

***Einfluss genetischer Varianten im Aquaporin 5-Promotor-  
Gen auf Schlüsselmechanismen der Sepsis***

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie

an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Katharina Rump

aus Herten

Juni 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Pharmakogenetik unter Leitung von Prof. Dr. med. Winfried Siffert und in der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums der Universität Duisburg-Essen unter Leitung von Prof. Dr. med. Jürgen Peters und der Klinik für Anästhesiologie des Knappschaftskrankenhaus Bochum unter Leitung von Prof. Dr. med. Michael Adamzik durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Adamzik
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Wiebke Hansen
3. Gutachter: \*

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. rer. nat. Andrea Vortkamp

Tag der mündlichen Prüfung: 1. September 2015

Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden bereits publiziert oder auf Kongressen vorgestellt:

1. Aquaporin 1 and 5 expression evoked by the  $\beta$ 2 adrenoreceptor agonist terbutaline and lipopolysaccharide in mice and in the human monocytic cell line THP-1 is differentially regulated. **Rump K**, Brendt P, Frey UH, Schäfer ST, Siffert W, Peters J, Adamzik M. Shock. 2013 Nov;40(5):430-6. doi: 10.1097/SHK.0000000000000035. PMID: 24088990
2. Der AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus und die AQP5-Expression beeinflussen die Letalität bei LPS-induzierter Inflammation und die Migration von Immunzellen: **Katharina Rump**, Alexander von Busch, Lars Bergmann, Anil Menon, Simon Schäfer, Winfried Siffert, Jürgen Peters, Michael Adamzik, Vortrag auf den Wissenschaftlichen Arbeitstagen der DGAI am 14.02.2014 in Würzburg; erschienen in: Anästh Intensivmed 2014;55:2-41
3. Das Methylierungsmuster des AQP5-Promotors beeinflusst die AQP5-Expression in Immunzellen und die Prognose von Patienten mit Sepsis: **Katharina Rump**, Simon Schäfer, Matthias Unterberg, Maximiliane Kreuzer, Agnes Gronek, Lars Bergmann, Stephan Hahn, Winfried Siffert, Jürgen Peters, Michael Adamzik, Vortrag auf den Wissenschaftlichen Arbeitstagen der DGAI am 27.02.2015 in Würzburg; erscheint in : Anästh Intensivmed 2015
4. AQP5-Promotor-Methylierung beeinflusst Prognose von Patienten mit Sepsis: **Katharina Rump (Bochum)**; Simon Schäfer (Essen); Matthias Unterberg (Bochum); Maximilliane Kreuzer (Bochum); Agnes Maria Dahlke (Essen); Lars Bergmann (Bochum); Stephan Hahn (Bochum); Winfried Siffert (Essen); Jürgen Peters (Essen); Michael Adamzik (Bochum). Posterpräsentation Deutscher Anästhesiekongress (DAC) 8. Mai 2015 in Düsseldorf
5. Einfluss vom AQP5 A(-1364)C SNP auf Sepsisletalität und Immunzellmigration: **Katharina Rump (Bochum)**; Alexander von Busch (Bochum); Lars Bergmann (Bochum); Anil Menon (Cincinnati OH); Simon Schäfer (Essen); Winfried Siffert (Essen); Jürgen Peters (Essen); Michael Adamzik (Bochum), Vortrag und Posterpräsentation Deutscher Anästhesiekongress (DAC) 8. Mai 2014 in Leipzig, 2. Preis beim Vortragswettbewerb: Grundlagenorientierte Forschung

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	8
1.1	Die Sepsis .....	8
1.2	Molekulare Grundlagen der Sepsis .....	10
1.2.1	Das Immunsystem .....	10
1.2.2	Molekulare Mechanismen der Sepsis .....	12
1.2.3	Therapie der Sepsis.....	15
1.3	Aquaporine .....	16
1.3.1	Aquaporine in Zellmigration und Zellproliferation.....	20
1.3.2	Aquaporin 5.....	21
1.4	Regulation der AQP5-Expression und beteiligte Signalwege .....	21
1.4.1	Epigenetische Regulation der AQP5-Expression.....	22
1.4.2	Regulation der AQP5-Expression durch LPS und $\beta$ 2-Mimetika .....	22
1.4.3	$\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren und die Kontrolle von inflammatorischen Signalwegen .....	25
1.5	Ziel der Arbeit.....	27
2	Material und Methoden .....	30
2.1	Material.....	30
2.1.1	Verbrauchsmaterialien .....	30
2.1.2	Geräte .....	30
2.1.3	Chemikalien .....	31
2.1.4	Restriktionsenzyme.....	32
2.1.5	Zellkulturreagenzien.....	32
2.1.6	Oligonukleotide .....	32
2.1.7	Antikörper.....	36
2.1.8	Medien .....	37
2.1.9	Verwendete Puffer .....	39

2.1.10	Material für die Blutentnahme und die Zellaufreinigung.....	42
2.1.11	verwendete Kits .....	42
2.1.12	Patientenmaterial für die Untersuchung der AQP5 mRNA Expression und Methylierung.....	43
2.1.13	Verwendeter Bakterienstamm .....	43
2.1.14	verwendete Zelllinien .....	43
2.1.15	verwendeter Mausstamm .....	44
2.1.16	Vektoren und Konstrukte .....	44
2.2	Methoden .....	45
2.2.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen .....	45
2.2.2	Reportergenassays (Luziferase Assays) .....	46
2.2.3	Isolation von primären neutrophilen und monozytären Zellen.....	53
2.2.4	Durchführung von Proliferationsassays mit monozytären Zellen .....	56
2.2.5	Migrationsassay mit neutrophilen Zellen.....	58
2.2.6	Stabile Transfektion von Jurkat-Zellen und anschließende Migrationsassays .....	59
2.2.7	EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay).....	61
2.2.8	Western Blot .....	67
2.2.9	Real-Time PCR.....	71
2.2.10	Untersuchung der Methylierung des AQP5-Promotors.....	75
2.2.11	Tierexperimentelle Arbeiten.....	79
2.2.12	Statistische Methoden .....	83
3	Ergebnisse .....	85
3.1	Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die um den AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus binden.....	85
3.1.1	Überprüfung der Bindung von c-Myb, NFAT und NMP4 mittels EMSA.	86

3.1.2	Regulation der AQP5-Promotoraktivität durch Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit des AQP5 A(-1364)C Polymorphismus untersucht mittels Reporterassay.....	90
3.1.3	Untersuchung der Regulation der AQP5-Expression durch Transkriptionsfaktoren mittels Real-Time PCR .....	93
3.2	Regulation der AQP5-Expression über Methylierung .....	95
3.2.1	Methylierung des AQP5-Promotors bei septischen Patienten in Abhängigkeit vom AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus.....	95
3.2.2	Untersuchungen zum Methylierungsmuster des AQP5-Promotors bei septischen und postoperativen Patienten .....	97
3.2.3	Regulation der AQP5-Expression durch Methylierung in unterschiedlichen Immunzellen.....	101
3.3	AQP5 A(-1364)C genotypabhängige AQP5-Expression sowie Cytokinkonzentration.....	104
3.4	Einfluss der AQP5-Expression bei der Inflammation <i>in vivo</i> .....	106
3.5	AQP5-abhängige Zellmigration und Proliferation von Immunzellen.....	109
3.5.1	Untersuchungen zur genotypabhängigen Migration von neutrophilen Granulozyten.....	109
3.5.2	AQP5-Expression in neutrophilen Zellen unter fMLP-Stimulation.....	112
3.5.3	Immunzellmigration unter AQP5-Überexpression .....	112
3.5.4	AQP5 A(-1364)C-genotypabhängigen Proliferation von monozytären Zellen	114
3.6	Einfluss von LPS und cAMP Stimulation auf THP-1-Zellen.....	115
3.6.1	AQP5-Expression nach Stimulation mit LPS und cAMP in THP-1 Zellen	115
3.6.2	Zellmorphologie und Viabilität nach LPS und cAMP-Stimulation von THP-1-Zellen.....	117
4	Diskussion.....	119

4.1	Untersuchungen zum Überleben von AQP5-KO und WT-Mäusen bei einer Sepsis .....	120
4.2	Untersuchungen zur AQP5-abhängigen Zellmigration und Zellproliferation 122	
4.3	Untersuchungen zur genotypabhängigen AQP5-Expression und Cytokinkonzentration bei Patienten mit schwerer Sepsis .....	126
4.4	Untersuchungen zum Methylierungsmusters des AQP5-Promotors bei Patienten mit schwerer Sepsis und postoperativen Patienten.....	129
4.5	Einfluss des Transkriptionsfaktors NMP4 auf die AQP5-Expression.....	132
4.6	AQP5-Expression nach LPS und cAMP Stimulation .....	134
4.7	Ausblick.....	137
5	Zusammenfassung.....	139
6	Literaturverzeichnis .....	141
7	Verzeichnisse.....	157
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	157
7.2	Abbildungsverzeichnis.....	159
7.3	Tabellenverzeichnis.....	168
	Lebenslauf.....	170
	Danksagung .....	170
	Erklärungen .....	171

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Sepsis

Bei der Sepsis handelt es sich um eine systemische Entzündungsreaktion auf eine Infektion (Werdan 2005). Die Erkrankung zeichnet sich durch eine systemische Entzündungsreaktion aus, welche mit der Aktivierung zahlreicher Zellsysteme und Signalkaskaden sowie der Ausschüttung und Bildung von humoralen und zellulären Mediatoren einhergeht (Werdan 2005, Bone et al. 1992). Die Sepsis stellt eine der häufigsten Komplikationen auf Intensivstationen dar und ist die dritthäufigste Todesursache in Deutschland (Werdan 2005). Die Sterblichkeit ist mit 30 – 50 % immer noch sehr hoch und konnte trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren nicht reduziert werden (Dellinger et al. 2013). Ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge und die Identifizierung neuer therapeutischer Targets für die Sepsistherapie bleibt somit ein essentielles Forschungsziel. Die hohe Komplexität der pathophysiologischen Vorgänge macht eine klare Definition der Sepsis allerdings schwierig. Deshalb gibt es verschiedene Definitionsversuche, wobei die Definitionen von Bone (1992) und Werdan (2005) bis heute Gültigkeit haben (Werdan 2005, Bone et al. 1992).

Nach beiden Definitionen werden vier separate Schweregrade unterschieden: *Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS)*, *Sepsis*, *schwere Sepsis* und *septischer Schock*.

Bei einem SIRS handelt es sich um eine generalisierte hyperinflammatorische Reaktion mit verschiedenen Ursachen. Zu deren Ursachen zählen beispielsweise eine Infektion mit Bakterien, Viren oder Pilzen, eine Verbrennung oder ein Trauma (Bone et al. 1992).

Die Kriterien für ein SIRS sind in Tabelle 1 zusammen gefasst.



Tabelle 1: Kriterien für SIRS

Kriterium	Werte
1) Fieber oder Hypothermie:	Körpertemperatur > 38°C Körpertemperatur < 36°C
2) Tachykardie:	Herzfrequenz >90/Min.
3) Tachypnoe: oder Hyperventilation:	Atemfrequenz: >20/Min. CO <sub>2</sub> -Partialdruck: < 32 mmHg
4) Leukozytose oder Leukopenie oder unreife Neutrophile	Leukozyten: >12.000/mm <sup>3</sup> Leukozyten <4000/mm <sup>3</sup> >10% im Differenzialblutbild

Für das Vorliegen einer Sepsis muss eine klinisch gesicherte oder vermutete Infektion vorliegen. Des Weiteren müssen zwei der vier Kriterien für ein (SIRS) erfüllt sein (Bone et al. 2009). Von einer schweren Sepsis wird gesprochen, wenn zusätzlich noch mindestens eine Organdysfunktion vorliegt. Falls trotz entsprechenden Maßnahmen immer noch ein Kreislaufversagen vorliegt, handelt es sich um einen septischen Schock (Bone et al. 2009, Martin et al. 2003, Silva et al. 2008, Bates et al. 1997).

Die Ursache der Sepsis ist zunächst eine lokale Infektion, wie beispielsweise eine Lungen- oder Hirnhautentzündung, oder eine Translokation von Bakterien aus dem Darm, die sich über das Blut ausbreitet. Häufigste auslösende Erreger einer Sepsis sind *Staphylokokken*, *Streptokokken* und gramnegative Darmbakterien (*E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacteroides*). Prinzipiell sind jedoch auch Erreger viraler, fungaler oder parasitärer Natur in der Lage eine Sepsis auszulösen und zu verstärken (Levy et al. 2003). In Folge der Infektion kommt es zu einer massiven Fehlregulation der proinflammatorischen und antiinflammatorischen Reaktionen des Körpers (Silva et al. 2008). Diese geht zunächst mit einer Aktivierung immunkompetenter Zellen und einer massiven Ausschüttung von primären Inflammationsmediatoren, wie Tumornekrosefaktor alpha (Tnf- $\alpha$ ) und Interleukin-1 (IL-1), ins Blut einher. Die Freisetzung der primären Mediatoren löst wiederum die Ausschüttung sekundärer Mediatoren aus. Die

Mediatoren können beispielsweise eine Gefäßschädigung oder ein Multiorganversagen auslösen, was zum Tod führen kann (Ramirez 2013).

Die große interindividuelle Variabilität im Krankheitsverlauf der schweren Sepsis lässt sich durch klassische Risikofaktoren, wie beispielsweise das Alter oder Vorerkrankungen nicht hinreichend erklären (Silva et al. 2008, Tran et al. 1990). Vielmehr scheint der individuelle genetische Hintergrund den Verlauf und die Letalität der Sepsis zu beeinflussen (Adamzik et al. 2011, Adamzik et al. 2013, Song et al. 2014, Belopolskaya et al. 2015, Fang et al. 2015). So konnten Adamzik et al. (2011) zeigen, dass das C-Allel des funktionellen AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus nicht nur mit einer geringeren Expression von AQP5 assoziiert ist (Adamzik et al. 2008), sondern auch mit einer geringeren Letalität bei schwerer Sepsis.

Die kausalen Zusammenhänge zwischen AQP5-Expression und Sterblichkeit bei Sepsis waren bis *dato* noch nicht aufgeklärt und waren daher Gegenstand dieser Promotion. Für das bessere Verständnis, wie AQP5 auf die Sepsis Einfluss nehmen könnte, sollen im Weiteren die molekularen Grundlagen der Sepsis betrachtet und die Funktion von Aquaporinen beschrieben werden.

## **1.2 Molekulare Grundlagen der Sepsis**

Bei der Sepsis kommt es zu einer massiven Fehlreaktion der Immunreaktion des Körpers. Um die molekularen Grundlagen der Sepsis darstellen zu können, wird zunächst die Funktion des intakten Immunsystems betrachtet.

### **1.2.1 Das Immunsystem**

Das Immunsystem ist ein komplexes Abwehrsystem, um den Körper vor pathogenen Erregern wie z.B. Bakterien oder Viren, aber auch vor anormalen Körperzellen zu schützen.

Klassisch wird das Immunsystem in die angeborene (=innate) und erworbene (=adaptive) Immunität unterteilt. Die angeborene Immunität reagiert sehr schnell bei einer Infektion, ist jedoch unspezifisch. Im Gegensatz dazu reagiert die adaptive Immunität langsamer, kann Infektionen aber spezifischer und wirksamer beseitigen (Murphy, Janeway 2008). Beide Antworten basieren auf der Aktivität der Leukozyten. Die zentralen Leukozyten der angeborenen Immunität sind die Makrophagen sowie neutrophile Zellen (Galli et al. 2011). Makrophagen halten sich in den Geweben auf,

erkennen schnell pathogene Mikroorganismen und setzen Mediatoren frei, die weitere Immunzellen aktivieren. Durch das Freisetzen von diversen proinflammatorischen Cytokinen, wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 und IL-6 wird der Körper auf die bevorstehende Immunantwort vorbereitet. Außerdem wandern neutrophile Zellen in großer Zahl in das infizierte Gewebe ein, nehmen die Pathogene auf und zerstören diese (Kovach, Standiford 2012).

Weiter ist eine gezielte Erkennung der Pathogene essentiell für eine erfolgreiche Aktivierung der angeborenen Immunität. Für diese Erkennung exprimieren Immunzellen spezifische Rezeptoren (Akira et al. 2006). Mit Hilfe dieser Rezeptoren können sie spezifische Muster, die sogenannten „Pathogen associated molecular Patterns“ (=PAMPS) auf Mikroorganismen erkennen. Nach der Erkennung der mikrobiellen Bestandteile wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die zur Bildung und Ausschüttung von Cytokinen wie beispielsweise TNF- $\alpha$  führt. Die Ausschüttung dieser Cytokine hat lokal schützende Effekte, indem sie die Phagozytose von Mikroorganismen einleitet (Delano et al. 2011).

Im Gegensatz zur angeborenen Immunität, welche sich vor allem durch ihre schnelle Einsatzbereitschaft auszeichnet, ist die adaptive Immunität insbesondere durch ihre Spezifität gegenüber neuen oder veränderten Pathogenen charakterisiert (Murphy, Janeway 2008). Die adaptive Immunität setzt sich aus den spezialisierten Immunzellen, den Lymphozyten sowie primären und sekundären lymphatischen Organen zusammen. Zu den primären lymphatischen Organen gehören das Knochenmark und der Thymus. In ihnen entstehen und reifen die Immunzellen. Die Lymphknoten und die Milz zählen zu den sekundären lymphatischen Organen. In ihnen wird die Immunantwort induziert (Tomar, De 2014).

Neben der proinflammatorischen Immunantwort existiert die sogenannte antiinflammatorische Immunantwort. Diese dient dazu die Immunreaktion zu beenden und zu kontrollieren. Wichtige Zellen stellen hierbei die regulatorischen T-Zellen dar (Adamzik et al. 2013), welche unter anderem das antiinflammatorische Cytokin Interleukin-10 (IL-10) sezernieren (von Boehmer 2005).

Unter normalen Umständen ist das Immunsystem in der Lage eindringende Pathogene zu beseitigen. Kommt es jedoch aufgrund beispielsweise einer Immunsuppression oder einer massiven Infektion mit vielen Erregern zu einer generalisierten Infektion, so ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage die

Pathogene zu eliminieren. Eine überschießende Immunreaktion kann schließlich zu einer Sepsis führen (Murphy, Janeway 2008). Die molekularen Mechanismen der Sepsis werden im nächsten Abschnitt näher erläutert.

### **1.2.2 Molekulare Mechanismen der Sepsis**

Die Pathogenese der Sepsis wird in 3 Phasen unterteilt, an denen verschiedene Mechanismen des Körpers beteiligt sind. In der ersten Phase, der proinflammatorischen Antwort, werden, als Reaktion auf beispielsweise eine bakterielle Infektion, übermäßig viele proinflammatorische Mediatoren, wie TNF- $\alpha$  und IL-1 ausgeschüttet. Dadurch wird ein SIRS ausgelöst (Sagy et al. 2013). Als zweite Phase wird die Fehlregulation der kompensatorischen antiinflammatorischen Antwort (CARS) bezeichnet. Hierunter versteht man ein Ungleichgewicht zwischen der pro- und antiinflammatorischen Antwort (Sagy et al. 2013). In der letzten Phase kommt es zu einer Immunsuppression, die durch eine übermäßige Ausschüttung von antiinflammatorischen Mediatoren wie IL-4 und IL-10 ausgelöst wird. Neu eindringende Pathogene können nicht mehr eliminiert werden und massive Organschädigungen verursachen (Sagy et al. 2013).

Zunächst werden die molekularen Mechanismen der ersten Phase (SIRS) eingehend betrachtet (Abbildung 1). Auslöser der proinflammatorischen Antwort sind beispielsweise Bestandteile von der Bakterienzellwand, die ins Blut eingeschwemmt werden und so zu einer Überreaktion des Immunsystems führen. Ein Mechanismus, über den Mikroorganismen erkannt werden, ist über Pattern-Recognition Receptors (PRRs) auf Immunzellen, welche an hochkonservierte Muster den PAMPs binden (Russell et al. 2011). Wichtige Rezeptoren, die Muster auf Pathogenen erkennen, sind beispielsweise fMet-Leu-Phe (fMLP) Rezeptoren auf Makrophagen und neutrophilen Zellen (M'Rabet et al. 1999, Li, Ye 2013). fMLP Rezeptoren erkennen bakterielle Polypeptide, die zumeist mit einem formylierten Methioninrest (fMet) beginnen. Bei fMLP Rezeptoren handelt es sich um chemotaktische Rezeptoren, die neutrophile Zellen zum Infektionsherd führen (Loitto et al. 2002). Weitere wichtige Rezeptoren in der angeborenen Immunität sind die „Toll-Like Rezeptoren“ (TLRs) (Beutler 2002), welche bakterielle Zellwandbestandteile erkennen. So erkennt beispielsweise der TLR-2 die Lipoteichinonsäure (LTS) von grampositiven Bakterien oder TLR-4 das Lipopolysaccharid (LPS) von gramnegativen Bakterien (Russell et al. 2011, Beutler 2002). In Folge einer gramnegativen Infektion interagiert zunächst das

humane LPS-Bindungsprotein (LBP) mit dem bakteriellen LPS (Muta, Takeshige 2001). LBP präsentiert nun das LPS dem TLR-4 Rezeptor und Cluster of differentiation-14 (CD-14). Die Interaktion mit TLR-4 und CD-14 führt zur Aktivierung einer Signalkaskade in den entsprechenden Immunzellen (Muta, Takeshige 2001). Die Signalkaskade bedingt unter anderem die Hochregulation der Transkriptionsfaktoren Nuclear Faktor  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B), Aktivator Protein-1 (AP-1) und Interferon regulatorischer Faktor-3 (IRF-3) im Zellkern (Ye, Liu 2001, Guha, Mackman 2001).

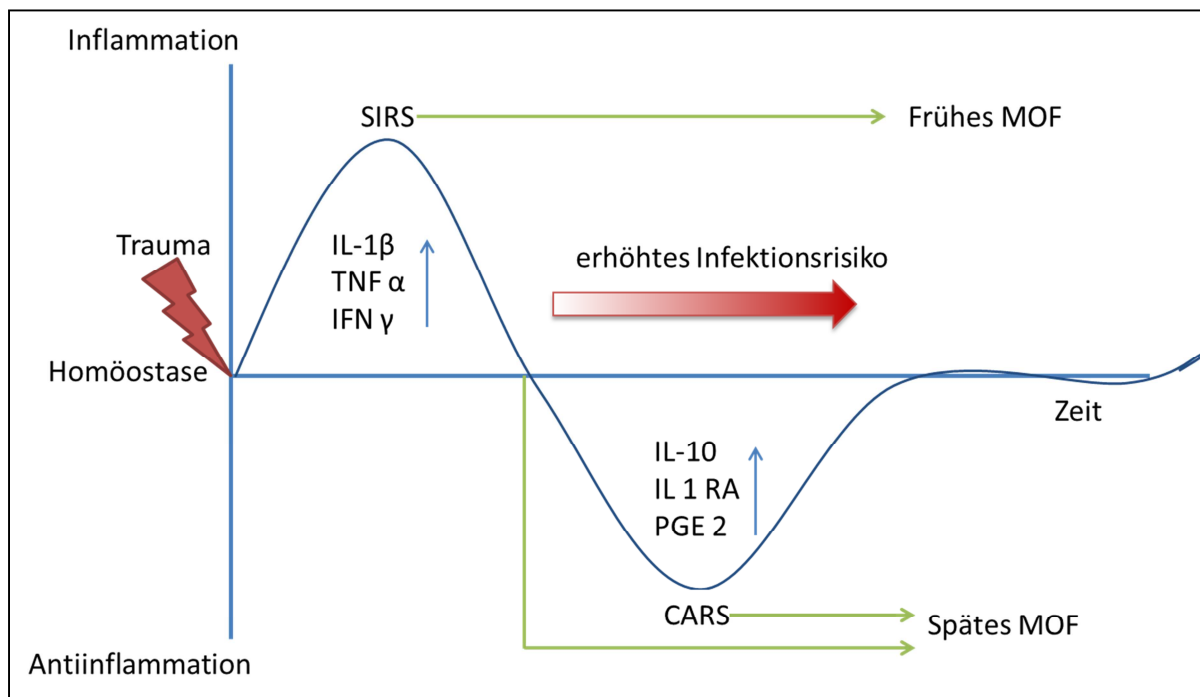
NF $\kappa$ B ist ein wichtiger Transkriptionsfaktor im Zuge einer Sepsis. Er reguliert die Transkription von über 150 immunmodulatorischen Genen wie beispielsweise TNF- $\alpha$ , IL-1 oder IL-6. Diese Cytokine beeinflussen die Aktivität von Monozyten und Makrophagen, die wiederum weitere Cytokine und Chemokine sezernieren (Cavaillon et al. 2005). Monozyten sezernieren beispielsweise in hohen Maßen IL-1 $\beta$ . Infolge dessen wird die inflammatorische Antwort noch weiter verstärkt und weitere Immunzellen wie neutrophile Granulozyten wandern in das infizierte Gewebe ein (Russell et al. 2011). Des Weiteren werden auch Lymphozyten der adaptiven Immunität aktiviert. Dazu zählen beispielsweise Subpopulationen der T-Helferzellen, welche ihrerseits Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sezernieren und damit Makrophagen aktivieren (Faivre et al. 2012).

Neben der ausgeprägten Inflammation kommt es auch zur zweiten Phase, der Antiinflammation (CARS; Abbildung 1). Neue Studien gehen davon aus, dass die CARS gleichzeitig mit der SIRS einsetzt (Hotchkiss et al. 2013b). Hierbei werden vermehrt antiinflammatorische Cytokine wie z. B. IL-4, IL-10 und Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) sezerniert und es kommt zur Apoptose von B- und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Russell et al. 2011). Außerdem wird die Freisetzung und Aktivität von TNF- $\alpha$  durch lösliche TNF alpha-Rezeptoren gehemmt (Shames et al. 1999). Auch die Aktivität von IL-1 $\beta$  wird durch die Freisetzung des Interleukin-1-Rezeptorantagonisten (IL1RA) gehemmt (Osuchowski et al. 2006).

Die Ausschüttung inflammatorischer und antiinflammatorischer Mediatoren führt zu der Beeinträchtigung zahlreicher Körperfunktionen, die in Phase drei der Sepsis in einem Multiorganversagen enden können (MOF, Abbildung 1).

Ursächlich für deren Entstehung ist hauptsächlich die Aktivierung des Endothels durch pro- und antiinflammatorische Mediatoren. Endothelzellen produzieren

daraufhin Zelloberflächenadhäsionsmoleküle und Stickstoffmonoxid (NO) (Kirkeboen, Strand 1999), was zu einer Dilatation der Gefäße führt. Dadurch kommt es zu einem verstärkten Einstrom von Leukozyten. Die Leukozyten sezernieren ihrerseits zytotoxische Substanzen, die das Endothel schädigen. Durch das zerstörte Endothel dringt vermehrt Flüssigkeit in das infizierte Gewebe ein. Als Folge des starken Flüssigkeitsaustritts kommt es intravasal zu einem Volumenmangel, welchen der Körper mit einer erhöhten Herzfrequenz auszugleichen versucht (Rittirsch et al. 2008). Zusätzlich geht die Schädigung des Endothels mit einer Störung der Blutgerinnung einher (Tsiotou et al. 2005). Vor allem in den Kapillaren führen TNF- $\alpha$  und IL-1 zu einer Stimulation der Thrombin- und Fibrinbildung, welche die Blutgerinnung aktivieren (Tsiotou et al. 2005). Eine Herunterregulation von Thrombomodulin und der Fibrinolyse inhibieren zudem die Antikoagulation (Sagy et al. 2013). Diese Faktoren führen zunächst zu einer verstärkten Gerinnung, welche vor allem kleine Gefäße „verstopfen“ und dadurch vor allem stark durchblutete Organe beeinträchtigt werden (MOF). Der „Verbrauch“ der Gerinnungsfaktoren, kann schließlich in eine Blutungsneigung resultieren (disseminierte intravasale Koagulopathie (DIC)) und ebenfalls ein MOF zur Folge haben (Taylor et al. 2000). Eine weitere Todesursache in der späten Phase der Sepsis kann eine überschießende nosokomiale Infektion sein, welche aufgrund einer ausgeprägten Antiinflammation nicht mehr eliminiert werden kann (Dellinger et al. 2013). Im folgenden Abschnitt sollen kurz die möglichen therapeutischen Gegenmaßnahmen bei der Sepsis dargestellt werden.



**Abbildung 1:** Gleichgewicht zwischen inflammatorischer (SIRS) und antiinflammatorischer Reaktion (CARS) des Körpers auf ein Trauma. Eine bakterielle Infektion (Trauma) löst zunächst eine inflammatorische Reaktion aus, welche ihrerseits zur Ausbildung der antiinflammatorischen Reaktion führt. Eine zu starke inflammatorische Reaktion kann zum frühen Multiorganversagen führen. In der Phase der Antiinflammation führt häufig eine nosokomiale Infektion zu einem späten Multiorganversagen durch Immunsuppression. (SIRS= systemisches inflammatorisches Responsesyndrom; CARS= kompensatorisches antiinflammatorisches Responsesyndrom, MOF= Multiorganversagen). Modifiziert nach Kumpf, Schumann und Hietbrink (Kumpf, Schumann 2010, Hietbrink et al. 2006).

### 1.2.3 Therapie der Sepsis

Die „Surviving Sepsis Campaign“ veröffentlicht in regelmäßigen Abständen Richtlinien zur Therapie einer Sepsis (Dellinger et al. 2013). Einer der wichtigsten Punkte bei der Behandlung einer Sepsis ist die rasche Erkennung der Sepsis, sodass schnell mit einer geeigneten Therapie begonnen werden kann (Russell 2006). Ein weiterer essentieller Punkt bei der Behandlung ist die Identifikation des Erregers beispielsweise über Blutkulturen und die Lokalisation sowie die anschließende Eliminierung des Infektionsherds.

