowie eine Transmembran-Domäne (Rosenberg 2009).

Die Aktivität von MMP wird auf verschiedenen Ebenen kontrolliert. Die erste Ebene ist die Kontrolle der Expression. In verschiedenen Geweben werden manche MMP

konstitutiv in ihrer inaktiven Proform exprimiert, beispielsweise MMP-2 im Hirngewebe (Candelario-Jalil *et al.* 2009). Andere MMP werden nur infolge eines Stimulus exprimiert. Unter den Signalwegen, die die MMP-Expression beeinflussen, ist der cAMP-Signalweg, dessen Aktivierung eine verstärkte Expression verschiedener MMP bewirkt (Hasan & Nakajima 1999, Alper *et al.* 2001, Shankavaram *et al.* 2001, Melnikova *et al.* 2006, Lai *et al.* 2003, Guo *et al.* 2010).

Die zweite Ebene der Kontrolle der MMP-Aktivität ist die Aktivierung der Proform. In Abbildung 3 ist diese am Beispiel von MMP-1 dargestellt (Birkedal-Hansen *et al.* 1993). MMP werden als Zymogen exprimiert. Die Propeptid-Domäne ist über eine Thiol-Bindung an das Zink im aktiven Zentrum gebunden (*cystein-switch*), wodurch eine für die Enzymaktivität notwendige Anlagerung von Wasser verhindert wird. Bei der Aktivierung des MMP-Moleküls wird zunächst die Cystein-Bindung an das Zink des aktiven Zentrums gelöst und in einem weiteren Schritt die Prodomäne autoproteolytisch entfernt. Somit entsteht die vollständig aktivierte MMP (Snoek-van Beurden & Von den Hoff 2005, Rosenberg 2009).

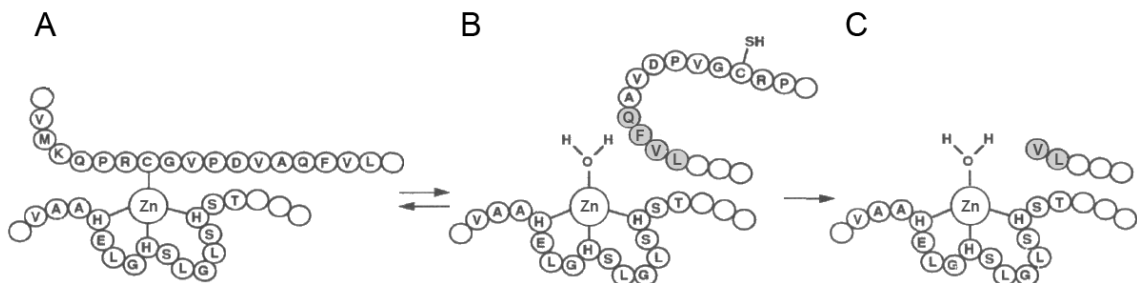


Abbildung 3: Aktivierung des Zymogens von MMP-1

(modifiziert nach Birkedal-Hansen *et al.* 1993)

Bei der Aktivierung der MMP-Proform (A) wird zunächst die Cystein-Bindung an das Zinkion des aktiven Zentrums gelöst. Es erfolgt die Anlagerung von Wasser an das Zinkion, wodurch die katalytische Aktivität ermöglicht wird (B). In einem weiteren Schritt wird die Prodomäne autoproteolytisch entfernt. Somit entsteht das vollständig aktivierte MMP-Molekül (C).

Die Aktivierung von MMP-Proformen erfolgt durch Proteasen, wie andere MMP, Plasmin oder die Plasminogenaktivatoren tPA und uPA. Plasmin aktiviert beispielsweise die Proformen von MMP-3 und MMP-14 (Abbildung 4). MMP-3 kann wiederum MMP-9 aktivieren. MMP-14 ist in der Lage, in einem Komplex mit TIMP-2

die Proform von MMP-2 zu aktivieren. Unter oxidativen Bedingungen ist zudem eine protease-unabhängige Aktivierung der MMP ohne Abspaltung der Pro-Domäne möglich. Dabei kann die Thiol-Bindung zwischen Cystein und Zink gelöst werden, wodurch das aktive Zentrum zugänglich wird und somit eine Proteaseaktivität ohne die Abspaltung der Pro-Domäne ermöglicht wird (Gu *et al.* 2002, Meli *et al.* 2003, Lehner *et al.* 2011, Snoek-van Beurden & Von den Hoff 2005, Candelario-Jalil *et al.* 2009, Nag *et al.* 2009).

Eine dritte Ebene der Aktivitätskontrolle besteht in der Regulierung durch die körpereigenen MMP-Inhibitoren TIMP-1, -2, -3 und -4 sowie das Serumprotein α_2 -Makroglobulin. Die wichtigsten Faktoren zur Regulierung der MMP-Aktivität im Gewebe sind die vier Mitglieder der TIMP-Familie. Jeder TIMP kann prinzipiell die Aktivität aller MMP durch Bildung nicht-kovalenter Komplexe inhibieren. Die Affinität der TIMP für bestimmte MMP ist allerdings unterschiedlich. MMP-2 wird beispielsweise von TIMP-2, MMP-9 von TIMP-1 stärker inhibiert. Während TIMP-1, -2 und -4 als lösliche Mediatoren sezerniert werden, ist TIMP-3 an Moleküle der EZM gebunden und hat somit eine lokal begrenzte Wirkung (Brew *et al.* 2000, Nag *et al.* 2009, Rosenberg 2009).

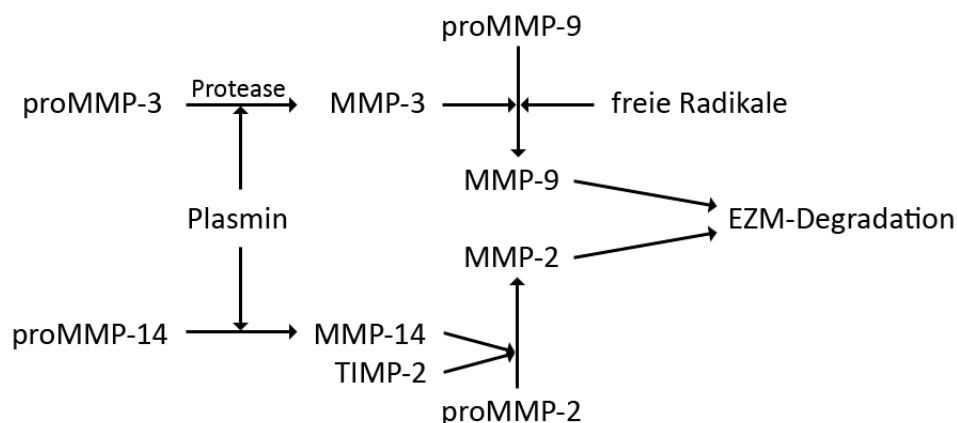


Abbildung 4: Kaskade der MMP-Aktivierung

(modifiziert nach Candelario-Jalil *et al.* 2009)

Die Proformen von MMP-3 und MMP-14 können durch Plasmin aktiviert werden. Die Proform von MMP-9 kann wiederum von MMP-3, aber auch durch die oxidative Wirkung von freien Radikalen, wie dem Stickstoffmonoxid-Radikal, aktiviert werden. MMP-2 wird in einem zellgebundenen Komplex mit MMP-14 und TIMP-2 in die aktive Form überführt.

Der Abbau von EZM durch MMP ist für eine Vielzahl physiologischer Prozesse von Bedeutung, wie beispielsweise während der Embryonalentwicklung, der Wundheilung, der Angiogenese oder der Remodellierung von Knochengewebe. Zudem stellen MMP wichtige Faktoren in der Pathophysiologie unter anderem der rheumatoiden Arthritis, der Osteoarthritis, der Parodontitis, des Ulkus, bei kardiovaskulären Krankheiten oder bei neurodegenerativen Erkrankungen dar (Dew *et al.* 2000, Page-McCaw *et al.* 2007, Gomis-Ruth 2009, Rosenberg 2009).

Während neuroinflammatorischer Prozesse wie der Reperfusion nach einer Ischämie, einer SE oder einer akuten Exazerbation der multiplen Sklerose kommt es zur Schädigung der BHS durch MMP. Dabei werden die *Tight Junctions* und die Komponenten der Basallamina degradiert und die Funktion der BHS gestört, woraus entsprechende Beeinträchtigungen der neurologischen Funktion resultieren können (Nag *et al.* 2009, Rosenberg 2009, Dal-Pizzol *et al.* 2013).

MMP werden in allen Elementen der neurovaskulären Einheit exprimiert. Allerdings gibt es Unterschiede der Expression einzelner MMP durch die verschiedenen Zellen. Astroglia exprimieren bevorzugt MMP-2 und MMP-14. Aktivierte Endothelzellen bilden verstärkt MMP-9. Aktivierte Mikroglia produzieren MMP-9 und haben eine erhöhte mRNA-Expression für MMP-1, MMP-2, MMP-14 und weitere MMP (Nag *et al.* 2011, del Zoppo *et al.* 2012, Nuttall *et al.* 2007). Auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie der Alzheimer- oder der Parkinson-Krankheit, die mit dem Verlust von Neuronen einhergehen, konnten veränderte MMP-Expressionsmuster beobachtet werden (Rosenberg 2009).

Neben den MMP gibt es weitere Proteasen, die in inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen können. Dazu zählen die mit den MMP verwandten, membrangebundenen ADAMs, zu denen das TNF- α -aktivierende Enzym TACE gehört (Candelario-Jalil *et al.* 2009).

1.5. Die Phosphoinositid-3-Kinasen der Klasse I

1.5.1. Einteilung und Funktionen der Phosphoinositid-3-Kinasen

Die Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) sind eine Gruppe von Signaltransduktionsproteinen. Die namensgebende Kinase-Aktivität ermöglicht den acht bekannten Isoformen, Phosphoinositide an der D3-Position des Inositolringes zu phosphorylieren. Alle PI3K weisen substantielle Homologien in ihren Lipid-Kinase-Domänen auf. Die Isoformen werden aufgrund ihrer Substratspezifität in die Klassen I, II und III eingeteilt. Die PI3K der Klasse I sind heterodimere Proteine, die aufgrund ihrer Molekülstruktur weiter in die Klassen IA und IB unterteilt werden. Die Klasse IA enthält die Isoformen PI3K α , PI3K β und PI3K δ , deren Aktivierung bevorzugt durch Rezeptorthyrosinkinasen erfolgt (Hawkins *et al.* 2006). PI3K β kann auch durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) aktiviert werden (Guillermet-Guibert *et al.* 2008). Die katalytischen Untereinheiten p110 α , p110 β und p110 δ sind jeweils an eine der regulatorischen Untereinheiten p85 α , p55 α , p50 α , p85 β oder p55 γ gebunden. PI3K γ stellt das einzige bekannte Mitglied der Klasse IB dar und wird insbesondere durch GPCR, wie beispielsweise Chemokinrezeptoren, aktiviert (Stoyanov *et al.* 1995, Rommel *et al.* 2007). Die katalytische Untereinheit p110 γ kann an die regulatorischen Untereinheiten p101 oder p84/p87 gebunden sein. Die Hauptfunktion der regulatorischen Untereinheit ist die Rekrutierung der katalytischen Untereinheit an membrangebundene Rezeptoren, Proteininteraktionspartner bzw. Substrate. Die katalytischen Untereinheiten aller PI3K der Klasse I besitzen eine RAS-Bindedomäne. Für p110 α , p110 γ und p110 δ konnte eine RAS-abhängige Aktivierung gezeigt werden (Rodriguez-Viciana *et al.* 2004). Eine Vielzahl an zellmembrangebundenen Rezeptoren aktiviert die PI3K der Klasse I, darunter sind Rezeptoren für verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone, Entzündungsmediatoren, Neurotransmitter und andere Agonisten (Hawkins *et al.* 2006, Fruman & Bismuth 2009).

Die thyrosinkinaseabhängige Aktivierung von PI3K der Klasse IA erfolgt über die direkte Bindung der regulatorischen Untereinheit an den aktivierten Rezeptor. Die GPCR-abhängige Aktivierung von PI3K γ und PI3K β erfordert die Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins in die Teile G α und G $\beta\gamma$. Die Rekrutierung von PI3K γ erfolgt durch die Bindung von G $\beta\gamma$ an die regulatorische Untereinheit. Gleichzeitig spielt auch

die Bindung von RAS-GTP an die katalytische Untereinheit eine wichtige Rolle für die vollständige Aktivierung der PI3K γ -Lipid-Kinase-Aktivität (Hawkins *et al.* 2006, Suire *et al.* 2006).

Alle PI3K der Klasse I sind in der Lage, Phosphoinositid-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Phosphoinositid-3,4,5-trisphosphat (PIP₃) zu phosphorylieren. PIP₃ ist ein wichtiges Sekundärsignalmolekül (*Second Messenger*) und aktiviert eine Vielzahl unterschiedlicher, zelltypspezifischer Signalwege zur Proliferation, Apoptose, Differenzierung, Migration, metabolischen Funktionen und Immunreaktionen. Die Bindung des membrangebundenen PIP₃ erfolgt über die pleckstrin-homologe Domäne (PH-Domäne), welche in einer großen Zahl verschiedener Moleküle existiert. Die wichtigsten Zielmoleküle sind die Phosphoinositid-abhängige Kinase (PDK-1) und die Proteinkinase B (PKB, heute als AKT bezeichnet). Aufgrund der Rekrutierung durch PIP₃ an die Zellmembran kann AKT durch PDK-1 am Thr-308 und durch mTORC2 am Ser-473 phosphoryliert werden (Alessi *et al.* 1997, Sarbassov *et al.* 2005). Die Aktivierung von AKT löst eine Vielzahl an Signalkaskaden zur Steuerung von Stoffwechselfvorgängen, Proliferation, Zellwachstum und Zellüberleben aus (Sasaki *et al.* 2007, Hawkins *et al.* 2006, Hirsch *et al.* 2007). Die Termination des PIP₃-Signales erfolgt durch Phosphatasen. Die wesentlichen Regulatoren sind die Phosphatase und Tensin-Homolog (PTEN) und die SRC-Homologie-2-Domänen-enthaltende Inositol-Polyphosphat-5-phosphatase (SHIP). Durch PTEN, den direkten Gegenspieler der PI3K Klasse I, wird PIP₃ zurück zu Phosphoinositid-4,5-bisphosphat dephosphoryliert. SHIP entfernt hingegen den Phosphatrest an der D5-Position des Inositolringes und bildet Phosphoinositid-3,4-bisphosphat, was nicht durch PI3K der Klasse I phosphoryliert werden kann (Hawkins *et al.* 2006).

Die Lipid-Kinase-Aktivität stellt nicht die einzige Funktion von PI3K der Klasse I dar. Zusätzlich verfügen alle Mitglieder dieser Klasse über eine Proteinkinase-Aktivität (Carpenter *et al.* 1993, Dhand *et al.* 1994, Walker *et al.* 1999, Naga Prasad *et al.* 2005). PI3K γ besitzt zudem eine Gerüstfunktion, bei der über eine direkte Protein-Protein-Interaktion die cAMP-degradierende Funktion verschiedener Phosphodiesterasen (PDE) aktiviert wird (Patrucco *et al.* 2004, Perino *et al.* 2011, Hirsch *et al.* 2009, Ghigo *et al.* 2012). Eine ähnliche kinase-unabhängige Gerüstfunktion wurde auch für PI3K β nachgewiesen (Jia *et al.* 2008, Ciruolo *et al.* 2008).

Die katalytischen PI3K-Untereinheiten p110 α und p110 β werden ubiquitär exprimiert. Homozygot p110 α - bzw. p110 β -negative Mäuse sterben bereits im Embryonalstadium (Bi *et al.* 1999, Bi *et al.* 2002). Ebenso führt der *Knockout* des PIK3R1-Genes, das die regulatorischen Untereinheiten p85 α , p55 α und p50 α kodiert, zu embryonaler Letalität, wohingegen p85 β -defiziente Tiere lebensfähig sind (Hawkins *et al.* 2006). Die Expression von p110 γ und p110 δ ist gewebespezifisch, hauptsächlich in Zellen des Immunsystems und des Herz-Kreislaufsystems (Herzmuskel-, Gefäßmuskel-, Endothelzellen). Mäuse mit einem genetischen *Knockout* für p110 γ oder p110 δ sind lebensfähig, weisen aber verschiedene Veränderungen, insbesondere bei der Reaktion auf pathophysiologische Bedingungen, auf (Hirsch *et al.* 2000, Morello *et al.* 2009, Hawkins *et al.* 2006, Ghigo *et al.* 2010).

1.5.2. Funktionen von PI3K γ

PI3K γ , der einzige Vertreter der PI3K Klasse IB, wird nicht ubiquitär exprimiert und konnte nur in einigen Organsystemen und Geweben nachgewiesen werden. Dazu gehören unter anderem Zellen des hämatopoetischen Systems, wie beispielsweise Leukozyten, daneben Zellen von Pankreas, Niere, Leber und Lunge sowie Herz- und Skelettmuskelzellen und Endothelzellen (Stoyanov *et al.* 1995, Go *et al.* 1998, Hirsch *et al.* 2000, Patrucco *et al.* 2004). Weiterhin wird PI3K γ in Zellen des Nervensystems exprimiert (König *et al.* 2010, Spitzenberg *et al.* 2010).

Die Aktivierung von PI3K γ erfolgt durch die Rekrutierung beider Untereinheiten durch die dissoziierte $\beta\gamma$ -Untereinheit eines G $_T$ -gekoppelten GPCR an die Zellmembran und die Interaktion von p110 γ mit Ras (Hawkins *et al.* 2006, Rommel *et al.* 2007).

PI3K γ hat Anteil an verschiedenen pro-inflammatorischen Reaktionen des Immunsystems und stellt ein mögliches Ziel zur pharmakologischen Behandlung verschiedener Entzündungsreaktionen dar (Rückle *et al.* 2006). PI3K γ spielt eine wichtige Rolle in Zellen der Immunabwehr bei verschiedenen Vorgängen wie Migration, Adhäsion und Chemotaxis, ROS-Bildung, Phagozytose, dem spontanen Zelltod von Neutrophilen und weiteren zellulären Reaktionen (Hirsch *et al.* 2000, Weiss-Haljiti *et al.* 2004, Saudemont *et al.* 2009, Ferguson *et al.* 2007, Lehmann *et al.* 2009, Kim *et al.* 2012, Schmidt *et al.* 2013, Xu *et al.* 2010). In verschiedenen murinen

Krankheitsmodellen wurde ein Einfluss von PI3K γ auf die Morbidität und / oder Mortalität gezeigt. Bei der experimentellen Autoimmun-Enzephalomyelitis (EAE), einem Modell für die multiple Sklerose, ist die Expression von PI3K γ mit einer höheren Morbidität und Mortalität verknüpft. Diese Befunde konnten auf eine verringerte Migrationsfähigkeit PI3K γ -defizienter T-Helferzellen zurückgeführt werden (Berod *et al.* 2011). Während der kollagen-induzierte Arthritis, einem Tiermodell zur rheumatoiden Arthritis, wurde analog eine verringerte Migration von Neutrophilen in die Gelenke und eine geringere Morbidität in PI3K γ -KO-Tieren bzw. in mit PI3K γ -Inhibitoren behandelten Tieren festgestellt (Camps *et al.* 2005). Der Verlust von PI3K γ verhindert die nahe den aktivierten Chemokinrezeptoren lokalisierte PIP₃-Bildung und somit die Bildung eines Leitsaums (*leading edge*). Eine gerichtete Migration entlang eines Chemokingradienten wird dadurch behindert (Hannigan *et al.* 2002, Nombela-Arrieta *et al.* 2007). Eine gestörte Migrationsfähigkeit wurde auch bei Neutrophilen, Makrophagen und dendritischen Zellen von PI3K γ -KO-Mäusen *in vitro* und *in vivo* festgestellt (Hirsch *et al.* 2000, Sasaki *et al.* 2000, Del Prete *et al.* 2004, Rommel *et al.* 2007). Insbesondere ist hierbei eine durch Verlust von PI3K γ verminderte Einwanderung von Neutrophilen durch die BHS ins Hirngewebe in einem Schlaganfall-Modell, der transienten MCAO (*middle cerebral artery occlusion*), zu erwähnen (Jin *et al.* 2011). PI3K γ spielt zudem bei der Aktivierung von T-Zellen eine Rolle. Der Verlust von PI3K γ führt zu einer verringerten Zytokinproduktion durch aktivierte T-Zellen. In Thymozyten reguliert PI3K γ die T-Zell-Rezeptor- bzw. GPCR-induzierte Apoptose (Sasaki *et al.* 2000). PI3K γ ist notwendig für die Degranulation von Mastzellen und hat somit Einfluss auf Entzündungsreaktionen und allergische Reaktionen. So sind PI3K γ -KO-Mäuse weitgehend gegen allergische Reaktionen geschützt (Laffargue *et al.* 2002). Die für die Pathogenabwehr wichtige Bildung von ROS wird ebenfalls von PI3K γ beeinflusst. Der Bildung von Superoxid-Anionen (O₂⁻) als Reaktion auf eine Stimulierung mit dem bakteriellen Peptid fMLP ist in PI3K γ -defizienten Neutrophilen verringert (Hirsch *et al.* 2000, Li *et al.* 2000, Sasaki *et al.* 2000). Superoxid-Anionen werden durch den NADPH-Oxidase-Komplex gebildet, dessen Aktivierung durch die PKC α -vermittelte Phosphorylierung von p47phox stattfindet. PKC α wiederum wird durch die Proteinkinase-Aktivität von PI3K γ in Reaktion auf eine fMLP-Rezeptor-Aktivierung phosphoryliert (Stoyanova *et al.* 1997, Lehmann *et al.* 2009). Weitere Funktionen, an denen PI3K γ beteiligt ist, sind die Thrombozytenaggregation, die

Adhäsion von Leukozyten durch Endothelzellen und die Kontraktilität von Gefäßmuskelzellen (Lian *et al.* 2005, Puri *et al.* 2005, Le Blanc *et al.* 2004, Vecchione *et al.* 2005).

Neben den wichtigen Funktionen bei verschiedenen Immunreaktionen spielt PI3K γ in Herzmuskelzellen eine Rolle bei der Reaktion auf eine pathophysiologische, chronische Blutdruckerhöhung und beeinflusst die Kontraktilität (Patrucco *et al.* 2004, Perino *et al.* 2011). Für diese Untersuchungen wurde neben einem PI3K γ -KO-Modell ein Modell verwendet, bei dem die Kinase-Aktivität von PI3K γ durch eine Lys833-Arg-Punktmutation deaktiviert ist, dabei das Molekül p110 γ -KD aber exprimiert wird (Patrucco *et al.* 2004). Im Gegensatz dazu wird die katalytische Untereinheit p110 γ im PI3K γ -KO-Modell nicht exprimiert (Hirsch *et al.* 2000). Interessanterweise wurde festgestellt, dass die kinase-inaktive Variante von PI3K γ im untersuchten Zusammenhang einen vergleichbaren Phänotyp aufweist wie die unveränderte Wildtyp-Version, der Verlust von PI3K γ jedoch zu Abweichungen des Phänotyps führt. Somit wurde gezeigt, dass PI3K γ neben seiner Kinase-Funktion weitere Interaktionsmöglichkeiten besitzt (Hirsch *et al.* 2009). Durch die Interaktion des Komplexes p84/87-p110 γ mit PKA und PDE3B wird die cAMP-degradierende Funktion von PDE3B aktiviert (Abbildung 5). PKA bindet dabei an p110 γ , die Bindung von PDE3B erfolgt durch p84/87, aber nicht durch die alternative regulatorische Untereinheit p101 (Perino *et al.* 2011). PI3K γ übt bei dieser Interaktion eine von der Kinase-Aktivität unabhängige Gerüstfunktion (*Scaffold*-Funktion) aus, wodurch PKA und PDE3B in engen Kontakt gebracht werden und somit eine verstärkte Aktivierung von PDE3B durch PKA ermöglicht wird. Eine vergleichbare Aktivierung von PDE durch PKA in einem Kinase-bindenden Protein-Komplex an PI3K γ wurde zudem für PDE3A, PDE4A und PDE4B gezeigt. Die Aktivierung von PDE führt zu einer verstärkten Hydrolyse von cAMP zu 5'-AMP. Somit besitzt PI3K γ als AKAP (*a-kinase anchoring protein*) einen moderierenden Einfluss auf die lokale Konzentration des *Second Messengers* cAMP und auf nachfolgende Signalwege. Eine Interaktion von PI3K γ findet nur mit bestimmten PDE-Isoformen statt, so wird die Aktivität von PDE4D durch den Verlust von PI3K γ nicht beeinflusst. Zu beachten ist, dass die Kinase-Aktivität von PI3K γ durch die Interaktion mit PKA inhibiert wird, indem eine Phosphorylierung von p110 γ am Thr-1024 erfolgt (Patrucco *et al.* 2004, Hirsch *et al.* 2009, Perino *et al.* 2010, Perino *et al.* 2011, Ghigo *et al.* 2012).

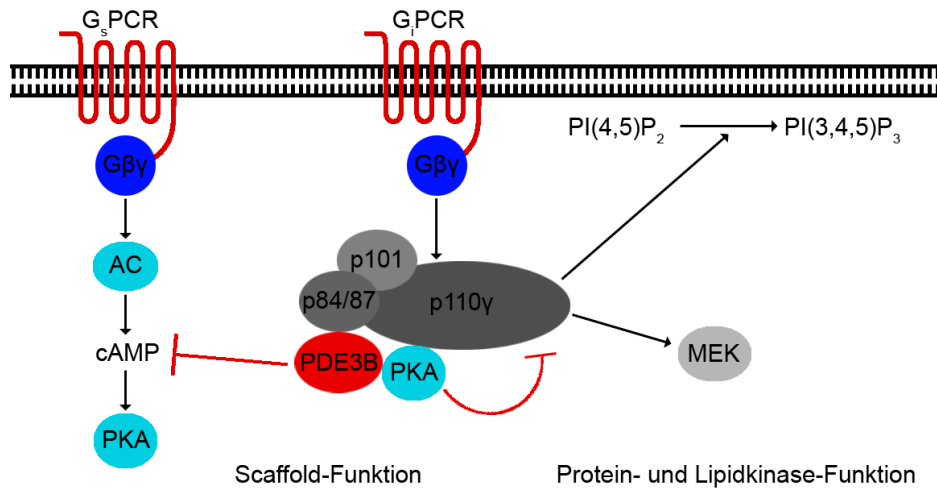


Abbildung 5: Übersicht über Scaffold- und Kinase-Funktion von PI3K γ

PI3K γ ist ein Komplex aus $p110\gamma$ und entweder $p84/87$ oder $p101$. Über die *Scaffold*-Funktion bilden $p110\gamma$ und $p84/87$ einen Komplex mit PKA und PDE3B. Dadurch wird PDE3B aktiviert und baut den *Second Messenger* cAMP ab (Patrucco *et al.* 2004, Perino *et al.* 2011). Die PI3K der Klasse I besitzen eine Lipidkinase-Funktion und können Phosphoinositid-4,5-bisphosphat ($PI(4,5)P_2$) zu dem *Second Messenger* Phosphoinositid-3,4,5-trisphosphat ($PI(3,4,5)P_3$) phosphorylieren. Zudem besitzt PI3K γ eine Proteinkinase-Funktion und kann MAP-Kinase-Signalwege aktivieren, insbesondere den ERK-Signalweg durch Phosphorylierung der MAPK-Kinase MEK (Bondeva *et al.* 1998). PI3K γ kann durch G_i -PCR aktiviert werden, die cAMP-bildende Adenylatcyclase (AC) durch G_s -PCR (Hawkins *et al.* 2006, Schmidt *et al.* 2005). Die Kinase-Aktivität von PI3K γ wird infolge der Bindung von PKA inhibiert (Perino *et al.* 2011).

Die in Kardiomyozyten beschriebene Gerüstfunktion von PI3K γ wurde in unserer Arbeitsgruppe auch in Mikroglia festgestellt, wo ein Einfluss der cAMP-Konzentration auf die Phagozytoseaktivität besteht (Schmidt *et al.* 2013). Die Beseitigung von Pathogenen und totem Zellmaterial durch Phagozytose ist eine wichtige Aufgabe von Immunzellen wie Makrophagen oder Mikroglia. Eine erhöhte cAMP-Konzentration, die in PI3K γ -defizienten Mikroglia bzw. infolge einer Inhibition der PDE-Aktivität nachzuweisen war, verringerte die Phagozytoseaktivität der Mikroglia-Zellen.

1.6. Zielstellung der Arbeit

Ein SIRS bzw. eine Sepsis stellt ein komplexes pathophysiologisches Geschehen dar, das die Funktion der verschiedenen Organsysteme beeinträchtigen und zu deren Versagen und in letzter Konsequenz durch Multiorganversagen zum Tod führen kann. Eine Beeinträchtigung bzw. ein Verlust von Funktionen des ZNS treten in bis zu 70% der Patienten mit einer schweren Sepsis auf und werden unter der Symptomatik der SE zusammengefasst. Das Auftreten einer SE ist mit einer höheren Mortalität und Morbidität der Patienten assoziiert.

Ein Kernpunkt der Entwicklung einer SE ist der bereits in einer frühen Phase der Erkrankung eintretende Verlust der Integrität der BHS infolge des neuroinflammatorischen Geschehens. Daraus kann sich ein Verlust der für die neurologische Funktion wichtigen Homöostase ergeben. Der in den vorigen Abschnitten dargelegte Wissensstand deutet auf einen möglichen Einfluss von PI3K γ auf die Expression von MMP durch die inhibierende Wirkung von PI3K γ auf cAMP-abhängige Signalwege. MMP sind in der Lage, die extrazellulären Komponenten der BHS abzubauen. Insbesondere im Hinblick auf die degradierende Wirkung von MMP auf Strukturen der BHS bei der Entwicklung der SE ist ein möglicher regulierender Einfluss von PI3K γ auf die Expression von MMP von Interesse. Dadurch könnte die kinase-unabhängige Funktion von PI3K γ eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung einer SE infolge einer systemischen Entzündungsreaktion spielen.

Zielsetzung der Arbeit war, die Funktion von PI3K γ bei der Entwicklung der SE zu untersuchen. Ausgangspunkt war der Nachweis von PI3K γ in Zellen des ZNS, insbesondere in Mikroglia (Jin *et al.* 2010b, Schmidt *et al.* 2013). Zudem wurde gezeigt, dass PI3K γ eine wichtige Rolle für verschiedene Funktionen von Immunzellen spielt (Costa *et al.* 2011) und eine regulierende Wirkung auf die Expression von MMP in Kardiomyozyten und Kardiofibroblasten hat (Guo *et al.* 2010).

In der vorliegenden Arbeit sollte nunmehr untersucht werden, ob eine Regulation der MMP-Expression durch PI3K γ in Mikroglia besteht und ob der Verlust von PI3K γ zu einer verstärkten Schädigung der BHS-Funktion *in vivo* führt. Die Untersuchung wurde anhand von drei Thesen geführt:

Zum Ersten wurde die These aufgestellt, dass PI3K γ die BHS-Integrität während LPS-induzierter neuroinflammatorischer Prozesse beeinflusst. PI3K γ hat Einfluss auf inflammatorische Prozesse in Immunzellen und spielt eine Rolle bei der Pathogenese verschiedener mit Entzündungsreaktionen assoziierter Krankheiten (Ghigo *et al.* 2010). Ein Einfluss von PI3K γ auf entzündliche Prozesse während der Pathogenese der SE ist wahrscheinlich und sollte deshalb in einem *in-vivo*-Modell untersucht werden. Für die mechanistischen Untersuchungen zu den Auswirkungen eines SIRS auf die BHS kam ein gut definierbares Maus-Modell zur Anwendung, das auf der Injektion des Pathogenbestandteiles LPS basierte und somit in Bezug auf den zeitlichen Verlauf und die Auswirkungen eine gute Reproduzierbarkeit bot.

Die zweite These besagt, dass PI3K γ die MMP-Expression in Mikroglia über die kinase-unabhängige *Scaffold*-Funktion moderiert. Die Bildung von MMP in der vaskulären Einheit infolge einer Entzündungsreaktion trägt wesentlich zur Schädigung der BHS bei der SE bei. Verschiedene MMP können durch Mikroglia exprimiert werden (Rosenberg 2009, del Zoppo *et al.* 2012, Nuttall *et al.* 2007, Candelario-Jalil *et al.* 2009). Mikroglia sind Zellen mesodermalen Ursprungs und exprimieren PI3K γ (Kettenmann *et al.* 2011, Tambuyzer *et al.* 2009, Jin *et al.* 2010b). In Kardiomyozyten wurde eine moderierende Wirkung der kinase-unabhängigen *Scaffold*-Funktion von PI3K γ auf die MMP-Expression gezeigt (Guo *et al.* 2010). In Mikroglia-Zellkulturen sollte der Einfluss von PI3K γ auf die MMP-Expression *in vitro* untersucht werden.