Außerdem beinhalten die Richtlinien beispielsweise Anweisungen, wie der Flüssigkeitsverlust durch die Endothelschädigung ausgeglichen werden kann. Hierzu empfehlen sie eine frühzeitige Volumentherapie mit einer Kristalloidenlösung zur Aufrechterhaltung des Blutdrucks. Des Weiteren existieren situationsabhängige Medikamente. So wird eine antimikrobielle Breitbandtherapie nach dem Erkennen eines septischen Schocks empfohlen. Noradrenalin und als Ergänzung Vasopressin dienen zur Aufrechterhaltung des arteriellen Drucks. Dobutamin hingegen wird beim

Auftreten einer myokardialen Dysfunktion empfohlen. Eine Gabe von Hydrocortison wird nur befürwortet, wenn eine Flüssigkeits- und Vasopressortherapie nicht ausreichen, um so die hämodynamische Stabilität wieder herzustellen (Dellinger et al. 2013).

Einige Jahre galt die Therapie mit aktiviertem Protein C als sehr vielversprechend. Aktiviertes Protein C weißt eine antikoagulatorische Wirkung auf und verhindert somit eine intravasale Koagulopathie. Die großen Erfolge auf die Senkung der Mortalitätsrate (Russell 2006) konnten aktuelle Studien nicht validieren. Somit wurde das Medikament Xigris (aktiviertes Protein C) 2011 vom Markt genommen (Williams 2012). Es fehlen weiterhin spezifische Therapeutika, um eine schwere Sepsis erfolgreich zu behandeln.

Eine intensive Forschung bleibt weiterhin essentiell. Wie bereits oben erwähnt, stellt AQP5 ein attraktives Kandidatengen als neues Drug-Target in der Sepsistherapie dar, da der AQP5 A(-1364)C SNP mit der 30-Tage Letalität bei schwerer Sepsis assoziiert ist. Im nächsten Kapitel soll die proteinchemische Struktur und die Rolle der Aquaporine in der Inflammation genauer erläutert und abschließend AQP5 näher betrachtet werden.

### **1.3 Aquaporine**

Aquaporine (AQPs) sind membranständige Kanalproteine, die Kanäle in der Zellmembran formen, um somit den Transport von kleinen Molekülen in bzw. aus der Zelle, entlang eines osmotischen Gradienten regulieren (Agre 2005). Anhand des „Transportguts“ werden Aquaporine in zwei Gruppen eingeteilt: Aquaporine und Aquaglycoproteine. Kanäle, die nur Wasser transportieren heißen Aquaporine und solche Kanalproteine, die auch Glycerol transportieren können heißen Aquaglycoproteine. Bis jetzt konnten 13 unterschiedliche humane Aquaporine (AQP0-12) identifiziert werden. Alle transportieren Wasser in unterschiedlichen Mengen, zusätzlich transportieren AQP 3, 7, 9 und 10 Glycerol und teilweise Harnstoff (Jeyaseelan et al. 2006). Die Aquaporine kommen in unterschiedlichen Geweben vor (Tabelle 2).

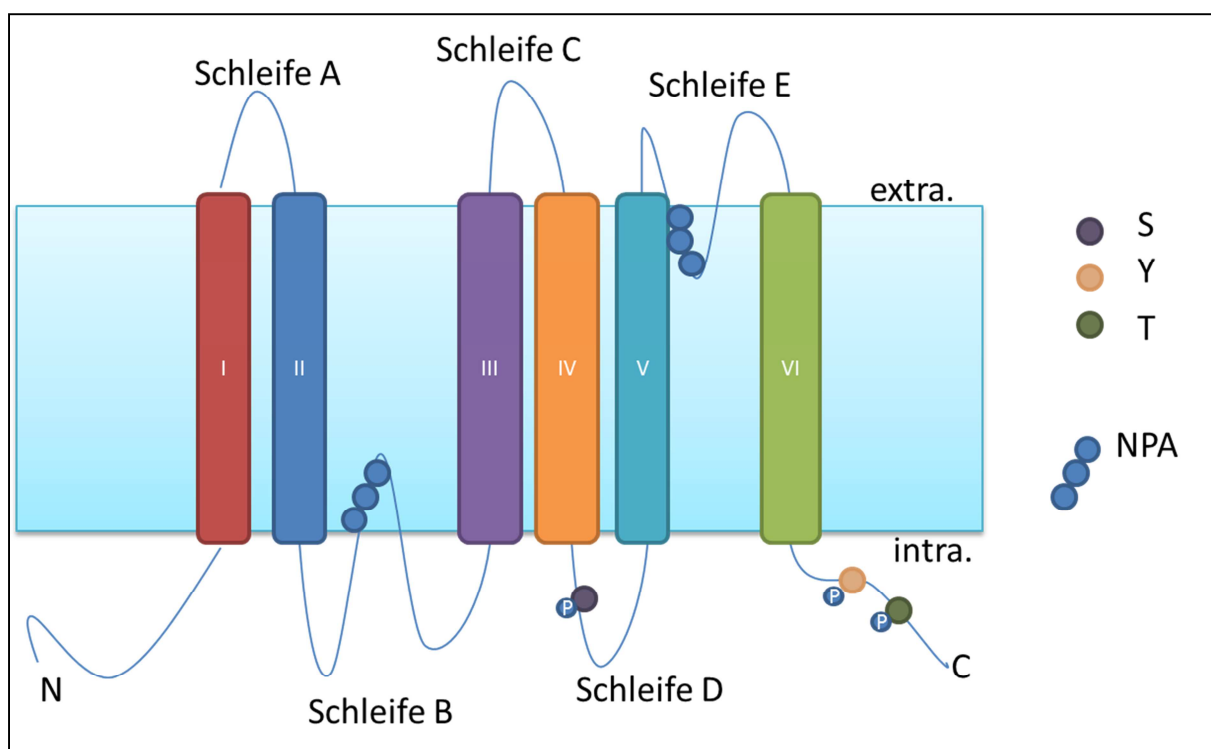


**Tabelle 2: Übersicht über die humanen Aquaporine, ihre chromosomale Lokalisation, ihre Permeabilität sowie die Gewebeverteilung (King et al. 2004, Ishibashi et al. 2013)**

<b>Aquaporin</b>	<b>Chromosom</b>	<b>Permeabilität</b>	<b>Gewebeverteilung</b>
AQP0	12q13	Wasser (gering)	Augenlinse
AQP1	7p14	Wasser (hoch)	Erythrozyten, Lunge, Niere, Gehirn, Auge, Endothel
AQP2	12q13	Wasser (hoch)	Niere, Samenleiter
AQP3	9p13	Wasser (hoch), Glycerol (hoch), Harnstoff (moderat)	Niere, Haut, Lunge, Auge, gastrointestinal Trakt
AQP4	18q22	Wasser (hoch)	Gehirn, Muskel, Niere, Lunge, gastrointestinal Trakt
AQP5	12q13	Wasser (hoch)	Sekretorische Drüsen, Lunge, Auge, Lymphozyten
AQP6	12q13	Wasser (gering), Anionen (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> > Cl <sup>-</sup> )	Niere
AQP7	9p13	Wasser (hoch), Glycerol (hoch), Harnstoff (hoch),	Fettgewebe, Niere, Hoden
AQP8	16p12	Wasser (hoch)	Niere, Leber, Pankreas, Hoden, gastrointestinal Trakt
AQP9	15q22	Wasser (gering), Glycerol (hoch), Harnstoff (hoch)	Leber, Leukozyten, Gehirn, Hoden
AQP10	7q21	Wasser (gering), Glycerol (hoch), Harnstoff (hoch)	gastrointestinal Trakt
AQP11	11q13	Wasser (hoch), Glycerol ?	Gehirn, Leber, Niere, Hoden
AQP12	2q37	Noch nicht bekannt	Pankreas

Aquaporine sind ubiquitär im menschlichen Organismus verteilt und die meisten AQPs sind weder gewebe- noch organspezifisch. Die Stärke der AQP-Expression ist

jedoch Abhängig von der Stimulation. So findet man unter physiologischen Bedingungen AQP5 in sekretorischen Drüsen, in der Lunge und in unreifen dendritischen Zellen, aber unter Inflammation beispielsweise auch in aktivierten B- und T-Zellen (Moon et al. 2004). Jedes Aquaporin hat aufgrund seiner Gewebeverteilung eine bestimmte Funktion (Gomes et al. 2009). So ist AQP1 beispielsweise wichtig für die Wasserwiederaufnahme in der Niere (Bondy et al. 1993) und AQP7 ist in Adipozyten für die Glycerolausscheidung entscheidend und spielt damit eine Rolle im Fettstoffwechsel (Rodriguez et al. 2006). Alle Aquaporine weisen eine ähnliche proteinchemische Struktur auf, welche in der Abbildung 2 dargestellt ist.

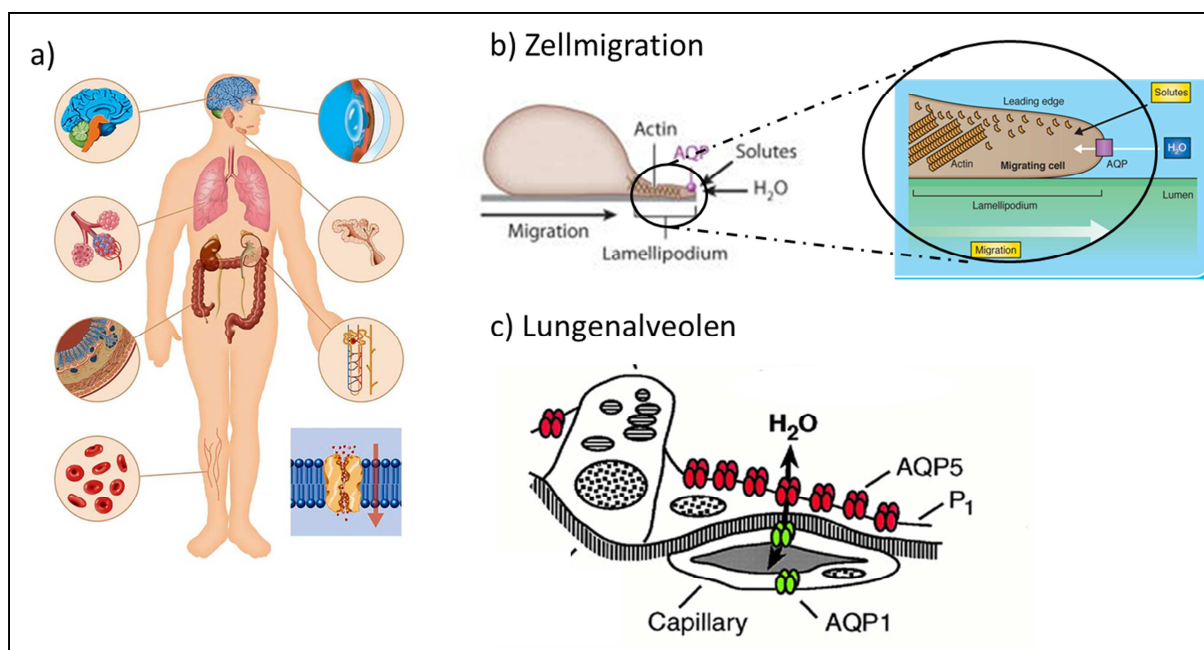


**Abbildung 2: Struktur der Aquaporine:** Aquaporine bestehen aus sechs membrandurchspannenden Domänen (I bis VI), welche durch die Schleifen A bis E verbunden sind. In Schleife B und E befindet sich das Asparagin-Prolin-Alanin (NPA) Strukturmotiv. Die Aminosäuren Serin 156 (S), Tyrosin 243 (Y) und Threonin 259 (T) stellen putative Phosphorylierungsstellen (P) dar. Intra.: intrazellulärer Raum, extra.: extrazellulärer Raum. Modifiziert nach Kruse (Kruse et al. 2006)

Allen Aquaporinen ist gemeinsam, dass sie eine analoge Struktur sowie Aminosäuresequenz aufweisen. Sie bestehen aus 236 bis 342 Aminosäuren mit 6 membrandurchspannenden Domänen. Die eigentliche Pore bilden die beiden Schleifen B und E. Der Amino- sowie der Carboxyterminus besitzen eine sehr ähnliche Aminosäuresequenz. Des Weiteren haben beide Enden ein charakteristisches Strukturmotiv, welches aus den drei Aminosäuren Asparagin-Prolin-Alanin besteht (Abbildung 2). Dieses Motiv trägt wesentlich zur Selektivität des

Wasserkanals bei (Verkman 2011), indem einzelne Wassermoleküle mit den Asparagin Seitenketten interagieren. Die positiv geladenen Asparagin Seitenketten bilden eine Wasserstoffbrückenbindung mit dem Wassermolekül aus. Dadurch wird das Wassermolekül in die richtige Orientierung gebracht und kann so den Kanal passieren (Kruse et al. 2006).

Von physiologischer Bedeutung sind die Aquaporine vor allem in Geweben mit hohem physiologischem Wassergehalt. Beim Menschen regulieren die Aquaporine beispielsweise den Wasserhaushalt der Erythrozyten sowie von renalen Zellen, Augenlinse, Gehirn und der Schnecke des Innenohrs. In Lebergallengängen und Gallenblase regulieren Aquaporine die Konzentration und Sekretion der Gallenflüssigkeit (Agre 1998, Krane et al. 2001a, Verkman et al. 2000). In den Zellen der Blutkapillaren regeln sie Ein- und Austritt der Zwischenzellflüssigkeit. In der Lunge beeinflussen sie mit anderen Salz- und Wassertransportsystemen den Wasseraustausch zwischen Interstitium und Alveolen (Towne et al. 2000, Towne et al. 2001, Ma et al. 2000) (Abbildung 3). In Granulozyten, Lymphozyten und Tumorzellen sind Aquaporine für die Ausbildung der Lamellipodien verantwortlich, die wiederum für Zellmigration und Zellproliferation essentiell sind (Papadopoulos et al. 2008, Verkman 2006).



**Abbildung 3: Physiologische Rolle der Aquaporine** a) Funktionen der Aquaporine im Körper. Aquaporine regulieren den Wasserhaushalt im Gehirn in den Alveolen, im Darm, in den Erythrozyten, im Auge, in den Speicheldrüsen und in den Nieren. b) Rolle der Aquaporine in der Zellmigration c) Rolle der Aquaporine beim Wasseraustausch in den Lungenalveolen (www. fineartamerica.com, (Verkman 2011, Nielsen et al. 1997)).

Zunächst soll nun die Rolle der Aquaporine auf Zellmigration und Zellproliferation genauer betrachtet werden, da diese Prozesse auch in der Inflammation eine wichtige Rolle spielen.

### **1.3.1 Aquaporine in Zellmigration und Zellproliferation**

Die Zellmigration ist ein Prozess, der auf dem zyklischen Auf- und Abbau von Membranausstülpungen beruht (Schafer et al. 2009, Schwab, Stock 2014). Diese Ausstülpungen werden Lamellipodien genannt und kommen durch die ständige Polymerisation und Depolarisation von Aktinfilamenten zu Stande (Schwab, Stock 2014). Die Interaktion der Aktinfilamente mit Motorproteinen, wie beispielsweise Myosin, generieren eine Kraft, die zur Bewegung der Zelle führt (Schwab, Stock 2014). Damit die Lamellipodien ausgebildet werden können, ist ein Volumenanstieg notwendig. Zunächst kommt es zu einem Ioneneinstrom in die Zelle. Dieser bewirkt, dass ein osmotischer Gradient entsteht (Papadopoulos et al. 2008). Dadurch strömt Wasser in die Zelle ein, das Volumen vergrößert sich und die Ausstülpung entsteht. Der Wassereinstrom wird durch die Aquaporine ermöglicht. Nun polymerisieren Aktinfilamente, um die Ausstülpung zu stabilisieren (Abbildung 3). Der Prozess beginnt von neuem, indem neue Ionen einströmen (Papadopoulos et al. 2008).

Die Rolle der Aquaporine bei der Zellproliferation ist vor allem durch den Glyceroleinstrom bedingt (ves-Filho et al. 2008). Durch Glycerol wird in der Zelle der Adenosintriphosphat (ATP)-Gehalt erhöht, was zu einer verstärkten Zellproliferation führt (Verkman et al. 2008). Außerdem wird vermutet, dass Aquaporine einen direkten Einfluss auf die Zellproliferation haben könnten. Die Phosphorylierung der PKA-Konsensussequenz der Aquaporine, die sich in Schleife D an den Positionen 153 bis 156 (RRTS, Abbildung 2) befindet, führt zur Aktivierung des Ras-Signalwegs, welcher wiederum die Zellproliferation induziert (Woo et al. 2008b).

Änderungen in der Expression oder der Proteinstruktur von Aquaporinen können daher prinzipiell nachhaltige Auswirkungen auf Grundprozesse der Inflammation oder Krankheitsverläufe haben, indem sie die Zellmigration und Proliferation beeinflussen. Insbesondere die Assoziation eines Promotorpolymorphismus im AQP5-Promotor mit der Letalität bei der schweren Sepsis warf die Frage auf, über welchen Mechanismus AQP5 mit der Sepsis verknüpft ist. Aus diesem Grund wird im Folgenden AQP5 näher erläutert.

### 1.3.2 Aquaporin 5

Bei Aquaporin 5 (AQP5) handelt es sich um ein Wasserkanalprotein, welches in zahlreichen Geweben exprimiert wird, wie beispielsweise in Speicheldrüsen (Borok et al. 2000, Yamamura et al. 2012, Yao et al. 2010), in der Lunge (Verkman et al. 2000, Rump et al. 2013), in der Niere (Day et al. 2013), in der Haut (Day et al. 2013) und in Lymphozyten (Moon et al. 2004). AQP5-defiziente Mäuse zeigen vermehrt ein akutes Lungenversagen, eine Hyperreagibilität des Atemtraktes auf chemische Reize, Hornhautveränderungen (Thiagarajah, Verkman 2002), eine erhöhte Kariesrate (Culp et al. 2005) sowie eine verminderte Fähigkeit der Drüsen zur Sekretion (Song, Verkman 2001). Eine veränderte AQP5-Expression spielt auch bei der Tumorgenese sowie der Tumorprogression bei Kolon- (Moon et al. 2003) und Ovarialkarzinom (Yang et al. 2006) eine Rolle. Dabei scheint die Interaktion von AQP5 mit dem Ras-Signaltransduktionsweg wichtig zu sein (Woo et al. 2008b, Woo et al. 2008c). Woo et al. (2008) konnten durch eine gezielte Mutation zeigen, dass die Phosphorylierung einer Phosphorylierungs-Konsensussequenz in der Schleife D des AQP5- Proteins durch die Phosphokinase A der Ras-Signalweg aktiviert wird (Woo et al. 2008a). Hieraus resultierte eine vermehrte Zellproliferation und Zelltransformation (Woo et al. 2008c).

Ob AQP5 über den Ras-Signalweg auch die inflammationsbedingte Migration, Proliferation und Transformation von Immunzellen beeinflusst, wurde bislang noch nicht untersucht. Interessanterweise wird AQP5 in aktivierten Lymphozyten verstärkt exprimiert (Moon et al. 2004), sodass eine Rolle bei der Volumenregulation, Proliferation und Migration von Immunzellen denkbar ist (Moon et al. 2004, Chihara et al. 2013).

### 1.4 Regulation der AQP5-Expression und beteiligte Signalwege

Über die Regulation von AQP5 sowie seiner Rolle bei einer Sepsis ist noch wenig bekannt. Eine Verbindung zwischen AQP5 und inflammatorischen Prozessen bei einer Sepsis ist über LPS und den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B gegeben (Yao et al. 2010, Shen et al. 2010). Interessanterweise kann man die AQP5-Expression durch  $\beta$ 2- Mimetika regulieren (Adamzik et al. 2008, Sidhaye et al. 2005). Außerdem wird die AQP5-Expression auch über epigenetische Mechanismen reguliert (Yamamura et al. 2012, Nomura et al. 2007). Diese drei Regulationsprozesse sollen im Weiteren näher betrachtet werden.

#### 1.4.1 Epigenetische Regulation der AQP5-Expression

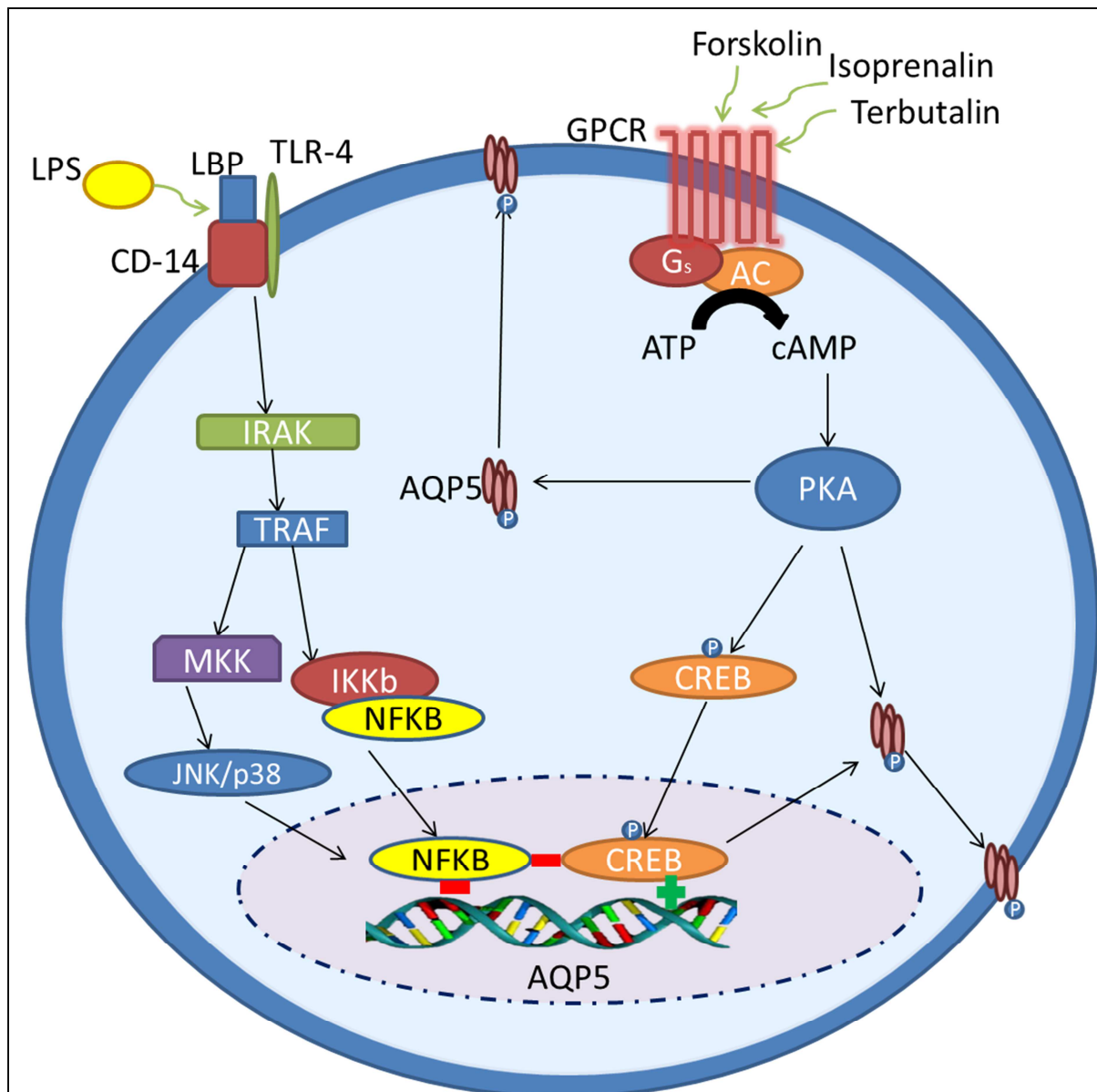
Epigenetische Veränderungen stellen Veränderungen in der Genfunktion dar, welche nicht auf Änderungen der Basenabfolge in der DNA-Sequenz, sondern auf anderen Modifikationen an der DNA beruhen (Feinberg 2007). Wichtige epigenetische Mechanismen sind die Methylierung von DNA, die Modifizierung von Histonen sowie die Regulierung durch nicht-codierende RNAs. Unter DNA-Methylierung versteht man den kovalenten Transfer einer Methylgruppe auf Cytosinen in CpG Dinukleotiden. DNA-Methylierung tritt bei Eukaryonten vor allem in nicht kodierenden DNA-Regionen auf, den CpG-Inseln in Promotoren, wo Methylierung zu einer Repression der Genexpression führen (Bayarsaihan 2011). Epigenetische Veränderungen spielen in zahlreichen zellulären Prozessen eine Rolle, so auch bei der Inflammation (Bayarsaihan 2011). Beispielsweise werden die Gene für TLR-2 und TLR-4 über Methylierung reguliert, was zu einer veränderten inflammatorischen Reaktion führt (Simon, Kingston 2009, Shuto et al. 2006). Darüber hinaus kann eine bakterielle Infektion den Methylierungszustand der DNA verändern (Barros, Offenbacher 2009). Auch die AQP5-Expression wird über Methylierung reguliert. So führt beispielsweise die Inkubation von Speicheldrüsenzellen mit einem DNA-Demethylierungsagens zu einer erhöhten AQP5-Expression (Motegi et al. 2005). Die erhöhte AQP5-Expression bei Demethylierung des AQP5-Promotors wird durch die Bindung des Transkriptionsfaktors SP-1 vermittelt, dessen Bindung nur bei Demethylierung möglich ist (Nomura et al. 2007). Über die Rolle der Methylierung des AQP5-Promotors bei der Inflammation ist noch nichts bekannt und auch der Methylierungsstatus des AQP5-Promotors in Immunzellen ist bis dato noch nicht aufgeklärt.

#### 1.4.2 Regulation der AQP5-Expression durch LPS und $\beta$ 2-Mimetika

Bekannt ist, dass die AQP5-Expression auf Gen- sowie Proteinebene durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und  $\beta$ -adrenerge Agonisten wie Forskolin, Terbutalin und Isoprenalin gesteigert werden kann (Sidhaye et al. 2005, Yang et al. 2003, Dong et al. 2012). Eine Aktivierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren führt in der Zelle zur Aktivierung der Adenylatzyklase, wodurch die cAMP Konzentration im Zytosol erhöht und die Proteinkinase A aktiviert wird (Kobilka 1992). Im weiteren Verlauf der Signalkaskade führt die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Phosphorylierung von AQP5. Dies hat einen Einfluss auf die Zellproliferation (Woo et

al. 2008b) und Membrantranslokation von AQP5 (Yang et al. 2003). Ebenfalls phosphoryliert die Proteinkinase A den Transkriptionsfaktor cAMP response element-binding protein (CREB), welcher dadurch dimerisiert, in den Zellkern transloziert und dort an cAMP response Elements (CRE) der DNA bindet (Hoeffler et al. 1988). Die Bindung von CREB an die Promotorregion von AQP5 induziert die AQP5-Expression (Wang, Zheng 2011b) (Abbildung 4). Für diese Induktion ist zusätzlich der Koaktivator CREB binding Protein (CBP) notwendig, welcher die Bindung von CREB an den Transkriptionsstartpunkt vermittelt (Tang, Goldberg 2012).

LPS hingegen führt in unterschiedlichen Geweben, wie zum Beispiel der Lunge, zu einer verminderten AQP5-Expression (Jiao et al. 2002, Jin et al. 2013). Dieses geschieht zum einen über IL-1 $\beta$ , welches die CREB Phosphorylierung inhibiert, oder durch NF $\kappa$ B, welches direkt an *CBP* bindet (Wang, Zheng 2011a). In SPC-A1 Zellen wird die Expression von AQP5 durch LPS über den p38/JNK Signalweg inhibiert (Shen et al. 2010, Shen et al. 2012). Auch eine direkte Bindung von NF $\kappa$ B an den AQP5-Promotor, bei der auch C-Fos/c-Jun beteiligt ist, inhibiert die AQP5-Expression (Yao et al. 2010). Ein weiterer Downstream-Effektor des LPS- Signalwegs ist das Cytokin TNF- $\alpha$ , welches die Expression von AQP5 über den epigenetischen Mechanismus der Suppression von der Acetylierung von Histon H4 inhibiert (Yamamura et al. 2011). Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie, dass LPS zu einer verstärkten Membrantranslokation von AQP5 führt (Ohinata et al. 2005). Dieses ist aber nicht auf eine erhöhte mRNA Expression zurückzuführen, sondern vielmehr auf eine Aktivierung der p38 MAP-Kinase (Ohinata et al. 2005), welche AQP5 phosphoryliert und die Membrantranslokation induziert. Die Phosphorylierung der Aquaporine und speziell von AQP5 ist damit essentiell für die Membrantranslokation und stellt somit einen wichtigen regulatorischen Mechanismus der AQP5-Fuktion dar (Nedvetsky et al. 2009) (Abbildung 4).



**Abbildung 4: AQP5-Signalwege.** Die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) mit Forskolin, Isoprenalin und Terbutalin führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase (AC), welche durch Bildung von cAMP die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Diese phosphoryliert AQP5 und induziert damit die Membrantranslokation. Außerdem wird durch die PKA der Transkriptionsfaktor CREB aktiviert, welcher die AQP5-Expression induziert (+). LPS welches an das LPS-Bindungsprotein (LBP) bindet, bindet an CD-14 und TLR-4 und induziert somit die Aktivierung verschiedener Kinasen und anderer Faktoren (Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK), TNF receptor associated factor (TRAF), Mitogen-activated protein kinase kinase (MKK) c-Jun N-terminal kinases (JNK), wozu es schließlich zur Dissoziation von NFkB und Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKKB) kommt und NFkB in den Kern transloziert. NFkB inhibiert CREB und bindet an den AQP5 Promotor, wodurch die Expression gehemmt wird (modifiziert nach: Ohinata et al. 2005, Nedvetsky et al. 2009, Shen et al. 2010, Wang et al. 2013, Yang et al. 2003).

LPS und  $\beta$ 2-Mimetika, vermittelt durch den Downstream-Effektor cAMP, haben gegensätzliche Effekte auf die AQP5-Expression.  $\beta$ 2-Mimetika stellen somit putative Antagonisten zu AQP5-vermittelten Mechanismen bei der Sepsis dar. Aus diesem Grund soll im Folgenden die Auswirkung der  $\beta$ 2-Mimetika auf inflammatorische Signalwege näher betrachtet werden.



### 1.4.3 $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren und die Kontrolle von inflammatorischen Signalwegen

Adrenerge Rezeptoren werden auf zahlreichen Zelltypen exprimiert und durch Katecholamine wie Adrenalin oder Noradrenalin stimuliert (Swaminath et al. 2004, Reiner et al. 2010). Sie werden in zwei Klassen eingeteilt: die  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren mit insgesamt neun Subklassen (Kobilka 1992). Auf Immunzellen, wie neutrophilen und dendritischen Zellen, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten wird vor allem der Rezeptor des  $\beta$ 2-Subtyps exprimiert (Elenkov et al. 2000).

Bei  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptoren handelt es sich um membranständige Proteine, welche aus sieben membrandurchspannenden  $\alpha$ -Helices bestehen und zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren zählen (Krauss 2008). Sie koppeln im aktivierten Zustand an G-Proteine der Klasse  $G_{\alpha_s}$  an. Diese Kopplung führt zu einer Aktivierung der Adenylatzyklase, was wiederum zur Bildung von cAMP und zur Aktivierung der Proteinkinase A führt (Abbildung 4). Durch die Proteinkinase A werden unterschiedliche Proteine, wie z. B. die Klasse C L-Typ Calcium-Kanäle phosphoryliert, wodurch die  $Ca^{2+}$ -Konzentration in der Zelle ansteigt.  $\beta$ 2-adrenergen Rezeptoren werden durch die körpereigenen Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin aktiviert (Krauss 2008). Sie sind aber auch wichtige pharmakologische Targets und zu ihren Agonisten zählen beispielsweise Fenoterol und Terbutalin (Guimaraes, Moura 2001). Auch bei der Beeinflussung der AQP5-Expression scheinen  $\beta$ 2-Agonisten potentielle Targets darzustellen (siehe 1.4.2). Im Folgenden soll nun näher auf die Rolle von  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren und die Kontrolle von inflammatorischen Signalwegen eingegangen werden.

$\beta$ 2-Adrenorezeptoren haben *in vitro* häufig eine antiinflammatorische Rolle, deren Mechanismen allerdings *in vivo* nicht aufgeklärt sind (Sitkauskiene, Sakalauskas 2005). Die antiinflammatorische Wirkung von  $\beta$ 2-Agonisten ist sehr vielfältig und kommt in zahlreichen Immunzellen vor (Theron et al. 2013). Beispielsweise wird durch die Stimulation mononukleärer Blutzellen mit Terbutalin die Expression des intrazellulären Adhensionsmoleküls-1 (ICAM-1) inhibiert, welches für die Migration von Leukozyten essenziell ist (Kuroki et al. 2004). Auch die LPS induzierte Expression der proinflammatorischen Cytokine IL-18, Interleukin-12 (IL-12) und TNF- $\alpha$  wird in Monozyten durch  $\beta$ 2-Agonisten inhibiert (Mizuno et al. 2005). Außerdem wirken  $\beta$ 2-Agonisten beispielsweise auch inhibitorisch auf die IL-8, IL-2, und IL-6 Produktion von Neutrophilen und Monozyten (Barnes 1999), sie hemmen die TNF- $\alpha$  Freisetzung

aus Mastzellen (Bissonnette, Befus 1997) und reduzieren die Chemotaxis von Neutrophilen und Eosinophilen (Theron et al. 2013). Im Gegensatz dazu wird die Expression des antiinflammatorischen Cytokins IL-10 in Monozyten und T-Zellen gesteigert (Theron et al. 2013). In T-Zellen werden weitere antiinflammatorische Mechanismen durch  $\beta$ 2-Agonisten hervorgerufen. So wird beispielsweise die Proliferation sowie die Sekretion der Cytokine IL-2, IL-3, IL-4 und IL-5 inhibiert (Johnson 2002).

Ein möglicher Mechanismus für den antiinflammatorischen Effekt in CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten Riether et al. (2011) aufklären. Sie fanden heraus, wenn man CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz von Ratten isoliert und diese simultan mit CD3/CD28 und mit dem  $\beta$ -AR Agonisten Terbutalin stimuliert, dass die IL-2 sowie INF- $\gamma$  Produktion und die Zellproliferation inhibiert werden. Sie entdeckten, dass die Proteinphosphatase Calcineurin (CaN) über den  $\beta$ 2/PKA abhängigen Mechanismus inhibiert wird. Durch die Calcineurin-Inhibition wurde der T-Zell-Rezeptor Signalweg gehemmt, was sich auf die Cytokinproduktion sowie Zellproliferation auswirkte (Rieher et al. 2011).

CaN spielt eine wichtige Rolle in inflammatorischen Signalwegen und wird auch in Neutrophilen, Monozyten und B-Zellen exprimiert (Rusnak, Mertz 2000). Dieser Mechanismus der CaN-Inhibition könnte somit auch in Neutrophilen, Monozyten, B-Zellen oder anderen Immunzellen die antiinflammatorischen Eigenschaften von  $\beta$ 2-adrenergen Agonisten erklären.

Aufgrund ihrer antiinflammatorischen Eigenschaften stellen  $\beta$ 2-adrenerge Agonisten potentielle Sepsistherapeutika dar.  $\beta$ 2-adrenerge Agonisten könnten beispielsweise die überschießende Immunreaktion zu Beginn einer Sepsis inhibieren und somit das Überleben verbessern.

## 1.5 Ziel der Arbeit

In unserer Arbeitsgruppe konnte erstmalig ein funktioneller Einzelbasenpolymorphismus (SNP) im AQP5-Promotor-Gen identifiziert werden. Durch Sequenzierung der AQP5-Promotorregion wurde der A(-1364)C Promotorpolymorphismus identifiziert. Der Austausch von A zu C ist mit einer verstärkten Transkriptionsfaktorenbindung, aber einer verminderten AQP5-Promotoraktivität unter stimulatorischen Bedingungen assoziiert (Adamzik et al. 2008). Außerdem zeigen C-Allelträger eine verringerte AQP5 mRNA Expression im menschlichen Herzen, wo Zellen rechter Herzohren von 66 Patienten mit koronarer Herzkrankheit untersucht wurden. Auch eine verminderte AQP5-Proteinexpression in den Erythrozytenmembranen aus gesunden Probanden konnte detektiert werden (Adamzik et al. 2008). Der AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus ist außerdem mit dem Überleben bei schwerer Sepsis assoziiert (Adamzik et al. 2011). Insbesondere das bessere Überleben von C-Allelträgern im Vergleich zu A-Allelträgern bei schwerer Sepsis, warf die Frage auf, ob diese Assoziation durch ein Kopplungsungleichgewicht mit einem anderen Zielgen bedingt ist, oder ob AQP5 ein Schlüsselprotein bei einer schweren Sepsis darstellt. Außerdem konnte der Transkriptionsfaktor, welcher stärker an das C-Allel bindet und zu einer verminderten Expression führt, noch nicht identifiziert werden. Die Frage des molekularen Mechanismus, der die verminderte Expression bedingt blieb bis dato also ebenfalls offen. Weiterhin ist noch wenig über die Regulation von AQP5 bei der Sepsis bekannt und der physiologische Mechanismus, der das bessere Überleben von C-Allelträgern bedingt konnte noch nicht aufgeklärt werden.

Ziel dieser Arbeit ist daher die Beantwortung dreier Fragenkomplexe:

- 1) Durch welchen molekularen Mechanismus ist der A(-1364)C Single Nucleotide-Polymorphismus (SNP) mit der AQP5-Expression verbunden?
- 2) Über welchen molekularen Mechanismus beeinflusst der AQP5 A(-1364)C SNP die Letalität bei schwerer Sepsis?
- 3) Beeinflusst die AQP5-Expression das Überleben im Sepsismausmodell und stellen  $\beta$ 2-Agonisten einen möglichen therapeutischen Ansatz dar?

Zur Beantwortung des ersten Fragenkomplexes sollen folgende Hypothesen überprüft werden:

1a) Das Bildungsverhalten von Transkriptionsfaktoren an die AQP5-Promotorregion um -1364 wird durch den Austausch von A zu C beeinflusst.

1b) Das Bindungsverhalten der Transkriptionsfaktoren beeinflusst die AQP5-Promotoraktivität und die AQP5-Expression.

Zur Testung dieser Hypothesen werden zunächst mittels *in silico*-Analyse Transkriptionsfaktoren ermittelt, welche um die Region AQP5 A(-1364) putative Bindungsstellen tragen. Anschließend soll deren Bindung mittels Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) analysiert und im Folgenden die Auswirkung der Bindung auf die Promotoraktivität mittels Luziferase-Assay bestimmt werden. Abschließend wird die Auswirkung der Transkriptionsfaktoren auf die AQP5-RNA- und Proteinexpression untersucht.

Als weiterer möglicher Regulationsmechanismus soll der epigenetische Mechanismus der DNA-Methylierung betrachtet werden. Dazu werden folgende Hypothesen getestet:

1c) Der AQP5 A(-1364)C- Promotorpolymorphismus ist mit dem Methylierungsmuster des AQP5-Promotors assoziiert.

1d) Die unterschiedliche Methylierung beeinflusst die AQP5-Expression in Immunzellen.

Zur Beantwortung des zweiten Fragenkomplexes sollen zwei mögliche Mechanismen betrachtet werden, über welche die AQP5-Expression die Sepsis beeinflussen könnte. Dazu werden folgende Hypothesen getestet:

2a) Der AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus ist mit der AQP5-Expression und Cytokinkonzentration im Blut septischer Patienten assoziiert.

2b) Der AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus ist mit der Migration neutrophiler Granulozyten assoziiert.

Hierbei soll zunächst untersucht werden, ob sich die Migration von neutrophilen Zellen gesunder Probanden mit unterschiedlichem AQP5 A(-1364)C-Genotyp unterscheidet. Kann hier ein Unterschied detektiert werden, soll im Folgenden die Migration unter Überexpression von AQP5 analysiert werden. Die dritte Hypothese lautet:

2c) Der AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus ist mit der Proliferation von Immunzellen assoziiert.

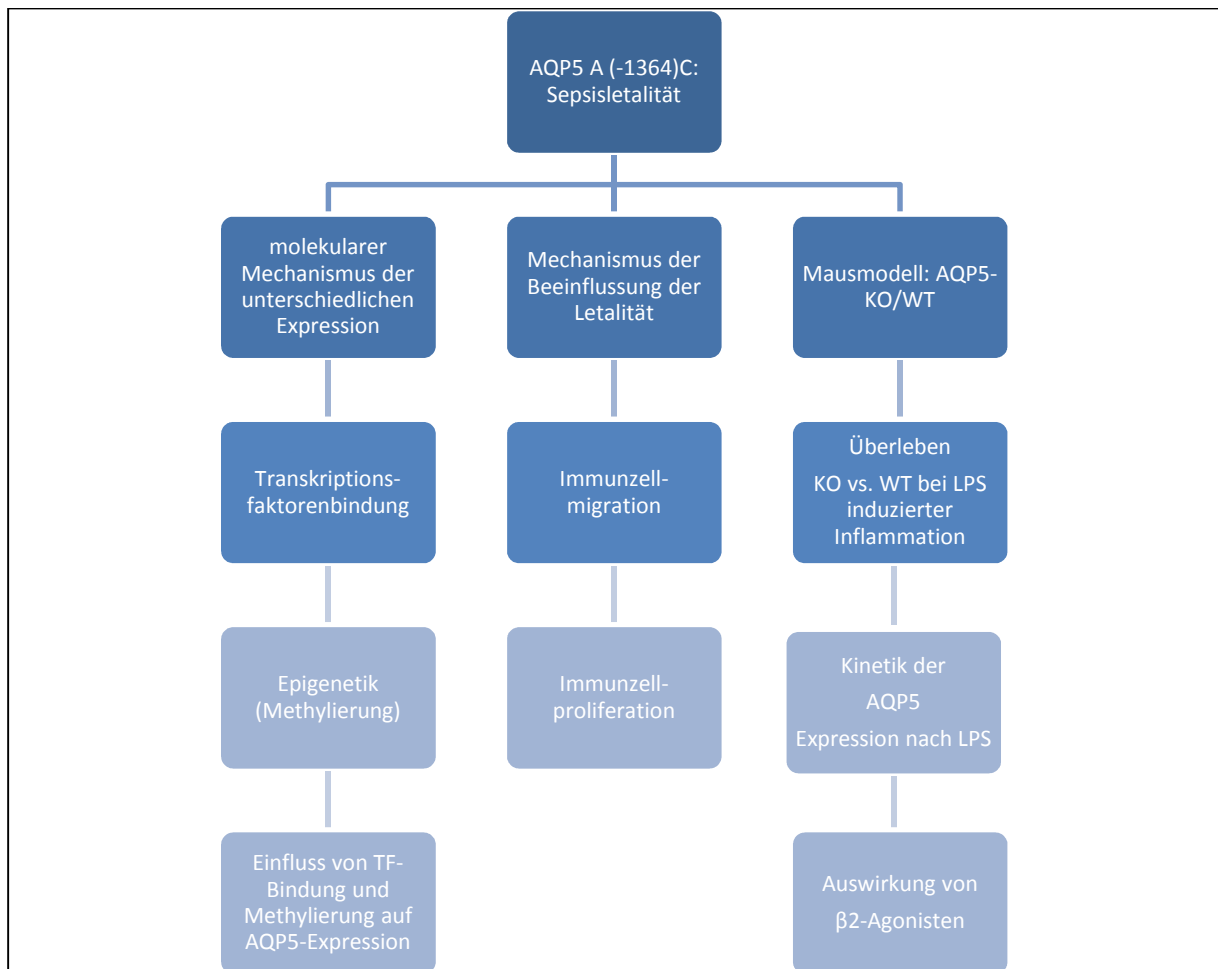
Auch die Proliferation soll an isolierten monozytären Zellen aus gesunden Probanden mit unterschiedlichem AQP5 A(-1364)C-Genotyp untersucht werden.

Zur Beantwortung des dritten Fragenkomplexes sollen die Hypothesen getestet werden:

3a) Das Überleben von AQP5-Knockout (KO) und AQP5-Wildtyp (WT)-Mäusen im Sepsismausmodell unterscheidet sich.

3b)  $\beta$ 2-Agonisten heben LPS-induzierte Effekte auf die AQP5-Expression auf.

Dabei wird die Kinetik der AQP5-Expression bei der Sepsis näher untersucht und  $\beta$ 2-Agonisten als mögliche Therapeutika getestet (Abbildung 5).



**Abbildung 5: Vorgehensweise bei der Untersuchung des Einflusses der AQP5-Expression und des AQP5 A(-1364) auf die Sepsisletalität**

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Verbrauchsmaterialien

<b>Material</b>	<b>Firma/Bezugsquelle</b>
Cryo tube vials	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen T25 und T75	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nylonmembranen	Ge-Healthcare, München
15 ml/50 ml Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
0,2 ml/ 1,5 ml Reaktionsgefäße	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
	StarLab, Hamburg
Whatman Protean PVDF Membran	Roth, Karlsruhe
Zellkulturinserts 8 µm	BD, Heidelberg

#### 2.1.2 Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Firma/ Bezugsquelle</b>
Analysenwaage	Sartorius, Köln
Autoklav	Fedegari, München
Brutschränke	Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen
Feinwaage	Kern, Balingen
Grobwaage	Sartorius, Köln
Heizblöcke	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA
Luminometer	Berthold Technologies, Köln
Magnetrührer	Heidolph, Schwabach

Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Mikrowelle	Lunik
Netzgeräte	LKB; Pharmacia, Stockholm, Schweden
Thermo-Cycler	Biometra (Uno, Unoll, Temperaturgradient), Jena
pH-Meter	Metrohm, Essen
Photometer	LKB, St. Paul, MN, USA
Pipetten	
(0.5-10, 5-40, 20-200, 200-1000 µl)	Labsystems, Finnpiquette, Schwerte
(0.5 – 10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schüttelwasserbad	IKA, Staufen
Sterilbank	Heraeus, MDH, Schwerte
UV-Fotoanlage	INTAS, Göttingen
Vortex Gerät	NeoLab, Heidelberg
Wasserbad	Köttermann, Bremen
Zellzähler	Merck, Millipore, Darmstadt
Megafuge 1.0R;	Heraeus, Schwerte
Omnifuge 2.0 RS	Heraeus, Schwerte
Biofuge pico, A bzw. 13	Heraeus, Schwerte
Zentrifuge 5417 C	Eppendorf, Hamburg

### 2.1.3 Chemikalien

Die Chemikalien wurden von den Firmen AppliChem, Boehringer, Difco, Fluka, Gibco-BRL, Merck, Noras, Roche, Roth, Serva und Sigma bezogen.

**2.1.4 Restriktionsenzyme**

<b>Enzym</b>	<b>Firma</b>
EcoRI	New England Biolabs
NotI	New England Biolabs
SpeI	New England Biolabs
BfuCI	New England Biolabs
NlaIV	New England Biolabs
BglII	New England Biolabs
EcoICRI	Fermentas

**2.1.5 Zellkulturreagenzien**

<b>Reagenz</b>	<b>Firma</b>
fMLP	Sigma-Aldrich, München
SDF-1 $\alpha$ (Stromal cell-derived factor-1 alpha) (CXCL12)	Prospec, East Brunswick, NY, USA
LPS <i>E. coli</i> 0111:B4	Sigma-Aldrich (L4391 für Zellkultur), München
LPS <i>E. coli</i> 0111:B4	Sigma-Aldrich (L3024 für <i>in vivo</i> Versuche), München
8-Br-cAMP	Sigma-Aldrich, München
Lectin from Phaseolus vulgaris (PHA-L)	Sigma-Aldrich, München (L2769)

**2.1.6 Oligonukleotide**

Alle verwendeten Oligonukleotide stammen von der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg.

**2.1.6.1 Oligonukleotide für Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Mittels bioinformatischer Methoden ([www.genomatix.com](http://www.genomatix.com), [www.patch.com](http://www.patch.com)) wurden putative Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren im AQP5-Promotor um den AQP5-Promotorpolymorphismus an Position -1364, sowie im Promotorbereich mit der höchsten basalen Promotoraktivität, ermittelt. Um die Bindung der



Transkriptionsfaktoren zu überprüfen, wurden Oligonukleotide generiert, die die putative Bindungssequenz sowie Position -1364 enthalten (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Oligonukleotide für die Überprüfung der Bindung der Transkriptionsfaktoren c-Myb, NFAT und NMP4 im AQP5-Promotor (-1340/-1380) um den A(-1364)C Promotorpolymorphismus. Die unterstrichenen Bereiche zeigen die direkten Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren an. In rot ist Position -1364 dargestellt.**

Zielgen und Oligonukleotidname	Sequenz (5' nach 3')
c-Myb	GA <u>ACTAAGACAGCAA</u> <b>A</b> AGGCAGGAAGGAAAAAC GA <u>ACTAAGACAGCAA</u> <b>C</b> AGGCAGGAAGGAAAAAC
NFAT	AG <u>ACAGCAA</u> <b>A</b> AGGCAGGAAGGAAAAACAGAA AG <u>ACAGCAA</u> <b>C</b> AGGCAGGAAGGAAAAACAGAA
NMP4 (ZNF384)	AC <u>AGCAA</u> <b>A</b> AGGCAGGAAGGAAAAACAGAAAATG AC <u>AGCAA</u> <b>C</b> AGGCAGGAAGGAAAAACAGAAAATG

Des Weiteren wurden drei Oligonukleotidpaare generiert, die putative Bindungsstellen für NMP4 in dem ATG nahen, hoch aktiven Promotorbereich (-470/-634) enthalten (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Oligonukleotide zur Untersuchung der Bindung von NMP4 im Bereich -470/-634**

Oligonukleotidname	Sequenz (5' nach 3')
NMP4.1	TCGCAGGAGGAAAAGGAGGAGCTGGACCAA
NMP4.2	<u>AGGAGCTGGACCAA</u> AGCCGAAGAGAAGAA
NMP4.3	GCCCGA <u>AAGAGAAGAAA</u> AGGGGAAGGCCGCG

### 2.1.6.2 Oligonukleotide für PCR und Real-Time-PCR

Im Folgenden sind die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide aufgelistet. (Tabelle 5).

Tabelle 5: Oligonukleotide zur PCR und Real-Time-PCR mit Zielgen, Sequenz, Annealingtemperatur, Produktgröße und Anwendung

Zielgen	Oligonukleotidname	Sequenz (5' nach 3')	Annealingtemperatur	Produktgröße	Anwendung
AQP5	AQP5-Taq-2-SE	CAACAACAACACAA CG	51°C	168 bp	RT-PCR
	AQP5-Taq-2-AS	TAGATTCCGACAAG GT			
B-Aktin human	ACTB_SE	CTGGAACGGTGAAG GTGACA	60°C	140 bp	RT-PCR
	ACTB_AS	AAGGGACTTCCTGT ACAATGCA			
RANKL human	RANKL-RT_Se	CAG CCT TTT GCT CAT CTC ACT ATT AA	60°C	79 bp	RT-PCR
	RANKL_RT_As	GGT ACC AAG AGG ACA GAC TCA CTT TA			
AQP5 Maus	AQP5_Maus-SE	CTCTGCATCTTCTCC TCCACG	62°C	355 bp	RT-PCR
	AQP5_Maus-AS	TCCTCTCTATGATCT TCCCAG			
B-Aktin, Maus	ACTB_Maus_SE _1	TTC GTT GCC GGT CCA CAC CC	62°C	88 bp	RT-PCR
	ACTB_Maus_AS _1	TTT GCA CAT GCC GGA GCC GT			
AQP5- Promotor	Neu_SE__Teil_1	AGGAAGAGGCTGGC AGAGGGAGAG GG	Slowdown	781 bp	Promotor- klonierung
	AQP5Teil_1.3_A S	CTGGGAGACGGGG CTCGGTC			
	AQPTeil2-SE	AGCCCTGCCTGACA AAC	63°C	741 bp	
	AQP5_Teil_2_AS	TCTGCCAGCCTCTT CCT			
	AQPTeil2-SE	AGCCCTGCCTGACA AAC	67°C	1511 bp	
	1.3_AS_short	CTGGGAGACGGGG			

		CT			
AQP5 human	AQP5-SE-tumor	GAAACTGCAGGATG AGAGAAAT	62°C	133 bp	AQP5 A(- 1364)C Genotyp- isierung
	AQP5-AS- Tumor_bio	TCTCTGTTCTCCACC TTCTCCA			
	AQP5-Seq	CAGAGAGACTAAGA CAGCA			
AQP5 Maus	Intron 3F:	ACC CCT TGACAGCGTCTC CA	60°C	230 bp beim WT- Allel 300 bp bei KO-Allel	Geno- typisierung Mäuse
	Intron 3R	GACAGGATTCCCAA TCCCAC			
	RPGKO	GCATGCTCCAGACT GCCTTGG			
AQP5 human	Meth_2_SE_neu	AAGATTGATTGATAG AAATAGATT T	53,6°C	320 bp	Methylierungs- analyse
	Meth_2_AS	CTAAACAATACCTAA ACTAAACAA C			
AQP5 human	Meth_3_Se_neu	GTTGTTTAGTTTAGG TATTGTTTAGTT AT	59°C	318 bp	
	Meth_3_AS	AACTTTTAATCCAAC TCCTCCTTT T			

Außerdem wurden folgende Oligonukleotide für die Methylierungsanalyse des AQP5-Promotors mittels RT-PCR und Pyrosequenzierung (PSQ) verwendet. Die Oligonukleotide für die PSQ wurden mit Hilfe der Primerdesignsoftware PyroMark Assay Design 2.0 erstellt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Oligonukleotide für Pyrosequenzierung**

Oligonukleotid -name	Sequenz (5' nach 3')	Annealing- temperatur	Produkt- größe	Anwendung
AQP5_M1_Se	GTTTATATCGTCGTTTGGGTTACG T	60°C	169 bp	Methylierungs- analyse mittels RT-PCR
AQP5_M1_As	AAACGACTCCTACGCTCGAA			
AQP5_U1_Se	GTTTATATTGTTGTTTGGGTTATG T	60°C	176 bp	
AQP5_U1_As	AAACAAAAACAACCTCCTACACTC A			
AQP5 F1-SE	TAGGGTGAGGGGTTTTTAGT	60°C	265 bp	Methylierungs- analyse mittels PSQ Teil 1

AQP5 bio_AS	R1	Biotin- AATAAACACCCTACCAACCTAC			
AQP5 S1		TTTTAGTAGGAAGAGGGA	Sequenzierprimer Teil 1 für PSQ		
Meth Teil 2 F1		GGTAGGTTGGTAAGGTGTTTGT TTTT	60°C	170 bp	
Meth Teil 2 R2 Bi		Biotin-ACCTTCCCCTTTTCTTCT			
Meth Teil 2 S2		GGTAGGATAGTTTTGTAGGATTT	Sequenzierprimer Teil 2 für PSQ		

### 2.1.7 Antikörper

Im Folgenden sind die verwendeten Antikörper für EMSA sowie dem Western Blot in tabellarischer Form aufgelistet (Tabelle 7).

**Tabelle 7: verwendete Antikörper. Sofern nicht anders angegeben bezieht sich die Verdünnung auf den Western Blot (WB)**

Antikörper	Klon	Markierung	Verdünnung	Firma
<b>AQP5</b>	G-19	keine	1:1000	Santa Cruz Biotechnology
<b>β-Aktin</b>	C4	keine	1:40000	Millipore
<b>c-Myb</b>	C-19	keine	1:10 (EMSA) 1:500	Santa Cruz Biotechnology
<b>NFAT</b>	H-74	keine	1:10 (EMSA) 1:500	Santa Cruz Biotechnology
<b>AQP1</b>	H-55	keine	1:100	Santa Cruz Biotechnology
<b>NMP4: ZNF384</b>	3545C5a	keine	1:10 (EMSA) 1:500	abCam
<b>IRDye 800CW Donkey anti-goat</b>	Polykonal	IRDye 800CW	1:4000	LI-Cor
<b>IRDye800CW Goat anti-rabbit</b>	Polykonal	IRDye800CW	1:4000	LI-Cor
<b>IRDye® 680RD Goat anti-mouse IgG</b>	Polykonal	IRDye 680RD	1:40000	LI-Cor

## 2.1.8 Medien

### 2.1.8.1 Medien für die Bakterienkultur

Die Medien für die Bakterienkultur wurden bei 121°C, bei 1,4 bar Überdruck und 20 Minuten autoklaviert. Das Endvolumen betrug in der Regel einen Liter.

Tabelle 8: Bakterienmedien

<b>Bakterienmedium, flüssig, nach Luria Bertani</b>	Tryptan	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	8 g
	ad 1 l H <sub>2</sub> O bidest.	
	Ampicillin	500 ng/ml
<b>Bakterienmedium, fest nach Luria Bertani</b>	Tryptan	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	8 g
	Agar-Agar	15 g
	ad 1 l H <sub>2</sub> O bidest.	
	X-Gal	40 mg/ml
	Ampicillin	500 ng/ml
<b>SOC-Medium</b>	Hefeextrakt	5 g
	Trypton	2% (w/v) (20 g/l)
	Natriumchlorid	10 mM (0,6 g/l)
	Kaliumchlorid	2,5 mM (0,2 g/l)
	Magnesiumchlorid	10 mM
	Magnesiumsulfat	10 mM
	Glucose	20 mM
	ad 1l H <sub>2</sub> O bidest	

### 2.1.8.2 Medien für die Zellkultur

Die Medien für die Zellkultur wurden steril filtriert eingesetzt (Filter: Ministar, Sartorius, Porengröße: 0,2 µm). Es wurden folgende Fertigmedien verwendet (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Medien für die Zellkultur**

Medium	Firma
DMEM Medium mit 4,5 g/l Glucose und L-Glutamin	PAA, Pasching
RPMI Medium mit L-Glutamin	PAA, Pasching
Fetales Kälberserum: Fetal Bovine Serum Gold (FKS)	PAA, Pasching
Penicillin/Streptomycin (1% Penicillin G/1% Streptomycin)	PAA, Pasching
Trypsin (1x)	PAA, Pasching
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Pasching
PBS (10x)	Gibco, Darmstadt
Accutase	Gibco, Darmstadt
Geneticin-Disulfat	Carl Roth, Karlsruhe

Die Medien wurden in folgenden Zusammensetzungen verwendet (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Medien**

Name	Zusammensetzung
DMEM voll	DMEM Medium 10 % FKS 1x Penicillin/Streptomycin
RPMI voll	RPMI Medium 10 % FKS 1x Penicillin/Streptomycin
Selektionsmedium für stabil transfizierte Jurkat Zellen	RPMI Medium 10 % FKS 1x Penicillin/Streptomycin 1 mg/ml Geneticin-Disulfat
RPMI leer	RPMI Medium
RPMI 1% FKS	RPMI Medium 1 % FKS

	1x Penicillin/Streptomycin
--	----------------------------

### 2.1.9 Verwendete Puffer

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Puffer mit Aqua bidest. hergestellt. Folgende Puffer wurden für die Durchführung eines Western Blots verwendet (Tabelle 11).