Die dritte These sagt aus, dass eine Aktivierung des cAMP-PKA-Signalweges in Mikroglia zu einer erhöhten Expression von MMP führt. Die kinase-unabhängige Funktion von PI3K γ bewirkt über die PDE-Aktivierung eine Verringerung der cAMP-Konzentration in Mikroglia (Schmidt *et al.* 2013). Die Expression verschiedener MMP wird durch eine Aktivierung des cAMP-Signalweges verstärkt (Hasan & Nakajima 1999, Alper *et al.* 2001, Shankavaram *et al.* 2001, Melnikova *et al.* 2006, Lai *et al.* 2003, Guo *et al.* 2010). Der Zusammenhang zwischen der erhöhten cAMP-Konzentration in PI3K γ -defizienten Mikroglia und der Expression von MMP sollte *in vitro* untersucht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Verwendete Materialien und Versuchstiere

2.1.1. Chemikalien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma (USA), Fluka (D), Roth (D), Serva (D) und Merck (D) bezogen und lagen im Reinheitsgrad *p.A.* vor.

2.1.2. Puffer und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen in doppelt deionisiertem Wasser angesetzt. Zur Bereitstellung wurde eine Millipore Synergy UV Anlage (Millipore, USA) verwendet.

Als Basis verschiedener Lösungen, als Waschpuffer in verschiedenen Anwendungen und für die Zellkultur wurde phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS: 100 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, 80 mM Na₂HPO₄, pH 7,5) verwendet. Die Zusammensetzung aller anderen Puffer und Lösungen wird in den jeweiligen Protokollen beschrieben.

2.1.3. Inhibitoren und Agonisten

In Tabelle 1 sind die verwendeten Inhibitoren und Stimulanzen aufgeführt. Lipopolysaccharid (LPS) wurde in PBS gelöst. Von den in DMSO gelösten Stoffen wurden Stammlösungen so hergestellt, dass die DMSO-Endkonzentration im Kulturmedium 0,1% nicht überstieg.

Tabelle 1: Inhibitoren und Agonisten

Substanz	Hersteller / Quelle	Konzentration (Stammlösung)
IBMX	Sigma (USA)	500 mM in DMSO
Cilostamid	Sigma (USA)	10 mM in DMSO
H89	Enzo Life Science (USA)	10 mM in DMSO
LPS von <i>Escherichia coli</i> 055:B5	Sigma (USA)	100 µg/ml für <i>in-vitro</i> -Versuche 2,5 mg/ml für <i>in-vivo</i> -Versuche in PBS
Forskolin	Enzo Life Science (USA)	10 mM in DMSO

2.1.4. Tiere und Primärzellen

Für *in-vivo*-Versuche und die Präparation von Mikroglia wurden C57BL/6J-Mäuse verwendet. Neben dem als Kontrollstamm dienenden Wildtyp kamen ein PI3K γ -defizienter *Knockout*-Stamm (KO) (Hirsch *et al.* 2000) und ein *Knockin*-Stamm (KD) (Patrucco *et al.* 2004) zum Einsatz. Durch eine gerichtete Punktmutation wird in PI3K γ des PI3K γ -KD-Stammes anstelle des Lysin-833 Arginin exprimiert, wodurch die Kinaseaktivität verloren ist. Der PI3K γ -KO- und PI3K γ -KD-Stamm waren seit mehr als zehn Generationen auf den C75BL/6J-Stamm zurückgekreuzt.

Die Tierhaltung erfolgte gemäß den Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes an den Standorten des Jenaer Instituts für Versuchstierkunde (IVTK) unter standardisierten, spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen mit 12 h Tag-Nacht-Rhythmus bei konstanter Temperatur und Luftfeuchte sowie Wasser und Standardfutter *ad libitum*. Die Terminalexperimente wurden vom Thüringer Kultusministerium genehmigt. Für Tierexperimente verwendete Weibchen wurden zur Angleichung des Geschlechtszyklus für drei Tage auf Streu von Männchen gesetzt, um die Proöstrus-Phase einzuleiten. Das Erreichen der Proöstrus-Phase wurde durch visuelle Begutachtung der Vaginalöffnung kontrolliert (Byers *et al.* 2012).

2.2. Methoden

2.2.1. Kultivierung von Mikroglia und BV2-Zellen

Als Mikroglia-Kulturmedium für primäre Mikroglia und die BV2-Zelllinie wurde *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM, *high glucose*, Sigma, USA) mit thermisch inaktiviertem fetalen Kälberserum (*fetal calf serum* – FCS, 10%_{v/v}), Penicillin (100 *units*/ml), Streptomycin (100 µg/ml) und Amphotericin B (2,5 µg/ml) verwendet. Die Kultivierung erfolgte in Zellkulturflaschen bzw. Mehr-*well*-Platten der Firma Greiner (D) in Inkubatoren der Firma Heraeus (D) bei 37 °C und CO₂-angereicherter Atmosphäre (5% CO₂). Zum Ablösen konfluenter BV2 wurden die Zellkulturen für 5 min mit Trypsin (0,05%_{m/v} Trypsin, 0,02%_{m/v} EDTA in PBS, PAA, D) inkubiert und leicht geschüttelt. Die Zellsuspension wurde in ein FalconTM-Röhrchen (BD Bioscience, USA) überführt. Nach einer Zentrifugation (500 xg, 5 min in der Centrifuge 5416, Eppendorf, D) wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und die Suspension zur Passagierung 1:10 verdünnt bzw. gezählt und für Experimente benutzt. BV2 wurden bis zur 15. Passage verwendet. Für Versuche wurden, sofern nicht anders angegeben, in 6-*well*-Platten 250000 Zellen/*well* mit je 2 ml Medium, in 96-*well*-Platten 10000 Zellen/*well* mit je 100 µl Medium kultiviert und nach dem Adhärenzen über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert.

2.2.2. Präparation von primären Mikroglia

Primäre Mikroglia wurden aus Großhirnanteilen neugeborener Mäuse (Tag eins bis drei nach der Geburt) gewonnen. Nach der Dekapitation wurde das Gewebe isoliert, zerkleinert, mit Dissoziationsmedium (20 mM HEPES, 0,05%_{m/v} Trypsin, 700 µM EDTA, 12 µg/ml DNase in DMEM) resuspendiert und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Überführung in Mikroglia-Kulturmedium und Homogenisierung der Zellsuspension erfolgte eine Kultivierung (37 °C, 5% CO₂) der erhaltenen Astroglia-Mikroglia-Mischkultur für 14 Tage. Das Kulturmedium wurde wöchentlich gewechselt. Zur Isolation der Mikroglia-Zellen aus der Mischkultur wurde diese Zellpopulation mit EDTA (2 mM in PBS) unter leichtem Schütteln von der Astroglia-Monoschicht abgelöst.

2.2.3. Posttranskriptionale Geninaktivierung von p110 γ mittels RNA-Interferenz

Für die genetische Inaktivierung der katalytischen Untereinheit von PI3K γ in BV2-Zellen wurde die PEI-Transfektionsmethode (Sauer *et al.* 2008) mit Plasmid-pLKO.1-Vektoren (Sigma-Aldrich, D) angewandt. Neben den Verpackungsplasmiden (pRev, pEnv-VSV-G und pMDLg) und einem Puromycin-Resistenz-Gen war in den Vektoren eine shRNA gegen p110 γ bzw. eine ungerichtete shRNA kodiert. Zur Produktion lentiviraler Partikel wurden HEK293T-Zellen verwendet. Diese Zellen wurden bis zu einer Konfluenz von ca. 40% in 6-*well*-Platten inkubiert. Die Transfektion mit dem Plasmid pLKO.1 (4 μ g/ml in DMEM) wurde mit Hilfe von PEI (2,5 μ g/ μ g DNA) durchgeführt. Die Zellen wurden für mindestens 4 h inkubiert. Danach wurde das Medium durch frisches DMEM mit thermisch inaktiviertem fetalen Kälberserum (10%_{v/v}) ersetzt. Nach 24 h und 48 h wurden die Kulturüberstände jeweils abgenommen, sterilfiltriert (Filtropur S 0,2 μ m, Sarstedt, D) und konzentriert (Amicon Ultracel-30, Millipore, USA).

Für die Infektion der Zielzellen wurden je 5000 Zellen über Nacht in 12-*well*-Platten kultiviert. Nach der Zugabe von Polybren (8 μ g/ml) wurde die Virussuspension auf die Zellen gegeben, die Platte zentrifugiert (500 xg, 60 min in der Heraeus Multifuge 1S, Thermo Scientific, USA) und für 6 h inkubiert. Nach Austausch des Mediums wurden die Zellen für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Selektion der infizierten Zellen über 14 Tage durch Zugabe von Puromycin (3 μ g/ml) zum Kulturmedium.

2.2.4. Tierexperimentelles Modell zur Induktion eines SIRS

In der vorliegenden Arbeit sollten die Auswirkungen einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS), unter Berücksichtigung der Aktivität von PI3K γ , auf die Immunzellen des Gehirns und der Einfluss auf die Blut-Hirn-Schranke untersucht werden. Zum weitestgehenden Ausschluss interferierender Einflüsse und zur Erreichung maximaler Reproduzierbarkeit bei Minimierung des Versuchstieraufwandes wurde ein Versuchsmodell mit einer Bolusinjektion einer definierten LPS-Menge gewählt.

Für die *in-vivo*-Untersuchungen wurden 8 bis 12 Wochen alte Tiere verwendet. Die Tiere erhielten einmalig eine intraperitoneale Injektion von LPS (10 mg/kg KG, in PBS), die Kontrollgruppen bekamen ein äquivalentes Volumen PBS (4 ml/kg KG). Zusätzlich wurde 500 µl sterile isotonische Kochsalzlösung subkutan injiziert, um einer Dehydratation vorzubeugen. Futter und Wasser standen *ad libitum* zur Verfügung.

2.2.5. Quantifizierung der BHS-Permeabilität

Die Quantifizierung der BHS-Permeabilität erfolgte mit Hilfe der Applikation von Evans Blue (Comim *et al.* 2011, Dal-Pizzol *et al.* 2013, Flierl *et al.* 2009). Dazu wurde den Mäusen 1 h vor dem Töten Evans-Blue-Lösung (4 ml/kg KG, 2% _{m/v} in PBS) in die Schwanzvene injiziert. Die Tiere wurden zum vorgegebenen Versuchsende mit Isofluran (2,5% in Sauerstoff) anästhesiert und transkardial mit 40 ml eiskaltem PBS über eine Zeitspanne von 12 min perfundiert. Dadurch wurde aus den Hirngefäßen das Blut mit dem darin an Albumin gebundenen Evans Blue entfernt. Nachfolgend wurde das Hirn entnommen und mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Quantifizierung des ins Hirngewebe übergetretenen Evans Blue wurde das Gewebe mit Mörser und Stößel homogenisiert und mit 50% _{m/v} Trichloressigsäure (4,1 ml/g Hirngewebe) versetzt. Die Suspension wurde mit einem Vortexmischer homogenisiert und danach zentrifugiert (10000 rpm, 20 min, 4 °C in der Centrifuge 5417R, Eppendorf, D). Nach Mischen von einem Teil des Zentrifugationsüberstandes mit drei Teilen Ethanol (96%) wurde die Fluoreszenz (Anregung 620 nm, Emission 670 nm) im Photospektrometer (Infinite F200, Tecan, CH) gemessen. Die Konzentration wurde anhand einer Standardreihe berechnet.

2.2.6. Beurteilung der Morbidität

Der klinische Schweregrad (*clinical severity score* – CSS, Gonnert *et al.* 2011) zur Beurteilung der Morbidität wurde anhand von Verhalten und Erscheinungsbild der Mäuse mit Hilfe der in Tabelle 2 angegebenen Kriterien bestimmt.

Tabelle 2: Einteilung der CSS-Grade

(gemäß Gonnert *et al.* 2011)

CSS-Grad	spontane Aktivität	Reaktion auf Reize	Haltung
1	hohe Aktivität	schnell, neugierig	normal
2	weniger aktiv, Unterbrechungen der Aktivität	verzögerte, aber adäquate Reaktion	leicht gekrümmt
3	langsam, müde, Bewegungen eingeschränkt	eingeschränkte und verzögerte Reaktion	gekrümmt
4	lethargisch, keine Bewegung	keine Reaktion	stark gekrümmt

2.2.7. Histologie und Immunhistochemie

Die Mäuse wurden anästhesiert und zunächst über 6 min mit 20 ml eiskaltem PBS und danach über 6 min mit 20 ml eiskalter Paraformaldehyd-Lösung (4% in PBS) transkardial perfundiert. Anschließend wurden die Gehirne entnommen und über Nacht bei 4 °C in Paraformaldehyd (4% in PBS) inkubiert. Danach folgten die Entwässerung in einer Alkoholreihe (50%, 70%, 96% 100% Ethanol, 67% Ethanol + 33% Xylol, 33% Ethanol + 67% Xylol, 100% Xylol) und das Einbetten in Paraffin. Schnitte mit einer Stärke von 6 µm wurden am Mikrotom HM335E (Microm, D) angefertigt und auf Menzel-Gläser Superfrost Plus (Thermo Scientific, USA) überführt.

Vor der Färbung wurden die Schnitte mittels absteigender Alkoholreihe (dreimal je 15 min Xylol, 2 min 99% Ethanol, zweimal 2 min 96% Ethanol, 2 min 70% Ethanol, 2 min 50% Ethanol) entparaffiniert und gewässert. Zur Antigen-Demaskierung wurden die Schnitte mit Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0) in der Mikrowelle (750 W, 11 min in R-989, Sharp, D) erhitzt und nach Abkühlen dreimal mit PBS gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde eine Blockierungslösung mit Rinderserum-Albumin (*bovine serum albumin* – BSA) und Eselnormalsерum verwendet

(1% BSA, 0,3% Triton X-100, 10% Eselnormals Serum in PBS) und für 1 h inkubiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen primären Antikörper (Tabelle 3) in Antikörperinkubationslösung (1%_{m/v} BSA, 0,3%_{v/v} Triton X-100, 2%_{m/v} Eselnormals Serum in PBS) erfolgte über Nacht bei 4 °C, gefolgt von dreimaligem Waschen in PBS und der Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper für 1 h bei 4 °C. Fluoreszenzaufnahmen wurden am Olympus BX61 (Olympus, D) aufgenommen. Negativkontrollschnitte wurden in Antikörperinkubationslösung ohne Antikörper inkubiert.

Tabelle 3: Antikörper für die Immunhisto- und Immuncytochemie

Zielmolekül	Quelle	Anwendung / Verdünnung	Spezies / Typ
Iba-1	Abcam (UK)	1:250	Ziege, polyklonal
MMP-2	Novus (UK)	1:100	Kaninchen, polyklonal
MMP-3	Abcam (UK)	1:75	Kaninchen, polyklonal
MMP-9	R&D Systems (D)	1:50	Ziege, polyklonal
MMP-13	Abcam (UK)	1:100	Kaninchen, polyklonal
Myeloperoxidase (MPO)	Dianova (D)	1:500	Kaninchen, polyklonal
Alexa Fluor® 488 donkey anti rabbit IgG	Molecular Probes (USA)	1:250 – 1:500	Esel, polyklonal, Sekundär-Antikörper
Alexa Fluor® 568 donkey anti goat IgG	Molecular Probes (USA)	1:250 – 1:500	Esel, polyklonal, Sekundär-Antikörper

Zur Detektion apoptotischer und nekrotischer Zellen wurden Färbungen nach der TUNEL-Methode mit dem In Situ Cell Death Detection Kit, AP (Roche, D) durchgeführt. Nach der Entparaffinierung wurden die Schnitte gemäß dem Herstellerprotokoll behandelt. Die gefärbten Präparate wurden mit Glyceringelatine eingedeckt. Als Übersichtsfärbung zur Unterscheidung morphologischer Strukturen wurde jeweils an parallelen Schnitten eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) vorgenommen. Nach der Entparaffinierung erfolgte eine Behandlung mit Hämatoxylin für 20 min. Anschließend wurden die Schnitte kurz mit destilliertem Wasser und danach je einmal für 3 min und für 10 min mit lauwarmem Leitungswasser gespült. Nach erneutem kurzen Spülen in destilliertem Wasser wurden die Schnitte für 7 min in alkoholischer Eosinlösung gefärbt und danach überschüssige Eosinlösung mit destilliertem Wasser abgespült. Danach erfolgte eine Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (siehe Seite 36) bis zum Xylol und die Eindeckung mit dem Roti®-Histokitt II (Roth, D). Die Färbungen histologischer Präparate wurden von Frau Rose-Marie Zimmer (Institut für Molekulare Zellbiologie) ausgeführt. Die pathologische Begutachtung von HE- und TUNEL-Färbungen erfolgte durch Dr. Michael Brodhun (Institut für Pathologie, HELIOS Klinikum Erfurt).

2.2.8. Immunzytochemie

Primäre Mikroglia wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten 12-mm-Deckgläschen kultiviert. Im Anschluss an die Kultivierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 20 min in Paraformaldehyd-Lösung (4% in PBS) fixiert. Nach zweimaligem Waschen (5 min und 10 min) in PBS wurden die Zellen für 1 h mit ICC-Blockierungslösung (1% BSA, 0,3% Triton X-100, 10% Ziegennormalserum in PBS) behandelt. Danach wurde über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper (Tabelle 3) in ICC-Antikörperlösung (1% BSA, 0,3% Triton X-100, 2% Ziegennormalserum in PBS) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen (5 min und 10 min) in PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:500 in ICC-Antikörperlösung) für 1 h. Nach erneutem zweimaligen Waschen (10 min und 20 min) in PBS erfolgte eine Färbung mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol, 2 µg/ml in PBS) für 5 min. Danach wurde die Probe zweimal in PBS gewaschen (5 min und 15 min) und mit Shandon

ImmuMount® (Thermo Scientific, USA) auf einen Objektträger aufgebracht. Bilder der Präparate wurden am Fluoreszenzmikroskop (BX61, Olympus, D) aufgenommen.

2.2.9. Western Blot

Die Lyse von Zellen bzw. Gewebeproben erfolgte auf Eis in RIPA-Puffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; dazu direkt vor der Verwendung zugegeben: 10 µM NaVO₃, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 1 µg/ml Pepstatin A, 1 µg/ml Pefabloc®, 2 µg/ml Leupeptin). Die Zellsuspension wurde mit einem Zellschaber (Nunc, DK) abgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, mechanisch aufgeschlossen und zentrifugiert (20000 xg, 20 min, 4 °C in der Centrifuge 5417R, Eppendorf, D). Die Zentrifugationsüberstände wurden in ein neues 1,5 ml Gefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels der Bradford-Methode ermittelt. Hierfür wurden die Proben für 15 min in Bradford-Reagenz (Sigma, USA) inkubiert und die OD bei 595 nm im Infinite F200 Photospektrometer (Tecan, CH) gegen eine Standard-BSA-Konzentrationsreihe gemessen.

Für den Western Blot wurden die Proben mit reduzierendem Fünffach-Laemmli-Probenpuffer (5%_{m/v} SDS, 33%_{v/v} Glycerol, 25%_{v/v} 2-Mercaptoethanol, 0,1 mg/ml Bromphenolblau, 83 mM Tris-HCl, pH 6,8) versetzt und jeweils gleiche Proteinmengen auf ein 10%iges Polyacrylamid-Gel aufgetragen (Tabelle 4). Für das Trenngel wurde Trenngelpuffer (TGP: 2 M Tris-HCl, pH 8,8) und für das Sammelgel Sammelgelpuffer (SGP: 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8) verwendet. Acrylamid-Methylbisacrylamid stand als gebrauchsfertige Lösung (Rotiphorese® Gel 30, Roth, D) mit 30% Acrylamid zur Verfügung. Natriumdodecylsulfat (SDS) und Ammoniumpersulfat (APS) wurden jeweils als 20%ige Stammlösungen angesetzt. Die Größenauftrennung der Proteine erfolgte durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) in Mighty Small II mini-SE250/SE260-Kammern (Hoefer Scientific Instruments, USA) bei maximal 120 V und 30 mA (Powersupply Model 1000/500, BioRad, USA) in Laemmli-SDS-PAGE-Puffer (25 mM Tris, 0,2 mM Glycin, 3,5 mM SDS). Das Gel wurde anschließend in Transfer-Puffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 15%_{v/v} Methanol) inkubiert und die aufgetrennten Proteine mittels einer

Semi-Dry-Blotting-Apparatur (Millipore Graphite, Millipore USA) auf eine PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm, Millipore, USA; in Methanol aktiviert) übertragen (1 mA/cm², 1 h).

Tabelle 4: Zusammensetzung für ein SDS-PAGE-Gel

	Gel-Ansatz					Polymerisationskatalysator
	Rotiphorese® Gel 30	TGP bzw. SGP	SDS (20% m/v)	H ₂ O	APS (20% m/v)	TEMED
Trenngel	32,9%	18,8%	0,5%	47,4%	0,4%	+ 0,04%
Sammelgel	13,1%	24,7%	0,5%	61,1%	0,6%	+ 0,06%

Anschließend wurde die Membran mit den immobilisierten Proteinen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in 2,5% BSA in TBS/T (50 mM NaCl, 0,1% Tween20, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4) für 30 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper (Tabelle 5) bei 4 °C und leichtem Schütteln über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS/T wurde die Membran mit HRP-konjugiertem sekundären Antikörper (Tabelle 5) für 30 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für je 5 min mit TBS/T sowie einmal für 5 min mit TBS (50 mM NaCl, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4) gewaschen und mit PierceTM ECL Western Blotting Substrate (Thermo Scientific, USA) für 1 min bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde auf eine Glasplatte gelegt, mit Folie abgedeckt und am LAS-4000 Luminescent Image Analyzer (Fujifilm, J) die Chemolumineszenz detektiert. Die Quantifizierung der Signalstärke erfolgte mittels der Software MultiGauge (Fujifilm, J). Zum Entfernen der Antikörper für eine weitere Detektion wurde die Membran mit Stripping-Puffer (100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,7)

für 30 min bei 56 °C und anschließend bei Raumtemperatur dreimal für je 15 min mit TBS/T gewaschen sowie für 15 min in 1% BSA in TBS/T inkubiert.

Tabelle 5: Für die Western-Blot-Analyse verwendete Antikörper

Zielmolekül	Quelle	Anwendung / Verdünnung	Spezies / Typ
p110 γ	Institut für Molekulare Zellbiologie, Jena	1:100; 5% Milchprotein*	Maus, monoklonal
β -Aktin	Sigma (USA)	1:5000; 5% BSA**	Maus, monoklonal
Vinculin	Cell Signaling (USA)	1:1000; 5% BSA**	Kaninchen, polyklonal
MMP-2	Novus (UK)	1:3000; 5% BSA**	Kaninchen, polyklonal
MMP-9	Cell Signaling (USA)	1:1000; 5% BSA**	Kaninchen, polyklonal
MMP-13	Abcam (UK)	1:5000; 5% BSA**	Kaninchen, polyklonal
p CREB (S133)	Cell Signaling (USA)	1:1000; 5% BSA**	Kaninchen, polyklonal
CREB	Cell Signaling (USA)	1:1000; 5% BSA**	Maus, monoklonal
goat anti rabbit	Santa Cruz (USA)	1:1000 – 1:5000; 5% Milchprotein*	Ziege, polyklonal, HRP-konjugierter Sekundär-Antikörper
goat anti mouse	Santa Cruz (USA)	1:1000 – 1:5000; 5% Milchprotein*	Ziege, polyklonal, HRP-konjugierter Sekundär-Antikörper

* Magermilchpulver (Applichem, D) in TBS/T; ** Bovines Serumalbumin (Sigma, USA) in TBS/T

2.2.10. Zymographie

Der Nachweis von MMP-2 und MMP-9 in Zellkulturüberständen erfolgt mittels Gelatine-Zymographie (del Zoppo *et al.* 2012, Dal-Pizzol *et al.* 2013). Zellkulturüberstände wurden zentrifugiert (500 xg, 10 min, 4 °C in der Centrifuge 5417R, Eppendorf, D), um suspendierte Zellen zu entfernen. Die Überstände wurden mit Hilfe von Amicon Ultra-0.5 mL Zentrifugalfiltern (Millipore, USA) mit einem Molekülgrößenausschluss von 30 kDa auf ein Volumen von ca. 30 µl konzentriert. Die Konzentrate wurden mit nicht-reduzierendem Fünffach-Probenpuffer (2%_{m/v} SDS, 50%_{v/v} Glycerol, 0,1 mg/ml Bromphenolblau, 0,3 M Tris-HCl, pH 6,8) versetzt und für 15 min bei 37 °C denaturiert. Die Proben wurden vollständig auf ein gelatinehaltiges, nicht-reduzierendes, 7,5%iges SDS-PAGE-Gel (Trenngel: 0,6 g/l Gelatine, 0,1%_{m/v} SDS, 25%_{v/v} Rotiphorese® Gel 30, 0,375 M Tris-HCl, pH 8,8) aufgetragen und elektrophoretisch bei einer Stromstärke von 15 mA aufgetrennt. Das Gel wurde zweimal für 30 min mit Triton X-100 (2,5%), je einmal für 30 min und für 15 min mit Wasser und anschließend für 30 min mit TAB-Puffer (30 mM CaCl₂, 0,01% NaN₃, 100 mM Tris-HCl, pH 7,8) gewaschen. Danach folgte die Inkubation bei 37 °C für 20 h in TAB-Puffer. Im Anschluss wurde das Gel mit Coomassie-Brilliantblau G250 (0,25% in 20% Methanol, 7% Essigsäure) für 40 min gefärbt und darauffolgend in mehreren Waschschritten entfärbt (20% Methanol, 7% Essigsäure). Zur densitometrischen Analyse wurden die Gele eingescannt (Scanjet G-4050, HP, USA) und als Grauwertbild mit der Software MultiGauge (Fujifilm, J) quantifiziert.

2.2.11. MMP-2/-9-Aktivitäts-Assay

Zellkulturüberstände wurden wie unter 2.2.10 beschrieben konzentriert und die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 mit dem InnoZyme Gelatinase (MMP2/MMP9) Activity Assay Kit (Calbiochem, D) entsprechend des Herstellerprotokolls detektiert. Das vollständige Probenvolumen wurde eingesetzt, mit Reaktionspuffer auf ein Volumen von 90 µl aufgefüllt und mit 10 µl des MMP-2/-9-spezifischen Substrats gemischt. Es erfolgte keine Zugabe eines Aktivators für die Proformen der MMP. Der Abbau des Substrats wurde anhand einer Fluoreszenzmessung (Anregung 320 nm, Emission 405 nm, Infinite 200Pro, Tecan, CH) gemessen.

2.2.12. Quantifizierung von cAMP

Mikroglia wurden in 96-*well*-Platten mit transparentem Boden inkubiert. Nach einer Inkubation über Nacht in serumfreiem Medium wurden die Zellen mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde mit dem cAMP GloAssayKit (Promega, D) gemäß dem Herstellerprotokoll unter Verwendung der zugehörigen Standards ermittelt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte mit einem Photospektrometer (Infinite F200, Tecan, CH). Die Messungen der intrazellulären cAMP-Konzentration wurden von Caroline Schmidt, Doktorandin am Institut für Molekulare Zellbiologie, durchgeführt.

2.2.13. RNA-Präparation und quantitative *real-time* PCR

Zellen wurden in 6-*well*-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit Inhibitoren bzw. Agonisten behandelt. Die Extraktion der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy Mini kit (QIAGEN, D) unter Verwendung des Herstellerprotokolls. Zur Beseitigung einer möglichen DNA-Kontamination wurde der Extrakt für 30 min bei 37 °C mit RNase-freier DNase I (Fermentas, D) inkubiert. Die DNase wurde durch Behandlung mit EDTA (25 mM) und eine Erwärmung für 10 min auf 65 °C inaktiviert. Die Ermittlung der RNA-Konzentration und Kontrolle der Reinheit wurde photospektrometrisch (Nanodrop ND-1000, Peqlab, D) durchgeführt. Die Herstellung von cDNA erfolgte aus jeweils 0,5 µg Gesamt-RNA mit dem First Strand cDNA Synthese Kit (Fermentas, D) nach dem Herstellerprotokoll unter Verwendung des Oligo(dT)₁₈-Primers.

Die Expressionsanalyse erfolgte mittels quantitativer *real-time* PCR (RT-qPCR) mit dem Maxima SYBR Green/ROX Kit (Fermentas, D) entsprechend des beigefügten Herstellerprotokolls im realplex Mastercycler ep gradient (Eppendorf, D). Die verwendeten Primer-Paare sind in Tabelle 6 aufgelistet. Nach initialem Erhitzen auf 95 °C für 10 min folgten 40 RT-qPCR-Zyklen (95 °C für 15 s, *Annealing*-Temperatur für 30 s, 72 °C für 40 s) und eine Schmelzkurve zur Qualitätskontrolle. Die erhaltenen Ct-Werte (*cycle threshold*) wurden gegen einen Faktor, der sich als geometrisches Mittel aus den zugehörigen Ct-Werten von β -Aktin, GAPDH und HPRT1 ergab, normalisiert.

Tabelle 6: Sequenzen der für die RT-qPCR verwendeten Primer

Ziel-mRNA	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer	Annealing-Temperatur	Referenz
MMP-1	GCCATTACCA GTCTCCGAG GA	GGAATTTGTT GGCATGACT CTCAC	58 °C	Woo <i>et al.</i> 2008
MMP-2	TGGCAGTGC AATACCTGA AC	CCGTACTIONTGC CATCCTTCTC	53 °C	Nagyoszi <i>et al.</i> 2010
MMP-3	GTACCAACCT ATTCCTGGTT GC	CCAGAGAGT TAGATTTGGT GGG	53 °C	Woo <i>et al.</i> 2008
MMP-9	ACCACTAAA GGTCGCTCG GATGGTT	AGTACTGCTT GCCCAGGAA GACGAA	58 °C	Setz <i>et al.</i> 2011
MMP-13	GGGCTCTGA ATGGTTATGA CATTC	AGCGCTCAG TCTCTTCACC TCTT	58 °C	Guo <i>et al.</i> 2010
MMP-14	AGGAGACAG AGGTGATCA TCATTG	GTCCCATGGC GTCTGAAGA	58 °C	Guo <i>et al.</i> 2010
β-Aktin	GAGGTATCCT GACCCTGAA G	CAGAGGCAT ACAGGGACA	53 °C	König <i>et al.</i> 2010
HPRT1	TGACACTGG CAAACAAT GCA	GGTCCTTTTC ACCAGCAAG CT	58 °C	Sieber <i>et al.</i> 2010
GAPDH	CAGGTTGTCT CCTGCGACTT	CCCTGTTGCT GTAGCCGTA	58 °C	Li <i>et al.</i> 2010

2.2.14. Statistische Auswertungen

Messergebnisse und Daten sind jeweils als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Die statistischen Auswertungen wurden mit den Routinen der Software Sigmaplot 12 (Systat Software, USA) vorgenommen. Statistische Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit dem ungepaarten t-Test durchgeführt. Zum Vergleich mehrerer Gruppen wurde je nach gegebenen Bedingungen eine einfaktorielle Varianzanalyse (*one-way-ANOVA*) bzw. ein Kruskal-Wallis-Test oder eine zweifaktorielle Varianzanalyse (*two-way-ANOVA*) vorgenommen. Unterschiede zwischen Gruppen wurden dabei mit dem Post-Hoc-Test nach Student-Newman-Keuls (SNK) bzw. der Methode nach Dunn geprüft. Von einer statistischen Signifikanz wurde für $p < 0,05$ ausgegangen.

3. Ergebnisse

3.1. *Der Verlust von PI3K γ erhöht die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke*

Die Zielstellung der vorliegenden Arbeit umfasste die Untersuchung eines Einflusses von PI3K γ während der Entwicklung einer septischen Enzephalopathie (SE). Dazu wurden in einem ersten Schritt *in vivo* die Auswirkungen eines Verlustes der Funktionen von PI3K γ auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) untersucht. Bedingungen einer systemischen Entzündungsreaktion wurden im Maus-Modell durch die intraperitoneale Injektion von LPS hervorgerufen (Abbildung 6).