Tabelle 11: Puffer für Western Blot

Name	Substanz	Menge/Endkonzentration
<b>RIPA-Puffer</b>	Tris pH 7 – 8	50mM
	NaCl	150 mM
	SDS (20%)	0.1%
	Natriumdesoxycholat	0.5%
	NP-40	1%
	Complete Protease Inhibitor (Roche)	1 x
<b>Lämmli 3x (Laemmli, 1970)</b>	SDS (20%)	3 ml
	Glycerol	3 ml
	Tris (1M, pH Wert 6,8)	1,8 ml
	Aqua bidest	2,2 ml
	Bromphenol Blau	
	beta- Mercaptoethanol	300 µl
<b>Trenngelpuffer</b>	Tris-HCl (pH 9,0)	1,5 M
	TEMED	0,4%
	SDS (100%)	0,4 %
<b>Sammelgelpuffer</b>	Tris-HCl (pH 6,8)	0,14 M
	TEMED	0,11%
	SDS (100%)	0,11%
<b>5x Laufpuffer</b>	Tris-HCl	25 mM
	Glycin	50 mM
	SDS	0,1%

<b>Transferpuffer</b>	Glycin	192 mM
	Tris-HCl (pH 8,3)	25 mM
	SDS	0,1%
	Methanol	10 %
<b>PonceauS-Lösung</b>	PonceauS Farbstoff	0,5%
	Essigsäure	1%
<b>TBS</b>	Tris HCl	10 mM
	NaCl	150 mM
	pH 8 mit HCl	
<b>TBST</b>	TrisHCl	10 mM
	NaCl	150 mM
	pH8 mit HCL	
	Tween 20	0,05%

Daraus wurden folgende Gele zur Durchführung des Western Blots hergestellt (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Gele für Western Blot**

<b>Name</b>	<b>Substanz</b>	<b>Menge/Konzentration</b>
<b>Verschlussgel</b>	Trenngel-Puffer	1 ml
	Polyacrylamid (29:1)	1 ml
	APS (10%)	10 µl
	TEMED	10 µl
<b>Trenngel</b>	Trenngel-Puffer	1,88 ml
	APS (10%)	150 µl
	Polyacrylamid (29:1)	2,8 ml
	Aqua dest	10 ml
<b>Sammelgel</b>	Sammelgel-Puffer	1,25 ml
	Polyacrylamid (29:1)	1,28 ml
	Aqua dest.	7,28 ml



	SDS (10%)	100 µl
--	-----------	--------

Für die Durchführung eines EMSAs wurden folgende Puffer verwendet (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Puffer für EMSA**

Name	Substanz	Menge/Konzentration
<b>Maleinsäure-Puffer</b>	Maleinsäure	0,1M
	NaCl	0,15M
<b>Waschpuffer</b>	Maleinsäure-Puffer	
	Tween 20	0,3%
<b>Detektionspuffer</b>	Tris HCl pH 9,5	0,1 M
	NaCl	0,1 M

Daraus wurden folgende Gele hergestellt (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Gele für EMSA**

Name	Substanz	Menge/Konzentration
Verschlussgel	Resolving Puffer	3 ml
	Acrylamid 40 (29:1)	3 ml
	APS (10%)	30 µl
	TEMED	30 µl
Trenngel (6%)	10x Puffer TBE	2 ml
	Acrylamid-Bisacrylamid 40 (29:1)	2,9 ml
	40% Acrylamid	3,1 ml
	80% Glycerol	1,25 ml
	Aqua dest.	30,43 ml
	TEMED	0,02 ml
	APS (10%)	0,3 ml

### 2.1.10 Material für die Blutentnahme und die Zellaufreinigung

Tabelle 15: Material für die Blutentnahme und die Zellaufreinigung

Name	Firma
EDTA-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Venofix safty 21 G	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Polymorphprep	Fresenius Kabi Norge AS

### 2.1.11 verwendete Kits

Tabelle 16: Verwendete Kits

Verwendungszweck	Kit-Name	Firma
PCR-Amplifikation	Taq DNA Polymerase Master Mix Red	Ampliqon, Odense, Dänemark
Klonierung von DNA-Fragmenten	pGEM®-T Easy Vector System I	Promega, Fitchburg, USA
Plasmidpräparation	QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Plasmidpräparation	QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Real-Time-PCR	QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNA-Aufreinigung aus Blut, Wangenabstrich und Ohrbiopsien der Maus	QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
DNA-Aufreinigung	DNA Clean & Concentrator	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
DNA-Gelaufreinigung	Zymoclean™ Gel DNA Recovery	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
Bisulfitkonversion	EZ DNA Methylation-Gold	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
PCR-Amplifikation nach Bisulfitkonversion	ZymoTaqPreMix	Zymo Research, Freiburg, Deutschland
Messung der Cytokine IL-1-β, IL-10 und TNF-α im Mausserum	LEGEND Max Elisa	BioLegend, San Diego, USA
Proliferation von monozytären Zellen	CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega, Fitchburg, USA
Luziferaseaktivität von Promotorkonstrukten	Dual-Glo Luziferase Assay	Promega, Fitchburg, USA

### 2.1.12 Patientenmaterial für die Untersuchung der AQP5 mRNA Expression und Methylierung

Als Untersuchungsmaterial diente Blut von Patienten mit schwerer Sepsis. Dieses Blut wurde innerhalb von 24 Std. nach dem Erfüllen der Sepsis-Kriterien nach Bone (Bone et al. 1997) entnommen. Als Kontrollgruppe diente das Blut von Patienten, die 24 Std. vorher eine Operation hatten (postoperative Patienten, POP), aber keine Sepsis entwickelten. Aus diesem Vollblut wurden RNA, DNA und Serumüberstände gewonnen. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben. RNA und DNA wurden bei -20°C gelagert und Serumüberstände bei -80°C.

### 2.1.13 Verwendeter Bakterienstamm

Als Bakterienstamm wurde der E.coli Stamm DH5 $\alpha$  (Life Technologies) verwendet.

Genotyp:

F-  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 endA1 hsdR17(rK-,mK+) phoA supE44  $\lambda$ - thi-1 gyrA96 relA1

### 2.1.14 verwendete Zelllinien

Folgende Zelllinien wurden verwendet (Tabelle 17).

Tabelle 17: verwendete Zelllinien

Name	Ursprung	Wachstum/Morphologie	Literatur
<b>HEK 293</b>	humane embryonale Nierenzellen (Epithelzellen)	adhärent und wachsen in Monolayern	(Graham et al. 1977)
<b>HELA-Zellen</b>	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	wachsen adhärent in Monolayern	(SCHERER et al. 1953)
<b>THP-1 Zellen</b>	humane monozytäre Leukämiezellen	wachsen in Suspension	(Tsuchiya et al. 1980)
<b>Jurkat Zellen</b>	immortalisierte T-Lymphozyten	wachsen in Suspension	(Gillis, Watson 1980)
<b>HL-60 Zellen</b>	neutrophile Vorläuferzellen einer Promyelozytenleukämie	wachsen in Suspension	(Collins et al. 1979)
<b>U937 Zellen</b>	humane monozytäre	wachsen in Suspension	(Bensimon, Rimbers

	Leukämiezellen		1977)
<b>REH Zellen</b>	Humane lymphoblastoide Leukämiezellen	wachsen in Suspension	(Sundstrom, Nilsson 1976)

### 2.1.15 verwendeter Mausstamm

Die verwendeten Mäuse stammen von Anil Menon, Cincinnati (Krane et al. 2001b). Es handelt sich dabei um AQP5<sup>+/+</sup> (Wildtyp) und AQP5<sup>-/-</sup> (Knockout) Mäuse, welche durch eine Blastozyteninjektion eines Knockout-Vektors generiert wurden. Die Mäuse tragen den genetischen Hintergrund 129SvJ x BlackSwiss.

### 2.1.16 Vektoren und Konstrukte

Folgende Vektoren wurden für die Klonierungsexperimente verwendet (Tabelle 18):

Tabelle 18: Vektoren zur Klonierung

Name des Vektors	Art des Vektors	Hersteller
<b>pGEM-T-easy</b>	Klonierungsvektor	Promega
<b>pGL4.10</b>	Reportergenvektor	Promega
<b>pGL4.74</b>	Kontrollvektor zur Reportergenfunktion	Promega
<b>pcDNA3.1</b>	Expressionsvektor	Invitrogen
<b>pReceiver-M02</b>	Expressionsvektor	GeneCopeia
<b>pReceiver-M09</b>	Expressionsvektor	GeneCopeia

Außerdem wurden folgende Konstrukte zur Überexpression des entsprechenden Zielgens verwendet (Tabelle 19).

Tabelle 19: Expressionskonstrukte

Zielgen	Name des Konstrukts/Katalognr.	Vektor	Ursprung
NFAT	NFAT-pcDNA3.1	pcDNA3.1	Klonierung im Institut für Pharmakogenetik

NMP4	NMP4_pReceiver EX-H1551-M02	pReceiver-M02	GeneCopeia
c-Myb	c-Myb_pReceiver EX-H3756-M02	pReceiver-M02	GeneCopeia
AQP5	AQP5_Preceiver EX-T1015-M09	pReceiver-M09	GeneCopeia

## 2.2 Methoden

Soweit nicht anders angegeben, stammt die Beschreibung aller Methoden aus „Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)“ (2012) von Michael R. Green und Joseph Sambrook (Autor) sowie aus „Der Experimentator-Molekularbiologie (6. Auflage)“ (2008) von Cornel Mülhardt.

### 2.2.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die Zellkulturarbeiten wurden alle unter einer Sterilbank durchgeführt. Die Materialien, die für die Arbeiten benötigt wurden, wurden entweder durch Autoklavieren, durch Behandlung mit Ethanol (70 % v/v) sterilisiert oder steril gekauft. Somit sollten Kontaminationen vermieden werden. Verpackungen, Medienflaschen oder Plastikmaterialien wurden vor dem Gebrauch mit 70 %igem Ethanol desinfiziert. Vor dem Beginn der Arbeiten wurden die Arbeitsflächen der Sterilbank wie auch die Handschuhe mit Ethanol desinfiziert. Mit Hilfe von Filtereinheiten (Filter: Ministar, Sartorius, Porengröße: 0,2 µm) mit niedriger Proteinbindungskapazität wurden unsterile Lösungen steril filtriert.

Die Zellen wurden in einem begasten (5% CO<sub>2</sub>) Brutschrank bei 37°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 80-90% kultiviert. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des “Muse Cell Analyzer” bestimmt.

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Säugetierzellen

HEK293 Zellen wurden in 20 ml DMEM Medium mit Zugabe von 2000 µl FKS und 200 µl Penicillin und Streptomycin kultiviert. Um die Teilungsaktivität der Zellen zu erhalten, wurden diese bei Erreichen des Konfluenzstadiums, zumeist alle 3 bis 4 Tage, gesplittet. Hierfür wurde das verbrauchte Medium entfernt, frisches Medium hinzu gegeben und in einem Verhältnis von 1:5 oder 1:6 gesplittet.

HeLa Zellen wurden in 20 ml RPMI Medium mit Zugabe von 2000 µl FKS und 200 µl Penicillin und Streptomycin kultiviert. Das Splitten erfolgte alle 3 bis 4 Tage im Verhältnis 1:2 bis 1:3.

THP-1 Zellen wurden in 20 ml RPMI mit Zugabe von 2000 µl Hitze-inaktiviertem FKS und 1 mM Na-Pyruvat sowie 200 µl Penicillin und Streptomycin kultiviert und alle 3 bis 4 Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:4 gesplittet.

Jurkat, REH, U937 und HL-60 Zellen wurden in 20 ml RPMI mit Zugabe von 2000 µl Hitze-inaktiviertem FKS sowie 200 µl Penicillin und Streptomycin kultiviert und alle 3 bis 4 Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:4 gesplittet.

### **2.2.2 Reporterassays (Luziferase Assays)**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Promotoraktivität des AQP5-Promotors unter Überexpression verschiedener Transkriptionsfaktoren mittels Luziferase Assay bestimmt. Das Prinzip des Assays basiert auf der Einklonierung von Promotorkonstrukten in Reportervektoren. Die Vektoren exprimieren unter der Kontrolle des eingebauten Promotors Luziferase. Die Stärke der Expression wird durch Zugabe eines Substrats gemessen, welches die Luziferase zu einem lumineszierenden Produkt umsetzt.

Dazu wurden die Reportervektoren pGL4.10 und pGL4.74 verwendet. Bei dem pGL4.10 Vektor handelt es sich um einen Vektor, mit dem die Promotoraktivität eines einklonierten DNA-Fragments (= Target-Promotor) gemessen werden kann. Der einklonierte Promotor kontrolliert die Expression des Luziferase Gens luc2. Dieses Gen kodiert ein Protein, die Firefly Luziferase. Diese setzt das Substrat Beetle Luciferin um, so dass Lumineszenz freigesetzt wird, welche gemessen werden kann. Die Stärke der Lumineszenz richtet sich also nach der Aktivität des Promotors. Wird kein Promotorelement einkloniert, so dient dieser Vektor als Negativkontrolle, da dieser selbst keine eukaryotischen Enhancer- und Promotorelemente besitzt. Der pGL4.74 Vektor ist ein Kontrollvektor, welcher in allen Experimenten ko-transfiziert wurde. pGL4.74 besitzt den Herpes Simplex Virus Thymidin Kinase (HSV-TK) Promotor, oberhalb des hRluc Gens. Dieser erzeugt eine geringe bis moderate Renilla Luziferase Expression in ko-transfizierten Säugetierzellen. Durch die Ko-Transfektion können die erhaltenen Aktivitätswerte verschiedener Wells miteinander verglichen werden, da unterschiedliche Transfektionseffizienzen korrigiert werden.

### 2.2.2.1 Umklonierung der AQP5-Promotorkonstrukte

Die putative AQP5-Promotorregion von nt-496/-1979 bezogen auf das Startcodon ATG lag in zwei teilweise überlappenden Fragmenten im pSEAP Vektor kloniert vor. Jedoch sollte die Promotorregion in den pGL4.10 Vektor umkloniert werden, da Luziferase-Messungen heute den Goldstandard bei Promotorcharakterisierungen darstellen und um beide Fragmente zu verbinden. Alle folgenden Schritte wurden jeweils im Doppelansatz durchgeführt, um jeweils ein Konstrukt mit AQP5 (-1364)A und eines mit AQP5 (-1364)C zu erhalten. Dazu erfolgte zunächst eine PCR-Amplifikation, um die Promotorfragmente in den Klonierungsvektor pGEMt-easy zu klonieren.

Die Amplifikation erfolgte mit der Pfu-DNA-Polymerase nach folgendem PCR-Ansatz (Tabelle 20):

**Tabelle 20: PCR-Ansatz zur Promotorklonierung**

Pfu- Buffer(10x)	5 µl
MgSO <sub>4</sub>	3 µl
DMSO	2,5µl
dNTP-Mix (10mM)	1,5 µl
Pfu-Polymerase	1 µl
Primer SE	2 µl
Primer AS	2 µl
Aqua dest	31 µl
DNA-Template	2 µl

Dabei erfolgte die Amplifikation des ersten Teils mit den Primern Neu\_SE\_\_Teil\_1 und AQP5Teil\_1.3\_AS mit einer Slowdown-PCR (Frey et al. 2008) nach folgendem PCR-Protokoll (Tabelle 21):

**Tabelle 21: Protokoll für Slowdown-PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zurück zu	Anzahl Wdh.	Temperaturänderung/ Zyklus
1	95°C	5 Min.			

2	95°C	30 Sek.			
3	70°C	30 Sek.			-1°C
4	72°C	1 Min.			
5	95°C	30 Sek.			
6	70°C	30 Sek.			-1°C
7	72°C	1 Min.			
8	95°C	30 Sek.			
9	70°C	30 Sek.			-1°C
10	72°C	1 Min.	2	20	
11	95°C	30 Sek.			
12	54°C	30 Sek.			
13	72°C	1 Min.	11	20	
14	72°C	10 Min.			

Die Amplifikation des zweiten Teils erfolgte mit den Primern AQP5\_Teil2-SE und AQP5\_Teil\_2\_AS mittels einer Standard-PCR und einer Annealingtemperatur von 63°C. Da die beiden herausamplifizierten Fragmente sich teilweise überlappten, erfolgte die Ligation der beiden Fragmente durch eine „*Splicing by overlap extension-PCR (SOE)*“ (Heckman, Pease 2007), mit den Primern AQP5\_Teil2-SE und 1.3\_AS\_short. Anschließend wurde das PCR-Produkt aufgereinigt. Für die Klonierung sollte das nun zusammenhängende Fragment in den Klonierungsvektor



pGEMt-easy genau nach Herstellerangaben (Promega) einkloniert werden. Zur einfachen Klonierung und zur Verhinderung einer Selbstligation besitzt der Vektor an beiden 3'-Enden Thymidin-Überhänge. Da die *Pfu*-Polymerase im Gegensatz zur *Taq*-Polymerase kein Adenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts hängt, musste dieses zunächst angefügt werden. Dazu erfolgte das sogenannte A-Tailing mit anschließender Ligation in den pGEMt-easy Vektor. Anschließend erfolgte die Umklonierung aus dem pGEMt-easy Vektor in den pGI4.10 Vektor. Es wurden jeweils die 3'-Enden des Fragments und die 5' Enden des pGL4.10 Vektors ohne Überhang (blunt) geschnitten und an den jeweils gegenseitigen Enden komplementäre Überhänge erzeugt. Dazu wurde das Fragment im pGEMt-easy Vektor mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdaut, worauf eine Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment erfolgte. So entstand das Ende ohne Überhang. Dieses wurde im pGL4.10 Vektor durch den Verdau mit *KpnI* und Klenow-Reaktion erreicht. Die komplementären Enden von Fragment und Vektor wurden durch den Verdau des Fragments mit *SpeI* und des Vektors mit *NheI* erzeugt. Dann erfolgte die Ligation des Konstrukts nt-469/-1979 mit dem Vektor.

Um die Promotorregion um den Polymorphismus genauer charakterisieren zu können, wurden Deletionskonstrukte erstellt, die jeweils einen kleinen Bereich des Promotors um den Polymorphismus abdecken. Dazu wurde das Gesamtfragment (nt-496/-1979) zunächst mit *EcoRI* aus dem pGEM-T easy Vektor herausgeschnitten. Anschließend erfolgte ein Verdau mit *BfuCI* und *NlaIV*. Der pGL4.10 wurde mit *EcoICRI* und *BglII* verdaut und das Konstrukt (nt-1144/-1734) konnte einligiert werden. Die Generierung der Konstrukte -934/-1878 erfolgte mittels Verdau durch *Sall* und *DraI*, wobei der Vektor durch Verdau mit *XhoI* und *EcoICRI* auf die folgende Ligation vorbereitet wurde. Die Umklonierung des Promotorkonstrukts mit der höchsten Aktivität (nt-470/-634) erfolgte direkt aus dem pSEAP Vektor. Hierfür musste das Promotorkonstrukt aus dem pSEAP Vektor mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* herausgeschnitten werden. Anschließend erfolgte die Auffüllreaktion mit dem Klenow-Fragment, das Konstrukt wurde mit *SpeI* geschnitten, währenddessen der Vektor pGI4.10 mit *KpnI* geschnitten wurde. Dann wurde das Konstrukt in den Vektor ligiert.

Es entstanden somit folgende AQP5-Promotorkonstrukte (Tabelle 22):

Tabelle 22: AQP5-Promotorkonstrukte in pGI4.10

Name	Beginn und Ende der Sequenz (ATG = 0)	Genotyp AQP5 A(-1364)C
AQP5-kurz_C 86	nt-1144/-1734	C
AQP5_kurz_A_91	nt-1144/-1734	A
AQP5_lang_A_23	nt-934/-1878	A
AQP5_lang_C_34	nt-934/-1878	C
Lang 2a2_AGenotyp	nt-469/-1979	A
Lang_1a1_C-Gnotyp	nt-469/-1979	C
Kurz_3d5	nt-470/-634	-

Im Folgenden werden nun die einzelnen Schritte der Klonierung näher beschrieben.

#### 2.2.2.1.1 Transformation in *E.coli* DH5 $\alpha$ /DH5 $\alpha$ T<sub>1</sub>

Die Aufnahme von Plasmid-DNA durch kompetente Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Die Plasmid-DNA kann dann im Bakterium *Escherichia coli* vermehrt werden. Der Bakterienstamm (DH5 $\alpha$ , Life Technologies) war zur besseren Anheftung des Plasmids an die Außenhülle des Bakteriums eisgekühlt. 20 $\mu$ l der Bakterien im Bakterienmedium wurden mit 1 $\mu$ l des Ligationsansatzes gemischt und 30 Min. auf Eis inkubiert. Um die Aufnahme der DNA in die Zelle zu ermöglichen, wurden die Bakterien einem kurzen (40 sec.) Hitzeschock von 42°C unterzogen. Nun wurden die Bakterien erneut 2 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden 80  $\mu$ l SOC-Medium (Invitrogen) zugesetzt und die Bakterien 1 Stunde bei 37° C unter Schütteln inkubiert. Zum Schluss wurden je 100 $\mu$ l der transformierten Bakterien auf Platten mit LB-Bakterienmedium, dem Ampicillin und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid (X-Gal) zugesetzt war, zur Selektion ausgestrichen und über Nacht bebrütet.

#### 2.2.2.1.2 Ampicillin- und blau/weiß-Selektion

Der pGEM-T easy Vektor trägt in der Multiple Cloning Site die aminoternale codierende Sequenz der  $\beta$ -Galactosidase.  $\beta$ -Galactosidase ist ein Enzym, welches X-Gal hydrolysiert und dadurch entsteht ein blauer Farbstoff. Wird nun DNA in den Vektor eingebracht, wird die Sequenz der  $\beta$ -Galactosidase unterbrochen. Klone mit Plasmiden, die das eingebrachte DNA-Fragment tragen, erscheinen also weiß. Mittels der oben beschriebenen blau/weiß-Selektion können Klone von den Platten gepickt werden, die weiß sind. Dadurch, dass dem Medium Ampicillin zugesetzt wurde, wachsen außerdem nur Klone, die den Vektor tragen.

Diese weißen Klone wurden gepickt, in flüssiges LB-Bakterienmedium eingebracht und bebrütet. Eine kleine Menge der gepickten Klone wurde zusätzlich für eine Kontroll-PCR vorbereitet.

#### 2.2.2.1.3 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Plasmidpräparation kamen zwei Verfahren zum Einsatz. Eine Minipröp wurde für die Analyse eines Plasmids mittels Restriktionsverdau oder Sequenzierung durchgeführt. Nachdem so bestätigt werden konnte, dass das richtige DNA-Fragment in der richtigen Orientierung und mit korrekter Sequenz einkloniert worden war, wurde für den präparativen Maßstab eine Maxiprep durchgeführt. Für beide Verfahren wurden kommerziell erhältliche Kits (QIAprep Miniprep bzw. Maxiprep, Qiagen) eingesetzt.

#### 2.2.2.1.4 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzierarbeiten wurden durch die Firma MWG Eurofins durchgeführt.

### **2.2.2.2 Überexpression von Transkriptionsfaktoren mittels Transfektion**

Die Vektoren zur Überexpression der Transkriptionsfaktoren wurden bei der Firma GeneCopeia bestellt oder lagen bereits in unserem Institut vor. Es erfolgte eine Kontrolle der erfolgreichen Überexpression mittels Transfektion in HEK293 Zellen und anschließender Proteingewinnung. Zur Transfektion von HEK293 wurden am Vortag 450.000 Zellen in 2 ml DMEM ohne P/S plus 10% FKS ausgesät. Die Transfektion erfolgte mit 4 µg des Überexpressionsvektors, welcher in 264 µl OptiMEM verdünnt wurde. 10 µl des Reagenz Lipofektamin2000 wurden in 240 µl OptiMEM verdünnt und für 5 Min. inkubiert. Nun erfolgte die Mischung der beiden Komponenten, mit einer anschließenden 20-minütigen Inkubationsphase. Nun konnte das DNA/Lipofektamin-Gemisch tröpfchenweise auf die Zellen gegeben werden. Nach 24 Std. wurden die Zellen in 350 µl RIPA-Puffer aufgenommen und bis zur Verwendung im Western Blot bei -80°C gelagert.

### **2.2.2.3 Transfektion von HEK293 und HeLa Zellen für Reporterassays**

Um herauszufinden, welche Transkriptionsfaktoren den AQP5 Promotor regulieren, wurde ein Luziferase Reporterassay durchgeführt. Hierfür mussten zunächst HEK293 und HeLa mit dem pGL4.10 Vektor (2.2.2.1), dem Kontrollvektor pGL4.74, sowie einem Überexpressionsvektor des zu untersuchenden Transkriptionsfaktors (2.2.2.2) transfiziert werden. Die Transfektion erfolgte mit Lipofektamin2000 (Invitrogen).

Einen Tag vor der Transfektion wurden HEK293 sowie HeLa im entsprechenden Medium (siehe 2.2.1.1), aber ohne Penicillin/Streptomycin, in einer 96 Lochplatte ausgesät und über Nacht bei 37°C kultiviert. Die Zellen sollten zur Transfektion 90% konfluent sein. Die Transfektion erfolgte nach folgendem Ansatz (Tabelle 23Tabelle 23):

**Tabelle 23: Transfektionsansatz**

	<b>HEK 293</b>	<b>HeLa</b>
ausgesäte Zellzahl/100 µl	15000	20000
über Nacht bei 37°C inkubiert		
AQP5-Promotorkonstrukte in pGL4.10	100 ng	100 ng
pGL4.74 Vektor	25 ng	25 ng
Überexpressionsvektoren der Transkriptionsfaktoren	100 ng	100 ng
In einem Endvolumen von 25 µl in OptiMEM verdünnen		
Lipofektamin2000	0,5 µl	0,7 µl
OptiMEM	24,5 µl	24,3 µl
Mischen und für 5 Min. Bei RT inkubieren		

Anschließend wurden jeweils 25 µl des verdünnten Lipofektamins und 25 µl der vorverdünnten DNA zusammengegeben und 20 Min. bei RT inkubiert. 50 µl des Reaktionsansatzes wurden pro Well auf die ausgesäten Zellen pipettiert und bei 37°C für 24 Std. inkubiert. Nach 24 Std. wurde das Medium abgesaugt und durch 75 µl frisches Medium ersetzt. Anschließend erfolgte die Messung der Lumineszenz (siehe 2.2.2.4).

#### **2.2.2.4 Messung der Lumineszenz**

Die Bestimmung der Promotoraktivität erfolgte mittels dem „Dual Glo Luziferase System“ von Promega. Mit diesem System kann simultan die Promotoraktivität (Firefly-Luziferase) und die Transfektionseffizienz (Renilla-Luziferase) gemessen werden.

Im ersten Schritt wurde die Aktivität der Firefly-Luziferase gemessen. Hierfür wurden 75 µl des Substrats "Beetle Luciferin" hinzugegeben. Nach 10 Min. wurde die Aktivität der Luziferase mit dem Luminometer Tristar LN 941 (Berthold Technologies) gemessen.

Um die Aktivität der Renilla-Luziferase messen zu können, muss zunächst die Aktivität der Firefly-Luziferase inaktiviert werden. Hierzu wurden 75 µl "Stop and Glo" Reagenz hinzugegeben. Dieses Reagenz inhibiert zum einen die Aktivität der Firefly-Luziferase und enthält andererseits das Coelenterazine Substrat für die Renilla-Luziferase. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit wurde die Aktivität der Renilla-Luziferase gemessen.

Die Auswertung der Messdaten erfolgte mit der MicroWin 200 Software. Diese berechnet das Verhältnis der Firefly-Luziferase Aktivität zur Renilla-Luziferase Aktivität. Dieses Verhältnis gibt Auskunft über die relative Aktivität des Promotorkonstrukts.

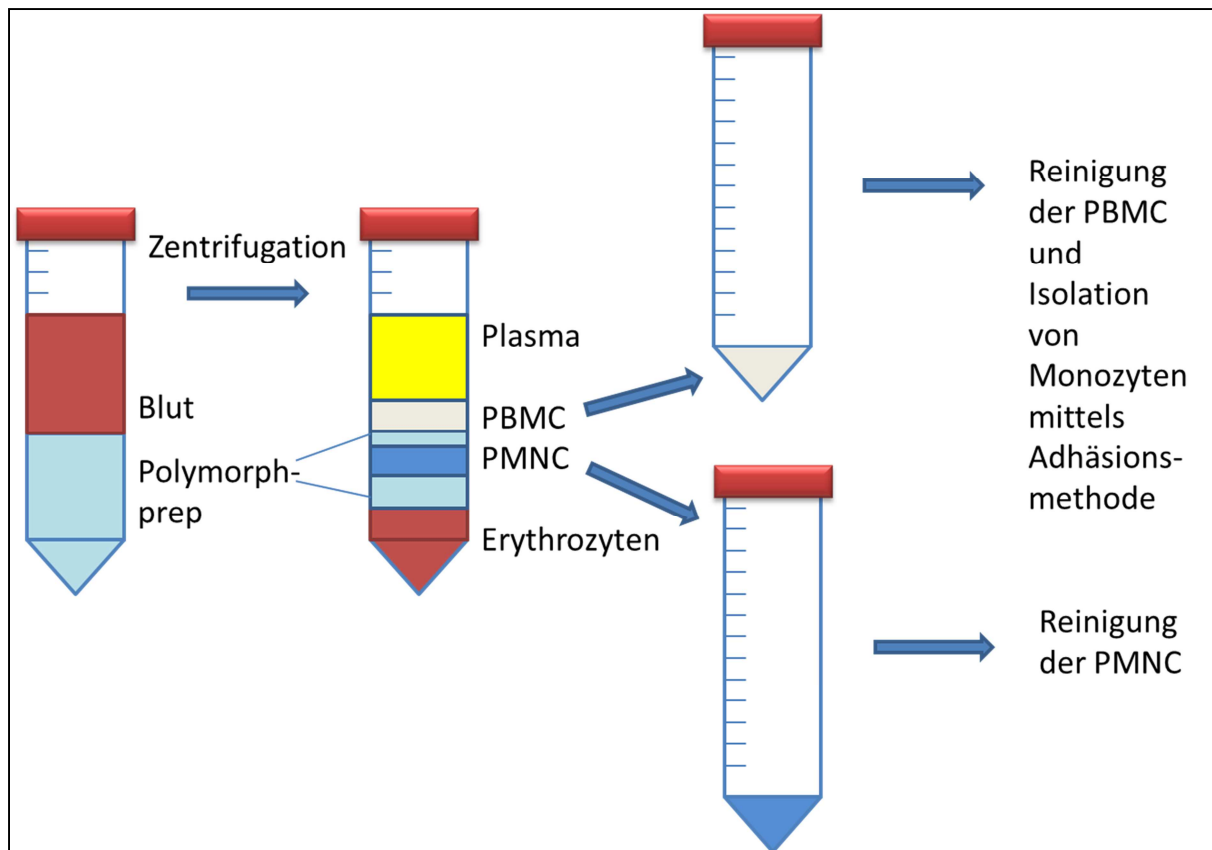
### **2.2.3 Isolation von primären neutrophilen und monozytären Zellen**

Um den funktionellen Mechanismus aufzuklären, über den der Promotorpolymorphismus AQP5 A(-1364)C die Sepsisletalität beeinflusst, sollte die Migration und Proliferation von Immunzellen, abhängig vom Genotyp, untersucht werden. Zunächst wurde den Probanden ein Wangenabstrich zur Genotypisierung entnommen. Aus diesem wurde mittels QIAamp DNA Blood Mini Kit genomische DNA isoliert. Die DNA wurde in eine PCR-Reaktion eingesetzt und mittels der Primer AQP5-SE-Tumor und AQP5-AS-Tumor\_bio amplifiziert. Anschließend erfolgte die Genotypisierung mittels Pyrosequenzierung. Für die Assays wurden neutrophile und monozytäre Zellen von gesunden Probanden mit bekanntem Genotyp isoliert und anschließend ein Migrations- und Proliferationsassay gemacht. Neutrophile Zellen wandern im Zuge einer Infektion sehr schnell und in großer Zahl in das infizierte Gewebe ein. Aus diesem Grund wurden diese zur Durchführung der Migrationsassays verwendet. Für die Proliferation wurden monozytäre Zellen verwendet, welche durch mitogene Substanzen wie Phytohämagglutinin (PHA) zur Proliferation stimuliert werden können.

Zur Isolation von primären neutrophilen und monozytären Zellen wurden gesunden Probanden 3 x 9 ml Blut in EDTA-Monovetten abgenommen. Die Aufreinigung der Zellen erfolgte mittels Dichtezentrifugation. Dieses Verfahren wird eingesetzt, um

Zellen unterschiedlicher Größe und Dichte aus einer Suspension zu fraktionieren. Als Separationsmedium wurde Polymorphprep verwendet, welches Dextran 500 (8% w/v) enthält und eine Dichte von  $1.113 \pm 0.001$  g/ml besitzt. Damit können polymorphe Zellen (PMNC) von Erythrozyten und mononukleären Zellen (PBMC) getrennt werden. Die PMNC sammeln sich in der Mediumschicht an (Abbildung 6). Die hohe Osmolarität von Polymorphprep induziert bei den Erythrozyten einen Wasserverlust. Aufgrund dessen schrumpfen die roten Blutzellen und bekommen eine höhere Dichte. Mononukleäre Zellen besitzen eine geringere Dichte (ca. 1.07 g/ml) und befinden sich daher nach der Zentrifugation oberhalb des Separationsmediums.

Nach der Blutentnahme wurden in ein 50 ml Falcon-Röhrchen 14 ml Polymorphprep vorgelegt. Anschließend wurde die gleiche Menge an Blut aufgeschichtet. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei  $500 \times g$  bei RT, für 35 Min. und ohne Bremse. Die obere Schicht (Plasma) wurde verworfen, die darunterliegende Schicht enthielt die monozytären Zellen, die in ein neues Röhrchen überführt wurden. Die nächste Schicht wurde wiederum verworfen, in der nächsten Schicht befanden sich die neutrophilen Zellen, die ebenfalls in ein neues Röhrchen überführt wurden. Anschließend erfolgte die getrennte Aufreinigung der monozytären und neutrophilen Zellen (Abbildung 6).

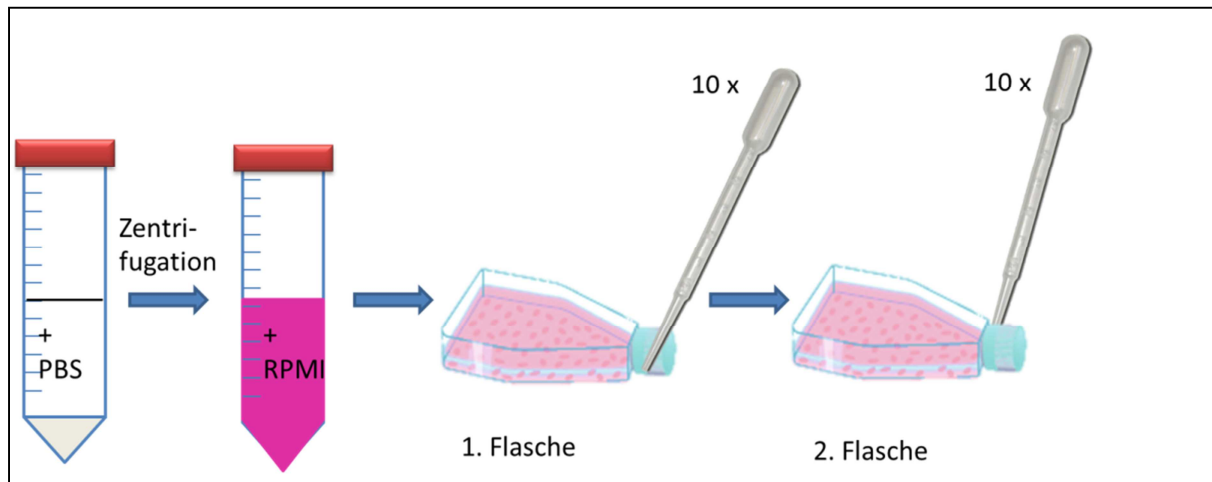


**Abbildung 6:** Aufreinigungsschema von mononukleären und neutrophilen Zellen aus Blut von gesunden Probanden. Die Trennung erfolgte mittels Polymorphprep. Erythrozyten sedimentieren nach der Zentrifugation, während sich polymorphe Zellen (PMNC) in einer Schicht im Separationsmedium ansammeln. Monozytäre Zellen (PBMC) befinden sich zwischen Plasma und Separationsmedium.

### 2.2.3.1 Reinigung der monozytären Zellen

Die Zellsuspension aus der oberen Zellschicht (PBMC), welche die monozytären Zellen enthielt, wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS gemischt und für 10 Min. bei 450 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde nochmals mit PBS gewaschen. Das Sediment, welches monozytäre Zellen enthielt, wurde im Zellkulturmedium (RPMI 1640, 10 % FKS, Pen/Strep) resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Um die restlichen Lymphozyten zu entfernen, wurde sich die Eigenschaft von aktivierten Monozyten zu Nutze gemacht. Im aktivierten Zustand adhären diese Immunzellen an den Zellkulturflaschenboden während die restlichen verbleibenden Immunzellen in Suspension bleiben. Zur Aktivierung wurde die Zellsuspension zehnmal auf und ab pipettiert und die Zellsuspension für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Der Überstand, der aus Lymphozyten bestand, wurde abgenommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Die adhärenen Monozyten wurden mit Medium gewaschen, die Waschlösung wurde ebenfalls in die neue Zellkulturflasche überführt. Die monozytären Zellen bekamen Medium und

wurden für 36 Std. im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. In dieser Zeit lösten sie sich wieder vom Flaschenboden ab. Um die Ausbeute an monozytären Zellen zu erhöhen, wurden die Zellen der neuen Zellkulturflasche ebenfalls zehnmal auf und ab pipettiert, bei 37°C inkubiert für eine halbe Stunde und der Überstand verworfen. Der Zellrasen bekam frisches Medium und die Zellen wurden ebenfalls für 36 Std. im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach den 36 Std. wurden die aufgereinigten monozytären Zellen in den Versuch genommen (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Aufreinigungsschema der monozytären Zellen.** Nach der Reinigung der Zellen mit PBS erfolgte die Zugabe von Zellkulturmedium (RPMI) und das Überführen in eine Zellkulturflasche. Durch 10-maliges auf- und abpipettieren wurden monozytäre Zellen aktiviert und adhärten an den Boden.

### 2.2.3.2 Reinigung der neutrophilen Zellen

Die Zellsuspension der neutrophilen Zellen wurde mit PBS auf 50 ml aufgefüllt, bei 500 x g und RT für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in Aqua reinst. für 5 Sek. inkubiert. Bei diesem Schritt wurden die restlichen Erythrozyten lysiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen sofort in ein vorbereitetes Röhrchen mit 50 ml PBS gegeben. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in RPMI resuspendiert und sofort in den Versuch genommen. Die Reinheit und Zellzahl der neutrophilen Zellen wurde mittels ScilVet ABC (animal blood counter) bestimmt (Abbildung 6).

### 2.2.4 Durchführung von Proliferationsassays mit monozytären Zellen

Die Proliferationsassays mit monozytären Zellen erfolgte mit isolierten Zellen aus gesunden Probanden, welche einen bestimmten AQP5 A(-1364)C-Genotyp aufwiesen. Hiermit sollte die Frage beantwortet werden, ob der AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus die Proliferation von Immunzellen beeinflusst.



Nach der Isolation der monozytären Zellen, wie unter 2.2.3.1 beschrieben, erfolgte die Durchführung des Proliferationsassays. Hierzu wurde das „CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay- Kit“ der Firma Promega angewandt.

Dieser Assay basiert auf einer kolorimetrischen Bestimmung von lebenden Zellen und beinhaltet die Tetrazolium Komponente 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (MTS) sowie das Elektronen-Kupplungsreagenz (PES) in einer Lösung. Das MTS wird durch lebende Zellen mit  $\text{NADH}^+$  zu Formazan reduziert, welches farbige und löslich im Zellkulturmedium ist. Formazan absorbiert Licht der Wellenlänge 490 nm. Die Zellen werden mit einer bestimmten Zellzahl in einer 96-well Platte ausplattiert und anschließend wird das Reagenz direkt in die Wells pipettiert und danach die Absorption bei 450 nm gemessen.

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe der Zellen erstellt und die Absorption bei 450 nm bei unterschiedlicher Zellzahl bestimmt. Daraus konnte dann eine Standardkurve zur Ermittlung der Zellzahl bestimmt werden. Aus dieser Verdünnungsreihe ergibt sich die Standardkurve mit folgender Gleichung zur Berechnung der Zellzahl (Abbildung 8):

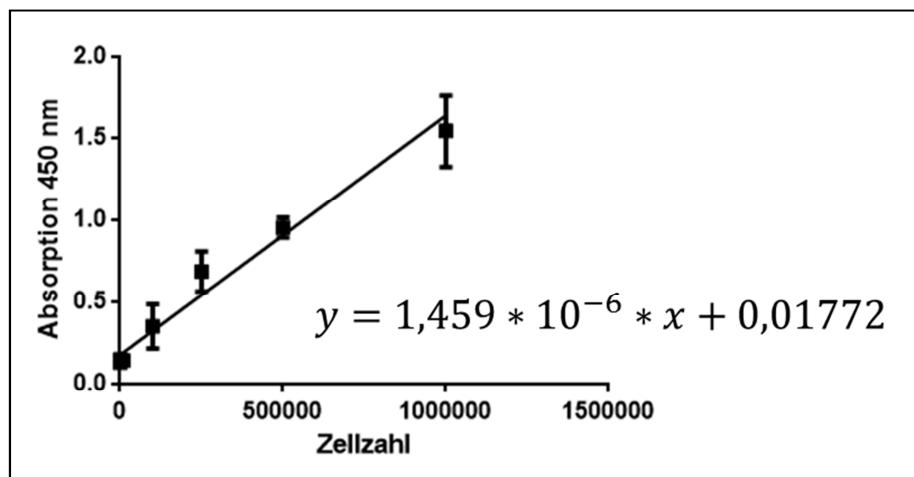


Abbildung 8: Messung der Absorption bei 450 nm mittels „CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ in Abhängigkeit von einer unterschiedlichen Anzahl eingesetzter Zellen

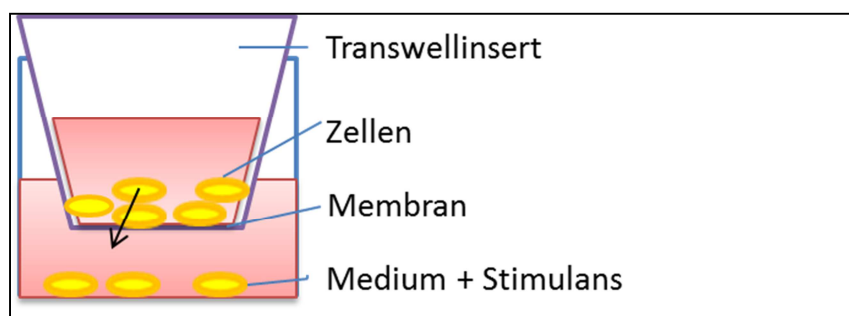
Dann erfolgte die Proliferationsmessung der zu untersuchenden Zellen. Pro Well wurden 10000 Zellen eingesetzt und es erfolgte eine Vierfachbestimmung je Ansatz. Die in 100  $\mu\text{l}$  RPMI ausgesäten Zellen wurden mit 5  $\mu\text{g/ml}$  PHA zur Proliferation stimuliert. Nach drei Tagen erfolgte die Messung der Proliferation. Hierzu wurden 20  $\mu\text{l}$  CellTiter 96 AQueous One Solution in jedes Well gegeben. Nach zwei Stunden wurde die Messung am ELISA Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt. Außerdem wurde als Absorptionskontrolle die Absorption bei der

Wellenlänge 690 nm gemessen, dieses dient zur Normierung gegen etwaige Verschmutzungen auf der Platte. Die gemessenen Werte wurden anschließend mittels Excel und GraphPad Prism ausgewertet.

### 2.2.5 Migrationsassay mit neutrophilen Zellen

Für den Migrationsassay wurden neutrophile Zellen verwendet, da diese im Zuge einer Inflammation durch Makrophagen zum Entzündungsherd rekrutiert werden und in großer Zahl in das Gewebe einwandern.

Um die Migration der neutrophilen Zellen zu beobachten, wurde ein Transwell-Assay durchgeführt. Das Prinzip des Assays besteht darin, dass in eine 24-Lochplatte ein Zellkulturinsert eingesetzt wird (siehe Abbildung 9). Die Unterseite des Inserts ist eine permeable Membran, durch die die Zellen diffundieren können. Zur gezielten Migration wird ein geeignetes Stimulans in den unteren Teil der Lochplatte gegeben. In den oberen Teil werden Zellen in einer definierten Zahl gegeben. Die Zellen migrieren nun in den unteren Teil des Lochs. Anschließend wurden die migrierten Zellen gezählt.



**Abbildung 9: Aufbau des Transwellmigrationsassays.** Die Zellen wurden in einer definierten Zellzahl in das Transwellinsert gegeben, welches sich in einer 24-Lochplatte befindet. Im unteren Teil des Lochs befindet sich ein Stimulans, welches die Zellen zur Migration durch die Membran anregt.

Die isolierten neutrophilen Zellen wurden gezählt und auf eine Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen in 200  $\mu$ l RPMI eingestellt. Als Stimulans fungierte Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP), ein starkes Chemoattraktant. Pro Loch wurden  $10^{-8}$  M fMLP vorgelegt. RPMI-Medium ohne fMLP diente als Negativkontrolle. Anschließend wurde das Insert luftblasenfrei eingesetzt und 200  $\mu$ l Zellsuspension auf das Insert pipettiert.

Pro Proband wurden insgesamt sechs Ansätze durchgeführt, wobei drei Ansätze mit fMLP stimuliert wurden und die anderen drei Ansätze als Kontrolle dienten. Anschließend folgte eine 30minütige Inkubation im Brutschrank bei 37°C. Dann

erfolgte die erste Zählung nach folgendem Prinzip: Die 24 Lochplatte wurde 3 Min. leicht bei RT geschüttelt, fünfmal hoch und runter pipettiert und anschließend 80 µl der Zellsuspension aus den Wells genommen und mit dem Zellzählgerät MUSE und dem Viability Kit gezählt. Hierfür wurde die Zellsuspension mit 320 µl Count and Viability Reagenz verdünnt und nur die lebenden Zellen ausgewertet. Nach 1,5 Std. erfolgte eine zweite Zählung, wie oben beschrieben. Allerdings wurden 50 µl TE Puffer zu den Wells gegeben, um das Ablösen aller adhärenierten, neutrophilen Zellen an der Unterseite des Inserts zu gewährleisten. Der TE Puffer musste 10 Min. bei RT und schütteln inkubieren.

#### **2.2.5.1 AQP5-Expressionsanalyse an neutrophilen Zellen**

Um die AQP5-Expression an neutrophilen Zellen zu bestimmen, wurde ein Aliquot der Zellen auf einen Objektträger aufgebracht und im Methanol/Aceton (1:1) für 10 Min. bei -20°C fixiert und anschließend getrocknet. Der Nachweis der AQP5-Expression erfolgte mittels immunologischer Färbung und wurde in Kooperation mit Prof. Dr. med. Agnes Bankfalvi am Institut für Pathologie durchgeführt.

#### **2.2.6 Stabile Transfektion von Jurkat-Zellen und anschließende Migrationsassays**

Zur Untersuchung der Frage, ob eine Überexpression von AQP5 zu einer verstärkten Immunzellmigration führt, wurde zunächst die T-Lymphozyten-Zelllinie Jurkat stabil mit einem AQP5-Überexpressionsplasmid (AQP5\_pRec),

sowie einem Kontrollplasmid (pRec) transfiziert. Diese Zelllinie wurde aus zwei Gründen ausgewählt. Der erste Vorteil war die erhöhte Transfektionseffizienz im Vergleich zu anderen Suspensionszelllinien. Eine gute Transfektionsrate (ca. 30%) verglichen mit anderen Methoden, konnte nur mittels Elektroporation erzielt werden. Daher wurde diese Transfektionsmethode ausgewählt. Der Nachteil einer Transfektion mittels Elektroporation ist jedoch das große Absterben der Zellen während der Transfektion. Deshalb wurden die Jurkat Zellen, in der vorliegenden Arbeit, stabil transfiziert. Der zweite Vorteil der Zelllinie Jurkat war das Vorhandensein eines etablierten Migrationsprotokolls.

##### **2.2.6.1 Linearisierung des Vektors zur stabilen Transfektion**

Eine Linearisierung der beiden verwendeten Vektoren (AQP5\_pRec und pRec) soll eine stabile Integration des Vektors in das Wirtsgenom ermöglichen. Hierfür wurden die Vektoren mit dem Restriktionsenzym *ScaI* verdaut, welches eine einzige

Schnittstelle im Ampicillin-Resistenzgen besitzt. So bleiben alle anderen Vektorabschnitte, wie der CMV-Promotor zur Expression des AQP5-Gens und auch das Neomycin-Geneticin-Resistenzgen intakt.

#### **2.2.6.2 Transfektion der Jurkat –Zellen durch Elektroporation**

Da sich eine Transfektion mittels Lipofektion bei Jurkat Zellen als uneffektiv erwies, wurden diese mittels Elektroporation transfiziert.

Die Elektroporation ist eine Technik bei der die Zellmembran kurzzeitig durch ein elektrisches Feld permeabel gemacht wird, um so Moleküle aus der Umgebung wie beispielsweise DNA aufnehmen zu können.

Damit sich die Jurkat Zellen am Tag der Elektroporation in der mittleren logarithmischen Wachstumsphase befanden, wurden die Zellen am Tag zuvor im Verhältnis 1:2 gesplittet. Für die Elektroporation wurden  $5 \cdot 10^6$  Jurkat Zellen in 100  $\mu$ l OptiMEM aufgenommen, resuspendiert und mit 2  $\mu$ g DNA (linearisierter Vektor: AQP5-pRec und pRec) gemischt. Die Elektroporation erfolgte mit dem „Gene Pulser XCell Electroporation System“ und in 0,2 cm Elektroporationsküvetten der Firma Biorad. Für die Elektroporation erwies sich eine Spannung von 140 V am effektivsten. Des Weiteren wurde ein Kondensator mit einer Kapazität von 1000  $\mu$ F verwendet. Dieser Kondensator wurde mit 140 V aufgeladen und die Entladung erfolgte über die Zellen.

Direkt im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen in 1000  $\mu$ l RPMI 1640 mit 10 % hitzeinaktiviertes FKS und 2 mM L-Glutamin überführt und für 48 Std. im Brutschrank inkubiert. Die Selektion positiver Klone erfolgte mittels Limiting Dilution und Geneticin-Disulfat (Lieber 2013). Hierfür wurde eine Verdünnungsreihe mit den transfizierten und untransfizierten Zellen hergestellt, in 200  $\mu$ l Vollmedium mit 1,1 mg/ml Geneticin-Disulfat (=Selektionsmedium) und in einer 96 Lochplatte ausgesät. Untransfizierte Zellen enthalten kein Neomycin-Geneticin-Resistenzgen und wurden so nach fünf bis zehn Tagen abgetötet. Am fünften und zehnten Tag wurde frisches Medium hinzugegeben, um die Geneticin-Disulfat Konzentration und somit den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Nach 14 Tagen waren keine untransfizierten Klone mehr lichtmikroskopisch detektierbar. Die erfolgreich transfizierten Zellen in der stärksten Ausgangsverdünnung wurden anschließend schrittweise in größere Volumina kultiviert. Die Kultivierung erfolgte von 24 Loch-, in 12 Loch-, dann in 6 Lochplatten und konnten danach in eine Zellkulturflasche überführt werden.

### **2.2.6.3 Durchführung von Migrationsassays mit stabil transfizierten Jurkat-Zellen**

24 Std. vor dem Migrationsassay wurden die stabil transfizierten Jurkat Zellen im Verhältnis 1:2 gesplittet. Um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten wurden die Zellen weiterhin im Selektionsmedium gehalten.

Zunächst wurden die Inserts mit 100 µl Fibronectin (6,3 µg) beschichtet und anschließend für 1,5 Std. im Brutschrank bei 37°C inkubiert, um so später eine bessere Adhäsion der Zellen an die Insertmembran zu erreichen. Um überflüssiges Fibronectin zu entfernen, wurden die Inserts mit PBS und dann mit RPMI gewaschen und getrocknet. Die Zellen wurden zweimal mit RPMI gewaschen und dann mit der Zellzählmaschine gezählt. Die Viabilität der Zellen wurde auch determiniert. Erst wenn die Viabilität der beiden Zellpopulationen (AQP5\_pRec und pRec) vergleichbar war und über 90 % lag, wurden die Zellen in den Versuch genommen. Es wurden 500000 Zellen in 200 µl RPMI ohne Zusätze pro Insert ausgesät. Für die Negativkontrolle dienten 500 µl RPMI-Medium ohne Zusätze, währenddessen fungierte das Stimulans SDF-1 $\alpha$  (100 ng/ml) in 500 µl RPMI als Positivkontrolle. Dann wurden die Inserts luftblasenfrei in die Wells eingesetzt und 500 µl Zellsuspension luftblasenfrei auf das Insert pipettiert.

Die Migration erfolgte im Brutschrank bei 37°C. Nach 4,5 Std. erfolgte die erste Messung und eine zweite Messung erfolgte nach 22 Std., wie unter 2.2.5 beschrieben.

### **2.2.7 EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)**

EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay) ist eine Methode, mit der die Interaktion von Proteinen mit der DNA nachgewiesen werden kann. Beispielsweise kann man mit dieser Methode untersuchen, welche Transkriptionsfaktoren an den Promotor binden. Der Einfluss eines SNPs in der Promotorregion auf die Bindefähigkeit des Transkriptionsfaktors kann ebenfalls mit dieser Methode untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung von Transkriptionsfaktoren um den AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus untersucht.

Zunächst wurden Oligonukleotide (=Sequenzabschnitte des AQP5-Promotors) generiert, die potentielle Bindungsstellen für die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren enthielten. Die Oligonukleotide wurden dann mit Digoxigenin markiert, um sie mit einem Antikörper sichtbar machen zu können. In der

vorliegenden Arbeit wurden zum einen Oligonukleotide generiert, die potentielle Bindungsstellen für unterschiedliche Transkriptionsfaktoren (NMP4, c-Myb, NFAT), um den AQP5 A(-1364)C-Polymorphismus trugen, zum anderen wurden auch Oligonukleotide verwendet, die die hochaktive ATG-nahe Region des AQP5-Promotors repräsentieren.

### 2.2.7.1 Vorarbeiten für den EMSA: Markierung der Oligonukleotide und Dot Blot

Die einzelsträngigen Oligonukleotide mussten zuerst in doppelsträngige Oligonukleotide umgewandelt werden. Hierfür mussten die komplementären Oligonukleotide hybridisiert werden. Dafür wurden die Oligonukleotide in TEN Puffer auf 20 pmol/μl verdünnt und auf 95°C erhitzt. Während des Abkühlens hybridisieren die komplementären Sequenzen.

Der nächste Schritt war die Markierung der Oligonukleotide mit Digoxigenin. Diese Markierung wurde mittels der terminalen Transferase durchgeführt (Tabelle 24).

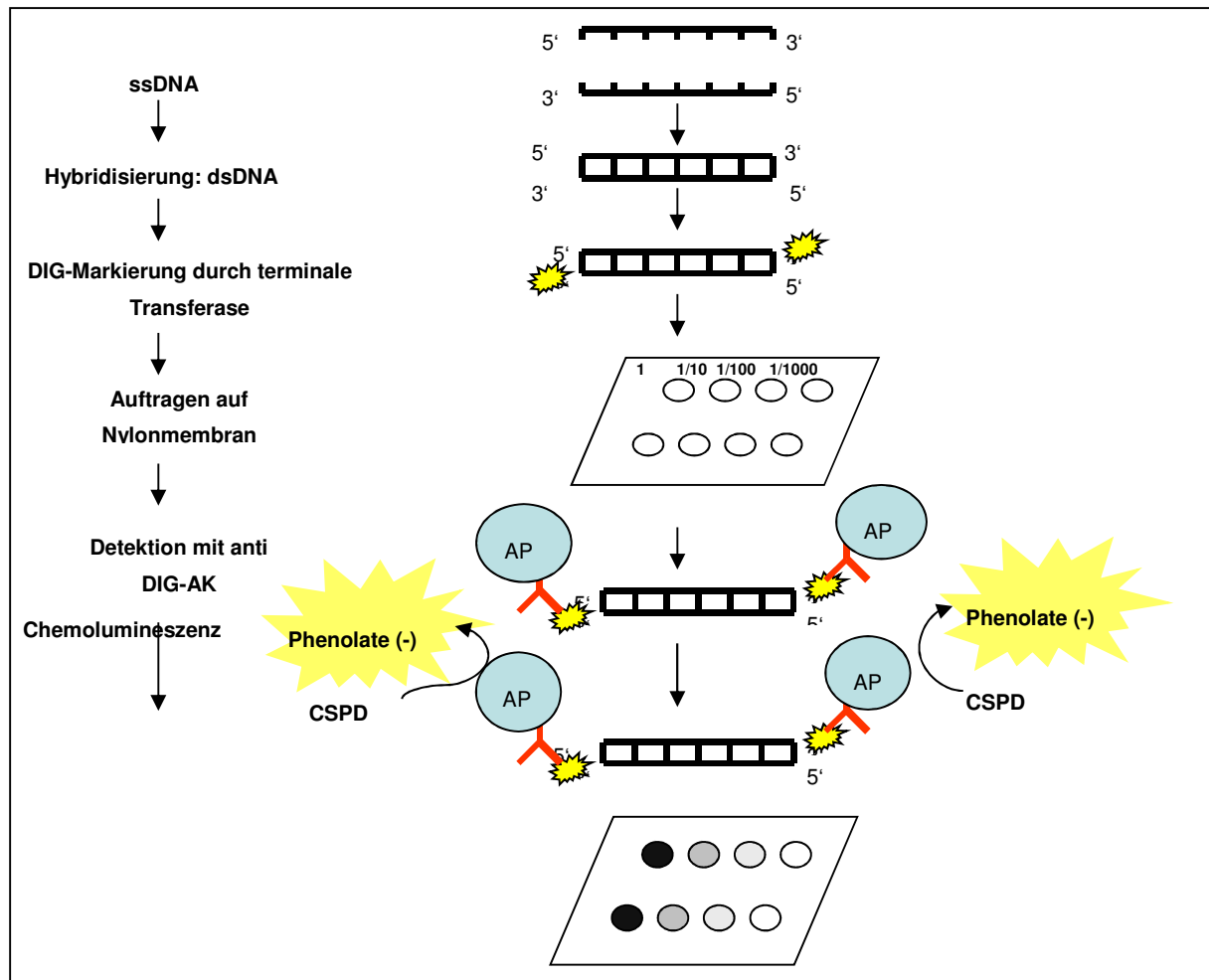
**Tabelle 24: Ansatz zur Markierung der Oligonukleotide**

Substanz	Menge und Endkonzentration
5 x Labeling Puffer	4 μl
CoCl <sub>2</sub> Lösung	4 μl (5mM)
DIG-ddUTP Lösung	1 μl (0,05 mM)
Terminale Transferase	1 μl (20 U/μl)
Durch Zugabe von 2 μl 0,2M EDTA (pH 8,0) wurde die Reaktion gestoppt	

Um die Effizienz der Markierung zu überprüfen, wurde ein Dot-Blot durchgeführt. Hiermit wurde insbesondere überprüft, ob die Markierungs-Effizienz bei allen Oligonukleotiden gleich stark war. Dies ist wichtig, um ausschließen zu können, dass unterschiedlich starke Banden auf eine unterschiedlich starke Markierung zurückzuführen sind. Für den Dot Blot wurde eine Verdünnungsreihe der markierten Oligonukleotide durchgeführt. Diese wurden in TEN-Puffer 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt und 10 μl der Verdünnung auf eine Nylonmembran aufgetragen. Des Weiteren wurde eine Verdünnungsreihe eines DIG-markierten Kontrolloligonukleotids auf die Membran aufgetragen. Zur kovalenten Verknüpfung der DNA mit der

Membran wurde diese in den UV Stratalinker 2400 der Firma Stratagene gegeben, der die Verknüpfung über UV-Strahlung herstellt.

Anschließend konnte der Dot Blot entwickelt werden. Die Entwicklung erfolgte genau nach dem Entwicklungsprotokoll Chemolumineszenz der Firma Roche (Abbildung 10).