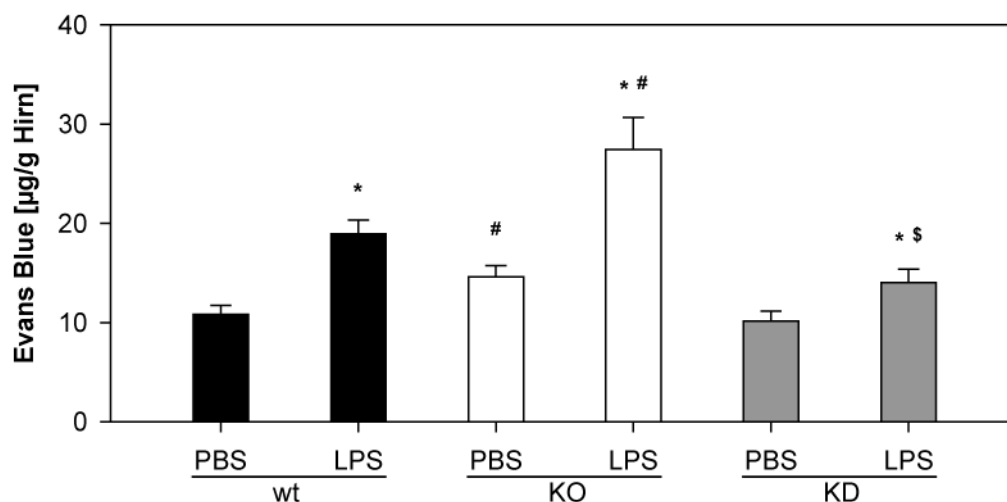


Abbildung 6: Der Verlust von PI3K γ führte zu erhöhter BHS-Permeabilität in Mäusen

Mäusen wurde LPS (10 mg/kg KG in PBS) bzw. PBS als Kontrolle intraperitoneal injiziert. Evans Blue (4 ml/kg KG, 2% in PBS) wurde intravenös für 1 h injiziert. 24 h nach LPS-Injektion wurden die Tiere mit 40 ml eiskaltem PBS perfundiert und die Gehirne präpariert. Die Extraktion von Evans Blue aus Hirnhomogenisaten erfolgte mit Trichloressigsäure (4,1 ml/g Hirngewebe, 50%). Zentrifugationsüberstände (10000 rpm, 20 min, 4 °C) wurden im Verhältnis 1:3 mit Ethanol (96%) gemischt, die Fluoreszenz (Anregung: 620 nm, Emission: 670 nm) gemessen und die Konzentration berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von n=17, statistische Signifikanz: * p<0,05 vs. PBS, # p<0,05 vs. wt, \$ p<0,05 vs. KO.

Es wurden Mausstämme verwendet, die sich hinsichtlich der Expression der katalytischen Untereinheit von PI3K γ p110 γ unterschieden. Als Kontrollstamm diente der C57BL/6J-Wildtyp-Stamm (wt). Als Vergleichsstämme dienten der *Knockout*-Stamm (KO) und der *Knockin*-Stamm (KD). Die Untersuchung der BHS-Integrität erfolgte anhand der Extravasation von Evans Blue ins Hirngewebe. Die Messung der Evans-Blue-Konzentration im Hirngewebe zeigte in allen drei Stämmen eine erhöhte BHS-Permeabilität 24 h nach der Injektion von LPS im Vergleich zur Injektion von PBS (Abbildung 6). Es wurden männliche Tiere (n=11 je Gruppe) und weibliche Tiere im Proöstrus (n=6 je Gruppe) untersucht. Es ergaben sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in der BHS-Permeabilität nach 24 h. Tiere des PI3K γ -KO-Genotyps wiesen gegenüber Wildtyp-Tieren eine signifikant erhöhte Durchlässigkeit der BHS auf. Unabhängig von einer LPS-Injektion wurde in Tieren des PI3K γ -KO-Genotyps eine höhere Evans-Blue-Konzentration festgestellt als in gleichbehandelten Wildtyp-Tieren. Sowohl in PBS- als auch in LPS-behandelten PI3K γ -KO-Tieren war die Evans-Blue-Konzentration höher als in der jeweils gleich behandelten Wildtyp-Gruppe. Tiere des PI3K γ -KD-Genotyps zeigten einen ähnlichen Phänotyp wie Wildtyp-Tiere.

Die Morbidität der Tiere wurde während der Behandlung anhand des klinischen Schweregrades (CSS) und des relativen Gewichtsverlustes dokumentiert. Gewicht und CSS wurden jeweils vor der Injektion von PBS bzw. LPS und 24 h nach der Injektion ermittelt. In allen drei untersuchten Stämmen (C57BL/6J Wildtyp, PI3K γ -KO und PI3K γ -KD) kam es in den LPS-injizierten Tieren im Vergleich zu den PBS-Kontrollen zu einer vergleichbar starken Erhöhung des CSS und des Gewichtsverlustes der Tiere während des 24-stündigen Untersuchungszeitraumes (Abbildung 7). Der CSS vor der Behandlung hatte bei allen Tieren den Wert 1.

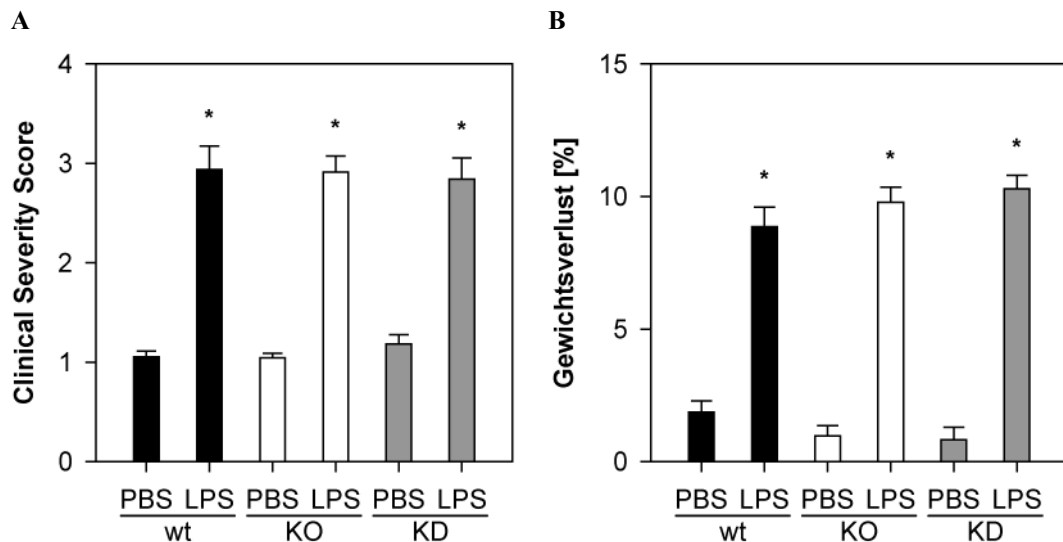


Abbildung 7: Die LPS-Injektion führte zur Erhöhung des CSS und zu Gewichtsverlust der Mäuse

Mäusen wurde LPS (10 mg/kg KG in PBS) bzw. PBS als Kontrolle intraperitoneal injiziert. A: CSS 24 h nach Injektion von LPS bzw. PBS. B: Das Gewicht wurde jeweils direkt vor der Injektion und vor dem Töten ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von $n=17$, statistische Signifikanz: * $p<0,05$ vs. PBS.

Anhand von HE- und TUNEL-Färbungen histologischer Schnitte des Hirngewebes wurde untersucht, ob infolge der 24-stündigen LPS-Behandlung ein erhöhter Anteil an apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen zu beobachten war. In den Präparaten wurden im frontalen, parietalen und temporalen Cortex, in der frontalen und temporalen weißen Substanz, den *Cornu-Ammonis*-Regionen des Hippocampus, im Thalamus, im Striatum, im Hirnstamm und im Cerebellum keine verstärkt apoptotischen bzw. nekrotischen Bereiche infolge der LPS-Behandlung in einem der drei untersuchten Mausstämme festgestellt.

Eine erhöhte BHS-Permeabilität war bereits 4 h nach der Injektion von LPS vorhanden. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine gesteigerte Extravasation von Evans Blue in den Gehirnen LPS-behandelter männlicher Tiere gemessen (Abbildung 8). Unterschiede in der BHS-Permeabilität zwischen den drei untersuchten Stämmen waren nach 4 h nicht feststellbar. Des Weiteren wurde parallel zu der erhöhten BHS-Permeabilität ein gesteigerter CSS in den LPS-behandelten Tieren dokumentiert (nicht dargestellt).

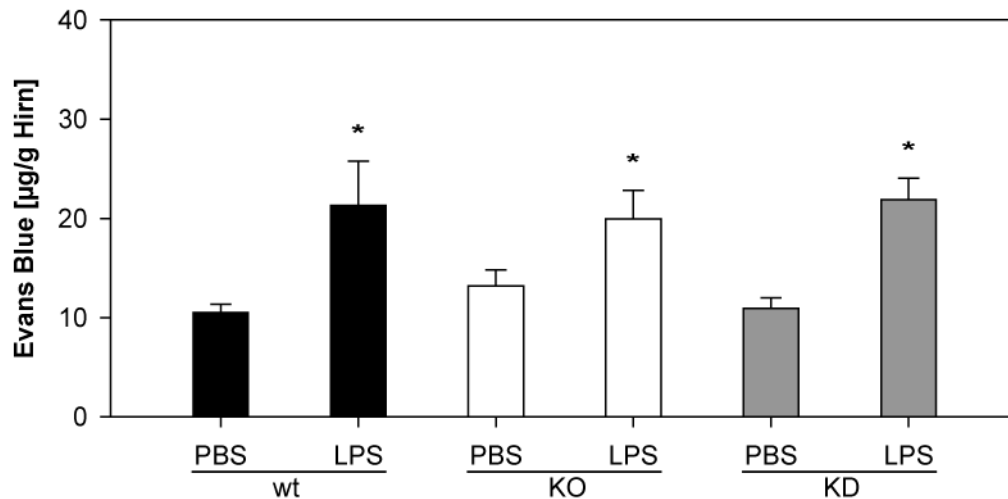


Abbildung 8: Erhöhte BHS-Permeabilität 4 h nach LPS-Injektion

Mäusen wurde LPS (10 mg/kg KG in PBS) bzw. PBS als Kontrolle intraperitoneal injiziert. Evans Blue (4 ml/kg KG, 2% in PBS) wurde intravenös für 1 h injiziert. 4 h nach LPS-Injektion wurden die Tiere mit 40 ml eiskaltem PBS perfundiert und die Gehirne präpariert. Die Extraktion von Evans Blue aus Hirnhomogenisaten erfolgte mit Trichloressigsäure (4,1 ml/g, 50%). Zentrifugationsüberstände (10000 rpm, 20 min, 4 °C) wurden im Verhältnis 1:3 mit Ethanol (96%) gemischt, die Fluoreszenz (Anregung: 620 nm, Emission: 670 nm) gemessen und die Konzentration berechnet. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von: wt und KO n=7, KD n=9. Statistische Signifikanz: * p<0,05 vs. PBS.

Zusammenfassend wurde eine Erhöhung der BHS-Permeabilität infolge der LPS-Behandlung gefunden. In Tieren des PI3K γ -KO-Stammes trat mit längerer Dauer der LPS-Exposition eine Verstärkung der beobachteten Störung der BHS-Integrität auf.

3.2. *Der Verlust von PI3K γ führt zu einer erhöhten MMP-Expression im Hirngewebe*

Um den unter 3.1 dargestellten Einfluss von PI3K γ auf die BHS-Permeabilität näher zu untersuchen, sollte zunächst die Expression im Gehirn von Mäusen bestätigt werden. Die katalytische Untereinheit von PI3K γ wurde im Hirngewebe von Wildtyp- und PI3K γ -KD-Mäusen nachgewiesen (Abbildung 9). Im PI3K γ -KO wurde p110 γ nicht detektiert.

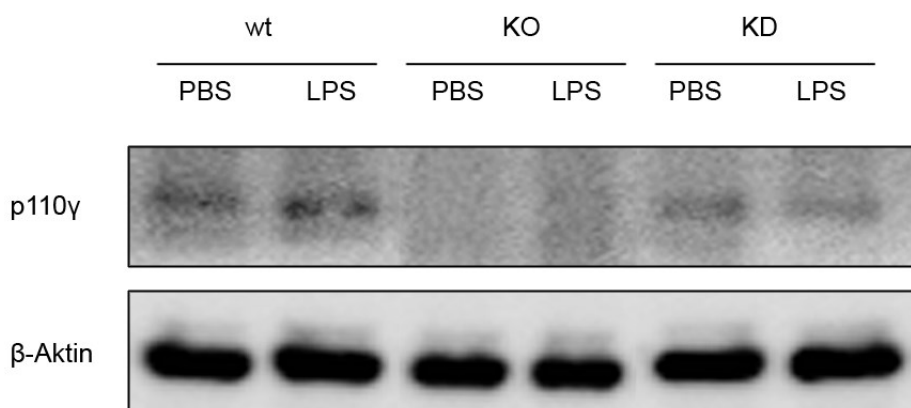


Abbildung 9: Nachweis von p110 γ im Gewebe des Großhirns von Mäusen

Mäuse wurden 24 h nach Injektion von LPS (10 mg/kg KG in PBS) bzw. PBS-Kontrolle perfundiert, Gehirne entnommen und eingefroren. Das Gewebe wurde in RIPA-Puffer lysiert, auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen p110 γ und β -Aktin analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=3 Experimenten.

3.2.1. Nachweis von MMP im Hirngewebe von Mäusen

Analog dem Nachweis von p110 γ wurden verschiedene MMP im Hirngewebe mittels Western Blot detektiert. In Lysaten aus dem Gewebe des Großhirns von Wildtyp-, PI3K γ -KO- und PI3K γ -KD-Tieren wurden MMP-2, MMP-9 und MMP-13 nachgewiesen (Abbildung 10 und Abbildung 11). Diese MMP waren im Großhirn von Mäusen aller drei untersuchter Stämme detektierbar. Insbesondere ergaben sich Hinweise auf eine erhöhte MMP-9-Expression im PI3K γ -KO-Stamm. Infolge einer LPS-Behandlung war die nachzuweisende Menge an MMP-9 im Hirngewebe von PI3K γ -KO-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren erhöht (Tabelle 7).

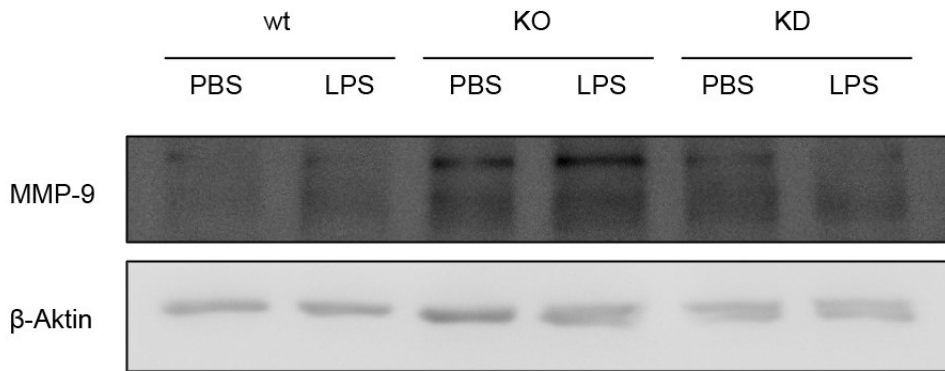


Abbildung 10: Nachweis von MMP-9 im Großhirn von Mäusen

Mäuse wurden 24 h nach Injektion von LPS (10 mg/kg KG in PBS) bzw. PBS-Kontrolle perfundiert, Gehirne entnommen und eingefroren. Das Gewebe wurde in RIPA-Puffer lysiert, auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen MMP-9 und β-Aktin analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=4 Experimenten.

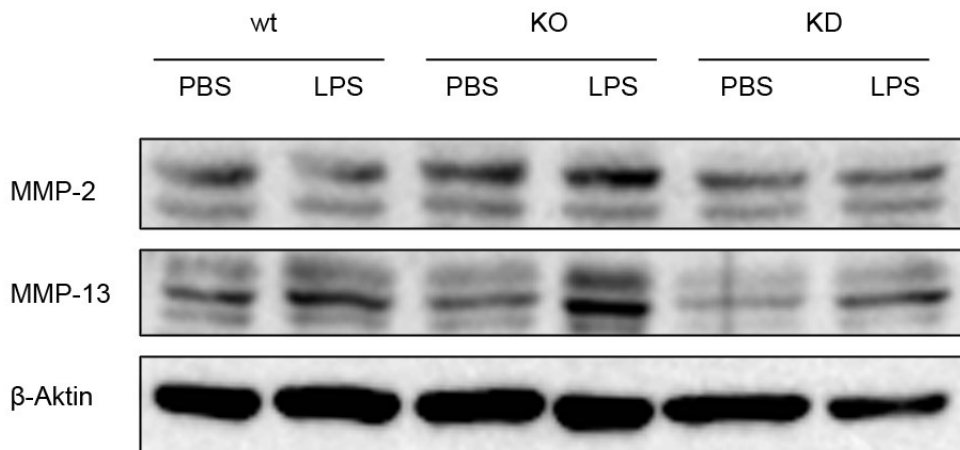


Abbildung 11: Nachweis von MMP-2 und MMP-13 im Großhirn von Mäusen

Mäuse wurden 24 h nach Injektion von LPS (10 mg/kg KG in PBS) bzw. PBS-Kontrolle perfundiert, Hirne entnommen und eingefroren. Das Gewebe wurde in RIPA-Puffer lysiert, auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen MMP-2, MMP-13 und β-Aktin analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=4 Experimenten.

Tabelle 7: Verstärkte MMP-9-Expression im Hirngewebe LPS-behandelter Mäuse

Mäuse wurden 24 h nach Injektion von LPS (10 mg/kg KG in PBS) perfundiert, die Gehirne entnommen und eingefroren. Das Gewebe wurde in RIPA-Puffer lysiert, auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen MMP-9 und β -Aktin analysiert. Es erfolgte eine densitometrische Quantifizierung und eine Normalisierung von MMP-9 auf β -Aktin. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM von n=4 Experimenten. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$ vs. wt.

	MMP-9 / β -Aktin
wt	0,75 \pm 0,06
PI3K γ -KO	1,33 \pm 0,15 *
PI3K γ -KD	0,90 \pm 0,19

3.2.2. Residente Immunzellen produzieren MMP im Gehirn

Um zu überprüfen, ob die erhöhte BHS-Permeabilität im PI3K γ -KO-Stamm auf die Einwanderung von MMP-produzierenden Leukozyten zurückgeführt werden kann, wurde in Hirnschnitten eine Doppelfärbung für Myeloperoxidase (MPO)-positive polymorph-nukleäre Leukozyten (PMN) und MMP-9 durchgeführt (nach Jin *et al.* 2011). Die Zahl MMP-9-produzierender PMN im Hirngewebe PBS-behandelter Tiere war in den drei untersuchten Mausstämmen auf vergleichbarem Niveau (Tabelle 8). Infolge der intraperitonealen Injektion von LPS stieg bei Tieren des Kontrollstammes die Zahl an eingewanderten MMP-9-positiven PMN an. Die Daten aus LPS-behandelten Mäusen gaben Hinweise auf eine geringere PMN-Einwanderung im PI3K γ -KO-Stamm, verglichen mit Wildtyp- bzw. PI3K γ -KD-Stamm, die aufgrund des geringen Stichprobenumfangs jedoch nicht statistisch verifiziert werden konnte. In den beiden p110 γ -exprimierenden Stämmen kam es infolge der LPS-Behandlung zu einer signifikant erhöhten PMN-Einwanderung in das Hirngewebe.

Tabelle 8: MMP-9-positive PMN in Hirnschnitten

Mäuse wurden 24 h nach Injektion von LPS (10 mg/kg KG in PBS) bzw. PBS-Kontrolle zunächst mit PBS und anschließend mit Paraformaldehyd (4% in PBS) perfundiert, die Gehirne in Paraformaldehyd fixiert und Paraffinschnitte (6 µm) angefertigt. Diese wurden entparaffiniert und mit dem MPO- und dem MMP-9-Antikörper sowie den zugehörigen sekundären Antikörpern doppel-gefärbt. Am Fluoreszenzmikroskop (BX61, Olympus, D) wurden Zellen, die MMP-9- und MPO-positiv waren, in je 16 Gesichtsfeldern gezählt und die Zellzahl je Gesichtsfeld berechnet. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM von n=3 Tieren. Statistische Signifikanz: # p<0,05 vs. PBS.

	MMP-9-positive PMN	
	PBS	LPS
wt	0,39 ± 0,03	3,55 ± 1,75 #
PI3K γ -KO	0,53 ± 0,24	1,18 ± 0,47
PI3K γ -KD	0,37 ± 0,07	3,71 ± 0,27 #

Darüber hinaus wurde die Expression von MMP in Mikroglia im Gehirn untersucht. Dazu wurde eine Doppel-Färbung des Mikroglia-Markers Iba-1 mit MMP-9 in Hirnschnitten durchgeführt (Abbildung 12). Es war eine Co-Lokalisation von Iba-1- und MMP-9-positiven Zellen in den Präparaten der drei untersuchten Stämme zu erkennen. Analog wurde auch eine Co-Lokalisation von Iba-1 mit MMP-3 detektiert (nicht dargestellt).

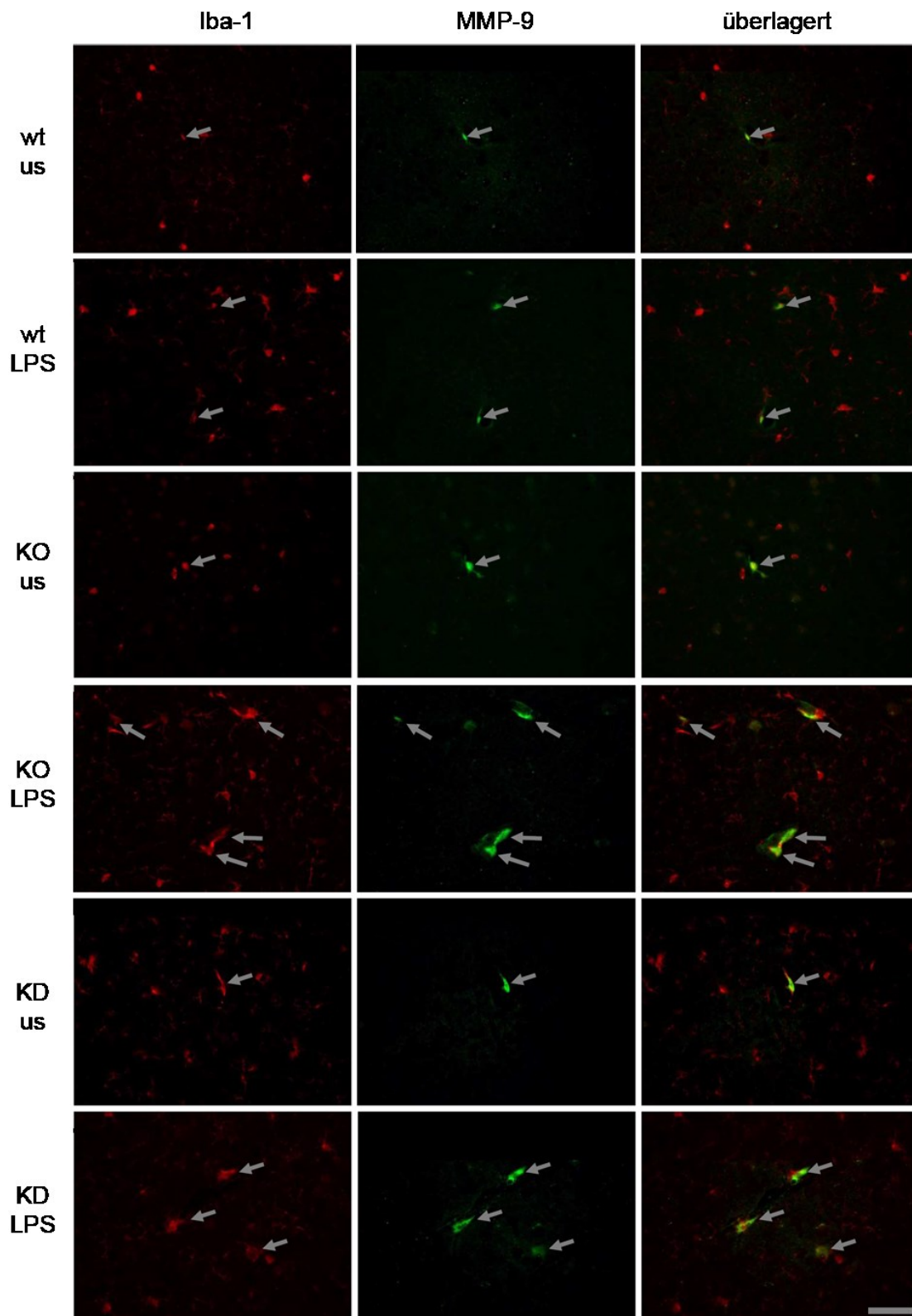


Abbildung 12: Iba-1-positive Zellen exprimieren MMP-9

Mäuse wurden 24 h nach Injektion von LPS (10 mg/kg KG in PBS) bzw. PBS-Kontrolle zunächst mit PBS und anschließend mit Paraformaldehyd (4% in PBS) perfundiert, die Gehirne in Paraformaldehyd fixiert und Paraffinschnitte (6 μm) angefertigt. Die Färbung erfolgte mit Antikörpern gegen Iba-1 und MMP-9. Die Schnitte wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (BX61, Olympus, D) aufgenommen (Skala 50 μm). Dargestellt sind repräsentative Schnitte aus n=6 Tieren je Gruppe.

Nach dem immunhistochemischen Befund einer Co-Lokalisation von MMP-9 und Iba-1 wurde die Expression verschiedener MMP durch primäre Mikroglia *in vitro* immunzytochemisch untersucht (Abbildung 13). In Doppelfärbungen wurden MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13 jeweils gemeinsam mit Iba-1 nachgewiesen. Diese MMP wurden jeweils in Mikroglia aus Wildtyp, PI3K γ -KO und PI3K γ -KD, sowohl in unbehandelten als auch LPS-stimulierten Zellen nachgewiesen. In Abbildung 13 sind die Färbungen von LPS-behandelten Wildtyp-Mikroglia gezeigt.

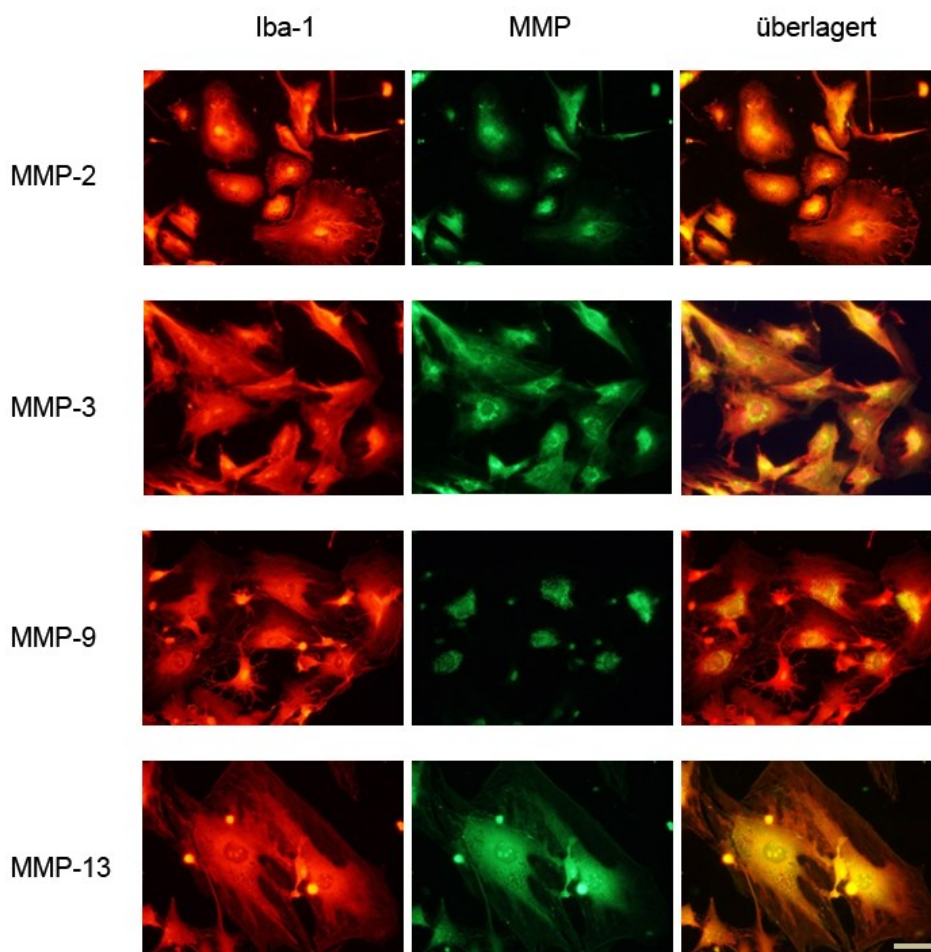


Abbildung 13: Mikroglia exprimieren MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13

Mikroglia-Zellen des Wildtyp-Stammes wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Glasplättchen kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für 24 h mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Nach der Fixierung der Mikroglia-Zellen mit Paraformaldehyd (4% in PBS) erfolgte die Färbung mit Antikörpern gegen Iba-1 und MMP-2, MMP-3, MMP-9 bzw. MMP-13. Die Fluoreszenzbilder wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (BX61, Olympus, D) aufgenommen (Skala 50 μ m). Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus n=3 Experimenten.

Zusammenfassend wurde die Expression von PI3K γ und verschiedenen MMP im Hirngewebe bestätigt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MMP-exprimierende PMN infolge einer LPS-Behandlung in das Hirngewebe einwandern. Dabei wurde eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren verstärkte Einwanderung von PMN bei Wildtyp- und PI3K γ -KD-Tieren detektiert. Außerdem wurde nachgewiesen, dass die im Gehirn residenten Mikroglia verschiedene MMP exprimieren.

3.3. Der Verlust von PI3K γ in Mikroglia bewirkt eine Erhöhung der MMP-Sezernierung infolge einer LPS-Stimulation

In den Gehirnen der untersuchten Mausstämme wurde die Expression verschiedener MMP durch Mikroglia nachgewiesen. Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der mechanistischen Untersuchungen zur Aufklärung des Einflusses von PI3K γ auf die Expression, Produktion und Freisetzung von MMP durch Mikroglia dargestellt.

3.3.1. Die LPS-Stimulation von Mikroglia erhöht die Expression von PI3K γ



Abbildung 14: Erhöhte Expression von PI3K γ in Mikroglia nach LPS-Stimulation

Mikroglia wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit LPS (100 ng/ml) für 24 h stimuliert. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert, auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen p110 γ und β -Aktin analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=4 Experimenten.

In Mikroglia des Wildtyp-Stammes war die katalytische Untereinheit von PI3K γ p110 γ detektierbar (Abbildung 14). Mikroglia des PI3K γ -KD-Stammes bilden die kinase-inaktive Variante von p110 γ , die mit dem verwendeten Antikörper ebenfalls im Western Blot detektiert werden konnte. Nach Stimulation mit LPS wurde die Expression von p110 γ verstärkt.

3.3.2. Erhöhte cAMP-Konzentration und verstärkte CREB-Phosphorylierung in PI3K γ -KO-Mikroglia

In früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass der Verlust von PI3K γ in Kardiomyozyten zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration führt (Patrucco *et al.* 2004, Perino *et al.* 2011). Auf Grundlage dieser Daten wurde die intrazelluläre cAMP-Konzentration in primären Mikroglia untersucht (Abbildung 15).