**Abbildung 10:** Prinzip eines EMSAs. Zunächst wurden einzelsträngige Oligonukleotide (ssDNA) zu doppelsträngigen Oligonukleotiden (dsDNA) hybridisiert. Diese wurden mit Hilfe der terminalen Transferase mit Digoxigenin markiert. Anschließend erfolgte das Auftragen der markierten Oligonukleotide in unterschiedlichen Verdünnungen auf eine Nylonmembran. Der Nachweis der DIG-Markierung erfolgte durch die Antikörper gegen Digoxigenin (anti-DIG-AK), an die die Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Durch Zugabe von CSPD wurde dieses zum Phenolat-Anion hydrolysiert, welches Licht der Wellenlänge 477 nm emittiert.

### 2.2.7.2 Gewinnung von Zellkernextrakten für EMSAs

Für unsere Fragestellung wurden Zellkernextrakte verwendet, in denen ein bestimmter Transkriptionsfaktor überexprimiert wurde. Es sollte die Bindung von unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren NFAT, NMP4 und c-Myb, um die Position A(-1364)C an den AQP5-Promotor untersucht werden. Hierfür muss sichergestellt sein, dass die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren auch in ausreichender

Menge in den Zellkernextrakten vorhanden sind. Dazu musste eine Zelllinie mit einem Überexpressionsplasmid transient transfiziert werden.

Für jeden Ansatz wurden auf drei 10 cm Platten jeweils  $1,5 \cdot 10^6$  HEK293 in 15 ml DMEM mit 10% FKS Serum und ohne Penicillin/Streptomycin ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach 24 Std. erfolgte die Transfektion der Zellen mit Lipofektamin 2000 (Invitrogen). Zur Transfektion wurden jeweils 24 µg Vektor in 1500 µl OptiMEM verdünnt. 60 µl Lipofektamin wurden mit 1440 µl OptiMEM vermischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Dann wurde die verdünnte DNA mit dem verdünnten Lipofektamin gemischt und für 20 Min. bei RT inkubiert. Schließlich wurden 3000 µl des Reaktionsansatzes tröpfchenweise auf die Zellen gegeben. 24 Std. nach der Transfektion wurden Zellkernextrakte und Zytoplasma mittels des *“Nuclear Extraction Kit”* von Sigma hergestellt. Die gewonnenen Zellkernextrakte wurden direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt. Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem *“BCA Protein Assay Kit”* der Firma Pierce durchgeführt.

### **2.2.7.3 Durchführung der EMSA-Gelelektrophorese**

Zur Durchführung der Gelelektrophorese wurde ein 6%iges Polyacrylamidgel mit dem Verhältnis von Acrylamid: Bisacrylamid von 60: 1 hergestellt. Um das Auslaufen des Gels aus der Gießkammer zu verhindern, wurde zunächst ein Verschlussgel gegossen. Nachdem das Verschlussgel getrocknet war, wurde das Polyacrylamidgel hergestellt.

Bei einem EMSA wurden mindestens drei Proben eines Oligonukleotids aufgetragen. Die erste Probe enthielt das markierte Oligonukleotid ohne Zugabe von Zellkernextrakten, während die 2. Probe das markierte Oligonukleotid mit dem Zellkernextrakt enthielt. Wenn die Proteine aus dem Zellkernextrakt an die DNA binden, dann kommt es zu einem Gelshift. Ein Gelshift bedeutet, dass eine „höhere“ Bande entsteht, da der DNA-Protein-Komplex langsamer durch das Gel wandert als die reine DNA. In der dritten Probe wurde eine Kompetition mit einem Überschuss des unmarkierten Oligonukleotids durchgeführt. Aufgrund dieses hohen Überschusses ist die Bindung des Proteins an das markierte Oligonukleotid so gering, dass keine spezifische Bande mehr sichtbar ist. Auf diese Weise konnten unspezifische von spezifischen Banden unterschieden werden. In weiteren Proben wurden Antikörper gegen bestimmte Proteine (Transkriptionsfaktoren) zugegeben.



Bindet der Protein-DNA-Komplex an einen Antikörper, so kommt es zu einem noch weiter reduzierten Laufverhalten (Supershift) (Abbildung 11).

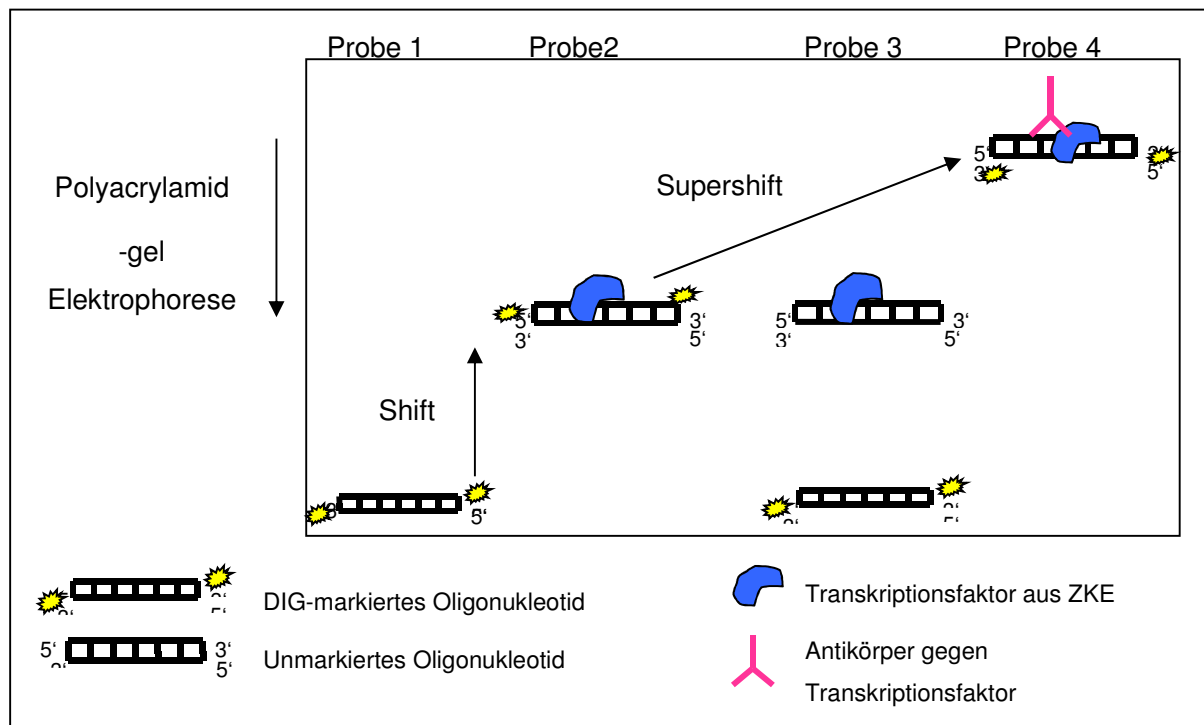


Abbildung 11: EMSA-Polyacrylamidgелеlektrophorese: Es wurden unterschiedliche Kombinationen aus markierten und unmarkierten Oligonukleotiden, sowie Zellkernextrakten und Antikörpern auf das Gel aufgetragen. Markierte Oligonukleotide erzeugen dabei eine sichtbare Bande, ZKE: Zellkernextrakte, DIG: Digoxigenin

Die Vorbereitung der Proben erfolgte für die Gelshiftreaktionen nach folgendem Protokoll (Tabelle 25):

Tabelle 25: Vorbereitung der Proben für die Gelshiftreaktion

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
<b>Binding Puffer</b>	4 µl	4 µl	4 µl	4 µl
<b>Poly [d(I-C)] (1 µg/µl)</b>	3,3 µl	3,3 µl	3,3 µl	3,3 µl
<b>Poly L-Lysine</b>	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
<b>DIG-markierte Oligonukleotide (1:10)=15,5fmol/µl</b>	2µl Oligonukleotid 1	2µl Oligonukleotid 1	2µl Oligonukleotid 1	2µl Oligonukleotid 1
<b>Unmarkierte Oligonukleotide 3,85 pmole/µl</b>	-	-	1 µl Oligonukleotid 1 (124fach)	-
<b>Zellkernextrakte</b>	-	10 µg	10 µg	10 µg

Antikörper	-	-	-	2 µl
H <sub>2</sub> O	ad. 20 µl	ad. 20 µl	ad. 20 µl	ad. 20 µl

Bei EMSAs mit Antikörpern wurde zunächst der Antikörper mit den Zellkernextrakten bei 4°C für 1 Std. und für weitere 30 Min. unter Zugabe des Bindungspuffers, Poly [d(I- C)] und Poly L-Lysine inkubiert. Alle weiteren Proben wurden auf Eis gemischt und bei RT für 20 Min. inkubiert. Nach Zugabe des Ladepuffers wurden die Proben auf ein „Pre-run“ Gel aufgetragen, das zuvor bei 12,5V/cm für 10 Min. gelaufen ist. Der Lauf wurde in 0,5 x TBE bei max. 7,5V/cm so lange durchgeführt, bis die Lauffront des Ladepuffers das Verschlussgel erreicht hatte.

#### **2.2.7.4 Durchführung des EMSA-Blottings**

Nachdem die Lauffront des Ladepuffers das Verschlussgel erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Es folgte der Transfer der DNA und DNA-Protein-Komplexe auf eine Nylonmembran. Hierzu wurden das Blotting-Papier und die Nylonmembran in 0,5x TBE getränkt. Das Gel wurde auf die Membran gelegt, die sich zwischen Blotting-Papier befand. Es erfolgte der Transfer auf die Membran für 30 Min. bei 0,05 V/cm<sup>2</sup> mittels der Semidry Blotting Apparatur der Firma Biorad.

Anschließend wurde die DNA auf der Membran fixiert. Hierzu wurde die Membran auf ein Blotting-Papier gelegt, welches in 2x SSC getränkt war. Die kovalente Bindung der DNA („Crosslinking“) erfolgte im UV Stratalinker 2400 der Firma Stratagene.

Schließlich wurde der EMSA entwickelt. Die Entwicklung erfolgte genau nach dem Entwicklungsprotokoll Chemolumineszenz der Firma Roche. Hierbei erfolgte zunächst die Inkubation der Membran im Blocking Reagenz, um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Anschließend wurde der Antidigoxigenin-Antikörper in einer Verdünnung von 1:10000 auf die Membran gegeben. Die Membran wurde gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Darauf folgte die Inkubation der Membran in Detektionspuffer, der einen Puffer für die alkalische Phosphatase darstellt, die am anti-Digoxigenin-Antikörper gebundenen ist. Anschließend erfolgte die Zugabe des CSPD Reagenzes, welches von der alkalischen Phosphatase umgesetzt und so Licht emittiert wird. Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert das CSPD zum meta-stabilen Phenolat-Anion bei deren Abbau Licht der Wellenlänge 477nm emittiert wird. Zur dauerhaften Dokumentation wurde ein Film in einer

Entwicklungskammer aufgelegt und durch die Chemolumineszenz belichtet. Der Film wurde entwickelt und fixiert. Nun konnten die Banden optisch ausgewertet werden.

### 2.2.8 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode, bei der Proteine auf eine Membran übertragen werden und dort über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden können. Hierfür müssen die Proteine zunächst über eine Gelelektrophorese getrennt werden. Anschließend werden die nach der Größe aufgetrennten Proteine auf eine Membran übertragen und beispielsweise über spezifische Antikörper nachgewiesen (Abbildung 12).

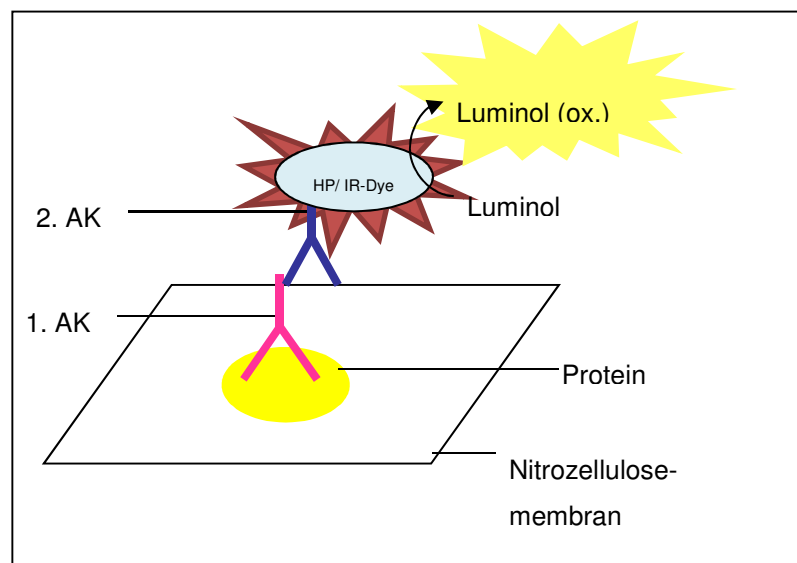


Abbildung 12: Prinzip der Immunodetektion: Die Proteine werden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der erste Antikörper (AK) erkennt spezifisch ein Protein. Der zweite AK erkennt den ersten AK und ist entweder mit der Meerrettich-Peroxidase (HP) gekoppelt, welche Luminol oxidiert und so Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert wird, oder mit einem IR-Farbstoff (IR-Dye) gekoppelt ist und Licht im Bereich von 680 nm bis 800 nm emittiert.

#### 2.2.8.1 Gewinnung von Proteinen aus Zellen

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die Expressionskinetik der AQP5-Expression bei der Sepsis zu untersuchen, um potentielle therapeutische Interventionsmaßnahmen zu finden. Hierzu sollte zunächst der Einfluss von LPS, als Modell für die Sepsis auf die AQP5-Expression in monozytären Zellen untersucht werden. Im anschließenden Experiment sollte analysiert werden, ob die LPS vermittelten Effekte auf die AQP5-Expression durch cAMP aufgehoben werden können. Als Modell für monozytäre Zellen diente die Zelllinie THP-1. Die Kinetik der AQP5-Expression nach LPS bzw. cAMP Stimulation wurde bei THP-1 Zellen untersucht.

Dazu wurden Zellen in frühen Passagen (<25) für die Stimulationsexperimente verwendet, da THP-1 Zellen in späten Passagen (>30) ein verändertes Wachstums- und Suspensionsverhalten aufweisen. Am Vortag wurden die Zellen in einer Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in RPMI + 1% FKS + Pen/Strep in eine 12-Lochplatte ausgesät. Am nächsten Morgen erfolgte die Stimulation mit 1  $\mu$ g/ml LPS oder 1 mM 8-Br-cAMP oder beiden Stimulanzen. Nach 2 Std., 6 Std. und 24 Std. wurden die Zellen geerntet, mit PBS gewaschen und die Zellen mittels RIPA Puffer lysiert.

Zur Extraktion der Proteine wurden die lysierten Zellen bei 4°C für 15 Min. geschüttelt und anschließend bei 14000 x g für 15 Min. zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde abgenommen, direkt im flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

#### **2.2.8.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Kit „*BCA Protein Assay Kit*“ der Firma Pierce eingesetzt. Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Zur Quantifizierung der Proteinmenge wurde eine im Kit enthaltene Standardkurve mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellt und deren Absorption bei 565 nm simultan mit den Proben gemessen. Anschließend erfolgte die Berechnung der Proteinkonzentration der Proben.

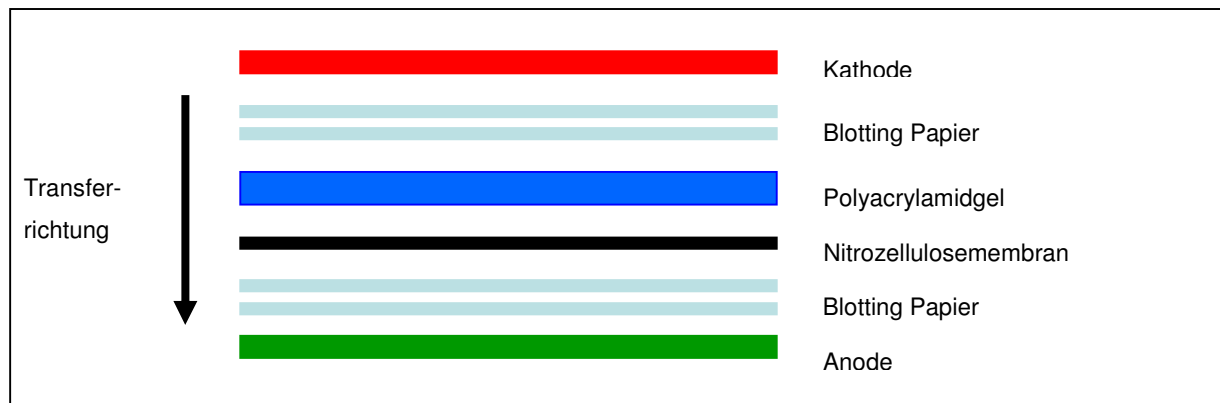
#### **2.2.8.3 Auftrennung der Proteine mittels SDS -Polyacrylamid Gelelektrophorese (Page)**

Die Auftrennung der Proteine erfolgt mittels einer SDS-Page. Hierbei werden die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Für das Gießen der Gele wurde in der vorliegenden Arbeit das „*Mini-Protean 2D Elektrophoresesystem*“ der Firma Biorad verwendet. Zunächst wurde ein Verschlussgel gegossen, um das Auslaufen des Gels aus der Gießvorrichtung zu verhindern. Als Trenngel diente ein 7,5%iges Polyacrylamidgel. Das Trenngel wurde zum Trocknen mit wassergesättigtem Butanol überschichtet, um das Austrocknen zu verhindern. Damit alle Proteine gleichzeitig in das Trenngel einlaufen, wurde auf das Trenngel ein Sammelgel gegossen. Anschließend erfolgte die Vorbereitung der Proteine für das Auftragen auf das SDS-PAGE Gel. Die Proben wurden mit 3x Lämmli und Aqua dest. auf eine Konzentration von 5 bis 20  $\mu$ g/ $\mu$ l verdünnt und anschließend für 5 Min. bei 95°C erhitzt. Danach wurden die Proben auf Eis gestellt und konnten direkt auf das SDS-Gel aufgetragen werden, oder wurden bei -20°C bis

zur weiteren Verwendung eingefroren. Es wurde je nach Fragestellung eine Proteinmenge von 20 µg bis 100 µg Protein aufgetragen. Damit alle Proteine gleichzeitig im Trenngel einlaufen, wurde zunächst eine Spannung von 10 V/cm<sup>2</sup> angelegt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte für ca. 2 - 3 Std. bei 15 V/cm<sup>2</sup> im Laufpuffer.

#### 2.2.8.4 Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran

Nachdem die Lauffront der Proteine das Verschlussgel erreicht hatte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Es folgte der Transfer der Proteine auf die Nitrozellulosemembran. Hierfür wurde die Membran und das Blotting-Papier einige Minuten im Transferpuffer getränkt. Anschließend erfolgte der Zusammenbau der Transferapparatur nach Abbildung 13.



**Abbildung 13: Aufbau der Blotting – Apparatur zum Western Blot: Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose erfolgt zwischen zwei in Transferpuffer getränkten Blotting Papieren. Durch das Anlegen einer konstanten Spannung wandern die Proteine von der Kathode zur Anode und somit aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran.**

Der Transfer erfolgte für 30 Min. bei 0,1 V/cm<sup>2</sup> in der „Semidry-Blotting-Kammer“ der Firma Biorad. Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in PBS gewaschen.

#### 2.2.8.5 Nachweis der Proteine durch PonceauS Färbung

Mit dem Farbstoff PonceauS kann der Erfolg des Transfers überprüft werden. Der Farbstoff bindet reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine und macht die Proteine somit auf der Membran sichtbar. Zur Färbung wurde die Membran 3 bis 5 Min. im Farbstoff gefärbt und dann wieder in PBS entfärbt. Bei einem erfolgreichen Transfer sind die Banden nach der Färbung sichtbar. Für die spätere Größenkontrolle beim Western Blot wurde von der Membran eine Kopie angefertigt. Im Anschluss daran wurde die Membran mit PBS komplett entfärbt. Dies ist essentiell, um die anschließende Immundetektion nicht zu beeinflussen.

### 2.2.8.6 Proteindetektion mittels Antikörpern (Immundetektion)

Die Tabelle 26 fasst die Schritte der Immundetektion in tabellarischer Form zusammen (Tabelle 26). Als Erstes musste die Membran mit einer Blockinglösung behandelt werden, um unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Nach diesem Schritt wurde die Membran mit dem Primärantikörper inkubiert. Um die Antigen-Antikörper Bindung detektieren zu können, wird ein Sekundärantikörper eingesetzt. Dieser Antikörper ist entweder mit einer Meerrettich-Peroxidase oder mit einem infraroten Farbstoff (IR-Dye) gekoppelt. Die Membran wurde gewaschen und die Detektion konnte erfolgen.

**Tabelle 26: Schritte der Immundetektion**

<b>Waschen</b>	2 x in PBS
<b>Blocking</b>	50 Min. in PBS + 5% Magermilch Pulver
<b>1. Antikörper</b>	über Nacht bei RT in PBS + 5% Magermilch Pulver + 0,2% Tween20
<b>Waschen</b>	4 x mit PBS + 0,1% Tween20 je 5 Min.
<b>2. Antikörper</b>	50 Min. in PBS + 5% Magermilch Pulver + 0,2 % Tween20
<b>Waschen</b>	3 x in PBS + 0,1 % Tween20 für je 5 Min.
<b>Waschen</b>	1 x in PBS für je 5 Min.

Der Nachweis erfolgte nun je nach eingesetztem Zweitantikörper entweder mittels Chemolumineszenz oder mittels Odyssey-Technologie.

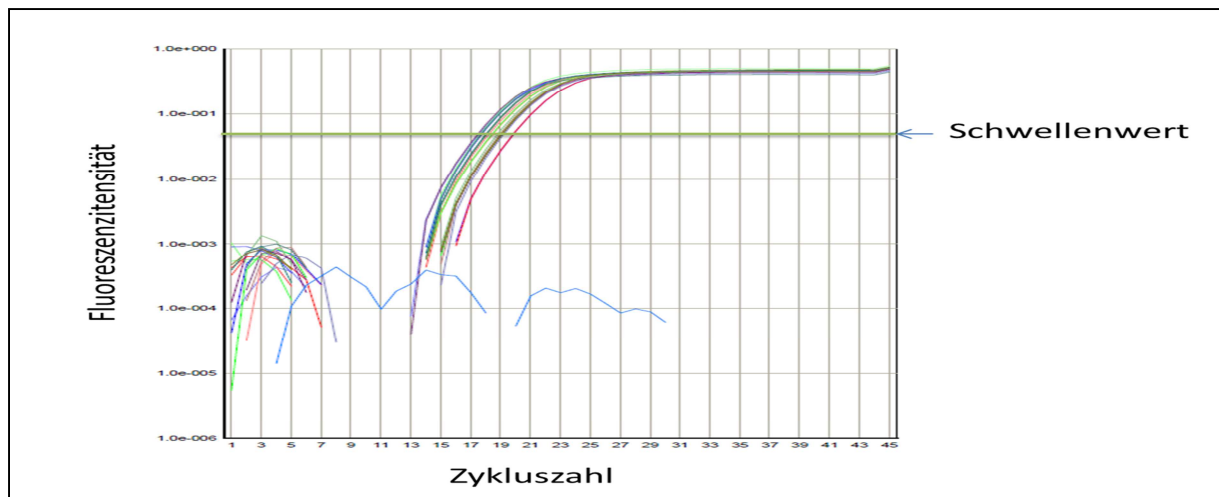
Für die Chemolumineszenz wurde „*Western Lightning Plus ECL Reagenz*“ verwendet (Perkin Elmer). Die ECL-Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und eine Min. bei RT inkubiert. Dieses Reagenz enthält Luminol, welches durch die Meerrettich-Peroxidase (horseradish-peroxidase, HP) oxidiert wird und dann Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert. Durch das Auflegen eines Films wurde diese Reaktion sichtbar gemacht. Der Film wurde entwickelt, anschließend fixiert und diente somit zur dauerhaften Dokumentation der sichtbar gemachten Banden.

Für die Odyssey-Technologie wurde die Membran auf das Scanmodul des Li-Cor Odyssey-Geräts gelegt. Das infrarote Licht kann in den Wellenlängen 600 nm und 800 nm angeregt werden. Diese Anregung kann simultan erfolgen, sodass zwei unterschiedliche Antikörper gleichzeitig nachgewiesen werden können. Nach dem Scanvorgang wurde das Bild auf einen Bildschirm übertragen und konnte

gespeichert werden. Die Banden wurden densitometrisch quantifiziert und die Messwerte der zu untersuchenden Proteine durch die Aktinkontrolle dividiert.

### **2.2.9 Real-Time PCR**

Die „Real-Time PCR“, eine quantitative Echtzeit PCR, dient der Quantifizierung von Nukleinsäuren. Dabei gibt es unterschiedliche Möglichkeiten, die DNA für eine Quantifizierung sichtbar zu machen. In unserem Institut wird zum Nachweis der Farbstoff SYBRGreen (Livak et al., 1995) eingesetzt, welcher unspezifisch in die doppelsträngige DNA interkaliert. Der dadurch entstandene DNA-Fluoreszenzfarbstoffkomplex emittiert grünes Licht mit einer Wellenlänge von 521 nm. Ziel einer Real-Time PCR ist die Analyse der Expression verschiedener Gene unter unterschiedlichen Bedingungen und in unterschiedlichen Zelltypen. Mit der Real-Time PCR Technik werden nicht, wie sonst üblich, absolute Mengen an PCR-Produkt gemessen, sondern man nutzt zur Quantifizierung die Kinetik der PCR-Reaktion. Die DNA-Menge verdoppelt sich in jedem Zyklus, wodurch ein exponentieller Anstieg der DNA-Menge, um den Faktor 2, stattfindet. In den frühen Zyklen unterscheidet sich das Fluoreszenzsignal des Templates nicht vom Hintergrund. Limitierende Faktoren der PCR sind die Primer oder Nukleotidkonzentration, aber auch ein Funktionsverlust der Taq-Polymerase gehört zu den limitierenden Faktoren. Somit erfolgt in späten Zyklen der Anstieg der DNA Menge nicht mehr linear. Aus diesen Gründen wird ein Schwellenwert festgelegt. Dieser Schwellenwert, auch „cycle threshold“ oder CT Wert genannt, bezieht sich auf den Zeitpunkt bzw. den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz des Templates erstmalig signifikant größer ist als die Hintergrundfluoreszenz. Je mehr Template vorliegt, desto früher wird der Schwellenwert überschritten (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zykluszahl. Die Zykluszahl, bei der der Schwellenwert überschritten wird ist der CT-Wert.

Ein weiteres Kriterium, das bei der Auswertung beachtet werden muss, sind die Schmelzkurven. Idealerweise sollte nur ein Schmelzpunkt vorhanden sein. Die Zahl der Schmelzpunkte darf die Zahl der amplifizierten Produkte nicht überschreiten. Somit können Kontaminationen oder Primerdimere ausgeschlossen werden.

Bei der Real-Time PCR handelt es sich um eine quantitative Methode. Zur Quantifizierung gibt es zwei Möglichkeiten: die absolute und die relative Quantifizierung. Die absolute Quantifizierung wird anhand einer gegebenen Kalibrierkurve durchgeführt, welche auf einer Verdünnungsreihe von beispielsweise einer definierten cDNA-Menge basiert. Bei der relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres nicht reguliertes „*Housekeeping Gen*“ (HKG) bezogen. Wir verwendeten  $\beta$ -Aktin als HKG. Die gebildete cDNA Menge wird dann in das Verhältnis zur Expression des Housekeeping-Gens gesetzt und kann somit quantifiziert werden.

### 2.2.9.1 Probengewinnung für die Real-Time PCR

Als Ausgangsmaterial für eine Real-Time PCR dient RNA. Um beispielsweise die AQP5-Expressionskinetik untersuchen zu können, wurden THP-1 Zellen, wie unter 2.2.8.1 beschrieben, ausgesät, stimuliert und zu definierten Zeitpunkten nach der Stimulation wurde Gesamt-RNA aus den Zellen gewonnen. Um die Auswirkung der Überexpression von Transkriptionsfaktoren auf die Expression von AQP5 untersuchen zu können, wurden HeLa und HEK293 Zellen, wie unter 2.2.2.2 beschrieben, transfiziert und 24 Std. nach der Transfektion wurde die Gesamt-RNA gewonnen. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte mit Hilfe des „*Qiagen RNeasy Mini*



*Kit*“. Kurz, die Zellen wurden mittels RLT-Puffer lysiert und das Lysat über eine QIAshredder Säule gegeben. Die Aufreinigung wurde nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Während der Aufreinigung wurde ein DNase Verdau durchgeführt. In diesem Schritt wird noch vorhandene DNA verdaut. Anschließend wurde die gewonnene Gesamt-RNA mittels Nanodrop vermessen, um Konzentration sowie die Reinheit zu bestimmen. Die RNA wurde bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Um eine Quantifizierung mittels Real-Time PCR durchführen zu können, musste die RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Nach folgendem Protokoll wurde die gewonnene Gesamt-RNA mittels SuperScriptII (Invitrogen) in cDNA umgeschrieben (Tabelle 27).

**Tabelle 27: Protokoll zur Umschreibung von RNA in cDNA**

<b>Substanz</b>	<b>Menge (Konzentration)</b>
Gesamt-RNA	1 µg in 10 µl Aqua reinst.
Oligo dT Oligonukleotid (Roche)	1 µl
dNTP Mix (Fermentas)	1 µl (10 mM)
5 Min. bei 65°C inkubieren	
First strand Puffer (Invitrogen)	4 µl
DTT (Fermentas)	2 µl (0,1M)
RNase Inhibitor (Fermentas)	1 µl (40U/µl)
2 Min. bei 42°C	
SuperScriptII (Invitrogen)	1 µl
50 Min. bei 42°C	
15 Min. bei 70°C	

Die gewonnene cDNA kann entweder bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden oder direkt in eine Real-Time PCR eingesetzt werden. Hierfür wurde die cDNA 1:2 oder 1:10 in *Aqua reinst.* verdünnt.

### 2.2.9.2 Durchführung der Real-Time PCR

Für die Real-Time-PCR wurde der „*QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix*“ der Firma Qiagen verwendet. Es wurden Doppelbestimmungen pro Probe angesetzt, ebenso wurde eine Negativkontrolle (MM ohne Template) mitlaufen gelassen, um Kontaminationen durch die Reagenzien auszuschließen. Die Reaktionsansätze für die Real-Time PCR setzten sich wie folgt zusammen (Tabelle 28):

**Tabelle 28: Ansatz zur Real-Time PCR**

<b>Real-Time PCR</b>	QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix	12,5 $\mu\text{l}$
	SE_RT_Primer	1 $\mu\text{l}$
	AS_RT_Primer	1 $\mu\text{l}$
	Aqua dest.	8 $\mu\text{l}$
	cDNA	2,5 $\mu\text{l}$

Die Reaktionsansätze wurden auf Eis pipettiert und anschließend herunterzentrifugiert. Die Durchführung der Real-Time PCR erfolgte mit dem „ABI Prism 7700 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems) nach folgendem Thermoprofil (Tabelle 29):

**Tabelle 29: Thermoprofil zur Real-Time PCR**

Schritt	Temperatur	Zeit	Zurück zu Schritt	Anzahl Wdh.
1	50°C	2 Min.		
2	95°C	15 Min.		
3	95°C	15 Sek.		
4	variabel	33 Sek.		
5	72°C	33 Sek.	3	45
6	95°C	15 Sek.		

7	60°C	1 Min.		
8	95°C	15 Sek.		

Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte unter Benutzung folgender Formel:

$$\frac{AQP5}{\beta - Aktin} = 2^{-[Ct(AQP5/1) - Ct(\beta - Aktin)]}$$

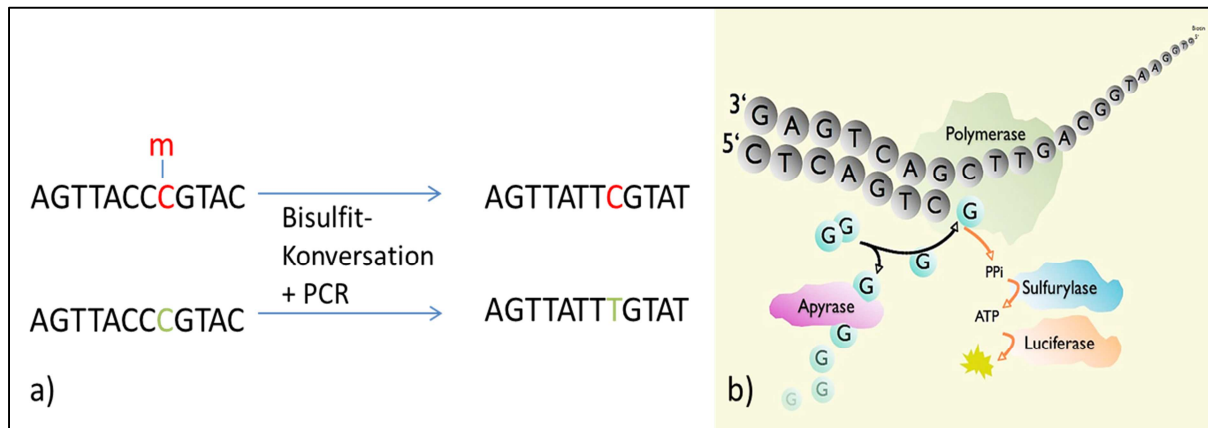
Jeder Ct-Wert ist der Mittelwert der Doppelbestimmungen einer Probe. Als Referenzgen wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

#### 2.2.10 Untersuchung der Methylierung des AQP5-Promotors

Ob der AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus das Methylierungsmuster des AQP5-Promotors beeinflusst, ist eine weitere Frage aus der vorliegenden Doktorarbeit. Um sich dieser Frage zu nähern, wurde zunächst in Zellkulturexperimenten untersucht, ob die AQP5-Expression in Immunzellen generell durch Methylierung reguliert wird. Dazu wurden unterschiedliche Immunzelllinien mit einem DNA-Methyltransferaseinhibitor inkubiert und anschließend DNA- und RNA isoliert. Für die Auswertung des Methylierungsstatus wurde sich der Methode der Bisulfit-Konversion mit anschließender RT-PCR mit spezifischen Oligonukleotide bedient. Das Prinzip der Bisulfitbehandlung beruht auf der Desaminierung von nicht methyliertem Cytosin zu Uracil durch das Reagenz Bisulfit. Methylierte Cytosine werden jedoch nicht konvertiert. Uracil wird in der PCR Reaktion als Thymin in den Strang eingebaut, methylierte Cytosine bleiben ein C (Abbildung 15 a). Der Methylierungsstatus wird entweder mittels RT-PCR mit methylierungsspezifischen Primern oder mittels PCR und einer Sequenzierung bestimmt. Bei der Methode der methylierungsspezifischen Oligonukleotide bedient man sich zweier Oligonukleotidpaare pro Analyse. Das eine Oligonukleotidpaar (M) erkennt spezifisch zuvor methylierte DNA, d.h. nicht konvertierte Cytosine. Das andere Oligonukleotidpaar (U) hingegen erkennt zuvor unmethylierte DNA, d.h. konvertierte Cytosine, also Thymine. Die Auswertung des Methylierungsstatus erfolgt über die Berechnung einer zuvor erstellten Verdünnungsreihe.

Bei den untersuchten Patientenproben war der Methylierungsstatus einzelner Basen von besonderer Bedeutung. Hierfür wurde der Methylierungsstatus der bisulfitbehandelten DNA mittels Pyrosequenzierung (PSQ) analysiert. Grundlage einer Pyrosequenzierung ist, dass die einzelsträngige Template-DNA an einen

Adapter ligiert ist. Die Template-DNA wird über den Adapter an einen Bead gekoppelt und kann so angesaugt werden. Das Detektionsprinzip basiert auf dem einzelnen Einbau von Nukleotiden, d.h. die vier Nukleotidbasen werden einzeln zum Reaktionsansatz gegeben. Erfolgt ein Einbau der Base wird eine Enzymkaskade unter Beteiligung einer Luziferase ausgelöst, wodurch Licht emittiert wird. Detektiert wird das emittierte Licht (Abbildung 15 b). Eine Software berechnet am Ende aus dem Anteil der detektierten Cs und Ts den Anteil an methyliertem Cytosin.



**Abbildung 15:** a) Prinzip der Bisulfit-Behandlung. Nicht methylierte Cytosine werden durch die Behandlung und PCR zum T und methylierte Cytosine bleiben ein C. b) Prinzip der Pyrosequenzierung. Durch Einbau eines komplementären Nukleotids durch die Polymerase wird Pyrophosphat (PPi) frei, wodurch die Enzymreaktion der Sulfurylase aktiviert wird, welche ATP bildet und die Luziferase aktiviert, die wiederum das Substrat abbaut und dabei Licht emittiert. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch die Apyrase abgebaut (Quelle: varionostic GmbH)

### 2.2.10.1 Untersuchung der AQP5-Promotormethylierung und AQP5-Expression nach Behandlung mit einem DNA-Methyltransferaseinhibitor mittels RT-PCR

Zur Untersuchung der AQP5-Promotormethylierung und AQP5-Expression nach Behandlung mit einem DNA-Methyltransferaseinhibitor wurden die Immunzelllinien HL-60, U937, Jurkat und REH verwendet. Die Zellen wurden in einer Konzentration von  $0,25 \cdot 10^6$ /ml in 2 ml RPMI-Medium ausgesät und direkt mit  $50 \mu\text{M}$  des DNA-Methyltransferaseinhibitors 5-Aza-2'-Deoxycytidin (ADC) stimuliert. Nach 3 Tagen erfolgten ein Mediumwechsel und eine anschließende Stimulation mit  $10 \mu\text{M}$  des Inhibitors in 4 ml Zellkulturmedium. In den folgenden drei Tagen erfolgte täglich eine neue Gabe von  $10 \mu\text{M}$  des Inhibitors. Nach sieben Tagen wurden DNA- und RNA-Proben genau nach Protokoll des „QIAamp DNA Blood Mini Kits“, sowie des „RNeasy Mini Kits“ isoliert. Die DNA- und RNA-Konzentrationen wurden mittels Nanodrop bestimmt. Es wurden 500 ng DNA in die Bisulfitkonversion eingesetzt. Diese Bisulfitkonversion der DNA erfolgte mittels „EZ DNA Methylation Gold kit“. Die Gewinnung von cDNA aus  $1 \mu\text{g}$  RNA-Probe erfolgte mittels „QuantiTect Reverse

*Transcription Kit*“. Die anschließende Quantifizierung des Methylierungsstatus und der AQP5-Expression erfolgte mittels RT-PCR mit dem „*QuantiTect SYBR Green PCR Kit*“. Für die Bestimmung des Methylierungsstatus wurde zunächst eine Verdünnungsreihe mit bekanntem Anteil methylierter und unmethylierter DNA hergestellt. Dazu wurde die DNA aus folgendem Kit: „*Cells-to-CpG™ Methylated & Unmethylated gDNA Control Kit*“ verwendet und diese in definierten Anteilen verdünnt. Es wurden die Oligonukleotide AQP5\_M1\_Se und AQP5\_M1\_As zur Detektion methylierter DNA (M) und die Oligonukleotide AQP5\_U1\_Se und AQP5\_U1\_As zur Detektion unmethylierter DNA (U) verwendet. Anschließend wurde in jeder Probe die Differenz der CT-Werte von unmethylierten und methylierten Primern (DeltaCT (U-M)) bestimmt. Dieses konnte nun gegen die bekannte prozentuale Methylierung aufgetragen werden. Aus der Verdünnungsreihe ergab sich folgende Standardkurve (Abbildung 16). Aus der Standardkurve wurde nachstehende Formel bestimmt:

$$\text{Methylierung [\%]} = \frac{42,63 * 100}{42,63 + (100 - 42,63) * e^{-100 * 0,0066 * \Delta CT}}$$

Dabei stellt 100 den Grenzwert der Funktion dar, 42,63 ist der berechnete Schnittpunkt mit der y-Achse und 0,0066 ist die berechnete Wachstumskonstante. Die Werte ergeben sich aus den gemessenen DeltaCT (U-M)) ( $\Delta CT$ )-Werten zu der gegebenen prozentualen Methylierung.

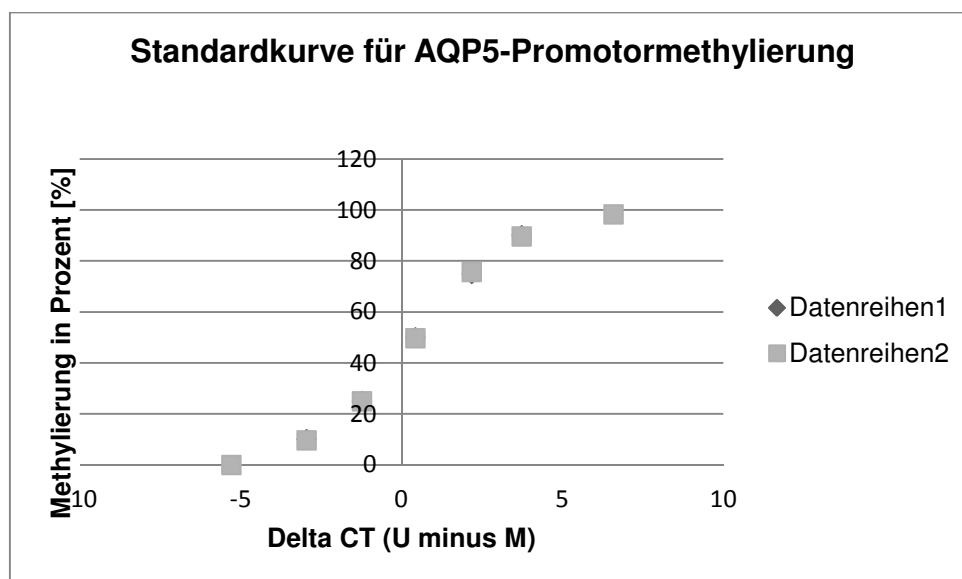


Abbildung 16: Standardkurve zur Berechnung des Anteils an methylierter DNA aus einer Probe. Datenreihe 1: mittels RT-PCR bestimmte Werte, Datenreihe 2: mittels oben genannter Formel berechneter Werte aus gegebenen DeltaCT-Werten. Die Datenreihen stimmen fast zu 100 % überein.

Der Anteil methylierter DNA der unterschiedlichen Proben konnte nun durch Einsetzen der berechneten DeltaCT-Werte (U-M) in die oben stehende Formel ermittelt werden. Die Quantifizierung der AQP5-Expression erfolgte mittels Real-Time-PCR, wie unter 0 beschrieben.

### **2.2.10.2 Bisulfitkonversion der DNA-Proben**

Zusätzlich wurde das Methylierungsmuster von Patienten mit schwerer Sepsis und postoperativen Patienten bestimmt. Hierfür wurde die DNA mittels „*QIAamp DNA Blood Mini Kit*“ isoliert. Die DNA Konzentration wurde mittels Nanodrop bestimmt. Es wurden 200 bis 500 ng DNA eingesetzt und die Bisulfitkonversion erfolgte genau nach Protokoll von dem „*EZ DNA Methylation Gold kit*“ (*Zymo Research*).

### **2.2.10.3 PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Proben**

Die Analyse des Methylierungsmuster erfolgte nach der Bisulfitkonvertierung mit einer Standard PCR. Als Mastermix diente der PCR Mastermix „*ZymoTaq PreMix*“ und als Primer wurden folgende benutzt: Meth\_2\_SE\_neu und Meth\_2\_AS sowie Meth\_3\_Se\_neu und Meth\_3\_AS. Anschließend wurden die Proben mittels Sequenzierung analysiert. Hierbei wurde der Pyrosequenzer „*PyroMark Q96 MD*“ der Firma Qiagen verwendet. Die Herstellung der Oligonukleotidsequenzen sowie das Design des Assays wurden mit der Software „*PyroMark CpG Assay Design*“ der Firma Qiagen durchgeführt. Ein Oligonukleotid muss für die Pyrosequenzierung biotinyliert werden, damit die Kopplung an den Sepharose-Bead erfolgen kann. Die Analyse der Proben erfolgte dem mit „*PyroMark Q96 MD*“ nach folgendem Protokoll (Tabelle 30):

**Tabelle 30: Protokoll zur Methylierungsanalyse mittels PSQ**

<b>Vorgang</b>	<b>Arbeitsschritt</b>
Kopplung der biotinylierten DNA an Sepharose Beads	40µl Binding Buffer, 28µl Aqua dest., 1µl Sepharose Beads und 7µl PCR Produkt pipettieren  Inkubation bei 1000 rpm für 5 Min.
Denaturierung der DNA-Doppelstränge	Ansaugen der Beads mittels PrepTool und Denaturierung mit NaOH sowie Reinigung mit Ethanol und Waschpuffer

Annealing der Sequenzierungsoligonukleotide	Überführung der Beads, sowie 8,4µl Annealingpuffer und 3,6µl Sequenzierungsoligonukleotide (1pmol) in die Sequenzierplatte und Inkubation für 2 Min. bei 80°C
Start der Sequenzierungsreaktion durch Zugabe der Nukleotide, Enzyme und des Substrats	Befüllen der Capillary Tips und der Reagent Tips mit der durch die Software errechneten Menge an Nukleotiden, sowie Substrat und Enzym

Die Auswertung erfolgte mit der „PyroMark CpG Assay Design“-Software, welche die prozentuale Methylierung der einzelnen Positionen einer Probe errechnet. Die weitere Auswertung erfolgte mittels Excel, GraphPad Prism 6.0 und SPSS Statistics 22.

### 2.2.11 Tierexperimentelle Arbeiten

Um die Frage zu beantworten, ob AQP5 eine Schlüsselrolle in der Sepsis einnimmt, wurde ein *in vivo* Experiment mit *Aqp5*-KO Mäusen durchgeführt. Die Hypothese ist, dass wenn AQP5 eine Schlüsselrolle einnimmt, müssten die *Aqp5*-KO (*Aqp5*<sup>-/-</sup>) Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen (*Aqp5*<sup>+/+</sup>) eine veränderte Überlebensrate haben. Die Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Anil Menon aus Cincinnati zur Verfügung gestellt.

Die Mäuse wurden im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen (ZTL) gehalten und gezüchtet. Sie wurden heterozygot verpaart, um *Aqp5*-KO-Mäuse sowie WT-Wurfgeschwister zu erhalten. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 20±1°C, relative Luftfeuchte 50±5% und einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden) in Polycarbonatkäfigen mit unbehandelten Hobelspänen als Einstreu. Standardisiertes Nagerfutter (Pellets der Firma Ssniff) und Leitungswasser standen *ad libitum* zur Verfügung. Als Modell für eine Sepsis diente eine LPS induzierte Inflammation (Zanotti-Cavazzoni, Goldfarb 2009). Hierfür wurde LPS i.p. injiziert. Anschließend wurde das Überleben der Mäuse beobachtet.

#### 2.2.11.1 Genotypisierung der Mäuse

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels Ohrbiopsie. Nach der Ohrmarkierung wurde das Stück Haut entnommen, um daraus die DNA zu gewinnen. Die DNA-Aufreinigung erfolgte mittels „QIAamp DNA Blood Mini Kit“ der Firma Qiagen. Dazu

wurden die Ohrbiopsien in 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K über Nacht bei 56°C inkubiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte genau nach Protokoll des Herstellers.

Die PCR erfolgte unter Verwendung eines Standardprotokolls und folgenden Oligonukleotiden: Intron 3F, Intron 3R und RPGKO. Die PCR Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Banden ausgewertet. Beim Wildtyp-Allel trat eine Bande von 230 bp auf, während die KO-Bande eine Größe von 300 bp aufwies. Heterozygote Tiere zeigten dementsprechend beide Banden.

#### **2.2.11.2 Auslösen der LPS-induzierten Inflammation**

Die Tierschutzkommission NRW genehmigte den Tierversuch unter folgendem Aktenzeichen: 84-02.04.2012.A416. Es wurden 18 WT sowie 18 KO Mäuse in den Versuch genommen. Den Mäusen, zu gleichen Teilen Männchen und Weibchen in einem Alter von 4 bis 6 Monaten, wurden 20 mg/kg Körpergewicht LPS i.p. injiziert. Hierdurch sollte eine Inflammation induziert werden, die in einer Sepsis enden sollte. Das Ausgangsgewicht betrug bei den Weibchen  $21,9 \pm 1,7$  g ( $Aqp5^{+/+}$ );  $21,9 \pm 1,8$  g ( $Aqp5^{-/-}$ ) und bei den Männchen  $26,8 \pm 3,0$  g ( $Aqp5^{+/+}$ );  $27,3 \pm 2,9$  g ( $Aqp5^{-/-}$ ).

Zu Versuchsbeginn wurden die Mäuse gewogen, um eine definierte Menge an LPS injizieren zu können. Das LPS (LPS E. coli 0111:B4, Sigma-Aldrich) wurde in einer 0,9%igen Natriumchloridlösung (NaCl) in einer Konzentration von 2 µg/ml gelöst. Pro Versuch wurden zwei Kontrolltiere mitgeführt, die anstelle von LPS eine 0,9%ige Natriumchloridlösung i.p. injiziert bekamen. Nach der Injektion wurden die Tiere zurück in ihren Käfig gesetzt und in regelmäßigen Abständen (in den ersten acht Std., jede Stunde) untersucht. Um den Allgemeinzustand der Versuchstiere beurteilen zu können, wurde in Zusammenarbeit mit den Tierärzten des ZTLs ein Score-Sheet entworfen und eingesetzt (Tabelle 31). Dabei erfolgte eine Punktevergabe von 0 bis 20 zu folgenden Merkmalen: Körpergewicht, Allgemeinzustand, Spontanverhalten, Klinischer Befund und Ausscheidungen. 0 Punkte bedeuteten einen unauffälligen, normalen Zustand und 20 Punkte den kritischsten Zustand (starker Durchfall, verklebte Körperöffnungen, Lethargie, Gewichtsreduktion über 20% etc.). Ebenso wurde das Überleben der Tiere dokumentiert. Zwischen den Stunden neun und 160 erfolgte die Beurteilung alle sechs Std.. Tiere, die eine zu hohe Belastungserscheinung aufwiesen (20 Punkte oder mehr), oder denen es beim



nächsten Beobachtungszeitpunkt nicht besser ging, wurden aus dem Versuch genommen. Die Tiere wurden mittels Isofluran-Überdosierung geopfert.

Nach 168 Std. wurde der Versuch beendet und alle Tiere wurden mittels Isofluran-Überdosis getötet (Tabelle 31).

**Tabelle 31: Darstellung des Score Sheets zur Beurteilung des Allgemeinzustands der Tiere**

<b>Beobachtung</b>	<b>Punktebewertung</b>
<u>I Körpergewicht</u>	
- 0-5% Gewichtsveränderung	5
- Gewichtsreduktion 5-20%	10
- Gewichtsreduktion > 20%	20
<u>II Allgemeinzustand</u>	
- Fell glatt, glänzend; Körperöffnungen sauber, Augen klar, glänzend	0
- Struppiges/schmutziges Fell, verklebte oder feuchte Körperöffnungen, unnormale Haltung, Augen trüb, hoher Muskeltonus, geringgradige Dehydration (Hautfalte verstreicht verzögert), schnelle oder abdominale Atmung	10
- Verkrampfungen, Lähmungen (Rumpfmuskulatur, Extremitäten), Atemgeräusche (schwerfällige Atmung), hochgradige Dehydration (Hautfalte bleibt stehen), dauerhaft gekrümmte Körperhaltung, schmutziges Fell, stark verklebte Augen/Nase, Kotverschmutzung	20
<u>III Spontanverhalten</u>	
- normales Verhalten (Schlafen, Reaktion auf Käfigbewegungen und Berührung, Neugier, Sozialkontakte)	0
- geringe Abweichung vom Normverhalten	1
- ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte Motorik oder leichte Hyperkinetik	5
- Selbstisolation, Lethargie; ausgeprägte Hyperkinetik bzw. Verhaltensstereotypen; Koordinationsstörungen, Fehlende Futter- oder Nahrungsaufnahme	10
- Schmerzlaute beim Ergreifen; Selbstamputation (Automutilation), Unfähigkeit der Nahrungsaufnahme	20
<u>IV Klinischer Befund</u>	
- Atmung normal, Extremitäten warm	0
- Atemfrequenz merklich erhöht, Erhöhung der Herzfrequenz	10
- Schnappatmung;	20
- Bewusstseinsverlust	20
<u>V Ausscheidungen</u>	
- normal unverändert	0
- leichte Veränderung in Form und Konsistenz	5
- mäßiger Durchfall oder trockener Kot, abnormaler Urin (Menge/Farbe)	

- unkontrollierter Durchfall, blutiger Kot, kein Urin/Kot oder inkontinent	10 20
<u>Bewertung; Maßnahmen</u>	
0-9 Punkte:	
Keine oder geringe Belastung; Tier wird weiterhin täglich kontrolliert	
10-19 Punkte:	
Mittelgradige Belastung, engmaschigere Überwachung (alle 6 Stunden); Tier wird schmerzfrei getötet, wenn nach 2 Tagen keine Besserung eingetreten ist	
20 Punkte oder mehr:	
Hochgradige Belastung, Versuch abbrechen, Tier wird schmerzfrei getötet	

### **2.2.11.3 Serumgewinnung und anschließende Cytokinbestimmung**

4,5 Std. und 24 Std. nach der LPS Injektion wurde eine retrobulbäre Blutabnahme bei den Mäusen vorgenommen und das Serum gewonnen. Hierfür wurden ca. 150 µl Blut abgenommen. Für die Blutabnahme wurden die Mäuse kurz mit Isofluran narkotisiert. Bis die Mäuse wieder ihre motorischen Fähigkeiten zurück erlangt hatten, wurden sie beobachtet. Das Blut wurde 30 Min. bei RT inkubiert und anschließend für 15 Min. bei 1000 x g zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Cytokinbestimmung der Cytokine IL-10, Tnf- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde mit dem „*LEGEND Max Elisa*“ von der Firma BioLegend durchgeführt. Das Prinzip eines ELISAs beruht auf einem Antikörper-basierten Nachweisverfahren. Bei den verwendeten Kits handelt es sich um sogenannte Sandwich-ELISA-Verfahren. Ein „Fänger“-Antikörper ist bereits an die Platte gekoppelt. An diesen bindet das Epitop des gesuchten Proteins. Der Nachweis erfolgt durch Bindung eines Detektions-Antikörpers, der mit einer alkalischen Phosphatase gekoppelt ist. Durch anschließende Zugabe eines Substrats, welches durch die alkalische Phosphatase umgesetzt wird, kommt es zu einem Farbumschlag. Dieser kann am ELISA-Reader bei der Wellenlänge 450 nm gemessen werden. Die Stärke des Farbumschlags ist dabei abhängig von der vorhandenen Cytokinkonzentration.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Serummenge der Enzyme IL-1 $\beta$ , Tnf- $\alpha$  und IL-10 gemessen. Bei den Cytokinen IL-1 $\beta$  und Tnf- $\alpha$  handelt es sich um Cytokine, welche bei einer Inflammation sehr früh sezerniert werden und die Entzündungsreaktion aktivieren. Da auch antiinflammatorische Cytokine betrachtet werden sollten, untersuchten wir auch die Menge von IL-10 im Mausserum. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerhandbuch. Die Auswertung erfolgte am ELISA Reader und mittels Excel und GraphPad Prism 6.0.

#### **2.2.12 Statistische Methoden**

Ergebnisse sind in der Regel als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Unterschiede wurden als statistisch signifikant anerkannt, wenn der P-Wert unter  $<0,05$  lag. Alle statistischen Analysen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der Software GraphPad Prism 6.0 oder SPSS Statistics 11.0 durchgeführt.

##### ***2.2.12.1 Auswertung der Luziferase- und Proliferations-Assays***

Die Luziferase und Proliferations-Assays wurden jeweils in einer Doppelbestimmung durchgeführt. Von den Messwerten wurde der Hintergrund abgezogen. Anschließend wurde bei den Luziferaseassays das Verhältnis der Lumineszenz von Firefly zu Renilla-Luziferase bestimmt. Von den Doppelbestimmungen wurde der Mittelwert gebildet. Die Bestimmung der Proliferations- und Luziferase-Assays erfolgte achtmal. Zur Überprüfung, ob sich zwei Messwerte signifikant unterschieden, wurde der ungepaarte T-Test zur Berechnung des P-Wertes verwendet. Der sogenannte »P-Wert« ist das Ergebnis eines Signifikanztests zur Prüfung einer vorab aufgestellten Nullhypothese. Ist der P-Wert kleiner als das, ebenfalls vorab, gewählte Irrtums- (Signifikanz-)Niveau  $\alpha$ , dann gilt das Ergebnis als statistisch signifikant (Bender, Lange 2001).

##### ***2.2.12.2 Auswertung der Real-Time-PCR***

Die Real-Time-PCR wurde jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt und die Mittelwerte wurden in die Berechnung eingesetzt.

Die Stimulationsversuche wurden sechsfach durchgeführt. Es erfolgte eine statistische Auswertung mittels 1-Weg-ANOVA oder 2-Weg-ANOVA je nach Experiment. Anschließend wurde ein Tukey-Post-hoc-Test verwendet, um die P-Werte zum Vergleich zweier Proben zu erhalten (TUKEY 1949).

### **2.2.12.3 Auswertung der Methylierungsanalysen**

Die erhobenen Daten wurden aufgrund der Ausreißer durch Ermittlung der Medianwerte und mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ausgewertet. Zunächst wurde jedoch mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft, ob die Daten tatsächlich nicht normalverteilt sind. Nachdem eine Normalverteilung ausgeschlossen wurde, wurde der Wilcoxon-Mann-Whitney-Test angewandt.

Bei dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test handelt es sich um einen parameterfreien statistischen Test. Er dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen. Das Testprinzip beruht auf einer aufsteigenden Rangvergabe der Messwerte zweier Stichproben und Errechnung der Prüfgröße U nach folgender Formel:  $U_1 = n_1 \cdot n_2 + n_1(n_1+1)/2 - R_1$  und  $U_2 = n_1 \cdot n_2 + n_2(n_2+1)/2 - R_2$ . Wobei  $R_1$  und  $R_2$  die Summe der Rangzahlen der jeweiligen Stichproben darstellen. Zur Auswertung wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgelegt. Aus den berechneten U-Werten konnte der P-Wert berechnet werden. Bei einem P-Wert von 0,05 oder kleiner ist davon auszugehen, dass sich die Verteilungen signifikant voneinander unterscheiden (WILCOXON 1946).

### **2.2.12.4 Auswertung der tierexperimentellen Arbeiten**

Zunächst wurde vor Durchführung der Experimente die benötigte Tierzahl ermittelt. Zur Berechnung der für die Experimente benötigten Tierzahlen wurde zunächst eine Power-Analyse durchgeführt. Der zu vergleichende Zielparameter war das prozentuale Überleben der Kontroll- und Versuchsgruppen nach einer Woche (168h). In veröffentlichten Studien mit ähnlicher Fragestellung und vergleichbarem statistischen Ansatz (Sun et al. 2011, Yamanishi et al. 2012) traten mittlere Unterschiede von ca. 10 zu knapp 60% zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe auf. Um unter diesen Rahmenbedingungen eine adäquate statistische Analyse zu ermöglichen, mussten bei einer geforderten Power von 0,8 und einem Signifikanzlevel von  $p < 0,05$  in jeder Gruppe effektiv zumindest 18 Tiere untersucht werden. Die statistische Auswertung der tierexperimentellen Arbeiten erfolgte über eine Kaplan-Meier Analyse. Es handelt sich dabei um eine nichtparametrische Schätzung der Überlebensfunktion über die Betrachtung des Eintretens eines Ereignisses (Ereignis = Tod). Die Cox-Regression wurde angewandt, um das Risiko darzustellen, unter dem das Ereignis eintritt (Crowley, Breslow 1984).