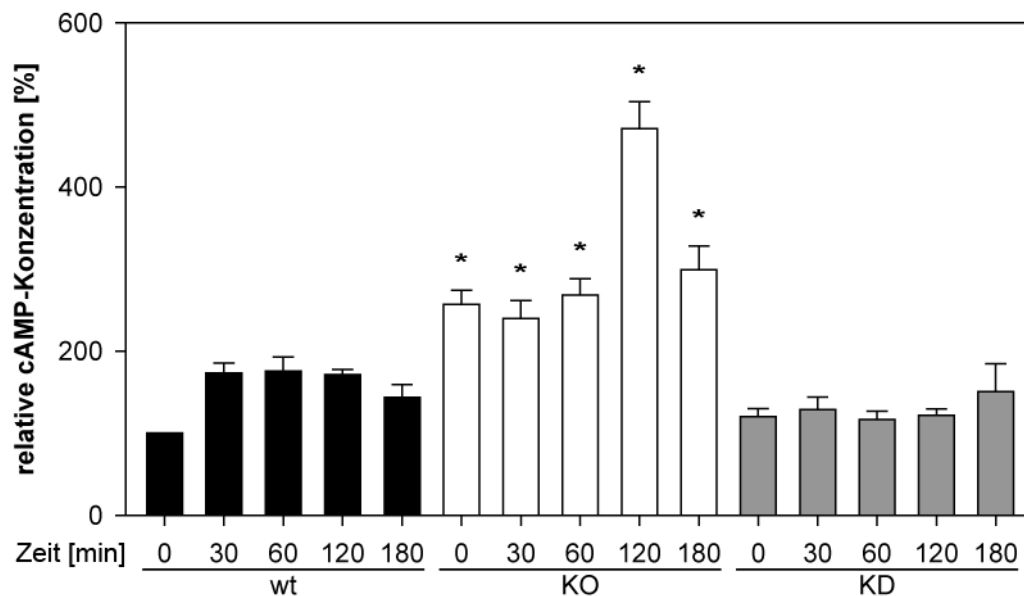


Abbildung 15: Höhere cAMP-Konzentration in PI3K γ -KO-Mikroglia

Mikroglia wurden in 96-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit LPS (100 ng/ml) für die angegebenen Zeiträume inkubiert. Der cAMP-Gehalt wurde mit dem cAMP-Assay-Kit (Promega) unter Verwendung des Herstellerprotokolls bestimmt. Die Messwerte der Einzelexperimente wurden normiert (jeweils auf wt, 0 min). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz: * p<0,05 vs. wt.

In PI3K γ -defizienten Mikroglia wurde eine Erhöhung der cAMP-Konzentration gemessen. Die in PI3K γ -KO- gegenüber Wildtyp- bzw. PI3K γ -KD-Zellen gesteigerte cAMP-Konzentration wurde in unbehandelten Kontrollzellen sowie in LPS-behandelten Zellen festgestellt.

Nachfolgend wurde untersucht, ob die gesteigerte cAMP-Konzentration zu einer Aktivierung des cAMP-PKA-CREB-Signalweges führt. Eine verstärkte Ser-133-Phosphorylierung von CREB in Mikroglia des PI3K γ -KO konnte nachgewiesen werden (Abbildung 16). Die basale CREB-Phosphorylierung in unstimulierten Zellen war bei PI3K γ -KO gegenüber Wildtyp bzw. PI3K γ -KD erhöht. Nach einer LPS-Stimulierung stieg die CREB-Phosphorylierung in Mikroglia aus allen drei untersuchten Stämmen an.

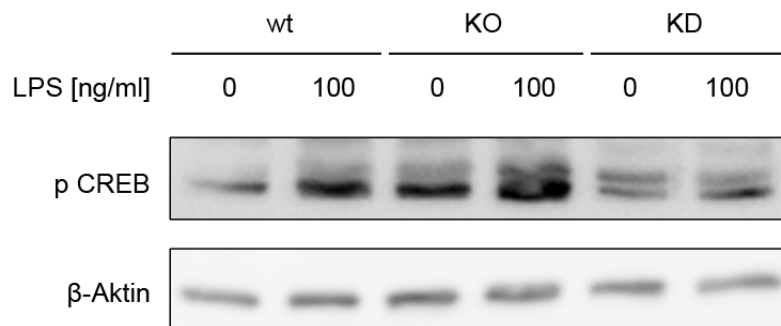


Abbildung 16: Erhöhte Phosphorylierung von CREB in PI3K γ -KO-Mikroglia

Mikroglia wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit LPS (100 ng/ml) für 3 h stimuliert. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert, gleiche Proteinmengen auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen phosphoryliertes CREB (p CREB) und β -Aktin als Kontrolle analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=4 Experimenten.

3.3.3. Erhöhte LPS-induzierte mRNA-Expression von MMP beim PI3K γ -KO

Anschließend wurde die MMP-Expression in primären Mikroglia untersucht. Der Einfluss einer LPS-Stimulation auf die Expression von verschiedenen MMP-mRNA in Mikroglia wurde in Abhängigkeit von PI3K γ mit Hilfe der quantitativen *real-time* PCR (RT-qPCR) analysiert (Abbildung 17). Es wurde eine Erhöhung der LPS-induzierten

Expression der mRNA für MMP-2, MMP-9 und MMP-13 in Mikroglia des PI3K γ -KO-Stammes gegenüber dem Wildtyp festgestellt.

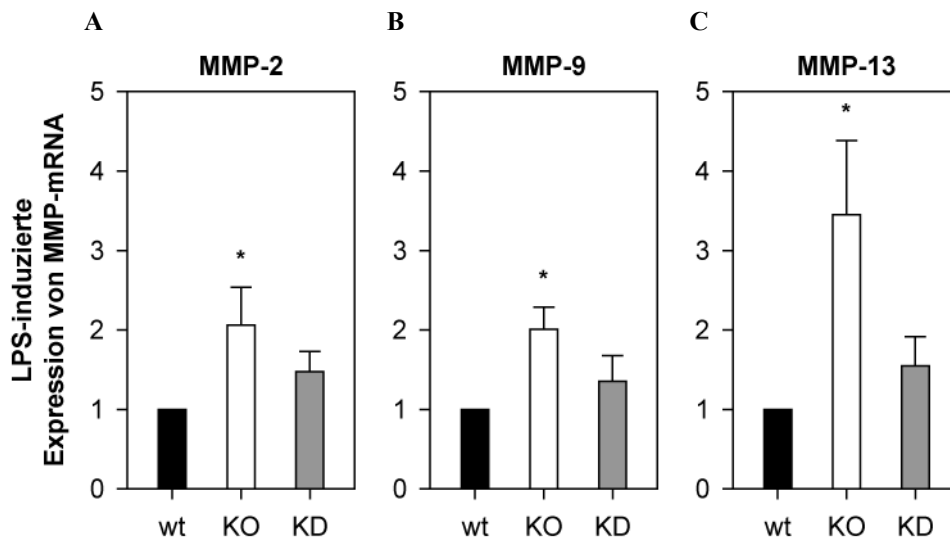


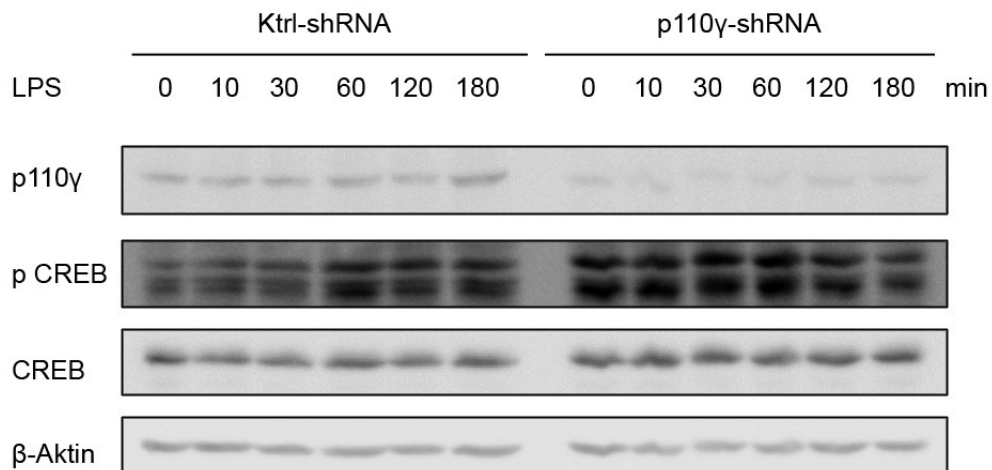
Abbildung 17: Das Fehlen von PI3K γ führt zu einer Erhöhung der LPS-induzierten mRNA-Expression von MMP-2, MMP-9 und MMP-13

Mikroglia wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit LPS (100 ng/ml) für 3 h inkubiert. Die RNA wurde extrahiert, cDNA mit einem Oligo(dT)₁₈-Primer hergestellt, in der RT-qPCR mit entsprechenden Primern für A: MMP-2, B: MMP-9 und C: MMP-13 quantifiziert und gegen β -Aktin, GAPDH und HPRT1 normalisiert. Dargestellt sind auf wt normierte Mittelwerte \pm SEM von n=4-7 Experimenten. Statistische Signifikanz: * p<0,05 vs. wt.

3.3.4. Erhöhte CREB-Phosphorylierung und verstärkte Expression von MMP-mRNA in BV2 nach dem *Knockdown* von p110 γ

Um die Befunde zur PI3K γ -abhängigen MMP-Expression aus primären Mikroglia-Zellen in einem zweiten Modell zu prüfen, wurde die Mikroglia-Zelllinie BV2 verwendet. Die Expression von PI3K γ wurde in BV2-Zellen mittels RNA-Interferenz dauerhaft herunter reguliert. Als Referenz wurden BV2 verwendet, die eine ungerichtete shRNA (Ktrl-shRNA) exprimierten. Die Transduktion der BV2 mit der shRNA gegen p110 γ (p110 γ -shRNA) bewirkte eine ca. 70% niedrigere Expression der katalytischen Untereinheit von PI3K γ (Abbildung 18). Die Phosphorylierung von CREB war unter unstimulierten Bedingungen in der p110 γ -shRNA-Zelllinie höher als in der Kontroll-Zelllinie. Nach LPS-Stimulation stieg die CREB-Phosphorylierung in den Kontroll-Zellen, während sie in den p110 γ -shRNA-Zellen auf einem erhöhten Niveau blieb.

A



B

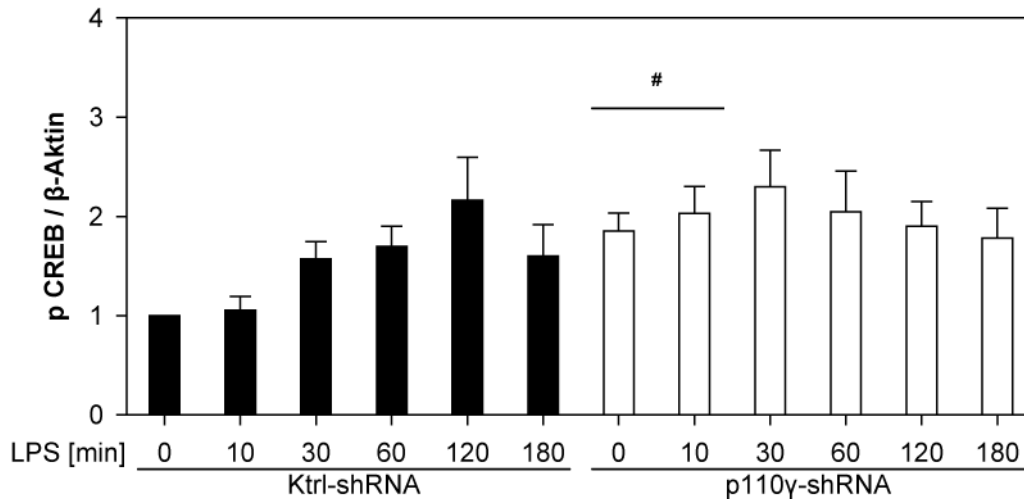


Abbildung 18: Erhöhte CREB-Phosphorylierung in p110γ-shRNA exprimierenden BV2-Zellen

BV2 wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit LPS (100 ng/ml) für die angegebenen Inkubationszeiten stimuliert. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert, gleiche Proteinmengen auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen p110γ, phosphoryliertes CREB (p CREB), CREB sowie β-Aktin als Kontrolle analysiert. A: Dargestellt ist ein repräsentative Western Blot von n=3 Experimenten. B: Densitometrische Quantifizierung von phosphoryliertem CREB normalisiert auf β-Aktin, dargestellt sind normierte (auf wt, 0 min) Mittelwerte ± SEM von n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz: # p<0,05 vs. Ktrl-shRNA.

Die LPS-induzierte Expression verschiedener MMP-mRNA wurde durch den *Knockdown* von PI3Kγ in BV2-Zellen erhöht (Abbildung 19). Eine Erhöhung wurde für die mRNA von MMP-2, MMP-9 und MMP-13 in den p110γ-shRNA exprimierenden BV2 im Vergleich zu den Kontrollzellen gemessen. Des Weiteren wurde auch für MMP-1 eine verstärkte mRNA-Expression in den p110γ-shRNA exprimierenden BV2 festgestellt sowie Hinweise auf eine tendenziell stärkere Expression von MMP-3

($p=0,06$). Die zellgebundene MMP-14 (MT1-MMP) weist hingegen eine vergleichbar hohe LPS-induzierte mRNA-Expression in Kontrollzellen und p110 γ -shRNA exprimierenden Zellen auf.

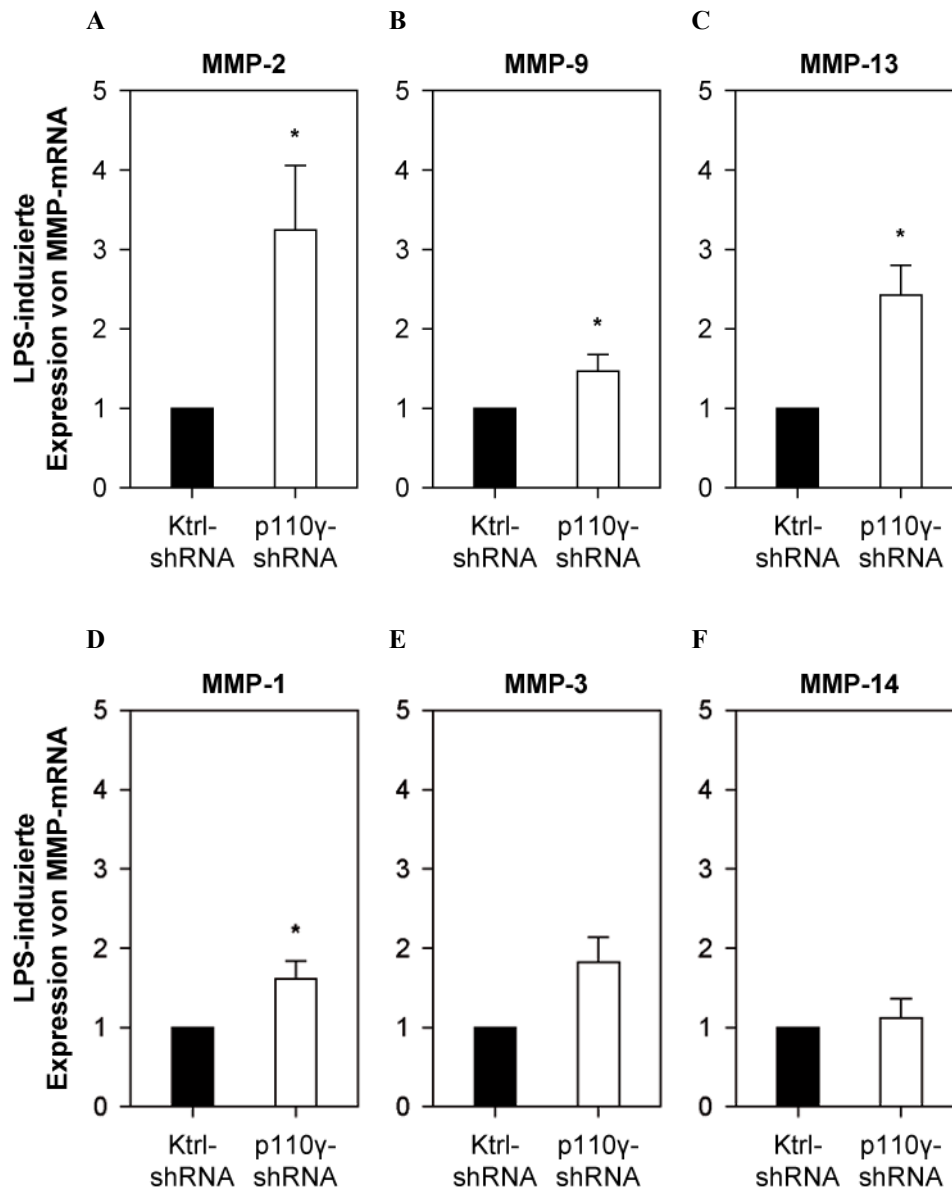


Abbildung 19: p110 γ -shRNA in BV2-Zellen führt zu erhöhter LPS-induzierter mRNA-Expression verschiedener MMP

BV2-Zellen wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit LPS (100 ng/ml) für 3 h inkubiert. Die RNA wurde extrahiert, cDNA mit einem Oligo(dT)₁₈-Primer hergestellt, in der RT-qPCR mit entsprechenden Primern für A: MMP-2, B: MMP-9, C: MMP-13, D: MMP-1, E: MMP-3 und F: MMP-14 quantifiziert und gegen β -Aktin, GAPDH und HPRT1 normalisiert. Dargestellt sind auf Ktrl-shRNA normierte Mittelwerte \pm SEM von A n=5, B n=5, C n=4, D n=5, E n=5, F n=4 Experimenten. Statistische Signifikanz: * $p<0,05$ vs. Ktrl-shRNA.

3.3.5. Modulation des cAMP-PKA-Signalweges beeinflusst die MMP-mRNA-Expression

Um die Hinweise auf einen moderierenden Einfluss von PI3K γ über den cAMP-PKA-CREB-Signalweg auf die Expression verschiedener MMP-mRNA näher zu prüfen, wurden die Effekte einer pharmakologischen Aktivierung bzw. Inhibition dieses Signalweges mittels Forskolin bzw. H89 auf die LPS-induzierte mRNA-Expression untersucht. Forskolin erhöhte in BV2 die LPS-induzierte Expression von MMP-9-mRNA (Abbildung 20), hingegen wurde diese durch den PKA-Inhibitor H89 erniedrigt. Analog verstärkte Forskolin in BV2 auch die LPS-induzierte Expression der MMP-13-mRNA.

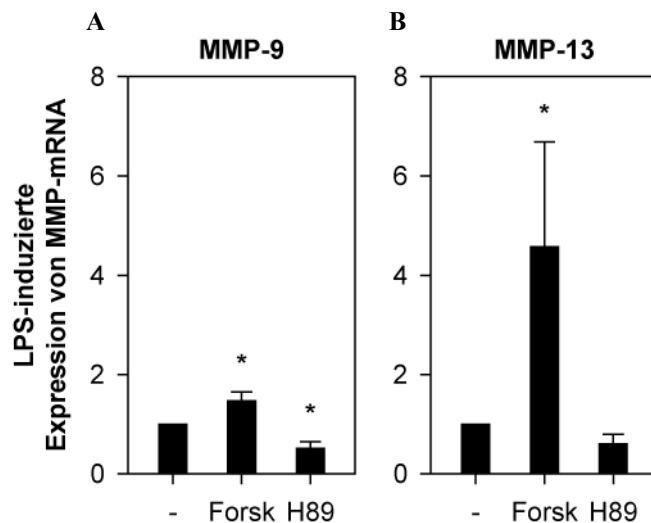


Abbildung 20: Manipulation des cAMP-PKA-Signalweges beeinflusst die LPS-induzierte Expression von mRNA für MMP-9 und MMP-13

BV2 wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert, anschließend mit DMSO (-), Forskolin (Forsk, 10 μ M) bzw. H89 (10 μ M) und mit LPS (100 ng/ml) für 3 h inkubiert. Die RNA wurde extrahiert, cDNA mit einem Oligo(dT)₁₈-Primer hergestellt, in der RT-qPCR mit entsprechenden Primern für A: MMP-9, B: MMP-13 quantifiziert und gegen β -Aktin, GAPDH und HPRT1 normalisiert. Dargestellt sind normierte (auf DMSO) Mittelwerte \pm SEM von n=5 Experimenten. Statistische Signifikanz: * p<0,05 vs. Ktrl-shRNA.

Nachfolgend wurde der Einfluss der cAMP-degradierenden Phosphodiesterasen (PDE) auf die mRNA-Expression untersucht. Hierfür wurde der unspezifische PDE-Inhibitor IBMX und der PDE3-spezifische Inhibitor Cilostamid verwendet. Der Einsatz von Cilostamid oder IBMX verstärkte die LPS-induzierte Expression der mRNA für MMP-9 und MMP-13 (Abbildung 21). Die durch die Inhibition hervorgerufene Verstärkung ist ähnlich hoch, wie der durch die p110 γ -shRNA verursachte Anstieg.

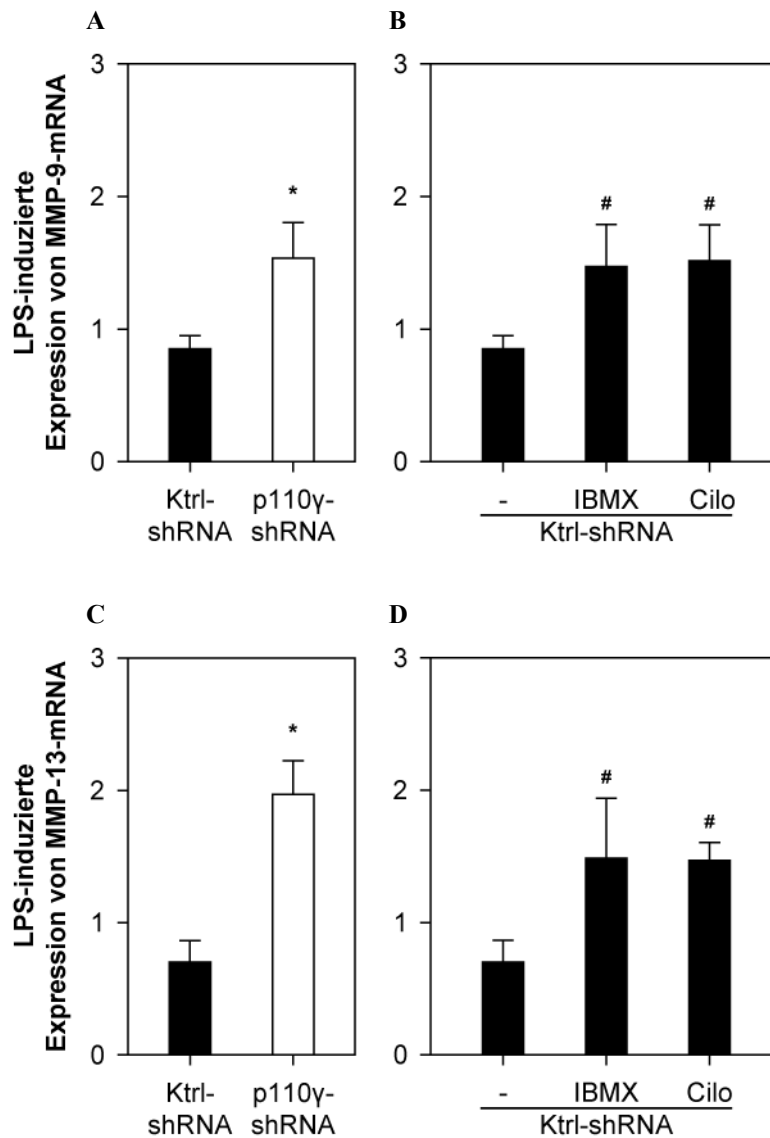


Abbildung 21: Die Inhibition der PDE-Aktivität erhöht die LPS-induzierte Expression von mRNA für MMP-9 und MMP-13

BV2 wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert, anschließend mit DMSO, IBMX (500 μ M) bzw. Cilostamid (Cilo, 10 μ M) und mit LPS (100 ng/ml) für 3 h inkubiert. Die RNA wurde extrahiert, cDNA mit einem Oligo(dT)₁₈-Primer hergestellt, in der RT-qPCR mit entsprechenden Primern für A und B: MMP-9, C und D: MMP-13 quantifiziert und gegen β -Aktin, GAPDH und HPRT1 normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von A n=8-10, B n=8-10, C n=6-7, D n=4-6 Experimenten. Statistische Signifikanz: * p<0,05 vs. Ktrl-shRNA, # p<0,05 vs. nicht inhibiert (-).

Es konnten keine Daten für die LPS-induzierte mRNA-Expression nach Inhibition der PDE-Aktivität und Forskolin- bzw. H89-Behandlung für MMP-2 gewonnen werden. In BV2-Zellen war die mRNA-Expression von MMP-2 um zwei Größenordnungen niedriger, verglichen mit MMP-9 und MMP-13 (Abbildung 22). In primären Mikroglia

hingegen wurden für die mRNA von MMP-2, MMP-9 und MMP-13 vergleichbar hohe Expressionsniveaus gemessen (Abbildung 23).

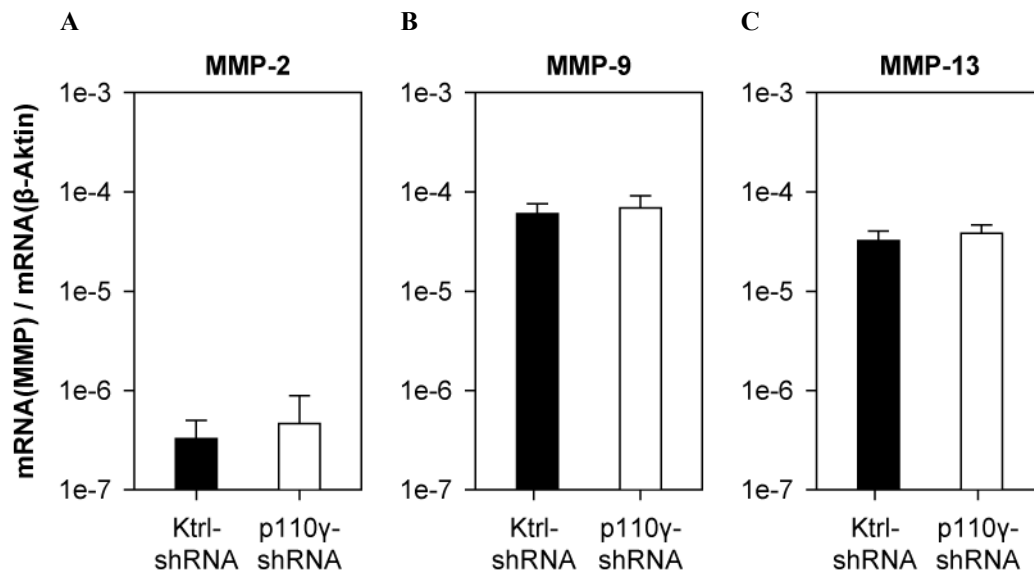


Abbildung 22: MMP-mRNA-Expression in unstimulierten BV2-Zellen

BV2-Zellen wurden in 6-well-Platten kultiviert und über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Die RNA wurde extrahiert, cDNA mit einem Oligo(dT)₁₈-Primer hergestellt und in der RT-qPCR mit entsprechenden Primern für A: MMP-2, B: MMP-9, C: MMP-13 quantifiziert und gegen β-Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM in logarithmischer Skalierung von n=5 Experimenten.

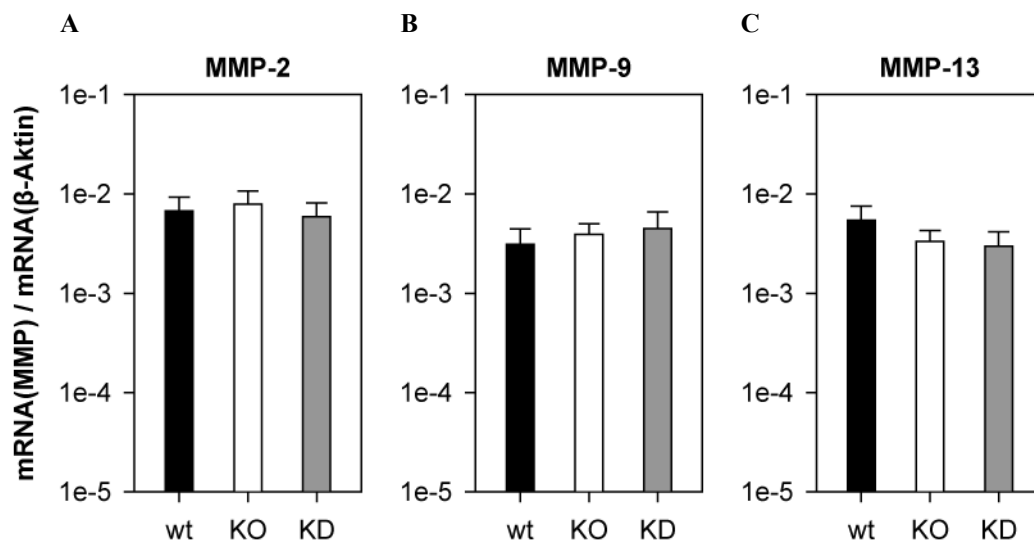


Abbildung 23: MMP-mRNA-Expression in unstimulierten Mikroglia

Mikroglia wurden in 6-well-Platten kultiviert und über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert. Die RNA wurde extrahiert, cDNA mit einem Oligo(dT)₁₈-Primer hergestellt und in der RT-qPCR mit entsprechenden Primern für A: MMP-2, B: MMP-9, C: MMP-13 quantifiziert und gegen β-Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM in logarithmischer Skalierung von n Experimenten (wt n=6; KO n=6; KD n=4).

3.3.6. Erhöhte MMP-Expression in PI3K γ -KO-Mikroglia

Nachdem auf Transkriptionsebene ein Einfluss von PI3K γ auf die MMP-Expression in Mikroglia gezeigt wurde, folgte nun die Untersuchung der zellulären MMP auf Proteinebene. MMP-2 und MMP-9 wurden in Lysaten primärer Mikroglia nachgewiesen (Abbildung 24). Die Ergebnisse weisen bereits 3 h nach einer LPS-Stimulation auf eine erhöhte Expression von MMP-9 in PI3K γ -KO-Mikroglia hin. Die Expression von MMP-2 ist nach 3 h unverändert und in Wildtyp-, PI3K γ -KO- und PI3K γ -KD-Mikroglia auf einem vergleichbaren Niveau.

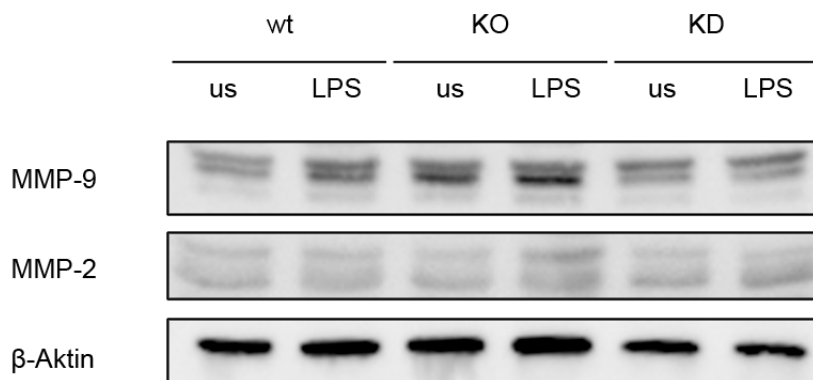
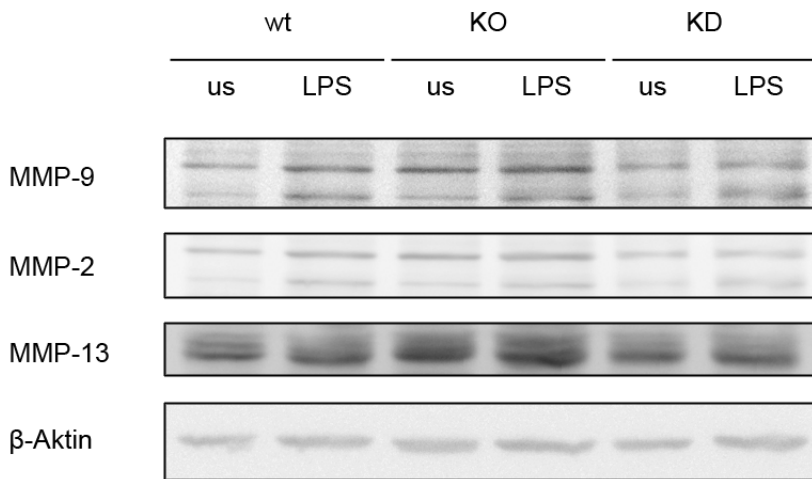


Abbildung 24: Expression von MMP-9 und MMP-2 in Mikroglia 3 h nach einer LPS-Stimulation

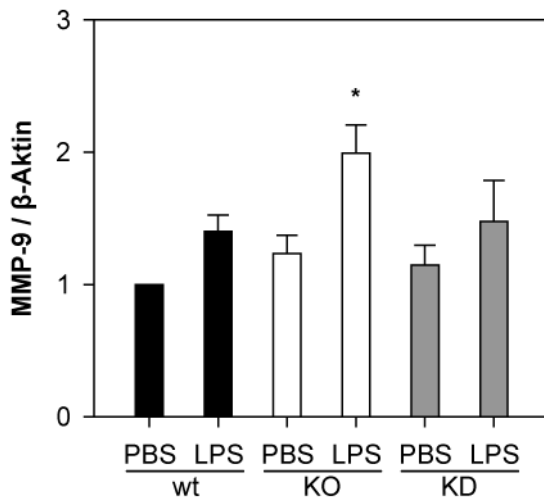
Mikroglia wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit LPS (100 ng/ml) für 3 h stimuliert. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert, gleiche Proteinmengen auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen MMP-9 und MMP-2 sowie β -Aktin als Kontrolle analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=4 Experimenten.