### 3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, 1) durch welche Mechanismen (Transkriptionsfaktorbindung oder Methylierungsmuster) der Polymorphismus A(-1364)C die AQP5-Expression verändert und 2) ob die AQP5-Expression die Letalität im Sepsis-Mausmodell, die Proliferation bzw. Migration von Immunzellen sowie die Cytokinexpression beeinflusst. Des Weiteren wurden die Regulation der AQP5-Expression in der Sepsis und mögliche therapeutische Optionen betrachtet. Im Folgenden werden die generierten Daten präsentiert.

#### 3.1 Identifizierung von Transkriptionsfaktoren, die um den AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus binden

Die erste Hypothese, die zu überprüfen war: das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren an die AQP5-Promotorregion um -1364 wird durch den Austausch von A zu C beeinflusst.

Um erste Hinweise auf mögliche bindende Transkriptionsfaktoren zu erhalten, wurde eine *in silico*-Analyse der AQP5-Promotorregion, um AQP5 A(-1364)C mittels Genomatix ([www.genomatix.com](http://www.genomatix.com)), durchgeführt. Die *in silico* Analyse untersuchte die Region des AQP5-Promotors 18 Basenpaare (bp) vor und 21 bp nach dem SNP A(-1364)C. Das Ergebnis der *in silico* Analyse ist in der folgenden Abbildung dargestellt.

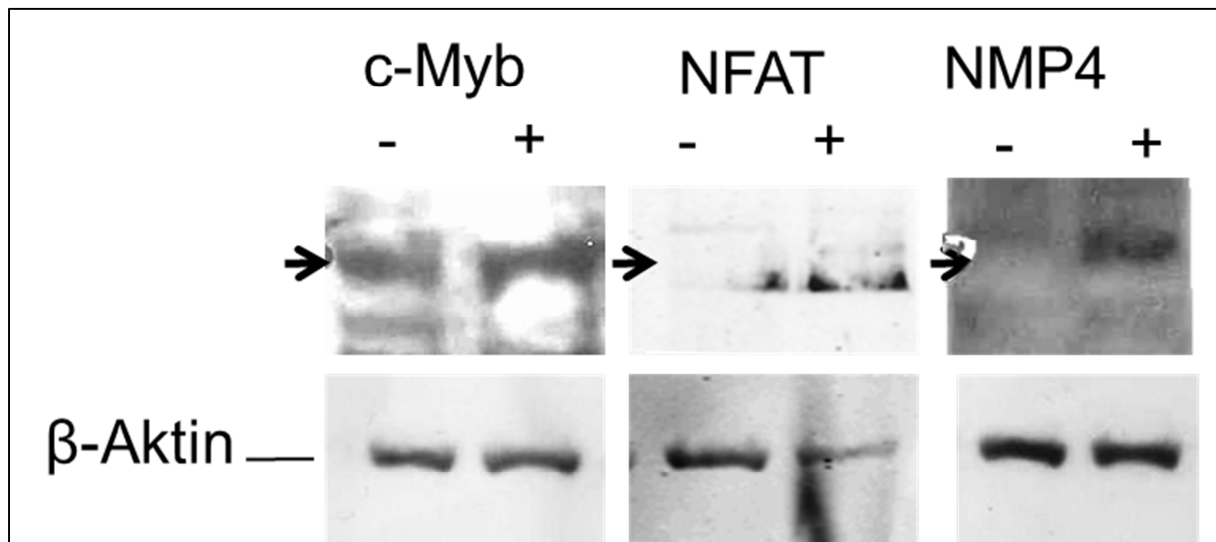


**Abbildung 17:** *in silico* Analyse zur putativen Bindung von Transkriptionsfaktoren an den AQP5-Promotor 18 bp vor und 21 bp nach dem AQP5 A(-1364)C SNPs mittels genomatix. Es konnten die Transkriptionsfaktoren NFAT, NMP4 und c-Myb identifiziert werden.

Anhand der Abbildung ist erkennbar, dass die Transkriptionsfaktoren NMP4, NFAT und c-Myb eine putative Bindung um den AQP5 Promotorbereich A(-1364)C eingehen (Abbildung 17). Die Validierung der Ergebnisse erfolgte mit einem EMSA.

Um sicherzustellen, dass die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren in den Zellkernextrakten vorhanden sind, wurden diese überexprimiert. Hierfür wurde auf die Zelllinie HEK293 aufgrund ihrer sehr guten Transfizierbarkeit (Transfektionseffizienz

>90%) zurückgegriffen. Ob die Transfektion erfolgreich war, wurde durch einen Western Blot überprüft. In der nachfolgenden Abbildung werden die Ergebnisse dargestellt.

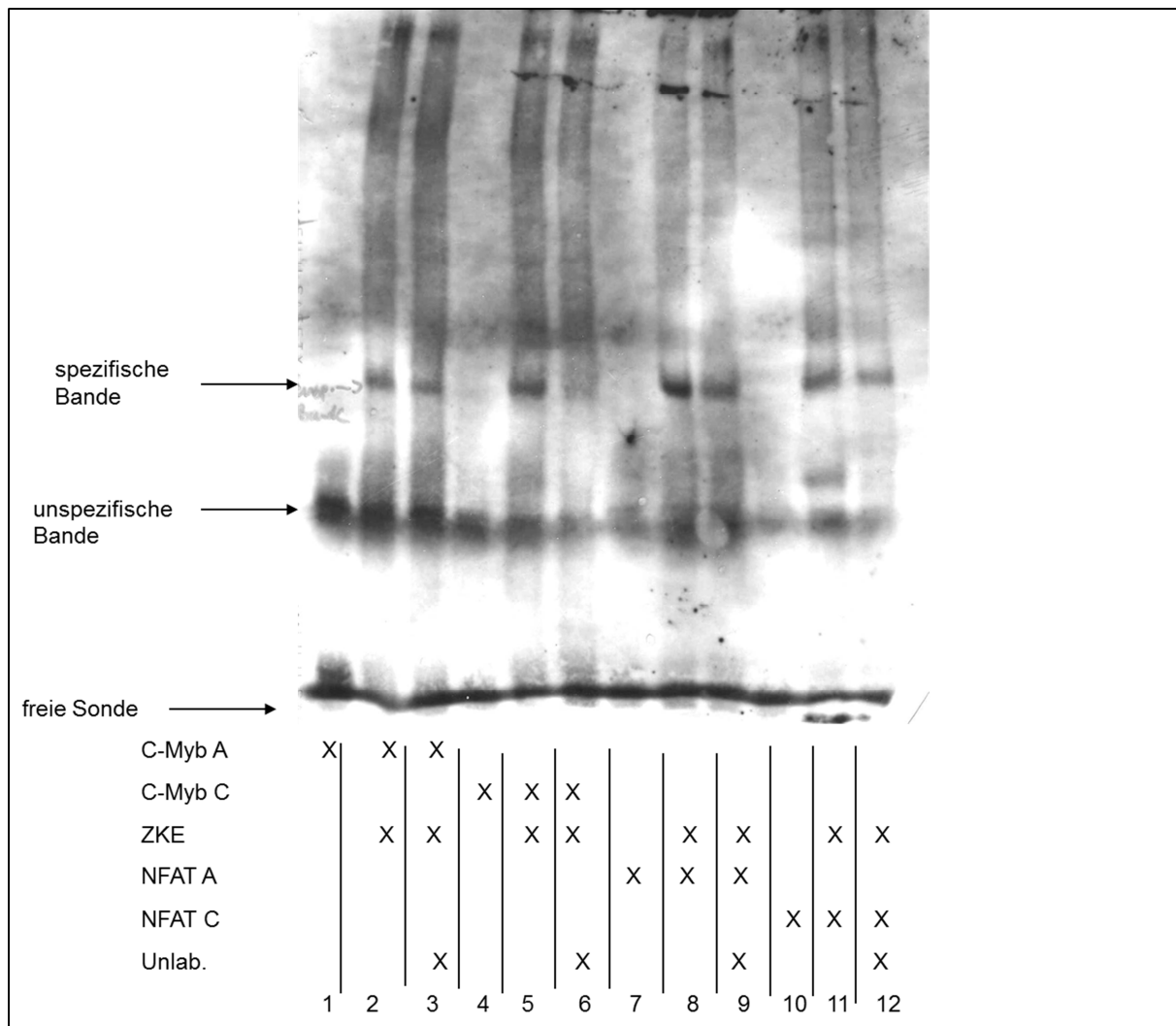


**Abbildung 18:** Untersuchung der Expression von c-Myb, NFAT und NMP4 in Zellkernextrakten aus HEK293 Zellen (+ mit Überexpressionsplasmid transfiziert, - untransfiziert). Um sicherzustellen, dass sich die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren in den Zellkernextrakten befinden, wurden die HEK293 Zellen zunächst mit den entsprechenden Überexpressionsplasmiden transfiziert.

Dabei zeigte sich, dass eine basale Expression von c-Myb in untransfizierten HEK293 Zellen stattfindet. Währenddessen sind NMP4 und NFAT in nativen HEK293 Zellen nur in geringen Mengen im Zellkern vorhanden. Während eine Überexpression von c-Myb nur zu einer leichten Expressionssteigerung führte, konnte die Überexpression von NMP4 und NFAT in HEK293 Zellen deutlich gesteigert werden (Abbildung 18).

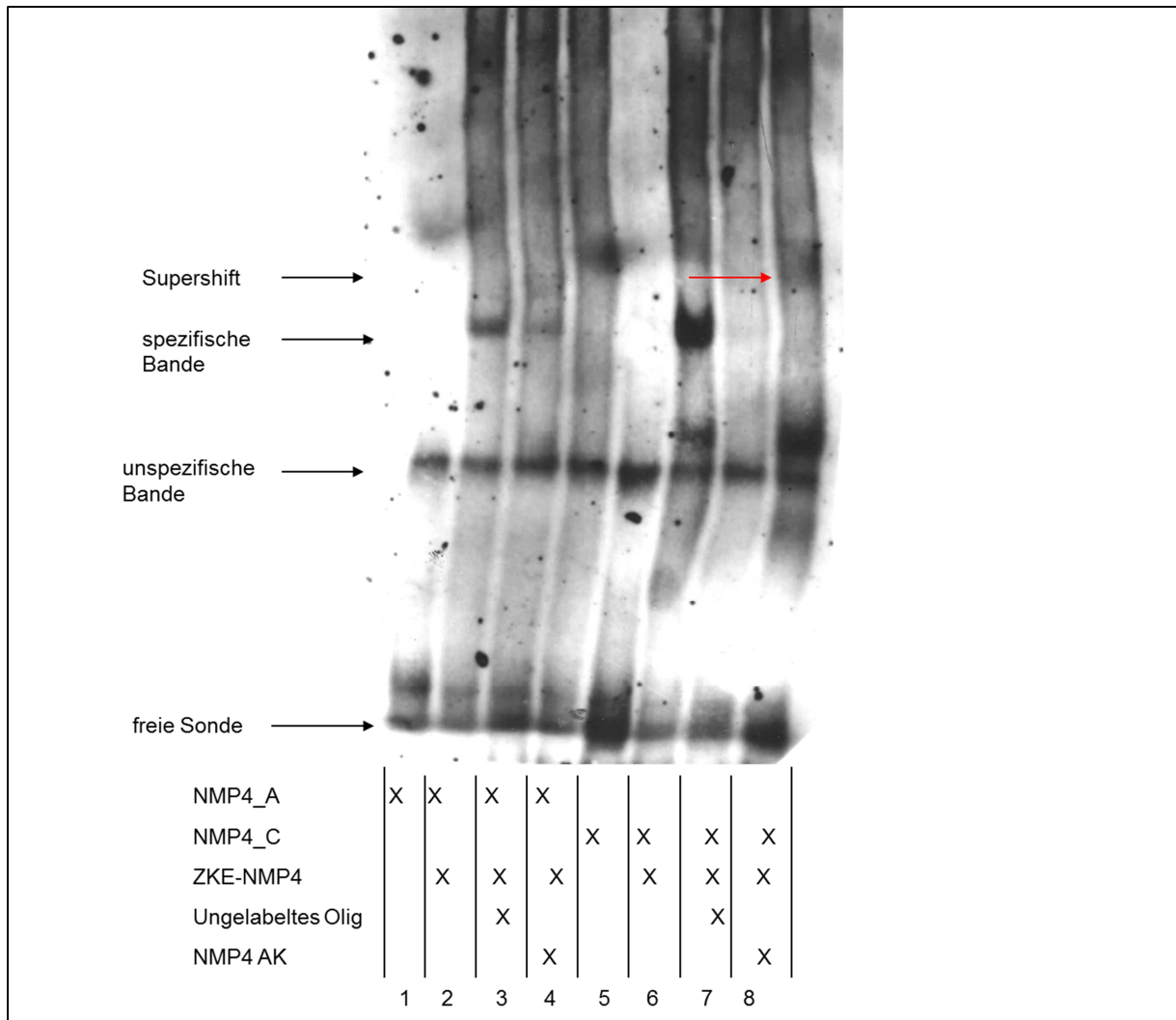
### 3.1.1 Überprüfung der Bindung von c-Myb, NFAT und NMP4 mittels EMSA

Mittels EMSA konnte für die Transkriptionsfaktoren c-Myb und NFAT keine spezifische Bindung im untersuchten Promotorbereich nachgewiesen werden, da die spezifische Bande in den untersuchten Bereichen nicht durch eine Konkurrenz mit einem Überschuss an ungelabeltem Oligonukleotid aufhebbar war (Abbildung 19).



**Abbildung 19: EMSA mit Oligonukleotiden, des AQP5 Promotors um A(-1364)C (Beispiel aus n=3) mit Zellkernextrakten, in denen C-Myb und NFAT überexprimiert sind. Es kommt zur Ausbildung einer stärkeren spezifischen Bande (Spur 2, 5, 8 und 11), die jedoch durch Zugabe eines Überschusses an ungelabeltem Oligonukleotid nicht (Spur 3, 6, 9, 12). Legende zur Abbildung: C-Myb A: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): A-Allel; C-Myb C: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): C-Allel; ZKE: Zellkernextrakte mit C-Myb oder NFAT-Überexpression aus HEK293; unlab Olig: ungelabeltes Oligonukleotid in 50x Überschuss**

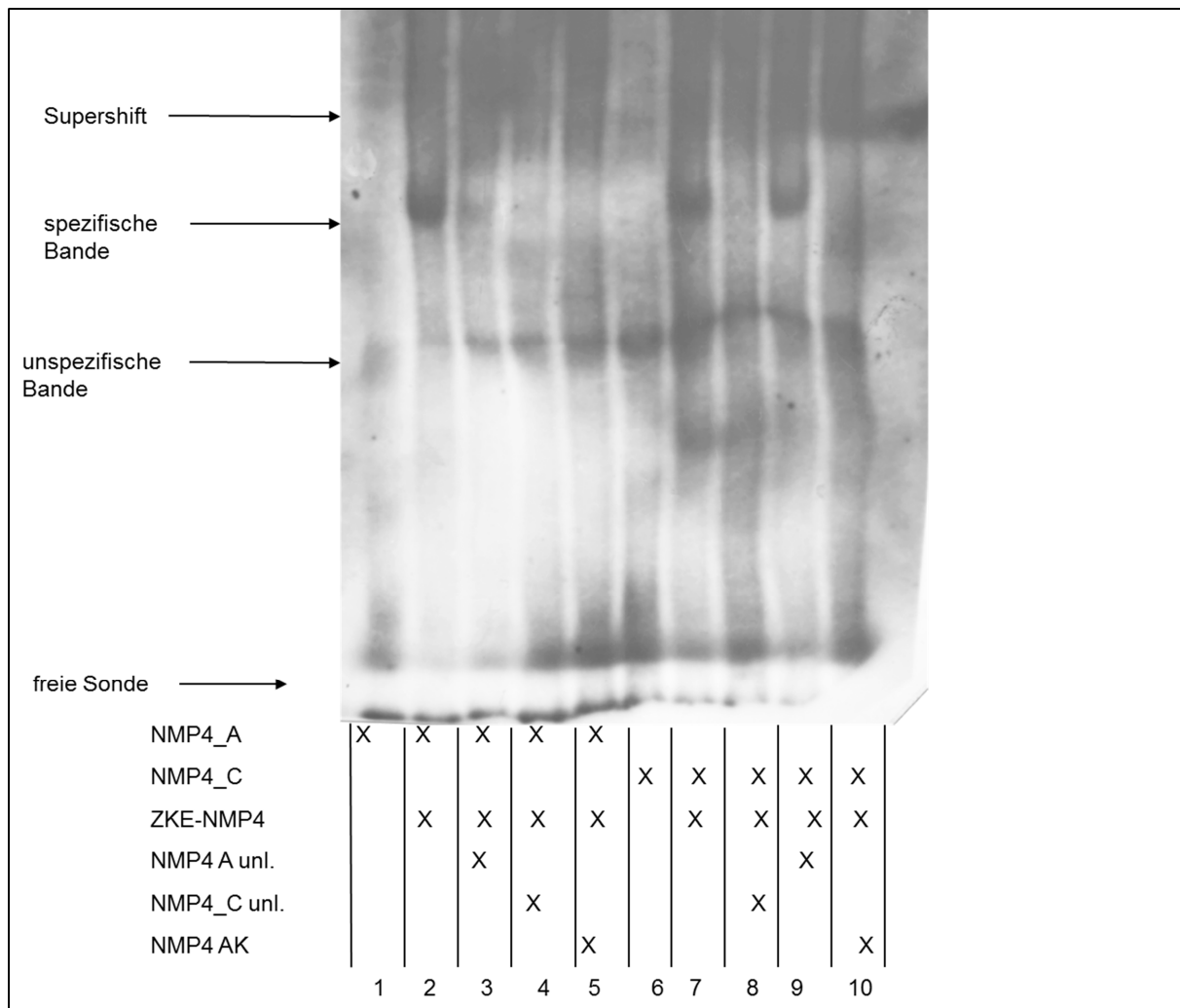
Interessanterweise konnte für den Transkriptionsfaktor NMP4 eine starke spezifische Bindung detektiert werden. Ein beispielhafter EMSA für die Bindung des Transkriptionsfaktor NMP4 um den AQP5 Promotorbereich A(-1364)C ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 20: EMSA mit Oligonukleotiden, des AQP5 Promotors um A(-1364)C(Beispiel aus n=3) mit Zellkernextrakten, in denen NMP4 überexprimiert ist. Es kommt zur Ausbildung einer stärkeren spezifischen Bande beim C-Allel (Spur 6) im Vergleich zum A-Allel (Spur 2). Durch Zugabe eines NMP4 Antikörpers kam es zur Ausbildung eines Supershifts (Spur 4; roter Pfeil, Spur 8). (Legende zur Abbildung: NMP4\_A: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): A-Allel; NMP4\_C: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): C-Allel; ZKE-NMP4: NMP4 überexprimierende Zellkernextrakte aus HEK293; ungelabeltes Olig: ungelabeltes Oligonukleotid in 50x Überschuss; NMP4 AK: NMP4 Antikörper)**

Für NMP4 konnte eine spezifische Bindung detektiert werden, die beim C-Allel deutlich stärker ausgeprägt ist (Spur 6, Abbildung 20). Durch Zugabe eines NMP4 Antikörpers konnte ein Supershift, d.h. eine zusätzliche Verlangsamung der Wanderung der Bande im Gel bei beiden Genotypen erzeugt werden. Somit konnte die spezifische Bindung von NMP4 an die AQP5-Promotorregion um Position nt-1364 bestätigt werden (Abbildung 20). In einem weiteren EMSA sollte die Gegenkompetition mit dem jeweils anderen Allel untersucht werden.





**Abbildung 21: EMSA mit Gegenkompetition mit dem jeweils gegenteiligen Oligonukleotid und mit Zellkernextrakten, in denen NMP4 überexprimiert war. (Legende zur Abbildung: NMP4\_A: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): A-Allel; NMP4\_C: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): C-Allel; ZKE-NMP4: NMP4 überexprimierende Zellkernextrakte aus HEK293; ungelabeltes Olig: ungelabeltes Oligonukleotid in 50x Überschuss; NMP4 AK: NMP4 Antikörper)**

Die ungelabelten Oligonukleotide mit C-Allel konnten die Bindung an das gelabelte Oligonukleotid mit A-Allel verhindern (Spur 4, Abbildung 21). Die Zugabe eines Überschusses des ungelabelten Oligonukleotids mit A-Allel hingegen führte nicht zur Aufhebung der Bindung an das gelabelte Oligonukleotid mit C-Allel (Spur 9, Abbildung 21). Dies verifiziert die spezifische Bindung an das C-Allel. Die Bindung an das C-Allel scheint also deutlich stärker zu sein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass um die Position nt-1364 im AQP5-Promotor NFAT nicht spezifisch bindet. Eine Bindung von c-Myb konnte ebenfalls nicht dargestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigt NMP4 eine spezifische Bindung, die am C-Allel deutlich stärker zu sein scheint.

Im nächsten Schritt sollte eingehend untersucht werden, ob NMP4 zu einer Allel-spezifischen Änderung der AQP5-Promotoraktivität führt.

### 3.1.2 Regulation der AQP5-Promotoraktivität durch Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit des AQP5 A(-1364)C Polymorphismus untersucht mittels Reporterassay

Die EMSA-Untersuchungen legten nahe, dass NMP4 die AQP5-Promotoraktivität genotypabhängig moduliert. Daher wurde hier zunächst untersucht, welche Auswirkung die Überexpression von NMP4 auf den AQP5-Promotorabschnitt um den Polymorphismus (nt-1144/-1734) hat.

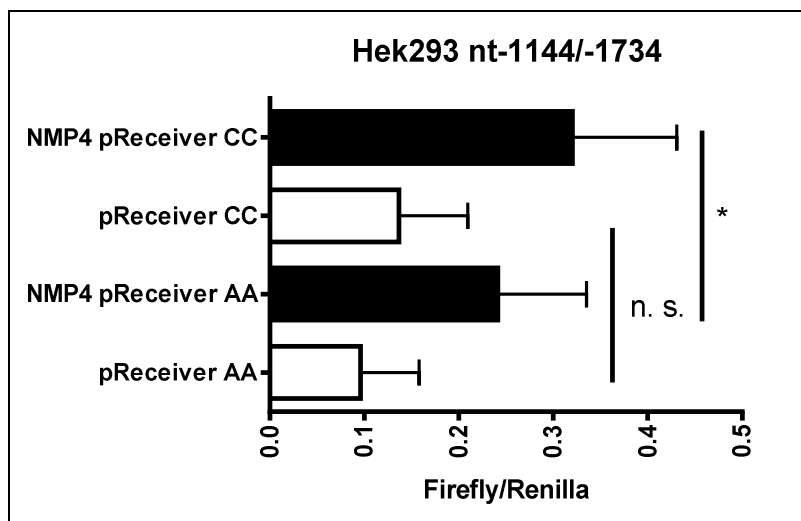
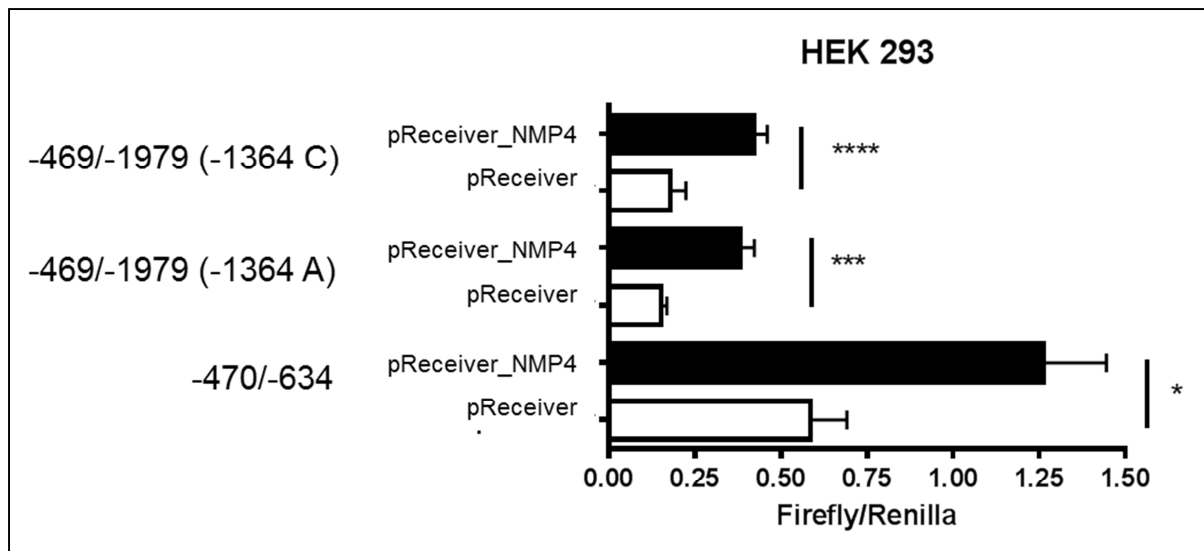


Abbildung 22: Reporterassays in HEK 293 Zellen mit AQP5 Promotorkonstrukten, die den Bereich um den Polymorphismus (-1144/-1734) charakterisieren. AA/CC pReceiver: Zellen mit Promotorkonstrukt mit entsprechendem Genotyp und leerem pReceiver transfiziert; AA/CCpReceiver NMP4: Zellen mit Promotorkonstrukt mit entsprechendem Genotyp und NMP4 Expressionsplasmid transfiziert. Die Messung wurde 24 Std. nach der Transfektion durchgeführt. n=8, ungepaarter t-Test.

Wie aus der Abbildung 22 erkennbar ist, erhöhte der Transkriptionsfaktor NMP4 die Promotoraktivität der beiden untersuchten Konstrukten (nt-1144/nt-1734A/C) signifikant um das mehr als zweifache (nt-1144/-1734 A:  $p=0,003$ ; nt-1144/-1734 C:  $p=0,0001$ ). Dabei war die Promotoraktivität beim C-Allel unter NMP4-Überexpression signifikant höher, im Vergleich zum A-Allel ( $p=0,03$ ; Abbildung 22), während sich die basale Promotoraktivität nicht unterschied. In der nachfolgenden Abbildung wird gezeigt, welchen Einfluss eine Überexpression von NMP4 auf die AQP5-Promotoraktivität des Gesamtpromotors hat.



**Abbildung 23:** Reporterassays in HEK293 Zellen mit drei AQP5 Promotorkonstrukten. Der untersuchte Promotorabschnitt ist durch die Basenangaben bezogen auf ATG gekennzeichnet. Die Überexpression von NMP4 (pReceiver\_NMP4) führte zu einer Erhöhung der Promotoraktivität im Vergleich zur Transfektion mit dem Kontrollplasmid (pReceiver). Die Messung wurde 24 Std. nach der Transfektion durchgeführt. n=8, ungepaarter t-Test.

Anhand der Abbildung erkennt man, dass eine Überexpression von NMP4 in HEK293 in allen untersuchten Konstrukten die Promotoraktivität beeinflusst. Eine Überexpression von NMP4 führte zu einer zweifach erhöhten Promotoraktivität, sowohl im Promotorbereich von nt-470/-634 ( $p=0,018$ ) als auch im Gesamtpromotorbereich (nt-469/-1979 (-1364A):  $p=0,005$ ; nt-469/-1979 (-1364 C):  $p < 0,0001$ ). Ein genotypabhängiger Unterschied konnte bei Betrachtung des Gesamtpromotorkonstrukts mit unterschiedlichen Genotypen nicht mehr nachgewiesen werden, da sich die Promotoraktivität der Konstrukte -469/-1979 (-1364A) und (-1364C) nicht unterschied ( $p = \text{n.s.}$ , Abbildung 23). Der genotypabhängige Effekt, welcher durch Betrachtung des Promotorkonstrukts um den Polymorphismus nt-1144/-1734 detektiert werden konnte, wird also beim Gesamtkonstrukt aufgehoben. Daraus lässt sich schließen, dass mehrere putative Bindungsstellen für NMP4 im AQP5 Promotor vorhanden sind. Dies legt auch die starke Erhöhung der AQP5-Promotoraktivität durch NMP4 im Konstrukt nt-470/-634 nahe. Daher wurde eine erneute *in silico* Analyse mittels Genomatix und Patch durchgeführt. Interessanterweise konnten mit beiden Programmen keine putativen Bindungsstellen für NMP4 in dem gesamten untersuchten Promotorbereich detektiert werden. Es ist jedoch bekannt, dass NMP4 an AGRE-Sequenzen (AG-rich elements: GAAAAGAAAAG) von Promotoren bindet (Fan et al. 2006). Drei Sequenzhomologien zu diesen Bindungsstellen für NMP4 konnten im Bereich von nt-470/-634 nachgewiesen werden. Diese sollten mittels EMSA überprüft werden. Dazu



(Spur 2, 3, 4; Abbildung 25). Für die Oligonukleotide NMP4.2 und NMP4.3 konnte keine spezifische Bindung detektiert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NMP4 eine Bindungsstelle in der Promotorregion nt-470/-634 trägt. Durch die zusätzliche Gabe eines NMP4 Antikörpers konnte diese spezifische Band abgeschwächt werden (Spur 5, Abbildung 25). Somit handelt es sich um eine spezifische Bindung von NMP4 an den AQP5-Promotorbereich nt-592/-602.

Es konnte also mittels Reporterassay gezeigt werden, dass NMP4 zu einer Erhöhung der AQP5-Promotoraktivität führt. Genotypabhängige Effekte von NMP4 auf die AQP5-Promotoraktivität konnten bei Betrachtung des Gesamtkonstrukts nicht nachgewiesen werden. Vielmehr konnte eine zusätzliche NMP4-Bindungsstelle im AQP5-Promotor identifiziert werden, welche die AQP5-Promotoraktivität beeinflusst. Ob dieses nun auch Auswirkung auf die AQP5-Expression hat, wurde im weiteren Verlauf untersucht.

### 3.1.3 Untersuchung der Regulation der AQP5-Expression durch Transkriptionsfaktoren mittels Real-Time PCR

Im nächsten Schritt wurde die Auswirkung einer Überexpression von NMP4 auf die AQP5-Expression in HEK293 untersucht. Dieses wurde mittels RT-PCR untersucht, dessen Ergebnis in der folgenden Abbildung dargestellt ist.