Ein Einfluss von PI3K γ auf die BHS-Permeabilität in mit LPS behandelten Mäusen wurde *in vivo* nach 24 h festgestellt, wohingegen zu einem früheren Zeitpunkt kein PI3K γ -spezifischer Effekt messbar war (siehe 3.1). Demnach erfolgte nun in einem *in-vitro*-Experiment eine LPS-Stimulation von Mikroglia für 24 h. Nach dieser Zeit wurde eine höhere Expression von MMP-9 und MMP-13 in den Zelllysaten von PI3K γ -KO-Mikroglia, verglichen mit Wildtyp-Mikroglia, detektiert (Abbildung 25). Mikroglia des PI3K γ -KD-Stammes wiesen gegenüber dem Wildtyp keine höhere Expression dieser MMP auf. Die Expression von MMP-2 zeigte nach 24 h keine PI3K γ -spezifischen Unterschiede in den untersuchten Mikroglia-Zellen.

A



B



C

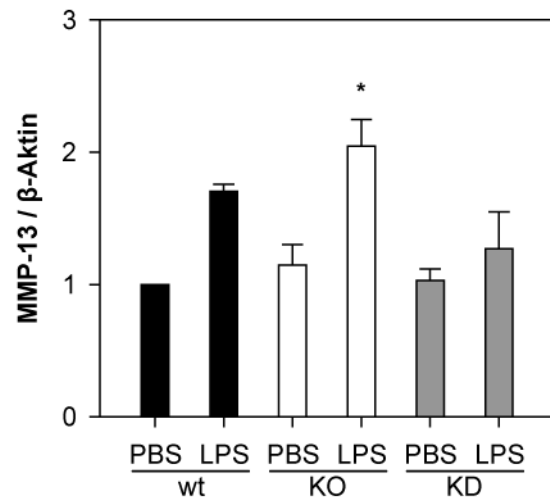


Abbildung 25: Erhöhte Expression von MMP-9 und MMP-13 in PI3K γ -KO-Mikroglia

Mikroglia wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für 24 h mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Die Zellen wurden in RIPA-Puffer lysiert, gleiche Proteinmengen auf ein 10% SDS-PAGE-Gel aufgetragen und im Western Blot unter Verwendung der Antikörper gegen MMP-9, MMP-2, MMP-13 und β -Aktin als Kontrolle analysiert. A: Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von n=3 Experimenten. B und C: Densitometrische Quantifizierung von MMP-9 und MMP-13, jeweils normalisiert auf β -Aktin. Dargestellt sind normierte (auf wt PBS) Mittelwerte \pm SEM von n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$ vs. wt.

3.3.7. Erhöhte MMP-Aktivität in den Kulturüberständen von PI3K γ -KO-Mikroglia

Nachfolgend wurde untersucht, ob aus dem moderierenden Einfluss von PI3K γ auf die MMP-Produktion in Mikroglia PI3K γ -abhängige Unterschiede der MMP-Aktivität in den Zellkulturüberständen resultierten. Um zu überprüfen, ob Mikroglia einen Teil der gebildeten MMP sezernieren, wurde in den Zellkulturüberständen der Mikroglia-Kulturen MMP-2 und MMP-9 mit Hilfe der Gelatine-Zymographie detektiert (Abbildung 26). Mit dieser Methode wurde die Gelatinase-Aktivität der MMP in einem gelatinehaltigen SDS-PAGE-Gel nachgewiesen. Dabei wurden neben den aktiven Formen von MMP-2 und MMP-9 auch deren Pro-MMP detektiert, die anhand der unterschiedlichen Molekülgrößen unterscheidbar waren. Die Proform muriner MMP-9 hat eine Molekülgröße von 105 kDa, die aktive Form 84 kDa. Ebenso konnten für MMP-2 die Proform mit 72 kDa und die aktive Form mit 64 kDa unterschieden werden.

Kulturüberstände unstimulierter Mikroglia wiesen geringe MMP-9-Aktivität auf. Nach einer Stimulation mit LPS (100 ng/ml) für 24 h stieg der MMP-9-Gehalt in den Kulturüberständen stark an (Abbildung 26). Insbesondere die Signalintensität der MMP-9-Proform wurde durch die LPS-Stimulation verstärkt. Mikroglia des PI3K γ -KO-Stammes sezernierten deutlich mehr MMP-9 als Zellen des Wildtyp- und des PI3K γ -KD-Stammes. In Abbildung 26B ist die densitometrische Analyse der gesamten im Kulturüberstand verfügbaren Menge an MMP-9 (aktive Form und Proform zusammengefasst) dargestellt. MMP-2 wurde ebenfalls mit der Zymographie-Methode in den Kulturüberständen primärer Mikroglia nachgewiesen. Die sezernierten Mengen waren sowohl in unstimulierten als auch LPS-stimulierten Mikroglia-Kulturen aus allen drei untersuchten Mausstämmen (Wildtyp, PI3K γ -KO und PI3K γ -KD) vergleichbar hoch (Abbildung 26C).

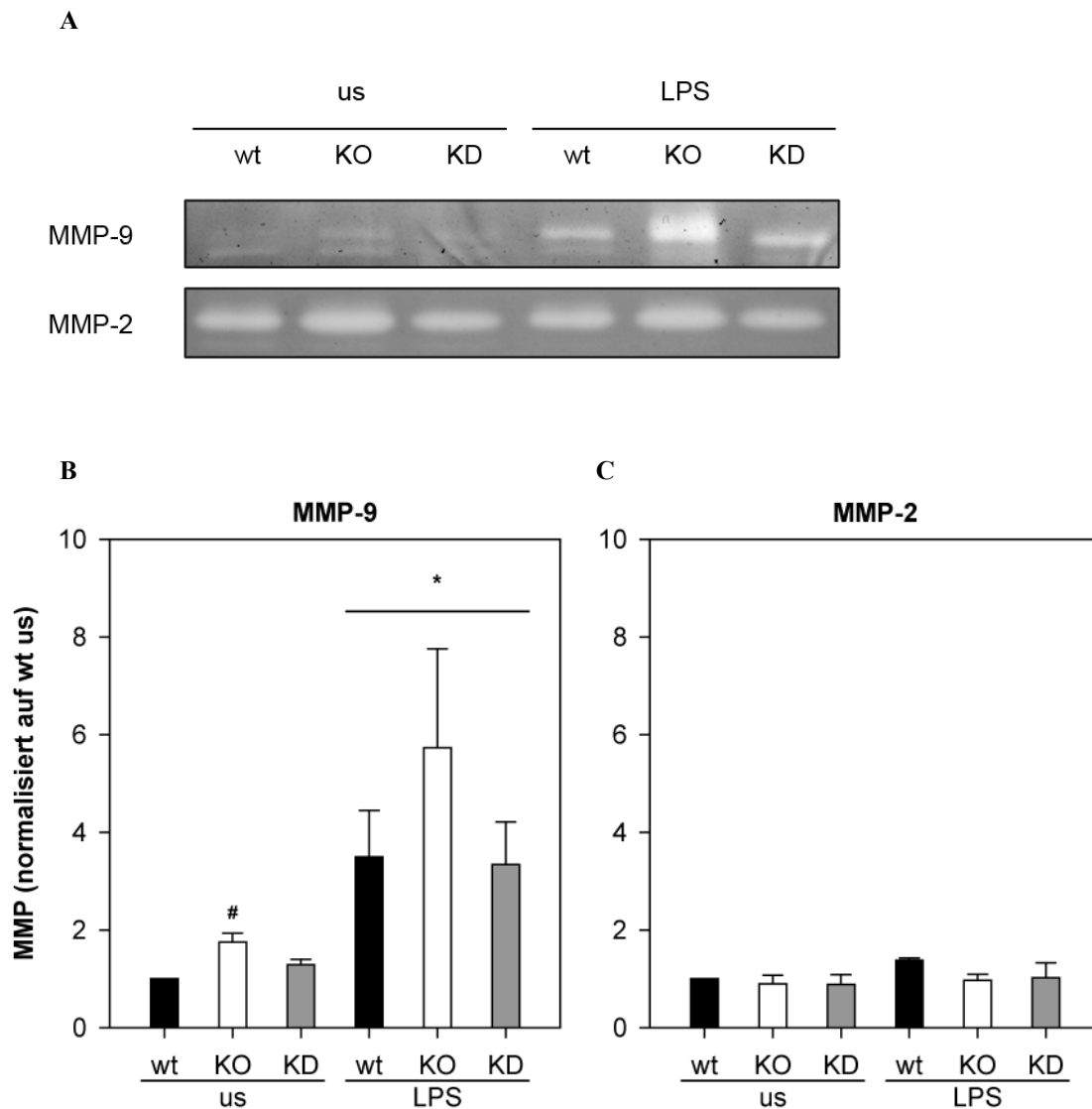


Abbildung 26: Verstärkte MMP-9-Sezernierung in den Kulturüberstand von PI3K γ -KO-Mikroglia

Mikroglia wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für 24 h mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. Je 500 μ l des Zellkulturüberstandes wurden konzentriert (30 kDa Größenausschluss) und in nicht-reduzierendem Proben-Puffer auf einem gelatinehaltigen 7,5% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Nach Waschschritten in Triton X-100 (2,5%), Wasser und TAB-Puffer wurden die Gele für 20 h in TAB-Puffer bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Coomassie-Brilliantblau G250 gefärbt. Die Gele wurden eingescannt und densitometrisch quantifiziert. A: Dargestellt ist eine repräsentative Zymographie von n=5 Experimenten. B, C: Dargestellt sind normierte (auf wt us) Mittelwerte \pm SEM von n Experimenten (MMP-2: n=4, MMP-9: n=5). Statistische Signifikanz: * p<0,05 vs. us, # p<0,05 vs. wt.

Um die Resultate der Zymographie zu verifizieren, wurde die Aktivität von MMP-2 und MMP-9 in einem für diese beiden Gelatinasen spezifischen Aktivitäts-Bestimmungsverfahren (MMP-2/-9-Aktivitäts-Assay) gemessen (Tabelle 9). Mit diesem System konnte lediglich die Gesamtaktivität der beiden Gelatinasen ermittelt aber keine Unterscheidung zwischen der Aktivität von MMP-2 und MMP-9 gemacht werden. In

den Kulturüberständen von Mikroglia des PI3K γ -KO-Stammes wurde eine im Vergleich zum Wildtyp erhöhte MMP-2/-9-Aktivität gemessen. Die Aktivität in Überständen von PI3K γ -KD-Mikroglia war so hoch wie beim Wildtyp.

Tabelle 9: Erhöhte MMP-2/-9-Aktivität in den Kulturüberständen von PI3K γ -KO-Mikroglia

Mikroglia wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für 24 h mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. 1,5 ml des Kulturüberstandes wurden konzentriert (30 kDa Größenausschluss). Die Konzentrate wurden vollständig aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit dem InnoZyme Gelatinase (MMP2/MMP9) Activity Assay Kit (Calbiochem, D). Dargestellt sind normierte (auf wt) Mittelwerte \pm SEM von n=3 Experimenten. Statistische Signifikanz: * p<0,05 vs. wt.

	MMP-2- / MMP-9-Aktivität
wt	1,00
KO	1,57 \pm 0,16 *
KD	0,96 \pm 0,32

3.3.8. Aktivierung von cAMP führt zu verstärkter Produktion von MMP-9 durch BV2

Die an primären Mikroglia-Zellen durchgeführten Versuchsreihen zeigten eine erhöhte MMP-Expression und -Sekernierung infolge des Verlustes der PDE-aktivierenden Funktion von PI3K γ . In der Mikroglia-Zelllinie BV2 führte der *Knockdown* von p110 γ zu einer Verstärkung der LPS-induzierten Expression von MMP-mRNA. Um zu überprüfen, ob daraus auch in BV2-Zellen eine erhöhte Sekernierung resultierte, wurde die Gelatinase-Aktivität von MMP-2 und MMP-9 im Kulturüberstand mit Hilfe der Zymographie untersucht. BV2, in denen mittels einer shRNA die Expression der katalytische Untereinheit von PI3K γ genetisch herunter reguliert wurde, produzierten nach LPS-Behandlung verstärkt MMP-9, verglichen mit Kontroll-BV2, die mit einer ungerichteten shRNA transduziert wurden (Abbildung 27). In den Kulturüberständen von BV2-Zellen wurden nur sehr geringe Mengen an MMP-2 detektiert.

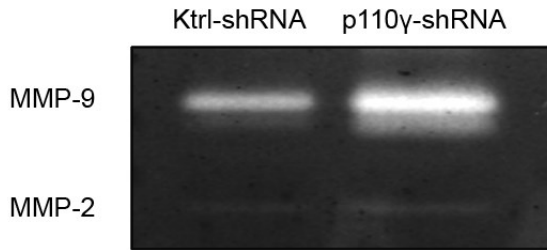
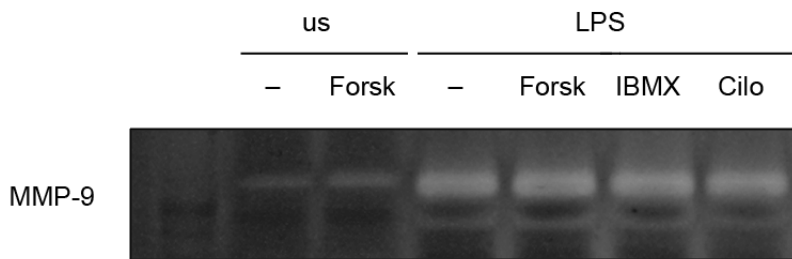


Abbildung 27: Verstärkte MMP-9-Sezernierung in den Kulturüberstand von p110 γ -shRNA exprimierenden BV2

BV2-Zellen wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend für 24 h mit LPS (100 ng/ml) stimuliert. 500 μ l des Kulturüberstandes wurden konzentriert (30 kDa Größenausschluss), in nicht-reduzierendem Proben-Puffer auf einem gelatinehaltigen 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Nach Waschschritten in Triton (2,5%) und Wasser wurden die Gele für 20 h in TAB-Puffer bei 37 °C inkubiert und anschließend mit Coomassie-Brilliantblau G250 gefärbt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von n=5 Experimenten.

Die Stimulation von BV2-Zellen mit LPS führte zu einer erhöhten Sezernierung von MMP-9 in den Kulturüberstand (Abbildung 28). Um den Einfluss der cAMP-Konzentration auf die MMP-9-Produktion in BV2-Zellen zu untersuchen, wurden in einem weiteren Schritt der Aktivator der Adenylatzyklase Forskolin bzw. die PDE-Inhibitoren IBMX und Cilostamid verwendet. Sowohl Forskolin als auch IBMX und Cilostamid bewirkten in LPS-stimulierten Kontroll-BV2 eine weitere Erhöhung der MMP-9-Konzentration im Kulturüberstand im Vergleich zu LPS-stimulierten Zellen. Die LPS-induzierte MMP-9-Sezernierung von Kontroll-BV2 ist nach Behandlung mit einem PDE-Inhibitor vergleichbar hoch wie in BV2, in denen die katalytische Untereinheit von PI3K γ genetisch herunter reguliert wurde.

A



B

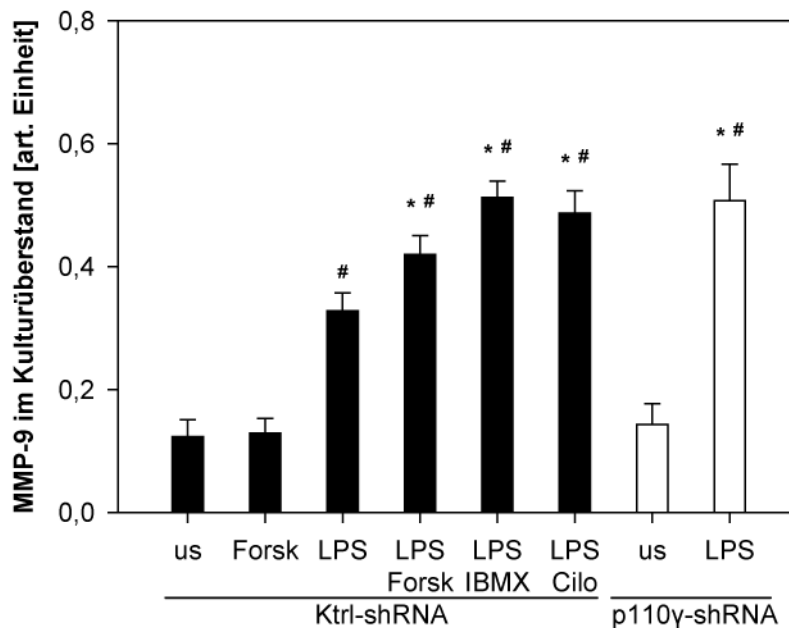


Abbildung 28: Aktivierung der Adenylatzyklase bzw. Inhibition von PDE erhöht die MMP-9-Sekretion in LPS-behandelten BV2-Zellen

BV2-Zellen wurden in 6-well-Platten kultiviert, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und anschließend mit Forskolin (Forsk, 10 μ M), IBMX (500 μ M), Cilostamid (Cilo, 10 μ M) bzw. DMSO und mit LPS (100 ng/ml) für 24 h stimuliert. 500 μ l des Kulturüberstandes wurden konzentriert (30 kDa Größenausschluss), in nicht-reduzierendem Proben-Puffer auf einem gelatinehaltigen 10% SDS-PAGE-Gel aufgetrennt. Nach Waschschritten in Triton (2,5%) und Wasser wurden die Gele für 20 h in TAB-Puffer bei 37 $^{\circ}$ C inkubiert und anschließend mit Coomassie-Brilliantblau G250 gefärbt. Die Gele wurden eingescannt und densitometrisch quantifiziert. A: Dargestellt ist eine repräsentative Zymographie von Ktrl-shRNA exprimierenden BV2. B: Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von n=3-7 Experimenten. Statistische Signifikanz: # p<0,05 vs. us, * p<0,05 vs. Ktrl-shRNA LPS.

Insgesamt deuten diese Daten auf einen regulierenden Einfluss von PI3K γ auf die MMP-Produktion in Mikroglia. Durch die Aktivierung von PDE in Anwesenheit von PI3K γ wird die cAMP-Konzentration in der Zelle gesenkt und die cAMP-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB verringert. Somit reguliert PI3K γ die

MMP-Expression in Mikroglia. Dabei ist nicht die Kinaseaktivität von PI3K γ von Bedeutung, sondern die *Scaffold*-Funktion für die Bildung eines Komplexes mit PDE und der daraus resultierenden Aktivierung der PDE.

3.3.9. Zusammenfassung der *in-vitro*-Daten

Zusammengefasst bestätigten die Ergebnisse dieser Arbeit, dass der Verlust von PI3K γ und deren PDE-aktivierender *Scaffold*-Funktion zu einer erhöhten cAMP-Konzentration in Mikroglia und zu einem erhöhten Niveau an phosphoryliertem CREB führt. Weiterhin wurde gezeigt, dass der Verlust von PI3K γ in Mikroglia und auch der *Knockdown* in der Mikroglia-Zelllinie BV2 eine Erhöhung der LPS-induzierten Expression von verschiedenen MMP-Genen bewirkt. Die Behandlung von BV2-Zellen mit Forskolin, IBMX oder Cilostamid verstärkte die LPS-induzierte Gen-Expression von MMP-9, während H89 diese verringerte. Insbesondere für MMP-9 wurde eine erhöhte Protein-Expression und Aktivität in Mikroglia-Kulturen des PI3K γ -KO-Stammes nachgewiesen. Zudem trat in BV2-Kulturen infolge einer Behandlung mit Forskolin, IBMX oder Cilostamid eine Verstärkung der LPS-induzierten Sezernierung von MMP-9 ein.

4. Diskussion

Das Ziel der Arbeit war es, die Rolle von PI3K γ während der Entwicklung einer septischen Enzephalopathie (SE), insbesondere im Hinblick auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS), zu beleuchten. Dabei sollten die Auswirkungen eines Verlustes der Funktionen von PI3K γ , der Kinase-Aktivität und der PDE-aktivierenden *Scaffold*-Funktion, untersucht werden.

Infolge einer intraperitonealen Injektion von Lipopolysaccharid (LPS) in Mäusen kam es zu einer Störung der BHS-Integrität. Eine weiter fortschreitende BHS-Schädigung in Tieren des PI3K γ -KO-Stammes konnte auf eine gesteigerte Expression von Matrixmetalloproteasen (MMP) durch Mikroglia zurückgeführt werden. Der Verlust der kinase-unabhängigen Funktion von PI3K γ führte zu einer erhöhten Aktivierung cAMP-abhängiger Signalwege in Mikroglia. Daraus resultierte eine in Zellen des PI3K γ -KO-Stammes verstärkte Bildung von MMP infolge einer LPS-Stimulation. Die höhere Expression matrix-degradierender Substanzen durch Mikroglia aus PI3K γ -KO-Tieren *in vitro* ist konform mit der Beobachtung einer stärkeren Schädigung der BHS *in vivo*.

4.1. *Entwicklung einer systemischen Entzündungsreaktion durch LPS*

Das in den *in-vivo*-Untersuchungen verwendete Endotoxämie-Modell diente zur Auslösung eines systemischen inflammatorischen Response-Syndroms (SIRS) durch die intraperitoneale Injektion von LPS. Dabei kommt es zu einer schnellen Erhöhung proinflammatorischer Zytokine in der systemischen Zirkulation (Krabbe *et al.* 2001, Andreasen *et al.* 2008). Die Endotoxämie kann als Modell für eine Sepsis dienen, da durch die Aktivierung des *Toll-Like-Rezeptors* 4 (TLR4) in Immunzellen und die daraus resultierende Immunantwort sepsisähnliche Symptome hervorgerufen werden. Dennoch ist zu beachten, dass dieses Modell Unterschiede im Krankheitsverlauf, verglichen mit Infektionsmodellen wie der CLP (*cecal ligation and puncture*), aufweist (Remick *et al.* 2000). Nach einer LPS-Injektion kommt es zu einem schnelleren und höheren Anstieg

der systemischen Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder IL-6 als nach einer CLP. Vorteil des CLP-Modells ist, dass hierdurch Verlauf und Charakteristik einer Sepsis am besten modelliert werden können (Dejager *et al.* 2011). Ein Vorteil des Endotoxämie-Modells hingegen ist die bessere Standardisierbarkeit und Reproduzierbarkeit. Mortalität und Morbidität sind, abhängig von den jeweils gewählten Bedingungen (wie beispielsweise der verwendeten LPS-Konzentration), in beiden Modellen vergleichbar (Remick *et al.* 2000, Recknagel *et al.* 2013). Das hier verwendete Model unter Nutzung einer LPS-Injektion diente zur Simulation der initialen Phase einer Sepsis, die beispielsweise durch erhöhte Plasmakonzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine gekennzeichnet ist (Fink 2014). In dieser Phase sollten die neuroinflammatorischen Prozesse und insbesondere deren Auswirkungen auf die BHS untersucht werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte intraperitoneale Injektion von LPS führte zu ähnlich stark ausgeprägten Krankheitssymptomen in Tieren aus allen drei untersuchten Stämmen, was anhand einer signifikanten Erhöhung des CSS (*clinical severity score*, Gonnert *et al.* 2011) dokumentiert wurde. Diese Daten entsprechen früheren Beobachtung, wonach Tiere infolge einer LPS-Behandlung eine deutlich verringerte Aktivität zeigten (Remick *et al.* 2000). Zusätzlich war ein deutlicher Gewichtsverlust der LPS-behandelten Tiere innerhalb der Behandlungsdauer von 24 h zu beobachten. Die Gewichtsabnahme kann auf eine verringerte Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme infolge der krankheitsbedingten Verhaltensänderungen, die sich auch im Anstieg des CSS widerspiegeln, zurückgeführt werden. Dieses veränderte Verhalten ist zum einen ein gut beobachtbarer Indikator für die erhöhte Morbidität infolge einer systemischen Entzündungsreaktion. Zum anderen kann insbesondere eine verringerte Flüssigkeitsaufnahme und eine daraus resultierende Dehydratation und Hypovolämie zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes beitragen (Granger *et al.* 2012). Während der *in-vivo*-Untersuchungen erfolgte eine subkutane Injektion von isotonischer Kochsalzlösung, um einem Volumenmangel entgegenzuwirken. Die Flüssigkeitszufuhr verringert die negativen Auswirkungen auf die kardiovaskuläre Leistungsfähigkeit und senkt die Mortalität (Zanotti-Cavazzoni *et al.* 2009).

Nach der intraperitonealen Injektion von LPS wurden Auswirkungen auf die BHS und Verhaltensänderungen der Versuchstiere innerhalb eines Zeitfensters von 4 h

festgestellt. Die rasche Auswirkung der LPS-Injektion ist auf eine schnelle systemische Verteilung zurückzuführen. Die Aufnahme des intraperitoneal injizierten LPS erfolgt sowohl über das Blut-, als auch über das Lymphgefäßsystem. Dabei umgeht die vom Lymphsystem absorbierte und insbesondere über den *Ductus thoracicus* transportierte Menge die Ausscheidung über die Leber, da die abdominale Lymphe über den *Angulus venosus* in die *Vena cava superior* abgeleitet wird (Olofsson *et al.* 1986). Währenddessen wird der in die peritoneale Blutzirkulation übergegangene Anteil über die *Vena portae* in die Leber transportiert. Das vom Lebergewebe absorbierte LPS löst dosisabhängig Entzündungsreaktionen aus, wodurch es zu Schädigungen der Leber bis hin zum Organversagen kommen kann (Kubitz *et al.* 1999, Recknagel *et al.* 2013).

Infolge einer gram-negativen Infektion bzw. LPS-Exposition kann es innerhalb weniger Stunden zu einer starken Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β oder IL-6 im Plasma kommen (Remick *et al.* 2000, Mehta *et al.* 2004). Dabei steigen zuerst die Plasmakonzentrationen von TNF- α , gefolgt von IL-1 β , die nach Erreichen eines Peaks wieder absinken. Die Plasmakonzentration von IL-6 erreicht ihr Maximum später und sinkt ab, während die anti-inflammatorische Phase mit steigenden Konzentrationen von Zytokinen wie IL-1RA und IL-10 beginnt (Andreasen *et al.* 2008). Der pro-inflammatorische „Zytokin-Sturm“ wird hauptsächlich durch die Reaktion von Leukozyten auf Pathogene bzw. deren Bestandteile wie LPS ausgelöst. Die Aktivierung von Leukozyten in der systemischen Zirkulation und die damit einhergehende Zytokinfreisetzung stellen einen wesentlichen Schritt der Entwicklung der systemischen Entzündungsreaktion dar, auch wenn erhöhte Plasmakonzentrationen von Zytokinen nicht in jedem Einzelfall nachweisbar sind (Cavaillon & Annane 2006, Adib-Conquy & Cavaillon 2009).

4.2. LPS-induzierte Schädigung der BHS

Infolge der intraperitonealen LPS-Injektion wurde eine erhöhte Durchlässigkeit der BHS für Plasmaproteine nach 4 h festgestellt, die in den Tieren der drei untersuchten Mausstämme (C57BL/6J Wildtyp, PI3K γ -KO und PI3K γ -KD) ähnlich stark ausgeprägt war. LPS kann die intakte BHS nur in sehr geringen Mengen passieren, jedoch auf verschiedene Weisen die Permeabilität beeinflussen (Banks & Robinson 2010, Banks &

Erickson 2010). Intraperitoneal verabreichtes und über die Zirkulation transportiertes LPS kann die BHS direkt über die Bindung an den TLR4 auf den Endothelzellen der BHS und indirekt durch die von Immunzellen sezernierten Zytokine wie TNF- α beeinflussen. (Verma *et al.* 2006, Chen *et al.* 2012, Fiala *et al.* 1997, Alexander *et al.* 2008). Zu dem frühen Verlust der BHS-Integrität tragen sowohl die direkte Wirkung von LPS als auch indirekte Wirkungen durch die erhöhten Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine auf die Endothelzellen, die mit ihren *Tight Junctions* und Transportmechanismen einen wesentlichen Teil der BHS bilden, bei. LPS führt unter anderem zu einer erhöhten Leukozyten-Adhäsion, zu verstärkter Endozytose und Aktivierung verschiedener Transportsysteme in den Zellen der BHS (Banks & Erickson 2010, Nag *et al.* 2011, Rosenberg *et al.* 1995). Aktivierte Endothelzellen produzieren Zytokine und NO (Adam *et al.* 2013). *In-vitro*-Kulturen von murinen Hirn-Endothelzellen sezernieren an der luminalen und abluminalen Membran unterschiedliche Mengen pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α oder IL-6, deren Sezernierung nach LPS-Stimulation erhöht wird (Verma *et al.* 2006). Zudem können verschiedene Zytokine, wie insbesondere IL-1 oder TNF- α , über saturierbare Transportsysteme vom Blut ins Hirngewebe durch die BHS transportiert werden (Banks 2005). Alexander und Kollegen zeigten, dass insbesondere TNF- α eine wesentliche Rolle beim Verlust der BHS-Integrität spielt. So wird infolge des genetischen *Knockouts* des TNF-Rezeptors-1 die Erhöhung der BHS-Permeabilität, welche durch eine Endotoxämie hervorgerufen wird, verhindert (Alexander *et al.* 2008). Die pro-inflammatorischen Bedingungen und die Endothel-Aktivierung können zu Störungen der Mikrozirkulation und der BHS-Funktion führen, woraus eine gestörte Versorgung und der Verlust der für die neuronale Funktion wichtigen Homöostase resultieren können (Taccone *et al.* 2010, Adam *et al.* 2013). Störungen der BHS-Funktion infolge der intraperitonealen LPS-Injektion wurden bereits nach 4 h anhand der Extravasation von Evans Blue ins Hirngewebe, als einem Marker für die Durchlässigkeit der BHS für Plasmaproteine, detektiert.

Um die verschiedenen Funktionen zu untersuchen, die in ihrer Gesamtheit die BHS-Integrität bewirken, gibt es eine Vielzahl von Methoden. Der Einsatz von Farbstoffen oder radioaktiv markierten Molekülen, welche die intakte BHS nicht passieren können, erlaubt die Untersuchung und Quantifizierung der BHS-Permeabilität für Moleküle aus dem Blutkreislauf. Ein häufig verwendeter Marker ist der Azofarbstoff Evans Blue, der mit hoher Affinität an Albumin bindet, wobei ein Komplex mit einer Größe von ca.

68 kDa entsteht. Nach der Injektion bindet Evans Blue an Albumin und ist innerhalb weniger Minuten nicht mehr in seiner ungebundenen Form im Blut zu detektieren (Wolman *et al.* 1981, Yen *et al.* 2013). Somit kann an Serumalbumin gebundenes Evans Blue als Marker für eine Durchlässigkeit der BHS für Plasmaproteine dienen, was eine erhebliche Funktionsstörung der BHS kennzeichnet. In das Hirngewebe diffundiertes Evans Blue ist dort histologisch nachweisbar (Alexander *et al.* 2008) bzw. kann eluiert und quantifiziert werden (Comim *et al.* 2011, Dal-Pizzol *et al.* 2013, Flierl *et al.* 2009).

Der Verlust der BHS-Funktion im Falle einer systemischen Aktivierung des Immunsystems kann auf die massive Beeinträchtigung durch die Wirkung proinflammatorischer Mediatoren und eine daraus resultierende Erschöpfung der Schutz- und Reparaturmechanismen des BHS-Systems zurückgeführt werden. Allerdings kann lokal eine Verringerung der BHS-Integrität auch unter physiologischen Bedingungen auftreten, um beispielsweise die Diapedese von Leukozyten zu erleichtern (Banks & Erickson 2010, Engelhardt & Sorokin 2009). Unter physiologischen Bedingungen ist die Einwanderung von Immunzellen in das ZNS durch die BHS stark eingeschränkt. Zunächst muss die Diapedese durch die Endothelzellschicht erfolgen. Danach ist die Durchquerung der Endothel-Basalmembran und anschließend der Astroglia-Basalmembran (*Glia limitans*), die jeweils unterschiedliche molekulare Zusammensetzungen aufweisen, erforderlich, um in das Hirnparenchym zu migrieren (Engelhardt 2008). Die Einwanderung von Leukozyten beginnt mit deren Anlagerung an das Endothel, wobei die Expression von Adhäsionsmolekülen durch die Endothelzellen eine wesentliche Rolle spielt. Durch Selektine werden Leukozyten im Blutstrom verlangsamt und bewegen sich rollend entlang der Gefäßwand. Die Sezernierung von Chemokinen und die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 führen zur Attraktion und Adhäsion der Leukozyten, woraufhin die Diapedese durch die Gefäßwand erfolgen kann. Unter pathophysiologischen Bedingungen, wie während einer CLP-induzierten Sepsis, kommt es zu einer verstärkten Adhäsion und Einwanderung von Immunzellen, wie beispielsweise Neutrophilen, in das Hirnparenchym (Comim *et al.* 2011, Engelhardt 2008). Leukozyten, die aufgrund einer Entzündungsreaktion aktiviert werden und die BHS passieren, können zur Schädigung der BHS und zur Weiterentwicklung der Entzündungsreaktion beitragen (Engelhardt & Sorokin 2009, Jin *et al.* 2010a, Nag *et al.* 2011, Jin *et al.* 2011, Imamura *et al.* 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde die Einwanderung von polymorph-nukleären

Leukozyten (PMN) in das Hirngewebe von Mäusen infolge einer LPS-Behandlung in Wildtyp- und PI3K γ -KD-Tieren gezeigt. Die geringe Invasion von PMN in LPS-behandelten PI3K γ -KO-Tieren deutet darauf hin, dass die Einwanderung von Leukozyten nicht ursächlich für den fortschreitenden Verlust der BHS-Integrität in diesen Tieren ist. Eine mögliche Erklärung für die geringe PMN-Invasion in PI3K γ -KO-Tieren ist die Beteiligung von PI3K γ an der Chemotaxis und Migration von Leukozyten, die *in vitro* in PI3K γ -defizienten Zellen durch die gestörte Ausbildung eines Leitsaums (*leading edge*) beeinträchtigt ist (Sasaki *et al.* 2000, Li *et al.* 2000, Hannigan *et al.* 2002, Ferrandi *et al.* 2007, Ghigo *et al.* 2010).

Die Wirkungen von LPS und Zytokinen auf die BHS und der spezifische Transport von Zytokinen durch die BHS können zu einer Entzündungsreaktion im Hirngewebe und zur Aktivierung von Mikroglia führen (Chen *et al.* 2012, Hines *et al.* 2013, Banks 2005, Pan & Kastin 2008, Verma *et al.* 2006). Mikroglia exprimieren den TLR4 und sind somit in der Lage, auf LPS mit einer Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege zu reagieren. Als die residenten Immunzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind Mikroglia Teil der neurovaskulären Einheit. In ihrer ramifizierten Form überwachen sie das Hirnparenchym. Als Reaktion auf einen pro-inflammatorischen Stimulus erfolgt eine entsprechend angepasste Aktivierung der Mikroglia, die bis hin zu einem neurotoxischen Aktivierungsstadium und zur Bildung von Zytokinen, Chemokinen, Proteasen und ROS führen kann (Tambuyzer *et al.* 2009, Kettenmann *et al.* 2011, Hellwig *et al.* 2013). Aktivierte Mikroglia exprimieren wie Makrophagen verstärkt Iba-1. Die Expression von IL-1 β im Hirnparenchym während einer CLP-induzierten SE ist mit Iba-1 co-lokalisiert (Imamura *et al.* 2011). Zudem exprimieren aktivierte Mikroglia MMP, was zu einer weiteren Degradation von *Tight-Junction*- und *EZM*-Molekülen der BHS beitragen kann (Gurney *et al.* 2006, Candelario-Jalil *et al.* 2009). Ein Verlust der BHS-Integrität wurde nach 4 h festgestellt und war nach 24 h persistent. In histologischen Präparaten konnte eine Co-Lokalisation von MMP-9 und dem Mikroglia-Marker Iba-1 festgestellt werden. Zudem wurde die Produktion weiterer MMP durch Mikroglia *in vitro* gezeigt.

Ein wesentlicher Aspekt, der zur Störung der BHS-Funktion beiträgt, ist der Verlust von *Tight Junctions* und der damit zusammenhängenden parazellulären Diffusionsbarrierefunktion. Infolge einer CLP-induzierten Sepsis wurde im

Hippocampus von Mäusen ein mehr als 90-prozentiger Verlust des *Tight-Junction*-Moleküls Occludin nach 24 h festgestellt (Imamura *et al.* 2011). Occludin verringert die parazelluläre Permeabilität und die elektrische Leitfähigkeit von *Tight Junctions* (Balda *et al.* 1996, Jin *et al.* 2010a). Während der Entzündungsreaktion infolge einer zerebralen Ischämie und Reperfusion wurde die Degradation des *Tight-Junction*-Moleküls Claudin-5 nachgewiesen. Es gibt Hinweise darauf, dass insbesondere MMP-9 wesentlich am Abbau der *Tight Junctions* und von Komponenten der EZM beteiligt ist (Jin *et al.* 2011). Claudin-5 ist essentiell für die Bildung von *Tight Junctions* und somit für die Bildung der BHS (Engelhardt 2008). Eine Störung oder der Verlust der BHS-Integrität kann zum Versagen der Barrierefunktionen und zur Ödembildung führen und somit zu einer gestörten Homöostase und Neurotransmitterkonstellation im Hirnparenchym, was zur Entstehung einer Enzephalopathie beiträgt (Jacob *et al.* 2011, Terborg 2012, Jin *et al.* 2010a).

Anhand des verwendeten *in-vivo*-Modells wurde 4 h nach der LPS-Behandlung eine Erhöhung der BHS-Permeabilität in Mäusen nach einer intraperitonealen LPS-Injektion im Vergleich zu PBS-behandelten Kontrollen festgestellt. Diese erhöhte Permeabilität der BHS für Plasmaproteine verstärkte sich in Tieren des PI3K γ -KO-Stammes im Vergleich zu Tieren des Wildtyp- und PI3K γ -KD-Stammes zeitabhängig. Nach 24 h war die BHS-Permeabilität in PI3K γ -KO-Tieren gegenüber Wildtyp-Tieren signifikant erhöht. Der PI3K γ -KD-Stamm zeigte, ähnlich dem Wildtyp-Stamm, keine weitere Erhöhung der BHS-Permeabilität im Vergleich zum 4 h-Zeitpunkt. Diese Daten weisen auf einen Einfluss der kinase-unabhängigen *Scaffold*-Funktion von PI3K γ auf das Fortschreiten der BHS-Permeabilität hin. Zudem deutet die geringere Einwanderung von Leukozyten ins Gehirn der PI3K γ -KO-Tiere auf eine Beteiligung von Zellen der neurovaskulären Einheit.

4.3. Verminderung der BHS-Integrität durch MMP aus Mikroglia

Die Ergebnisse bestätigten frühere Untersuchungen, wonach eine intraperitoneale Injektion von LPS zu einer pathologisch erhöhten BHS-Permeabilität führt (Alexander *et al.* 2008). Die Störung der BHS-Funktion wird in einer frühen Phase des LPS-

induzierten SIRS durch die Wirkungen von LPS und im Blut zirkulierender Zytokine auf die Zellen der BHS und die neurovaskuläre Einheit ausgelöst (Banks & Erickson 2010, Candelario-Jalil *et al.* 2009). Die fortschreitende BHS-Schädigung im Verlauf des LPS-induzierten SIRS wird maßgeblich durch die Freisetzung und Aktivierung von MMP im perivaskulären Hirngewebe verursacht (Dal-Pizzol *et al.* 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression verschiedener MMP im Hirngewebe bestätigt. MMP sind Proteasen, die insbesondere Moleküle der extrazellulären Matrix und der *Tight Junctions* abbauen und somit an der Degradation von BHS-Komponenten beteiligt sind (Candelario-Jalil *et al.* 2009, Nag *et al.* 2009, Jin *et al.* 2010a). Es ist bekannt, dass bei der Reperfusion nach einer MCAO (*middle cerebral artery occlusion*) erhöhte Konzentrationen bzw. Aktivitäten von MMP-2, MMP-3 und MMP-9 im Hirngewebe von Mäusen auftreten und mit einer verstärkten BHS-Permeabilität assoziiert sind (Rosenberg *et al.* 2001). Eine intrazerebrale Injektion von TNF- α erhöht in Ratten die MMP-9-Expression im Hirngewebe und die BHS-Permeabilität (Rosenberg *et al.* 1995). Insbesondere die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 greifen Komponenten der Endothel-Basallamina an und können somit die BHS-Integrität schwächen (Mun-Bryce & Rosenberg 1998, Candelario-Jalil *et al.* 2009, Jin *et al.* 2010a). Viele MMP werden in Reaktion auf eine Aktivierung exprimiert, beispielsweise wird MMP-9 von Mikroglia nach einer LPS-Stimulation produziert (Sands & Palmer 2008, Lee *et al.* 2012). Die Expression von MMP-9 und MMP-3 kann durch TNF- α und IL-1 β aktiviert werden (Candelario-Jalil *et al.* 2009). Die Serumkonzentrationen beider Zytokine steigen infolge einer LPS-Injektion innerhalb weniger Stunden (Mehta *et al.* 2004, Remick *et al.* 2000, Andreasen *et al.* 2008). Zudem können TNF- α und IL-1 β die BHS über spezifische Transportsysteme passieren (Banks 2005, Pan & Kastin 2008, Banks & Erickson 2010). MMP-3 und MMP-9 werden in den extrazellulären Raum sezerniert und können frei diffundieren. MMP-3 ist in der Lage die inaktive Proform von MMP-9 zu aktivieren (Hahn-Dantona *et al.* 1999, Candelario-Jalil *et al.* 2009). Die Proform von MMP-2 wird von Astroglia konstitutiv produziert und steht somit permanent für die Aktivierung zur Verfügung (Nag *et al.* 2011). Die Aktivierung von MMP-2 erfolgt an der Zelloberfläche durch die membrangebundene MMP-14 in einem trimolekularen Komplex aus proMMP-2, TIMP-2 und MMP-14 (Candelario-Jalil *et al.* 2009).

Die verschiedenen MMP haben zwar unterschiedliche bevorzugte Substrate, können aber auch mit einer Vielzahl anderer Moleküle interagieren. Die Gelatinasen MMP-2

und MMP-9 bauen Komponenten der EZM bzw. der Basallamina ab. Insbesondere MMP-9 spielt in vielen physiologischen Prozessen eine Rolle, wie in der Embryonalentwicklung, bei Angiogenese, Wundheilung oder Diapedese sowie auch bei Lern- und Gedächtnisprozessen im ZNS (Rivera *et al.* 2010, Martins *et al.* 2013, Chaturvedi & Kaczmarek 2014). Zu den Substraten der Gelatinasen gehören verschiedene Kollagene und EZM-Moleküle wie Laminin (Woessner & Nagase 2000, Niyibizi *et al.* 1994, Seltzer *et al.* 1990, Aimes & Quigley 1995). Ebenso sind diese MMP in der Lage die Moleküle der *Tight Junctions* anzugreifen (Asahi *et al.* 2001, Yang *et al.* 2007). MMP-2 und MMP-9 sind somit wesentlich an der Schädigung der BHS beteiligt (Rosenberg 2009, Chodobski *et al.* 2011). Andere MMP, wie die Kollagenase MMP-13, tragen ebenfalls zu der Degradation verschiedener EZM-Moleküle bei (Woessner & Nagase 2000, Welgus *et al.* 1983, Fosang *et al.* 1996, Knauper *et al.* 1997). Eine erhöhte Expression und Aktivierung von MMP durch Mikroglia kann somit durch eine verstärkte Schädigung der BHS zum Verlust der für die neuronale Funktion notwendigen Homöostase beitragen.

Die Expression von MMP im Gehirn wurde anhand von Lysaten und histologischen Schnitten der Maushirne bestätigt. Dabei wurden im Hirngewebe von Tieren der drei untersuchten Mausstämme MMP-2, MMP-9 und MMP-13 im Western Blot nachgewiesen. Da der zelluläre Ursprung dieser MMP-Expression mit dieser Methode nicht feststellbar war, wurden immunhistochemische Doppelfärbungen vorgenommen. Insbesondere konnten dabei im perivaskulären Gewebe MMP-9 und MMP-3 in Iba-1-positiven Zellen nachgewiesen werden. MMP können von verschiedenen Zellen im ZNS gebildet werden, unter anderem von Astroglia und insbesondere von Iba-1-positiven Mikroglia (Gurney *et al.* 2006, Candelario-Jalil *et al.* 2009). Mikroglia exprimieren *in vitro* verschiedene MMP, unter anderem MMP-9, die einen wesentlichen Faktor bei einer BHS-Schädigung während inflammatorischer Prozesse im Gehirn darstellt (Rosenberg *et al.* 2001, Nuttall *et al.* 2007, del Zoppo *et al.* 2012, Candelario-Jalil *et al.* 2009). Da neben residenten Zellen wie Mikroglia auch einwandernde aktivierte Leukozyten wie PMN als Quelle von MMP-9 in Frage kamen (Jin *et al.* 2011), wurde immunhistochemisch die Einwanderung MMP-9-positiver PMN untersucht. Eine erhöhte Invasion infolge einer LPS-Behandlung war nur in Wildtyp- und PI3K γ -KD-Tieren zu beobachten. Einwandernde PMN konnten somit als Quelle einer verstärkten MMP-Expression im Hirngewebe von PI3K γ -KO-Tieren und einer

damit in Zusammenhang stehenden erhöhten BHS-Permeabilität ausgeschlossen werden.

Nachdem immunhistochemisch die Expression von MMP-9 und MMP-3 in den Gehirnen LPS-behandelter Tiere Iba-1-positiven Zellen, also aktivierten Mikroglia, zugeordnet wurde, erfolgte *in vitro* die Untersuchung der MMP-Expression in Mikroglia der drei untersuchten Mausstämme. Mikroglia exprimierten die mRNA von MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 und weiterer MMP. Durch immunologische Färbung der Zellen und mittels Western Blot erfolgte der Nachweis der Produktion von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13 durch aktivierte Mikroglia *in vitro*. Die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 konnten zudem mit Hilfe der Zymographie im Zellkulturüberstand detektiert werden. Mit dieser Methode konnte sowohl die Expression als auch die Aktivität von MMP festgestellt werden. Als Substrat diente Gelatine, wodurch insbesondere MMP-2 und MMP-9 betrachtet werden konnten. Für die Detektion anderer MMP ist die Nutzung entsprechender Substrate erforderlich (Snoek-van Beurden & Von den Hoff 2005). MMP werden als Zymogen exprimiert, deren Aktivierung in der Regel durch andere Proteasen erfolgt (Snoek-van Beurden & Von den Hoff 2005, Rosenberg 2009). Mit Hilfe der Gelatine-Zymographie war es möglich, sowohl das Zymogen als auch die aktive Form von MMP-2 bzw. MMP-9 zu detektieren und anhand der Molekülgröße zu unterscheiden. Infolge der Denaturierung durch SDS erfolgte eine Aktivierung des Zymogens, jedoch ohne die Abspaltung der Prodomäne. Vollständig aktivierte MMP und durch die Methode aktivierte Proform waren somit anhand der entsprechenden Lokalisation im Gel differenzierbar (Snoek-van Beurden & Von den Hoff 2005). *In vitro* war nur ein geringer Teil der sezernierten MMP-2 bzw. MMP-9 aktiviert. Bei der densitometrischen Quantifizierung der Zymographie-Gele wurden jeweils Proform und aktive Form zusammengefasst, um die gesamte an die Umgebung abgegebene und somit für eine extrazelluläre Aktivierung zur Verfügung stehende MMP zu erfassen. Die von Mikroglia und anderen Zellen sezernierten MMP-Proformen können im Extrazellularraum durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden (Candelario-Jalil *et al.* 2009). Während für MMP-2 keine LPS-abhängige Erhöhung der Protein-Expression durch Mikroglia-Zellen festgestellt wurde, führte die LPS-Behandlung zu einer verstärkten Bildung und Sezernierung von MMP-9.

Die Expression verschiedener MMP wurde auch im zweiten verwendeten Mikroglia-Modell, der Zelllinie BV2, detektiert. Im Gegensatz zu primären Mikroglia wurde in BV2-Zellen die mRNA von MMP-2 in wesentlich geringerem Maße exprimiert als die mRNA von MMP-9 oder MMP-13. Die Expression der mRNA von MMP-2 war in BV2-Zellen um zwei Größenordnungen geringer als die der mRNA von MMP-9 oder von MMP-13. Dagegen war in primären Mikroglia die mRNA-Expression für MMP-2, MMP-9 und MMP-13 auf vergleichbar hohem Niveau. Diese Befunde auf Transkriptionsebene entsprechen den auf Ebene der MMP-Sezernierung ermittelten Daten. Die Zymographieuntersuchungen der Kulturüberstände von BV2-Kulturen zeigten eine hohe Sezernierung von MMP-9, während die parallel detektierte MMP-2 am Detektionsminimum war. Eine LPS-abhängige Induktion der mRNA-Expression von MMP-2 war zwar auch in BV2-Zellen messbar und in p110 γ -shRNA exprimierenden Zellen erhöht, die Aussagekraft der Daten aus den Untersuchungen der BV2-Zelllinie über die Rolle von MMP-2 in Mikroglia ist aufgrund der im Vergleich zu Primärzellen stark verringerten Expression von mRNA und Protein dieser MMP jedoch eingeschränkt. Die Unterschiede in der MMP-2-Expression zwischen primären Mikroglia und BV2 weisen auf die Grenzen der Anwendbarkeit der BV2-Zelllinie als Modell für Mikroglia-Zellen hin (Stansley *et al.* 2012).

Verschiedene MMP wurden *in vivo* im Gehirn detektiert. MMP-3 und MMP-9 konnten dabei mit Iba-1-positiven Zellen assoziiert werden. *In vitro* erfolgte in Mikroglia-Kulturen der Proteinnachweis von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13. Die LPS-induzierte Expression verschiedener MMP, insbesondere von MMP-9, war in PI3K γ -defizienten Mikroglia erhöht. Eine erhöhte Expression und Aktivierung von MMP aus Mikroglia kann zu einer verstärkten Degradation von Bestandteilen der BHS führen und zum Verlust der für die neuronale Funktion notwendigen Homöostase beitragen.

4.4. Der Verlust von PI3K γ führt zu erhöhter MMP-Expression in Mikroglia

In PI3K γ -KO-Tieren wurde 24 h nach der intraperitonealen LPS-Injektion ein weiteres Fortschreiten der BHS-Schädigung im Vergleich zu Tieren des Wildtyp und des PI3K γ -KD-Stammes detektiert. Zudem war in den Gehirnen der entsprechenden PI3K γ -KO-

Tiere eine erhöhte Expression von MMP-9 feststellbar. Die stärkere BHS-Permeabilität in LPS-behandelten Tieren kann auf eine erhöhte MMP-Aktivität zurückgeführt werden (Dal-Pizzol *et al.* 2013). Die fortschreitende Schädigung der BHS in PI3K γ -KO-Tieren könnte somit durch eine zusätzlich verstärkte MMP-Produktion durch Zellen in der neurovaskulären Einheit verursacht worden sein.

Zunächst wurde in *in-vitro*-Versuchen bestätigt, dass Mikroglia auf eine LPS-Stimulation mit erhöhter MMP-Expression auf Ebene der mRNA-Transkription und auf Proteinebene reagieren. Der Einfluss von PI3K γ auf diese MMP-Expression wurde durch den Vergleich von primären Mikroglia des Wildtyp-, des PI3K γ -KO- und des PI3K γ -KD-Stammes und an BV2-Zellen, in denen die p110 γ -Expression mittels shRNA genetisch herunter reguliert wurde, untersucht. Die Analyse von p110 γ in Mikroglia bestätigte die fehlende Expression von p110 γ im PI3K γ -KO-Stamm. Erwartungsgemäß wurde das Protein im Wildtyp- und im PI3K γ -KD-Stamm nachgewiesen. Ein Anstieg der Expression von PI3K γ in aktivierten Mikroglia wurde bereits unter postischämischen Bedingungen beschrieben (Jin *et al.* 2010b). In p110 γ -shRNA exprimierenden BV2-Zellen war die Expression von p110 γ um ca. 70% erniedrigt, im Vergleich zu Kontroll-shRNA exprimierenden BV2. Der Verlust von PI3K γ führte zu einer erhöhten LPS-induzierten MMP-Expression, insbesondere von MMP-9 und MMP-13, in Mikroglia-Zellen.

Die Untersuchung der LPS-induzierten MMP-Expression in Wildtyp-, PI3K γ -KO- und PI3K γ -KD-Mikroglia gab Hinweise auf eine Abhängigkeit von der *Scaffold*-Funktion von PI3K γ . Durch diese von der Kinaseaktivität unabhängige Funktion kann PI3K γ mit bestimmten Phosphodiesterasen, wie der PDE3B interagieren. Dabei bilden p110 γ und p84/87 einen Komplex mit PKA und PDE3B, wobei die cAMP-degradierende Funktion von PDE3B aktiviert wird (Patrucco *et al.* 2004, Perino *et al.* 2011). Somit bewirkt PI3K γ indirekt eine Reduzierung der cAMP-Konzentration in der Zelle und beeinflusst damit cAMP-abhängige Signalwege (Schmidt *et al.* 2013). Die in diesem Zusammenhang beschriebene Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration in Mikroglia des PI3K γ -KO-Stammes konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Eine erhöhte Konzentration des *Second Messengers* cAMP führt zu einer verstärkten Aktivierung von PKA. Dabei wird durch die Bindung von vier cAMP-Molekülen die PKA aktiviert. Es kommt zur Abspaltung von zwei C-Untereinheiten der PKA, welche

dann verschiedene Substrate an Threonin bzw. Serin phosphorylieren können (Shemarova 2009, Löffler 2005). Unter anderem kann somit der Transkriptionsfaktor CREB durch die Phosphorylierung am Ser-133 aktiviert werden. Phosphoryliertes CREB ist in der Lage, an cAMP-Response-Element (CRE)-Sequenzen verschiedener Gene zu binden und deren Expression auszulösen (Wen *et al.* 2010). Eine cAMP-abhängige Expression wurde für MMP-2, MMP-9 und MMP-13 in verschiedenen Zelltypen beschrieben, unter anderem in Monozyten (Hasan & Nakajima 1999, Melnikova *et al.* 2006, Alper *et al.* 2001, Vaday *et al.* 2001, Shankavaram *et al.* 2001, Quinn *et al.* 2000, Guo *et al.* 2010). Der Promotor des MMP-9-Gens enthält zudem auch Bindungsstellen für NF κ B und AP-1 (Masure *et al.* 1993). Diese Transkriptionsfaktoren werden unter anderem durch den TLR4-, TNF-Rezeptor- bzw. IL-1-Rezeptor-Signalweg aktiviert. Eine Stimulation mit LPS, TNF- α oder IL-1 kann demnach die Expression von MMP-9 bewirken, was insbesondere auch in LPS-stimulierten BV2-Mikroglia gezeigt wurde (Lin *et al.* 2008, Lin *et al.* 2009, Lee *et al.* 2012). Die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB kann zu einer weiteren Erhöhung der MMP-9-mRNA-Expression führen (Park *et al.* 2010, Lee *et al.* 2012).

Eine Phosphorylierung von CREB an Ser-133 kann durch die Aktivierung verschiedener Signalwege erfolgen, unter anderem durch PKA (cAMP-PKA-Signalweg), PKC, Ca²⁺- / Calmodulin-abhängige Kinasen (CaMK) oder pp90 ribosomale S6-Kinase (Wen *et al.* 2010). Namensgebend für das cAMP-Response-Element (CRE) und den Transkriptionsfaktor CREB ist die bereits beschriebene cAMP-abhängige Aktivierung. Ferner besteht die Möglichkeit, dass eine Stimulation mit LPS zu einer Phosphorylierung von CREB führt. Durch die Wirkung von LPS kann über den SRC-Kinase-Signalweg eine Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration bewirkt werden, was über die Aktivierung der Ca²⁺- / Calmodulin-abhängigen Kinase eine Phosphorylierung von CREB hervorruft (Zanoni *et al.* 2009, Illario *et al.* 2008). Zudem kann infolge einer LPS-Stimulierung die Aktivierung von MAP-Kinase-Signalwegen (p38, ERK) über die Mitogen- und Stress-aktivierten Protein-Kinasen (MSK) zu einer Phosphorylierung von CREB führen (Caivano & Cohen 2000, Wen *et al.* 2010). Eine Aktivierung des PI3K-AKT-Signalweges kann ebenfalls in einer Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB resultieren (Du & Montminy 1998, Park *et al.* 2010). Zusammengefasst gibt es eine Vielzahl von Signalwegen, die eine Aktivierung von CREB bewirken können (Wen *et al.* 2010).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine LPS-abhängige Erhöhung der CREB-Phosphorylierung in primären Mikroglia und BV2-Zellen. In Zellen des PI3K γ -KO-Stammes war die CREB-Phosphorylierung in unstimulierten Zellen erhöht, was auf die nachgewiesene Erhöhung der cAMP-Konzentration in diesen Zellen zurückgeführt werden kann. Analog ist auch in den p110 γ -shRNA-exprimierenden BV2 eine erhöhte cAMP-Konzentration als Ursache der stärkeren basalen CREB-Phosphorylierung zu vermuten. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration in BV2-Mikroglia wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht gemessen. Allerdings führte die Behandlung von p110 γ normal exprimierenden Kontroll-BV2-Zellen mit dem Aktivator der Adenylatzyklase Forskolin, welcher eine verstärkte cAMP-Bildung bewirkt, zu einer erhöhten LPS-induzierten Expression der mRNA von MMP-9 und MMP-13. Diese Ergebnisse bestätigen einen Einfluss von cAMP auf die Gen-Expression von MMP-9 und MMP-13. Die erhöhte cAMP-Konzentration kann zu einer verstärkten PKA-Aktivierung und einer daraus resultierenden Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB führen und somit zu einer erhöhten CREB-abhängigen Gen-Transkription (Wen *et al.* 2010).

Die LPS-induzierte mRNA-Expression von MMP-2, MMP-9 und MMP-13 war in PI3K γ -KO-Mikroglia gegenüber Wildtyp-Mikroglia erhöht. Die Promotor-Regionen dieser MMP-Gene beinhalten CRE-Sequenzen, an denen der Transkriptionsfaktor CREB binden kann (Xie *et al.* 1997, Shukla *et al.* 2009, Alper *et al.* 2001, Huhtala *et al.* 1990, Bui *et al.* 2012). Die erhöhte Expression dieser MMP in PI3K γ -KO-Mikroglia kann demnach durch die Auswirkung einer erhöhten cAMP-Konzentration infolge der verminderten PDE-Aktivierung bei fehlender *Scaffold*-Funktion von PI3K γ erklärt werden. Eine durch erhöhtes cAMP verstärkte Aktivierung von PKA ruft dann eine höhere Phosphorylierung und somit Aktivierung von CREB hervor (Abbildung 29, Wen *et al.* 2010). Die CREB-Phosphorylierung war in Mikroglia des PI3K γ -KO-Stammes und in p110 γ -shRNA exprimierenden BV2-Zellen deutlich höher als in den jeweils entsprechenden Kontroll-Zellen. Die in der BV2-Mikroglia-Zelllinie beobachtete Verringerung der LPS-induzierten MMP-9-mRNA-Expression nach der Behandlung der Zellen mit dem PKA-Inhibitor H89 deutet auf eine Beteiligung von PKA an dieser Expression hin. Eine durch die PKA-Inhibition verringerte Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB kann möglicherweise in einer schwächeren Gentranskription CREB-regulierter Gene wie MMP-9 und MMP-13 resultieren (Wen *et al.* 2010, Shukla *et al.* 2009). Gemeinsam mit der in BV2-Zellen beobachteten

Verstärkung der LPS-induzierten MMP-9-Sezernierung durch Forskolin sprechen diese Daten für den postulierten Einfluss von cAMP und PKA auf die MMP-9-Expression.

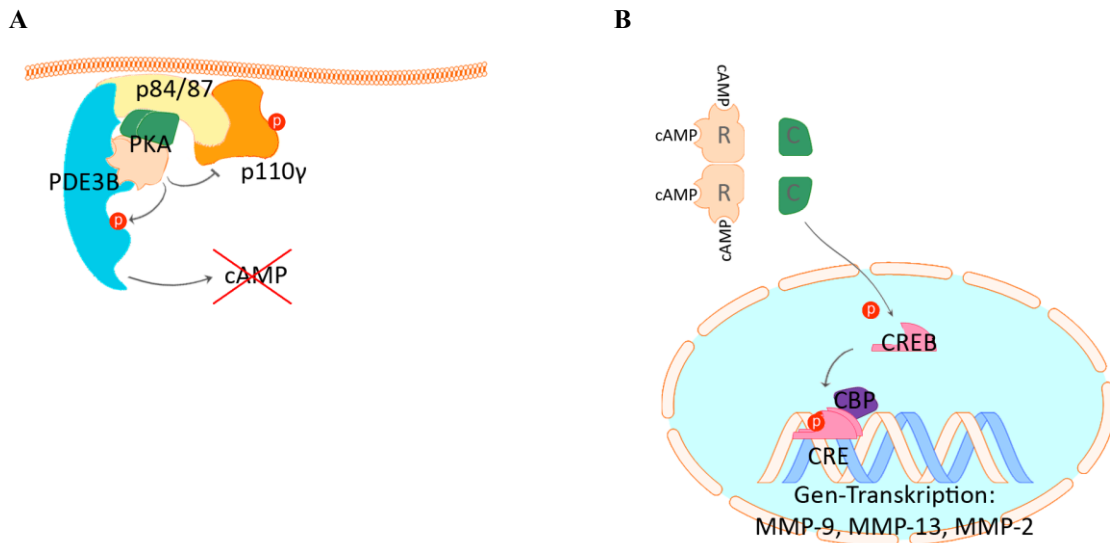


Abbildung 29: Modell des moderierenden Einflusses von PI3K γ auf die MMP-Expression

A: Die kinase-unabhängige Gerüstfunktion von PI3K γ (bestehend aus p110 γ und der regulatorischen Untereinheit p84/87) im Komplex mit PKA und PDE3B aktiviert die cAMP-degradierende Funktion der PDE und moderiert somit die cAMP-Konzentration (Perino *et al.* 2011, Abbildung nach Perino *et al.* 2010). B: Der Transkriptionsfaktor CREB kann unter anderem durch PKA aktiviert werden: Die Bindung von cAMP an PKA führt zur Freisetzung der C-Untereinheiten der PKA, welche CREB phosphorylieren können. Durch Interaktion mit dem CREB-bindenden Protein (CBP) oder p300 kann CREB an CRE-Sequenzen der DNA binden und die Gentranskription auslösen (Wen *et al.* 2010).

Passend zu der erhöhten mRNA-Expression wurde eine verstärkte Bildung von MMP-9 auch auf Protein-Ebene nachgewiesen. Der Nachweis zellgebundener MMP-9 mit Hilfe des Western Blot und der in den Kulturüberstand sezernierten MMP-9 durch die Zymographie zeigten eine verstärkte Expression in Mikroglia-Zellen des PI3K γ -KO-Stammes. Der MMP-2-/MMP-9-Aktivitäts-Assay konnte diesen Befund bestätigen. Zwar ist eine Unterscheidung zwischen der Aktivität von MMP-2 und MMP-9 mit diesem Assay nicht möglich, unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Zymographie kann die erhöhte Aktivität in den Kulturüberständen von PI3K γ -KO-Mikroglia aber MMP-9 zugeordnet werden, da die Sezernierung von MMP-2 in unstimulierten und LPS-stimulierten Zellen aller drei Mausstämme vergleichbar stark war. Analog wurde in Kulturen von BV2-Mikroglia, in denen die Expression von p110 γ mittels shRNA herunter reguliert wurde, eine erhöhte Sezernierung von MMP-9 in den Kulturüberstand festgestellt.

Der Nachweis intrazellulärer und sezernierter MMP-9 zeigte 24 h nach einer LPS-Stimulation eine signifikant erhöhte Expression durch Mikroglia des PI3K γ -KO-Stammes im Vergleich zum Wildtyp-Stamm. Analog zu MMP-9 wurde auch für die Kollagenase MMP-13 eine erhöhte zelluläre Protein-Expression in PI3K γ -KO-Mikroglia festgestellt. MMP-13 ließ sich jedoch mit den zur Verfügung stehenden Methoden nicht im Kulturüberstand nachweisen, die angewandte Zymographie-Methode war nur für die Detektion von Gelatinasen geeignet. Allerdings legen Befunde an Makrophagen nahe, dass MMP-13 ebenfalls in den Kulturüberstand sezerniert werden kann (Quillard *et al.* 2011).

Die Protein-Expression bzw. Sezernierung von MMP-2 war in den Mikroglia-Zellen der drei untersuchten Mausstämme ähnlich stark ausgeprägt. Sowohl intrazellulär, als auch in den entsprechenden Zellkulturüberständen des Wildtyp-, PI3K γ -KO- und PI3K γ -KD-Stammes wurde eine ähnlich hohe MMP-2-Expression festgestellt. In Anbetracht der erhöhten LPS-induzierten mRNA-Transkription von MMP-2 in PI3K γ -KO-Mikroglia ergaben sich somit Hinweise auf eine posttranskriptionale Regulierung der MMP-2-Expression in Mikroglia. Eine entsprechende Regulation der MMP-2-Expression wurde in Zellen des Nierenzellkarzinoms beschrieben. Während MMP-9 einer transkriptionalen Regulation unterliegt, wird die Expression von MMP-2 auf posttranskriptionaler Ebene kontrolliert (Cho *et al.* 2003).

4.5. Die Phosphodiesterase-Aktivität hat Einfluss auf die Expression von MMP durch Mikroglia

In Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass die Wechselwirkung von PI3K γ und Phosphodiesterasen, insbesondere PDE3B, zur Erniedrigung der cAMP-Konzentration führt (Perino *et al.* 2011). Dieser Zusammenhang konnte in unserer Arbeitsgruppe auch in Mikroglia nachgewiesen werden (Schmidt *et al.* 2013, Frister *et al.* 2014). Der moderierende Einfluss von PI3K γ auf die Bildung von MMP durch die Aktivierung von PDE3B konnte indirekt über die Auswirkung auf die LPS-induzierte mRNA-Expression von MMP-9 und MMP-13 gezeigt werden. PDE3B wird in einem Komplex mit PKA und PI3K γ aktiviert und degradiert cAMP in der Zelle. Fehlt p110 γ , erfolgt diese Form der Aktivierung von PDE3B nicht und die cAMP-Konzentration in der Zelle ist erhöht.

Analog führt die Inhibition von PDE3B zu einer erhöhten cAMP-Konzentration (Patrucco *et al.* 2004, Perino *et al.* 2011, Schmidt *et al.* 2013). Um zu zeigen, dass die PDE-Aktivität die MMP-Expression entscheidend beeinflusst, wurde in BV2-Zellen eine pharmakologische Inhibition von PDE bzw. eine Aktivierung der cAMP-Bildung vorgenommen. Durch die Inhibition von PDE3, sowohl durch den unspezifischen PDE-Inhibitor IBMX als auch durch den PDE3-spezifischen Inhibitor Cilostamid, kam es in den Kontroll-BV2-Zellen zu einer Steigerung der LPS-induzierte mRNA-Expression von MMP-9 und MMP-13. Dabei wurde infolge des Einsatzes der PDE-Inhibitoren in diesen BV2 ein vergleichbar hoher Wert erreicht, wie er in den p110 γ -shRNA exprimierenden BV2 auftrat. Eine Inhibition von PDE3B hatte demnach einen ähnlich starken Einfluss auf die MMP-Expression, wie der *Knockdown* der p110 γ -Expression. Ferner bewirkte auch eine durch Forskolin-Stimulation erhöhte cAMP-Bildung eine verstärkte LPS-induzierte mRNA-Expression von MMP-9 und MMP-13. Diese Befunde auf Ebene der mRNA-Transkription wurden für MMP-9 auf Ebene der Protein-Expression in BV2-Kulturen bestätigt. Die in Kontroll-Zellen durch LPS-Stimulation erhöhte MMP-9-Sezernierung wurde sowohl durch eine zusätzliche Forskolin-Stimulation als auch durch eine Inhibition von PDE3 durch IBMX oder Cilostamid weiter verstärkt. Die durch Forskolin, IBMX bzw. Cilostamid verstärkte MMP-9-Sezernierung durch Kontroll-BV2-Zellen in den Kulturüberstand war vergleichbar hoch wie die von p110 γ -shRNA exprimierenden BV2-Zellen, jeweils nach einer LPS-Behandlung. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die durch LPS induzierte MMP-9-Expression durch eine erhöhte cAMP-Konzentration weiter verstärkt wurde. Analoge Untersuchungen in primären Mikroglia-Zellen bestätigen diese in BV2-Zellen gewonnenen Befunde (Frister *et al.* 2014). Diese Ergebnisse weisen somit auf eine regulierende Funktion von PI3K γ auf die MMP-Expression in Mikroglia infolge einer LPS-Stimulation hin.

Zusammenfassend kann man anhand der *in-vitro*-Untersuchungen auf einen Zusammenhang zwischen der PDE3B-aktivierenden Funktion von PI3K γ , einer daraus resultierenden geringeren cAMP-Konzentration und einer verminderten MMP-Expression in Mikroglia schließen.

4.6. Zusammenfassung und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen weisen eine protektive Wirkung von PI3K γ auf die Integrität der BHS bei LPS-induzierter systemischer Entzündungsreaktion nach.

In vivo wurde die Auswirkung einer intraperitonealen Injektion von LPS auf die Permeabilität der BHS in C57BL6/J-Mäusen in Abhängigkeit der Expression bzw. der Kinaseaktivität von PI3K γ untersucht. These 1 dieser Arbeit besagte, dass PI3K γ die BHS-Permeabilität während LPS-induzierter neuroinflammatorischer Prozesse beeinflusst. Im Tiermodell wurde eine weiter fortschreitende Störung der BHS-Integrität in Mäusen des PI3K γ -defizienten KO-Stammes im Vergleich zu Tieren der Stämme C57BL6/J-Wildtyp und PI3K γ -KD festgestellt. Diese Daten weisen auf einen protektiven Einfluss der kinase-unabhängige *Scaffold*-Funktion von PI3K γ auf die Integrität der BHS während neuroinflammatorischer Prozesse hin.

In vitro wurde an zwei Mikroglia-Modellen der Einfluss von PI3K γ auf die Expression von MMP untersucht, zum einen an primären Zellen aus Tieren der drei Mausstämmen (C57BL6/J-Wildtyp, PI3K γ -KO und PI3K γ -KD), zum anderen an der Mikroglia-Zelllinie BV2. Entsprechend der These 2 dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kinase-unabhängige *Scaffold*-Funktion von PI3K γ durch ihre moderierende Wirkung auf die cAMP-Konzentration in Mikroglia eine regulierende Wirkung auf die Gen-Expression verschiedener MMP ausübt. Insbesondere eine verstärkte Bildung und Sezernierung von MMP-9 durch PI3K γ -defiziente Mikroglia wurde nachgewiesen. Diese erhöhte Expression von MMP-9 trat parallel zu einer erhöhten cAMP-Konzentration in den Zellen auf. Der Einsatz von PDE-Inhibitoren oder die Aktivierung der cAMP-Bildung bewirkten analog eine Erhöhung der MMP-9-Expression, wohingegen die Inhibition von PKA eine verringerte mRNA-Transkription zur Folge hatte. Diese Daten stimmen mit der These 3 dieser Arbeit überein, wonach die MMP-Expression in Mikroglia durch den cAMP-PKA-Signalweg beeinflusst wird. Abbildung 30 zeigt schematisch einen möglichen Wirkmechanismus der cAMP-moderierenden Funktion von PI3K γ auf die MMP-9-Expression. Eine verstärkte Aktivierung von CREB infolge des Verlustes der kinase-unabhängigen Funktion von PI3K γ wurde gezeigt. In welchem Umfang die CREB-Phosphorylierung durch PKA erfolgte und inwieweit andere inflammatorische Signalwege, wie beispielsweise MAP-

Kinasen, in diese Aktivierung involviert waren, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht genauer untersucht werden. Eine Möglichkeit die Auswirkungen der CREB-Aktivierung auf die PI3K γ -abhängige MMP-Expression detaillierter zu untersuchen, könnte gegebenenfalls eine Inaktivierung des CREB-Signalweges in Mikroglia der verwendeten drei Mausstämme bieten (Shukla *et al.* 2009, Wen *et al.* 2010).

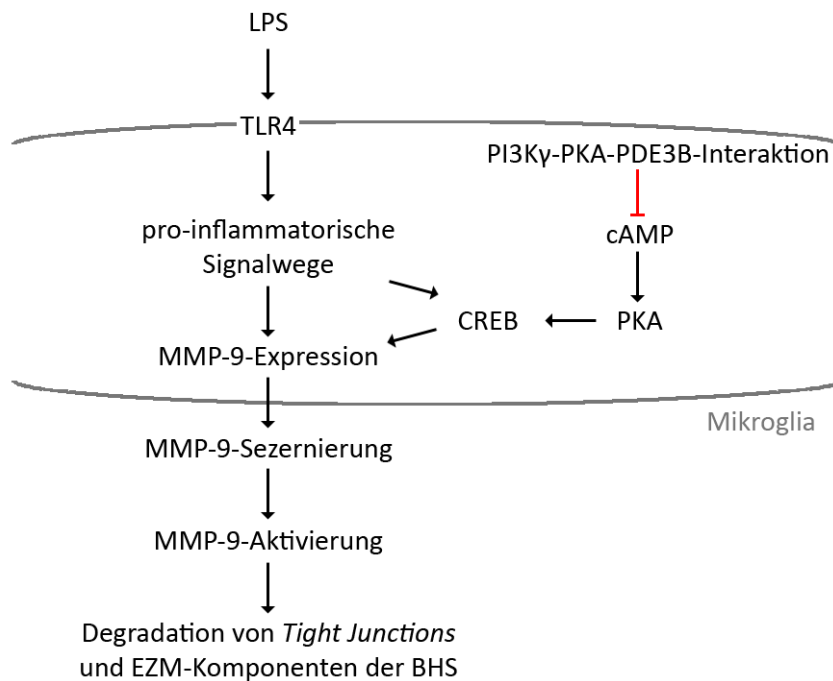


Abbildung 30: Möglicher Wirkmechanismus der kinase-unabhängigen Funktion von PI3K γ zur Reduzierung der MMP-9-Expression in Mikroglia.

Die Interaktion von PI3K γ , PKA und PDE3B führt zu einer Verringerung der cAMP-Konzentration (Perino *et al.* 2011). Eine geringere Aktivierung des PKA-CREB-Signalweges resultiert in einer geringeren CREB-abhängigen Expression von MMP-9 und somit einer geringeren Degradation von *Tight Junctions* und EZM der BHS (Shukla *et al.* 2009, Wen *et al.* 2010, Dal-Pizzol *et al.* 2013).

Die *in-vivo*-Untersuchung der BHS-Integrität zeigte eine erhöhte Extravasation von Evans Blue in PBS-behandelten Tieren des PI3K γ -KO-Stammes gegenüber dem Wildtyp. In Verbindung mit der *in vitro* in PI3K γ -defizienten Mikroglia detektierten höheren basalen cAMP-Konzentration, CREB-Phosphorylierung und MMP-9-Sezernierung ergeben sich aus diesen Daten Hinweise auf einen Einfluss von PI3K γ auf die BHS-Integrität unter physiologischen Bedingungen.

Die protektive Wirkung von PI3K γ im untersuchten Modell der SE steht in Kontrast zu positiven Auswirkungen der PI3K γ -Inhibition bzw. des PI3K γ -*Knockout* in

Untersuchungsmodellen zu anderen neuroinflammatorischen Krankheitsbildern wie der Alzheimer-Krankheit oder der postischämischen Reperfusion (Passos *et al.* 2010, Jin *et al.* 2011). Dies verdeutlicht die ambivalenten Auswirkungen eines Verlusts der Funktionen von PI3K γ , welche für verschiedenste inflammatorische Reaktionen wie beispielsweise die ROS-Bildung oder die Chemotaxis von Bedeutung sind (Costa *et al.* 2011). Der Verlust der Lipidkinase-Funktion von PI3K γ , der sich auf die Migrationsfähigkeit von Immunzellen auswirkt, führte beispielsweise in Modellen zur Autoimmun-Enzephalomyelitis, zur rheumatoiden Arthritis oder im Schlaganfall-Modell der transienten MCAO (*middle cerebral artery occlusion*) zu einer Abmilderung des Krankheitsverlaufes (Berod *et al.* 2011, Camps *et al.* 2005, Jin *et al.* 2011). Die Auswirkungen einer Inhibition von PI3K γ bzw. einer genetischen Inaktivierung im Tiermodell sind abhängig von den am jeweiligen Krankheitsgeschehen beteiligten Zellsystemen und den entsprechend relevanten Wirkmechanismen von PI3K γ . Ein Einsatz von pharmakologischen PI3K γ -Inhibitoren kann dementsprechend sowohl positive als auch negative Auswirkungen haben und erfordert eine differenzierte Betrachtung jedes Modells und Krankheitsbildes, insbesondere in Bezug auf die spezifischen Funktionen von PI3K γ . Eine pharmakologische Inhibition von PI3K γ bei der Behandlung bestimmter Erkrankungen, wie systemischem *Lupus erythematoses*, rheumatoider Arthritis oder Arteriosklerose wurde nach aussichtsreichen *in-vivo*-Untersuchungen an entsprechenden Maus-Modellen vorgeschlagen (Rückle *et al.* 2006, Ghigo *et al.* 2010). Hingegen deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine moderierende Funktion von PI3K γ während der Pathogenese der SE hin und können insofern als Hinweis gegen eine mögliche Anwendung einer pharmakologischen PI3K γ -Inhibition zur Prävention oder Behandlung einer Enzephalopathie bei systemischen Entzündungsreaktionen gewertet werden.

Zusammenfassend zeigen die Resultate dieser Arbeit einen moderierenden Einfluss der kinase-unabhängigen *Scaffold*-Funktion von PI3K γ auf die LPS-induzierte Expression von MMP durch Mikroglia und auf die Entwicklung einer BHS-Schädigung während einer LPS-induzierten systemischen Entzündungsreaktion. Somit zeichnet sich eine protektive Wirkung von PI3K γ in der neurovaskulären Einheit während der Pathogenese der SE ab. Die aktuellen Untersuchungen bestätigen und erweitern zuvor veröffentlichte Daten zu regulatorischen Effekten von PI3K γ auf cAMP-abhängige Funktionen in Zellen des angeborenen Immunsystems.

Literaturverzeichnis

- Abbott NJ (2000). Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cellular and molecular neurobiology*. 20, 131-147.
- Adam N, Kandelman S, Mantz J, Chretien F, Sharshar T (2013). Sepsis-induced brain dysfunction. *Expert review of anti-infective therapy*. 11, 211-221.
- Adib-Conquy M, Cavaillon JM (2009). Compensatory anti-inflammatory response syndrome. *Thrombosis and haemostasis*. 101, 36-47.
- Aimes RT, Quigley JP (1995). Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem*. 270, 5872-5876.
- Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol*. 7, 261-269.
- Alexander JJ, Jacob A, Cunningham P, Hensley L, Quigg RJ (2008). TNF is a key mediator of septic encephalopathy acting through its receptor, TNF receptor-1. *Neurochem Int*. 52, 447-456.
- Alper O, Bergmann-Leitner ES, Abrams S, Cho-Chung YS (2001). Apoptosis, growth arrest and suppression of invasiveness by CRE-decoy oligonucleotide in ovarian cancer cells: protein kinase A downregulation and cytoplasmic export of CRE-binding proteins. *Molecular and cellular biochemistry*. 218, 55-63.
- Amiry-Moghaddam M, Xue R, Haug FM, Neely JD, Bhardwaj A, Agre P, Adams ME, Froehner SC, Mori S, Ottersen OP (2004). Alpha-syntrophin deletion removes the perivascular but not endothelial pool of aquaporin-4 at the blood-brain barrier and delays the development of brain edema in an experimental model of acute hyponatremia. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 18, 542-544.
- Andreasen AS, Krabbe KS, Krogh-Madsen R, Taudorf S, Pedersen BK, Moller K (2008). Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Current medicinal chemistry*. 15, 1697-1705.
- Angus DC, van der Poll T (2013). Severe sepsis and septic shock. *The New England journal of medicine*. 369, 840-851.
- Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C (2005). Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res*. 97, 512-523.
- Armulik A, Genove G, Betsholtz C (2011). Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental cell*. 21, 193-215.
- Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH (2001). Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci*. 21, 7724-7732.
- Aumüller G (2007). *Anatomie: 208 Tabellen; [mit CD-ROM zum Präp-Kurs]*. Stuttgart: Thieme.
- Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K (1996). Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical

- resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol.* 134, 1031-1049.
- Balk RA (2014). Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? *Virulence.* 5, 20-26.
- Banks WA (2005). Blood-brain barrier transport of cytokines: a mechanism for neuropathology. *Current pharmaceutical design.* 11, 973-984.
- Banks WA, Erickson MA (2010). The blood-brain barrier and immune function and dysfunction. *Neurobiol Dis.* 37, 26-32.
- Banks WA, Robinson SM (2010). Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. *Brain, behavior, and immunity.* 24, 102-109.
- Barcia C, Sr., Mitxitorena I, Carrillo-de Sauvage MA, Gallego JM, Perez-Valles A, Barcia C, Jr. (2013). Imaging the microanatomy of astrocyte-T-cell interactions in immune-mediated inflammation. *Frontiers in cellular neuroscience.* 7, 58.
- Bauer M, Brunkhorst F, Welte T, Gerlach H, Reinhart K (2006). [Sepsis. Update on pathophysiology, diagnostics and therapy]. *Anaesthesist.* 55, 835-845.
- Berg RM, Moller K, Bailey DM (2011). Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab.*
- Berod L, Heinemann C, Heink S, Escher A, Stadelmann C, Drube S, Wetzker R, Norgauer J, Kamradt T (2011). PI3Kgamma deficiency delays the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis and ameliorates its clinical outcome. *European journal of immunology.* 41, 833-844.
- Bhatia M, He M, Zhang H, Moochhala S (2009). Sepsis as a model of SIRS. *Frontiers in bioscience.* 14, 4703-4711.
- Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Nussbaum RL (2002). Early embryonic lethality in mice deficient in the p110beta catalytic subunit of PI 3-kinase. *Mammalian genome: official journal of the International Mammalian Genome Society.* 13, 169-172.
- Bi L, Okabe I, Bernard DJ, Wynshaw-Boris A, Nussbaum RL (1999). Proliferative defect and embryonic lethality in mice homozygous for a deletion in the p110alpha subunit of phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 274, 10963-10968.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, Engler JA (1993). Matrix metalloproteinases: a review. *Critical reviews in oral biology and medicine: an official publication of the American Association of Oral Biologists.* 4, 197-250.
- Biswas SK, Lopez-Collazo E (2009). Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 30, 475-487.
- Bogdanski R, Blobner M, Hanel F, Kochs E (1999). [Septic encephalopathy]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 34, 123-130.
- Bondeva T, Pirola L, Bulgarelli-Leva G, Rubio I, Wetzker R, Wymann MP (1998). Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. *Science.* 282, 293-296.
- 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, 1644-1655.
- Brew K, Dinakarandian D, Nagase H (2000). Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 1477, 267-283.

- Bui C, Barter MJ, Scott JL, Xu Y, Galler M, Reynard LN, Rowan AD, Young DA (2012). cAMP response element-binding (CREB) recruitment following a specific CpG demethylation leads to the elevated expression of the matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes and osteoarthritis. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 26, 3000-3011.
- Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M (2005). Animal models of sepsis: setting the stage. *Nature reviews. Drug discovery*. 4, 854-865.
- Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA (2012). Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One*. 7, e35538.
- Caivano M, Cohen P (2000). Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 beta in RAW264 macrophages. *J Immunol*. 164, 3018-3025.
- Camps M, Rückle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, Ferrandi C, Chabert C, Gillieron C, Francon B, Martin T, Gretener D, Perrin D, Leroy D, Vitte PA, Hirsch E, Wymann MP, Cirillo R, Schwarz MK, Rommel C (2005). Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nature medicine*. 11, 936-943.
- Candelario-Jalil E, Yang Y, Rosenberg GA (2009). Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience*. 158, 983-994.
- Carpenter CL, Auger KR, Duckworth BC, Hou WM, Schaffhausen B, Cantley LC (1993). A tightly associated serine/threonine protein kinase regulates phosphoinositide 3-kinase activity. *Mol Cell Biol*. 13, 1657-1665.
- Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D (2003). Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis*. 35, 535-544.
- Cavaillon JM, Annane D (2006). Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res*. 12, 151-170.
- Chaturvedi M, Kaczmarek L (2014). Mmp-9 inhibition: a therapeutic strategy in ischemic stroke. *Molecular neurobiology*. 49, 563-573.
- Chavan SS, Huerta PT, Robbiati S, Valdes-Ferrer SI, Ochani M, Dancho M, Frankfurt M, Volpe BT, Tracey KJ, Diamond B (2012). HMGB1 mediates cognitive impairment in sepsis survivors. *Molecular medicine*. 18, 930-937.
- Chen Z, Jalabi W, Shpargel KB, Farabaugh KT, Dutta R, Yin X, Kidd GJ, Bergmann CC, Stohlgan SA, Trapp BD (2012). Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4. *J Neurosci*. 32, 11706-11715.
- Cho NH, Shim HS, Rha SY, Kang SH, Hong SH, Choi YD, Hong SJ, Cho SH (2003). Increased expression of matrix metalloproteinase 9 correlates with poor prognostic variables in renal cell carcinoma. *European urology*. 44, 560-566.
- Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J (2011). Blood-brain barrier pathophysiology in traumatic brain injury. *Translational stroke research*. 2, 492-516.
- Cinel I, Opal SM (2009). Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med*. 37, 291-304.
- Ciraolo E, Iezzi M, Marone R, Marengo S, Curcio C, Costa C, Azzolino O, Gonella C, Rubinetto C, Wu H, Dastru W, Martin EL, Silengo L, Altruda F, Turco E, Lanzetti L, Musiani P, Rückle T, Rommel C, Backer JM, Forni G, Wymann MP, Hirsch E (2008). Phosphoinositide 3-kinase p110beta activity: key role in

- metabolism and mammary gland cancer but not development. *Science signaling*. 1, ra3.
- Comim CM, Vilela MC, Constantino LS, Petronilho F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, da Rocha JL, Teixeira AL, Quevedo J, Dal-Pizzol F (2011). Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med*. 37, 711-718.
- Costa C, Martin-Conte EL, Hirsch E (2011). Phosphoinositide 3-kinase p110gamma in immunity. *IUBMB life*. 63, 707-713.
- Dal-Pizzol F, Rojas HA, Dos Santos EM, Vuolo F, Constantino L, Feier G, Pasquali M, Comim CM, Petronilho F, Gelain DP, Quevedo J, Moreira JC, Ritter C (2013). Matrix Metalloproteinase-2 and Metalloproteinase-9 Activities are Associated with Blood-Brain Barrier Dysfunction in an Animal Model of Severe Sepsis. *Molecular neurobiology*.
- Daneman R (2012). The blood-brain barrier in health and disease. *Annals of neurology*. 72, 648-672.
- Dantzer R, Konsman JP, Bluth RM, Kelley KW (2000). Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Autonomic neuroscience: basic & clinical*. 85, 60-65.
- de Jong HK, van der Poll T, Wiersinga WJ (2010). The systemic pro-inflammatory response in sepsis. *Journal of innate immunity*. 2, 422-430.
- Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C (2011). Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends in microbiology*. 19, 198-208.
- Del Prete A, Vermi W, Dander E, Otero K, Barberis L, Luini W, Bernasconi S, Sironi M, Santoro A, Garlanda C, Facchetti F, Wymann MP, Vecchi A, Hirsch E, Mantovani A, Sozzani S (2004). Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO J*. 23, 3505-3515.
- del Zoppo GJ, Frankowski H, Gu YH, Osada T, Kanazawa M, Milner R, Wang X, Hosomi N, Mabuchi T, Koziol JA (2012). Microglial cell activation is a source of metalloproteinase generation during hemorrhagic transformation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 32, 919-932.
- Dew G, Murphy G, Stanton H, Vallon R, Angel P, Reynolds JJ, Hembry RM (2000). Localisation of matrix metalloproteinases and TIMP-2 in resorbing mouse bone. *Cell and tissue research*. 299, 385-394.
- Dhand R, Hiles I, Panayotou G, Roche S, Fry MJ, Gout I, Totty NF, Truong O, Vicendo P, Yonezawa K, et al. (1994). PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. *EMBO J*. 13, 522-533.
- Du K, Montminy M (1998). CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem*. 273, 32377-32379.
- Dyson A, Singer M (2009). Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med*. 37, S30-37.
- Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D (2007). Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med*. 33, 941-950.
- Eggers V, Schilling A, Kox WJ, Spies C (2003). [Septic encephalopathy. Diagnosis und therapy]. *Anaesthesist*. 52, 294-303.
- Eidelman LA, Putterman D, Putterman C, Sprung CL (1996). The spectrum of septic encephalopathy. Definitions, etiologies, and mortalities. *JAMA*. 275, 470-473.

- Engelhardt B (2008). The blood-central nervous system barriers actively control immune cell entry into the central nervous system. *Current pharmaceutical design*. 14, 1555-1565.
- Engelhardt B, Sorokin L (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in immunopathology*. 31, 497-511.
- Ferguson GJ, Milne L, Kulkarni S, Sasaki T, Walker S, Andrews S, Crabbe T, Finan P, Jones G, Jackson S, Camps M, Rommel C, Wymann M, Hirsch E, Hawkins P, Stephens L (2007). PI(3)Kgamma has an important context-dependent role in neutrophil chemokinesis. *Nature cell biology*. 9, 86-91.
- Ferrandi C, Ardisson V, Ferro P, Rückle T, Zaratin P, Ammannati E, Hauben E, Rommel C, Cirillo R (2007). Phosphoinositide 3-kinase gamma inhibition plays a crucial role in early steps of inflammation by blocking neutrophil recruitment. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 322, 923-930.
- Fiala M, Looney DJ, Stins M, Way DD, Zhang L, Gan X, Chiappelli F, Schweitzer ES, Shapshak P, Weinand M, Graves MC, Witte M, Kim KS (1997). TNF-alpha opens a paracellular route for HIV-1 invasion across the blood-brain barrier. *Molecular medicine*. 3, 553-564.
- Fink MP (2014). Animal models of sepsis. *Virulence*. 5, 143-153.
- Flierl MA, Stahel PF, Rittirsch D, Huber-Lang M, Niederbichler AD, Hoesel LM, Touban BM, Morgan SJ, Smith WR, Ward PA, Ipaktchi K (2009). Inhibition of complement C5a prevents breakdown of the blood-brain barrier and pituitary dysfunction in experimental sepsis. *Crit Care*. 13, R12.
- Fosang AJ, Last K, Knauper V, Murphy G, Neame PJ (1996). Degradation of cartilage aggrecan by collagenase-3 (MMP-13). *FEBS Lett*. 380, 17-20.
- Freise H, Bruckner UB, Spiegel HU (2001). Animal models of sepsis. *Journal of investigative surgery: the official journal of the Academy of Surgical Research*. 14, 195-212.
- Freund HR, Muggia-Sullam M, Peiser J, Melamed E (1985). Brain neurotransmitter profile is deranged during sepsis and septic encephalopathy in the rat. *J Surg Res*. 38, 267-271.
- Frister A, Schmidt C, Schneble N, Brodhun M, Gonnert FA, Bauer M, Hirsch E, Müller JP, Wetzker R, Bauer R (2014). Phosphoinositide 3-Kinase gamma Affects LPS-Induced Disturbance of Blood-Brain Barrier Via Lipid Kinase-Independent Control of cAMP in Microglial Cells. *Neuromolecular medicine*. 16, 704-713.
- Fruman DA, Bismuth G (2009). Fine tuning the immune response with PI3K. *Immunological reviews*. 228, 253-272.
- Galanos C, Freudenberg MA (1993). Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity. *Immunobiology*. 187, 346-356.
- Ghigo A, Damilano F, Braccini L, Hirsch E (2010). PI3K inhibition in inflammation: Toward tailored therapies for specific diseases. *Bioessays*. 32, 185-196.
- Ghigo A, Perino A, Mehel H, Zahradnikova A, Jr., Morello F, Leroy J, Nikolaev VO, Damilano F, Cimino J, De Luca E, Richter W, Westenbroek R, Catterall WA, Zhang J, Yan C, Conti M, Gomez AM, Vandecasteele G, Hirsch E, Fischmeister R (2012). Phosphoinositide 3-kinase gamma protects against catecholamine-induced ventricular arrhythmia through protein kinase A-mediated regulation of distinct phosphodiesterases. *Circulation*. 126, 2073-2083.
- Go YM, Park H, Maland MC, Darley-USmar VM, Stoyanov B, Wetzker R, Jo H (1998). Phosphatidylinositol 3-kinase gamma mediates shear stress-dependent activation of JNK in endothelial cells. *Am J Physiol*. 275, H1898-1904.

- Gomis-Ruth FX (2009). Catalytic domain architecture of metzincin metalloproteases. *J Biol Chem.* 284, 15353-15357.
- Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Losche W, Claus RA, Bauer M (2011). Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res.* 170, e123-134.
- Granger JI, Ratti PL, Datta SC, Raymond RM, Opp MR (2012). Sepsis-induced morbidity in mice: Effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. *Psychoneuroendocrinology.*
- Green R, Scott LK, Minagar A, Conrad S (2004). Sepsis associated encephalopathy (SAE): a review. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library.* 9, 1637-1641.
- Greten H, Andrassy K (2005). *Innere Medizin: verstehen - lernen - anwenden; 360 Tabellen/Übersichten.* Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA (2002). S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 297, 1186-1190.
- Gucek A, Vardjan N, Zorec R (2012). Exocytosis in astrocytes: transmitter release and membrane signal regulation. *Neurochem Res.* 37, 2351-2363.
- Guillermet-Guibert J, Bjorklof K, Salpekar A, Gonella C, Ramadani F, Bilancio A, Meek S, Smith AJ, Okkenhaug K, Vanhaesebroeck B (2008). The p110beta isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 8292-8297.
- Guo D, Kassiri Z, Basu R, Chow FL, Kandalam V, Damilano F, Liang W, Izumo S, Hirsch E, Penninger JM, Backx PH, Oudit GY (2010). Loss of PI3Kgamma enhances cAMP-dependent MMP remodeling of the myocardial N-cadherin adhesion complexes and extracellular matrix in response to early biomechanical stress. *Circ Res.* 107, 1275-1289.
- Gurney KJ, Estrada EY, Rosenberg GA (2006). Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol Dis.* 23, 87-96.
- Hahn-Dantona E, Ramos-DeSimone N, Siple J, Nagase H, French DL, Quigley JP (1999). Activation of proMMP-9 by a plasmin/MMP-3 cascade in a tumor cell model. Regulation by tissue inhibitors of metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci.* 878, 372-387.
- Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, Sorokin LM (2005). Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiological reviews.* 85, 979-1000.
- Handa O, Stephen J, Cepinskas G (2008). Role of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in activation and dysfunction of cerebrovascular endothelial cells during early onsets of sepsis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 295, H1712-1719.
- Hannigan M, Zhan L, Li Z, Ai Y, Wu D, Huang CK (2002). Neutrophils lacking phosphoinositide 3-kinase gamma show loss of directionality during N-formyl-Met-Leu-Phe-induced chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 3603-3608.
- Hasan S, Nakajima M (1999). Retinoic acid synergizes with cyclic AMP to enhance MMP-2 basal promoter activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 258, 663-667.

- Hawkins BT, Davis TP (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacological reviews*. 57, 173-185.
- Hawkins PT, Anderson KE, Davidson K, Stephens LR (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans*. 34, 647-662.
- Hellwig S, Heinrich A, Biber K (2013). The brain's best friend: microglial neurotoxicity revisited. *Frontiers in cellular neuroscience*. 7, 71.
- Hines DJ, Choi HB, Hines RM, Phillips AG, MacVicar BA (2013). Prevention of LPS-induced microglia activation, cytokine production and sickness behavior with TLR4 receptor interfering peptides. *PLoS One*. 8, e60388.
- Hirsch E, Braccini L, Ciruolo E, Morello F, Perino A (2009). Twice upon a time: PI3K's secret double life exposed. *Trends Biochem Sci*. 34, 244-248.
- Hirsch E, Costa C, Ciruolo E (2007). Phosphoinositide 3-kinases as a common platform for multi-hormone signaling. *The Journal of endocrinology*. 194, 243-256.
- Hirsch E, Katanaev VL, Garlanda C, Azzolino O, Pirola L, Silengo L, Sozzani S, Mantovani A, Altruda F, Wymann MP (2000). Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma in inflammation. *Science*. 287, 1049-1053.
- Hofer S, Bopp C, Hoerner C, Plaschke K, Faden RM, Martin E, Bardenheuer HJ, Weigand MA (2008). Injury of the blood brain barrier and up-regulation of icam-1 in polymicrobial sepsis. *J Surg Res*. 146, 276-281.
- Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K (1990). Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem*. 265, 11077-11082.
- Illario M, Giardino-Torchia ML, Sankar U, Ribar TJ, Galgani M, Vitiello L, Masci AM, Bertani FR, Ciaglia E, Astone D, Maulucci G, Cavallo A, Vitale M, Cimini V, Pastore L, Means AR, Rossi G, Racioppi L (2008). Calmodulin-dependent kinase IV links Toll-like receptor 4 signaling with survival pathway of activated dendritic cells. *Blood*. 111, 723-731.
- Imamura Y, Wang H, Matsumoto N, Muroya T, Shimazaki J, Ogura H, Shimazu T (2011). Interleukin-1beta causes long-term potentiation deficiency in a mouse model of septic encephalopathy. *Neuroscience*. 187, 63-69.
- Iwashyna TJ, Ely EW, Smith DM, Langa KM (2010). Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*. 304, 1787-1794.
- Jacob A, Brorson JR, Alexander JJ (2011). Septic encephalopathy: inflammation in man and mouse. *Neurochem Int*. 58, 472-476.
- Jacob A, Hensley LK, Safratowich BD, Quigg RJ, Alexander JJ (2007). The role of the complement cascade in endotoxin-induced septic encephalopathy. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 87, 1186-1194.
- Jia S, Liu Z, Zhang S, Liu P, Zhang L, Lee SH, Zhang J, Signoretti S, Loda M, Roberts TM, Zhao JJ (2008). Essential roles of PI(3)K-p110beta in cell growth, metabolism and tumorigenesis. *Nature*. 454, 776-779.
- Jin R, Song Z, Yu S, Piazza A, Nanda A, Penninger JM, Granger DN, Li G (2011). Phosphatidylinositol-3-kinase gamma plays a central role in blood-brain barrier dysfunction in acute experimental stroke. *Stroke; a journal of cerebral circulation*. 42, 2033-2044.
- Jin R, Yang G, Li G (2010a). Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiol Dis*. 38, 376-385.

- Jin R, Yu S, Song Z, Quillin JW, Deasis DP, Penninger JM, Nanda A, Granger DN, Li G (2010b). Phosphoinositide 3-kinase-gamma expression is upregulated in brain microglia and contributes to ischemia-induced microglial activation in acute experimental stroke. *Biochem Biophys Res Commun.* 399, 458-464.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A (2011). Physiology of microglia. *Physiological reviews.* 91, 461-553.
- Kierdorf K, Erny D, Goldmann T, Sander V, Schulz C, Perdiguero EG, Wieghofer P, Heinrich A, Riemke P, Holscher C, Müller DN, Luckow B, Brocker T, Debowski K, Fritz G, Opdenakker G, Diefenbach A, Biber K, Heikenwalder M, Geissmann F, Rosenbauer F, Prinz M (2013). Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature neuroscience.* 16, 273-280.
- Kim HJ, Kim SR, Park JK, Kim DI, Jeong JS, Lee YC (2012). PI3Kgamma activation is required for LPS-induced reactive oxygen species generation in respiratory epithelial cells. *Inflamm Res.* 61, 1265-1272.
- Knauper V, Cowell S, Smith B, Lopez-Otin C, O'Shea M, Morris H, Zardi L, Murphy G (1997). The role of the C-terminal domain of human collagenase-3 (MMP-13) in the activation of procollagenase-3, substrate specificity, and tissue inhibitor of metalloproteinase interaction. *J Biol Chem.* 272, 7608-7616.
- König C, Gavrilova-Ruch O, von Banchet GS, Bauer R, Grün M, Hirsch E, Rubio I, Schulz S, Heinemann SH, Schaible HG, Wetzker R (2010). Modulation of mu opioid receptor desensitization in peripheral sensory neurons by phosphoinositide 3-kinase gamma. *Neuroscience.* 169, 449-454.
- Konsman JP, Kelley K, Dantzer R (1999). Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. *Neuroscience.* 89, 535-548.
- Krabbe KS, Bruunsgaard H, Hansen CM, Moller K, Fonsmark L, Qvist J, Madsen PL, Kronborg G, Andersen HO, Skinhoj P, Pedersen BK (2001). Ageing is associated with a prolonged fever response in human endotoxemia. *Clinical and diagnostic laboratory immunology.* 8, 333-338.
- Kubitz R, Wettstein M, Warskulat U, Haussinger D (1999). Regulation of the multidrug resistance protein 2 in the rat liver by lipopolysaccharide and dexamethasone. *Gastroenterology.* 116, 401-410.
- Laffargue M, Calvez R, Finan P, Trifilieff A, Barbier M, Altruda F, Hirsch E, Wymann MP (2002). Phosphoinositide 3-kinase gamma is an essential amplifier of mast cell function. *Immunity.* 16, 441-451.
- Lai WC, Zhou M, Shankavaram U, Peng G, Wahl LM (2003). Differential regulation of lipopolysaccharide-induced monocyte matrix metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-9 by p38 and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen-activated protein kinases. *J Immunol.* 170, 6244-6249.
- Le Blanc C, Mironneau C, Barbot C, Henaff M, Bondeva T, Wetzker R, Macrez N (2004). Regulation of vascular L-type Ca²⁺ channels by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *Circ Res.* 95, 300-307.
- Lee DK, Park EJ, Kim EK, Jin J, Kim JS, Shin IJ, Kim BY, Lee H, Kim DE (2012). Atorvastatin and simvastatin, but not pravastatin, up-regulate LPS-induced MMP-9 expression in macrophages by regulating phosphorylation of ERK and CREB. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology.* 30, 499-511.

- Lehmann K, Müller JP, Schlott B, Skroblin P, Barz D, Norgauer J, Wetzker R (2009). PI3Kgamma controls oxidative bursts in neutrophils via interactions with PKCalpha and p47phox. *The Biochemical journal*. 419, 603-610.
- Lehnardt S (2010). Innate immunity and neuroinflammation in the CNS: the role of microglia in Toll-like receptor-mediated neuronal injury. *Glia*. 58, 253-263.
- Lehner C, Gehwolf R, Tempfer H, Krizbai I, Hennig B, Bauer HC, Bauer H (2011). Oxidative stress and blood-brain barrier dysfunction under particular consideration of matrix metalloproteinases. *Antioxidants & redox signaling*. 15, 1305-1323.
- Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G, Scm/Esicm/Accp/Ats/Sis (2003). 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med*. 31, 1250-1256.
- Li JJ, Wang W, Baines KJ, Bowden NA, Hansbro PM, Gibson PG, Kumar RK, Foster PS, Yang M (2010). IL-27/IFN-gamma induce MyD88-dependent steroid-resistant airway hyperresponsiveness by inhibiting glucocorticoid signaling in macrophages. *J Immunol*. 185, 4401-4409.
- Li Z, Jiang H, Xie W, Zhang Z, Smrcka AV, Wu D (2000). Roles of PLC-beta2 and -beta3 and PI3Kgamma in chemoattractant-mediated signal transduction. *Science*. 287, 1046-1049.
- Lian L, Wang Y, Draznin J, Eslin D, Bennett JS, Poncz M, Wu D, Abrams CS (2005). The relative role of PLCbeta and PI3Kgamma in platelet activation. *Blood*. 106, 110-117.
- Lin CC, Kuo CT, Cheng CY, Wu CY, Lee CW, Hsieh HL, Lee IT, Yang CM (2009). IL-1 beta promotes A549 cell migration via MAPKs/AP-1- and NF-kappaB-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Cell Signal*. 21, 1652-1662.
- Lin CC, Tseng HW, Hsieh HL, Lee CW, Wu CY, Cheng CY, Yang CM (2008). Tumor necrosis factor-alpha induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB in A549 cells. *Toxicology and applied pharmacology*. 229, 386-398.
- Löffler G (2005). *Basiswissen Biochemie: mit Pathobiochemie; mit 125 Tabellen; [Bonusmaterial im Web]*. Heidelberg: Springer Medizin.
- Martins VL, Caley M, O'Toole EA (2013). Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell and tissue research*. 351, 255-268.
- Masure S, Nys G, Fiten P, Van Damme J, Opdenakker G (1993). Mouse gelatinase B. cDNA cloning, regulation of expression and glycosylation in WEHI-3 macrophages and gene organisation. *European journal of biochemistry / FEBS*. 218, 129-141.
- Mayhan WG (1998). Effect of lipopolysaccharide on the permeability and reactivity of the cerebral microcirculation: role of inducible nitric oxide synthase. *Brain research*. 792, 353-357.
- Mehta A, Brewington R, Chatterji M, Zoubine M, Kinasewitz GT, Peer GT, Chang AC, Taylor FB, Jr., Shnyra A (2004). Infection-induced modulation of m1 and m2 phenotypes in circulating monocytes: role in immune monitoring and early prognosis of sepsis. *Shock*. 22, 423-430.
- Meli DN, Christen S, Leib SL (2003). Matrix metalloproteinase-9 in pneumococcal meningitis: activation via an oxidative pathway. *The Journal of infectious diseases*. 187, 1411-1415.

- Melnikova VO, Mourad-Zeidan AA, Lev DC, Bar-Eli M (2006). Platelet-activating factor mediates MMP-2 expression and activation via phosphorylation of cAMP-response element-binding protein and contributes to melanoma metastasis. *J Biol Chem.* 281, 2911-2922.
- Monk PN, Shaw PJ (2006). ALS: life and death in a bad neighborhood. *Nature medicine.* 12, 885-887.
- Morello F, Perino A, Hirsch E (2009). Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system. *Cardiovascular research.* 82, 261-271.
- Mun-Bryce S, Rosenberg GA (1998). Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18, 1163-1172.
- Nag S, Kapadia A, Stewart DJ (2011). Review: molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury. *Neuropathology and applied neurobiology.* 37, 3-23.
- Nag S, Manias JL, Stewart DJ (2009). Pathology and new players in the pathogenesis of brain edema. *Acta neuropathologica.* 118, 197-217.
- Naga Prasad SV, Jayatilleke A, Madamanchi A, Rockman HA (2005). Protein kinase activity of phosphoinositide 3-kinase regulates beta-adrenergic receptor endocytosis. *Nature cell biology.* 7, 785-796.
- Nagyoszi P, Wilhelm I, Farkas AE, Fazakas C, Dung NT, Hasko J, Krizbai IA (2010). Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells. *Neurochem Int.* 57, 556-564.
- Niyibizi C, Chan R, Wu JJ, Eyre D (1994). A 92 kDa gelatinase (MMP-9) cleavage site in native type V collagen. *Biochem Biophys Res Commun.* 202, 328-333.
- Nombela-Arrieta C, Mempel TR, Soriano SF, Mazo I, Wymann MP, Hirsch E, Martinez AC, Fukui Y, von Andrian UH, Stein JV (2007). A central role for DOCK2 during interstitial lymphocyte motility and sphingosine-1-phosphate-mediated egress. *J Exp Med.* 204, 497-510.
- Nuttall RK, Silva C, Hader W, Bar-Or A, Patel KD, Edwards DR, Yong VW (2007). Metalloproteinases are enriched in microglia compared with leukocytes and they regulate cytokine levels in activated microglia. *Glia.* 55, 516-526.
- Olofsson P, Nylander G, Olsson P (1986). Endotoxin: routes of transport in experimental peritonitis. *American journal of surgery.* 151, 443-446.
- Omari KM, Dorovini-Zis K (2003). CD40 expressed by human brain endothelial cells regulates CD4+ T cell adhesion to endothelium. *Journal of neuroimmunology.* 134, 166-178.
- Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 221-233.
- Pan W, Kastin AJ (2008). Cytokine transport across the injured blood-spinal cord barrier. *Current pharmaceutical design.* 14, 1620-1624.
- Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED (2000). Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med.* 28, 3019-3024.
- Park JK, Park SH, So K, Bae IH, Yoo YD, Um HD (2010). ICAM-3 enhances the migratory and invasive potential of human non-small cell lung cancer cells by inducing MMP-2 and MMP-9 via Akt and CREB. *International journal of oncology.* 36, 181-192.
- Passos GF, Figueiredo CP, Prediger RD, Silva KA, Siqueira JM, Duarte FS, Leal PC, Medeiros R, Calixto JB (2010). Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma in the neuro-inflammatory response and cognitive impairments induced

- by beta-amyloid 1-40 peptide in mice. *Brain, behavior, and immunity*. 24, 493-501.
- Patrucco E, Notte A, Barberis L, Selvetella G, Maffei A, Brancaccio M, Marengo S, Russo G, Azzolino O, Rybalkin SD, Silengo L, Altruda F, Wetzker R, Wymann MP, Lembo G, Hirsch E (2004). PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects. *Cell*. 118, 375-387.
- Perino A, Ghigo A, Ferrero E, Morello F, Santulli G, Baillie GS, Damilano F, Dunlop AJ, Pawson C, Walser R, Levi R, Altruda F, Silengo L, Langeberg LK, Neubauer G, Heymans S, Lembo G, Wymann MP, Wetzker R, Houslay MD, Iaccarino G, Scott JD, Hirsch E (2011). Integrating cardiac PIP3 and cAMP signaling through a PKA anchoring function of p110gamma. *Mol Cell*. 42, 84-95.
- Perino A, Ghigo A, Hirsch E (2010). Leukocyte and cardiac phosphoinositide 3-kinase gamma activity in pressure overload-induced cardiac failure. *Trends in cardiovascular medicine*. 20, 273-276.
- Puri KD, Doggett TA, Huang CY, Douangpanya J, Hayflick JS, Turner M, Penninger J, Diacovo TG (2005). The role of endothelial PI3Kgamma activity in neutrophil trafficking. *Blood*. 106, 150-157.
- Pytel P, Alexander JJ (2009). Pathogenesis of septic encephalopathy. *Curr Opin Neurol*. 22, 283-287.
- Quillard T, Tesmenitsky Y, Croce K, Travers R, Shvartz E, Koskinas KC, Sukhova GK, Aikawa E, Aikawa M, Libby P (2011). Selective inhibition of matrix metalloproteinase-13 increases collagen content of established mouse atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 31, 2464-2472.
- Quinn CO, Rajakumar RA, Agapova OA (2000). Parathyroid hormone induces rat interstitial collagenase mRNA through Ets-1 facilitated by cyclic AMP response element-binding protein and Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II in osteoblastic cells. *Journal of molecular endocrinology*. 25, 73-84.
- Recknagel P, Gonnert FA, Halilbasic E, Gajda M, Jbeily N, Lupp A, Rubio I, Claus RA, Kortgen A, Trauner M, Singer M, Bauer M (2013). Mechanisms and functional consequences of liver failure substantially differ between endotoxaemia and faecal peritonitis in rats. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 33, 283-293.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, Bardutzky J, Dempfle CE, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S, Kern W, Kreymann G, Krüger 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, Stüber F, Weiler N, Weimann A, Werdan K, Welte T, German Sepsis S, German Interdisciplinary Association of Intensive C, Emergency M (2010). Prevention, diagnosis, therapy 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.
- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR (2000). Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*. 13, 110-116.

- Riedemann NC, Guo RF, Ward PA (2003). The enigma of sepsis. *The Journal of clinical investigation*. 112, 460-467.
- Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 8, 776-787.
- Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA (2007). The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*. 81, 137-143.
- Rivera S, Khrestchatsky M, Kaczmarek L, Rosenberg GA, Jaworski DM (2010). Metzincin proteases and their inhibitors: foes or friends in nervous system physiology? *J Neurosci*. 30, 15337-15357.
- Rodriguez-Viciano P, Sabatier C, McCormick F (2004). Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Mol Cell Biol*. 24, 4943-4954.
- Rommel C, Camps M, Ji H (2007). PI3K delta and PI3K gamma: partners in crime in inflammation in rheumatoid arthritis and beyond? *Nat Rev Immunol*. 7, 191-201.
- Rosenberg GA (2009). Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet neurology*. 8, 205-216.
- Rosenberg GA, Cunningham LA, Wallace J, Alexander S, Estrada EY, Grossetete M, Razhagi A, Miller K, Gearing A (2001). Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases in reperfusion injury to rat brain: activation of MMP-9 linked to stromelysin-1 and microglia in cell cultures. *Brain research*. 893, 104-112.
- Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE, Stetler-Stevenson WG (1995). Tumor necrosis factor-alpha-induced gelatinase B causes delayed opening of the blood-brain barrier: an expanded therapeutic window. *Brain research*. 703, 151-155.
- Rückle T, Schwarz MK, Rommel C (2006). PI3Kgamma inhibition: towards an 'aspirin of the 21st century'? *Nature reviews. Drug discovery*. 5, 903-918.
- Sands WA, Palmer TM (2008). Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cell Signal*. 20, 460-466.
- Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*. 307, 1098-1101.
- Sasaki T, Irie-Sasaki J, Jones RG, Oliveira-dos-Santos AJ, Stanford WL, Bolon B, Wakeham A, Itie A, Bouchard D, Kozieradzki I, Joza N, Mak TW, Ohashi PS, Suzuki A, Penninger JM (2000). Function of PI3Kgamma in thymocyte development, T cell activation, and neutrophil migration. *Science*. 287, 1040-1046.
- Sasaki T, Sasaki J, Sakai T, Takasuga S, Suzuki A (2007). The physiology of phosphoinositides. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 30, 1599-1604.
- Saudemont A, Garcon F, Yadi H, Roche-Molina M, Kim N, Segonds-Pichon A, Martin-Fontecha A, Okkenhaug K, Colucci F (2009). p110gamma and p110delta isoforms of phosphoinositide 3-kinase differentially regulate natural killer cell migration in health and disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 106, 5795-5800.
- Sauer H, Ruhe C, Müller JP, Schmelter M, D'Souza R, Wartenberg M (2008). Reactive oxygen species and upregulation of NADPH oxidases in mechanotransduction of embryonic stem cells. *Methods in molecular biology*. 477, 397-418.
- Schmidt C, Schneble N, Müller JP, Bauer R, Perino A, Marone R, Rybalkin SD, Wymann MP, Hirsch E, Wetzker R (2013). Phosphoinositide 3-kinase gamma mediates microglial phagocytosis via lipid kinase-independent control of cAMP. *Neuroscience*. 233, 44-53.

- Schmidt RF, Lang F, Thews G, Schmidt Lang T (2005). *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie; mit 78 Tabellen; [neue Approbationsordnung]*. Heidelberg: Springer Medizin.
- Seidel M, Winning J, Claus RA, Bauer M, Losche W (2009). Beneficial effect of clopidogrel in a mouse model of polymicrobial sepsis. *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. 7, 1030-1032.
- Seltzer JL, Akers KT, Weingarten H, Grant GA, McCourt DW, Eisen AZ (1990). Cleavage specificity of human skin type IV collagenase (gelatinase). Identification of cleavage sites in type I gelatin, with confirmation using synthetic peptides. *J Biol Chem*. 265, 20409-20413.
- Semmler A, Hermann S, Mormann F, Weberpals M, Paxian SA, Okulla T, Schafers M, Kummer MP, Klockgether T, Heneka MT (2008). Sepsis causes neuroinflammation and concomitant decrease of cerebral metabolism. *J Neuroinflammation*. 5, 38.
- Setz C, Brand Y, Radojevic V, Hanusek C, Mullen PJ, Levano S, Listyo A, Bodmer D (2011). Matrix metalloproteinases 2 and 9 in the cochlea: expression and activity after aminoglycoside exposition. *Neuroscience*. 181, 28-39.
- Shankavaram UT, Lai WC, Netzel-Arnett S, Mangan PR, Ardans JA, Caterina N, Stetler-Stevenson WG, Birkedal-Hansen H, Wahl LM (2001). Monocyte membrane type 1-matrix metalloproteinase. Prostaglandin-dependent regulation and role in metalloproteinase-2 activation. *J Biol Chem*. 276, 19027-19032.
- Shemarova IV (2009). cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. *Critical reviews in microbiology*. 35, 23-42.
- Shukla A, Bosenberg MW, MacPherson MB, Butnor KJ, Heintz NH, Pass HI, Carbone M, Testa JR, Mossman BT (2009). Activated cAMP response element binding protein is overexpressed in human mesotheliomas and inhibits apoptosis. *The American journal of pathology*. 175, 2197-2206.
- Sieber MW, Guenther M, Kohl M, Witte OW, Claus RA, Frahm C (2010). Inter-age variability of bona fide unvaried transcripts Normalization of quantitative PCR data in ischemic stroke. *Neurobiology of aging*. 31, 654-664.
- Sixt M, Engelhardt B, Pausch F, Hallmann R, Wendler O, Sorokin LM (2001). Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol*. 153, 933-946.
- Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW (2005). Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *BioTechniques*. 38, 73-83.
- Spitzenberg V, König C, Ulm S, Marone R, Ropke L, Müller JP, Grün M, Bauer R, Rubio I, Wymann MP, Voigt A, Wetzker R (2010). Targeting PI3K in neuroblastoma. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 136, 1881-1890.
- Sprung CL, Cerra FB, Freund HR, Schein RM, Konstantinides FN, Marcial EH, Pena M (1991). Amino acid alterations and encephalopathy in the sepsis syndrome. *Crit Care Med*. 19, 753-757.
- Stansley B, Post J, Hensley K (2012). A comparative review of cell culture systems for the study of microglial biology in Alzheimer's disease. *J Neuroinflammation*. 9, 115.
- Stoyanov B, Volinia S, Hanck T, Rubio I, Loubtchenkov M, Malek D, Stoyanova S, Vanhaesebroeck B, Dhand R, Nürnberg B, et al. (1995). Cloning and

- characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science*. 269, 690-693.
- Stoyanova S, Bulgarelli-Leva G, Kirsch C, Hanck T, Klinger R, Wetzker R, Wymann MP (1997). Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase gamma: structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *The Biochemical journal*. 324 (Pt 2), 489-495.
- Suire S, Condliffe AM, Ferguson GJ, Ellson CD, Guillou H, Davidson K, Welch H, Coadwell J, Turner M, Chilvers ER, Hawkins PT, Stephens L (2006). Gbetagammmas and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. *Nature cell biology*. 8, 1303-1309.
- Taccone FS, Su F, Pierrakos C, He X, James S, Dewitte O, Vincent JL, De Backer D (2010). Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. *Crit Care*. 14, R140.
- Takeuchi H, Jin S, Wang J, Zhang G, Kawanokuchi J, Kuno R, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A (2006). Tumor necrosis factor-alpha induces neurotoxicity via glutamate release from hemichannels of activated microglia in an autocrine manner. *J Biol Chem*. 281, 21362-21368.
- Takeuchi O, Akira S (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 140, 805-820.
- Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ (2009). Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *J Leukoc Biol*. 85, 352-370.
- Terborg C (2012). [Septic encephalopathy]. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin*. 107, 629-633.
- Vaday GG, Schor H, Rahat MA, Lahat N, Lider O (2001). Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. *J Leukoc Biol*. 69, 613-621.
- Vecchione C, Patrucco E, Marino G, Barberis L, Poulet R, Aretini A, Maffei A, Gentile MT, Storto M, Azzolino O, Brancaccio M, Colussi GL, Bettarini U, Altruda F, Silengo L, Tarone G, Wymann MP, Hirsch E, Lembo G (2005). Protection from angiotensin II-mediated vasculotoxic and hypertensive response in mice lacking PI3Kgamma. *J Exp Med*. 201, 1217-1228.
- Verma S, Nakaoke R, Dohgu S, Banks WA (2006). Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain, behavior, and immunity*. 20, 449-455.
- Vincent JL, Opal SM, Marshall JC, Tracey KJ (2013). Sepsis definitions: time for change. *Lancet*. 381, 774-775.
- Vollmar B (2011). [Pathophysiological basis of surgery-linked sepsis]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*. 82, 199-207.
- Walker EH, Perisic O, Ried C, Stephens L, Williams RL (1999). Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature*. 402, 313-320.
- Weiss-Haljiti C, Pasquali C, Ji H, Gillieron C, Chabert C, Curchod ML, Hirsch E, Ridley AJ, Hooft van Huijsduijnen R, Camps M, Rommel C (2004). Involvement of phosphoinositide 3-kinase gamma, Rac, and PAK signaling in chemokine-induced macrophage migration. *J Biol Chem*. 279, 43273-43284.
- Welgus HG, Kobayashi DK, Jeffrey JJ (1983). The collagen substrate specificity of rat uterus collagenase. *J Biol Chem*. 258, 14162-14165.
- Wen AY, Sakamoto KM, Miller LS (2010). The role of the transcription factor CREB in immune function. *J Immunol*. 185, 6413-6419.

- Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P (2005). *Sepsis und MODS*. Berlin, Heidelberg: Springer Medizin Verlag Heidelberg.
- Wiersinga WJ, van der Poll T (2007). Is the septic response good or bad? *Current infectious disease reports*. 9, 366-373.
- Wilson JX, Young GB (2003). Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *Can J Neurol Sci*. 30, 98-105.
- Woessner JF, Nagase H (2000). *Matrix metalloproteinases and TIMPs*. New York [u.a.]: Oxford University Press.
- Wolman M, Klatzo I, Chui E, Wilmes F, Nishimoto K, Fujiwara K, Spatz M (1981). Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta neuropathologica*. 54, 55-61.
- Woo MS, Park JS, Choi IY, Kim WK, Kim HS (2008). Inhibition of MMP-3 or -9 suppresses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines and iNOS in microglia. *J Neurochem*. 106, 770-780.
- Xie S, Price JE, Luca M, Jean D, Ronai Z, Bar-Eli M (1997). Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *Oncogene*. 15, 2069-2075.
- Xu Y, Loison F, Luo HR (2010). Neutrophil spontaneous death is mediated by down-regulation of autocrine signaling through GPCR, PI3Kgamma, ROS, and actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107, 2950-2955.
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA (2007). Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 27, 697-709.
- Yawata I, Takeuchi H, Doi Y, Liang J, Mizuno T, Suzumura A (2008). Macrophage-induced neurotoxicity is mediated by glutamate and attenuated by glutaminase inhibitors and gap junction inhibitors. *Life sciences*. 82, 1111-1116.
- Yen LF, Wei VC, Kuo EY, Lai TW (2013). Distinct patterns of cerebral extravasation by Evans blue and sodium fluorescein in rats. *PLoS One*. 8, e68595.
- Yende S, Angus DC (2007). Long-term outcomes from sepsis. *Current infectious disease reports*. 9, 382-386.
- Zanoni I, Ostuni R, Capuano G, Collini M, Caccia M, Ronchi AE, Rocchetti M, Mingozzi F, Foti M, Chirico G, Costa B, Zaza A, Ricciardi-Castagnoli P, Granucci F (2009). CD14 regulates the dendritic cell life cycle after LPS exposure through NFAT activation. *Nature*. 460, 264-268.
- Zanotti-Cavazzoni SL, Guglielmi M, Parrillo JE, Walker T, Dellinger RP, Hollenberg SM (2009). Fluid resuscitation influences cardiovascular performance and mortality in a murine model of sepsis. *Intensive Care Med*. 35, 748-754.
- Zhou H, Andonegui G, Wong CH, Kubes P (2009). Role of endothelial TLR4 for neutrophil recruitment into central nervous system microvessels in systemic inflammation. *J Immunol*. 183, 5244-5250.
- Zhou H, Lapointe BM, Clark SR, Zbytniuk L, Kubes P (2006). A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide. *J Immunol*. 177, 8103-8110.
- Zlokovic BV (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron*. 57, 178-201.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist nur in den gedruckten Exemplaren enthalten.

Publikationen

Im Rahmen der Dissertation veröffentlichte Publikationen

Frister A, Schmidt C, Schneble N, Brodhun M, Gonnert FA, Bauer M, Hirsch E, Müller JP, Wetzker R, Bauer R (2014). Phosphoinositide 3-Kinase gamma Affects LPS-Induced Disturbance of Blood-Brain Barrier Via Lipid Kinase-Independent Control of cAMP in Microglial Cells. *Neuromolecular Medicine*. 16, 704-713.

Posterpräsentationen auf internationalen Kongressen

Frister A, Bauer R, Rubio I, Wetzker R (2010). Role of PI3K γ in the induction of endotoxin tolerance. *European Student Conference on Microbial Communication 2010*; 28.09.–01.10.2010

Frister A, Schmidt C, Bauer R, Müller JP, Rubio I, Wetzker R (2011). Role of PI3K γ in the inflammatory response of macrophages. *2nd Student Conference on Microbial Communication – MiCom 2011*; 13.–16.09.2011

Frister A, Tsitsipatis D, Bauer R, Wetzker R (2012). Role of PI3K γ in inflammatory phagocytes. *3rd International Conference on Microbial Communication – MiCom 2012*; 05.–08.11.2012

Frister A, Schmidt C, Schneble N, Bauer R, Wetzker R (2013). PI3K γ regulates MMP expression in microglial cells by control of cAMP dependent signaling. *XI European Meeting on Glial Cells in Health and Disease 2013*; 03.–06.07.2013

Von der Dissertation unabhängige Publikationen

Chen L, Frister A, Wang S, Ludwig A, Behr H, Pippig S, Li B, Simm A, Hofmann B, Pilowski C, Koch S, Buerke M, Rose-John S, Werdan K, Loppnow H (2009). Interaction of vascular smooth muscle cells and monocytes by soluble factors synergistically enhances IL-6 and MCP-1 production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 296, H987-996.

Loppnow H, Zhang L, Buerke M, Lautenschläger M, Chen L, Frister A, Schlitt A, Luther T, Song N, Hofmann B, Rose-John S, Silber RE, Müller-Werdan U, Werdan K (2011). Statins potently reduce the cytokine-mediated IL-6 release in SMC/MNC cocultures. *J Cell Mol Med*. 15, 994-1004.

Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern des Instituts für Molekulare Zellbiologie. Insbesondere möchte ich Herrn Prof. Dr. Reinhard Wetzker und Herrn Prof. Dr. Reinhard Bauer sowie Herrn Prof. Dr. Michael Bauer (Klinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie) für die Ermöglichung und Betreuung dieser Arbeit danken.

Für die Unterstützung bei den Arbeiten im Tierlabor und der immunhistochemischen Färbung von Hirnschnitten danke ich ganz besonders Frau Rose-Marie Zimmer, ebenso Herrn Dr. Michael Brodhun (Institut für Pathologie, HELIOS Klinikum Erfurt) für die pathologische Bewertung der Präparate.

Besonderer Dank gilt meinen geschätzten Kolleginnen Frau Nadine Schneble und Frau Caroline Schmidt für die gute und produktive Zusammenarbeit, insbesondere bei der Präparation von Mikroglia und bei den cAMP-Messungen, aber auch für die vielen anregenden Diskussionen und die schöne gemeinsame Zeit.

Herr PD Dr. Jörg Müller stand mir stets mit zahlreichen konstruktiven Anregungen, Ratschlägen und Tipps zur Seite, von denen ich sehr profitieren konnte.

Bei allen anderen Mitarbeitern und Kollegen des CMB möchte ich mich ebenfalls für die gute kollegiale Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung bedanken – und natürlich für die unvergessliche Zeit in Jena.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig, ohne die unzulässige Hilfe Dritter und ohne die Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Aus fremden Quellen, Texten von Dritten oder eigenen Prüfungsarbeiten direkt oder indirekt übernommene Gedanken wurden als solche kenntlich gemacht, die entsprechenden Quellen wurden angegeben.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in ihrer Gesamtheit noch in Teilen an einer anderen Hochschule als Dissertation oder Prüfungsarbeit eingereicht habe. Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde von mir nicht in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen jeglicher Art für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der Erstellung dieser Dissertation stehen. Die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena ist mir bekannt.

.....

(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift)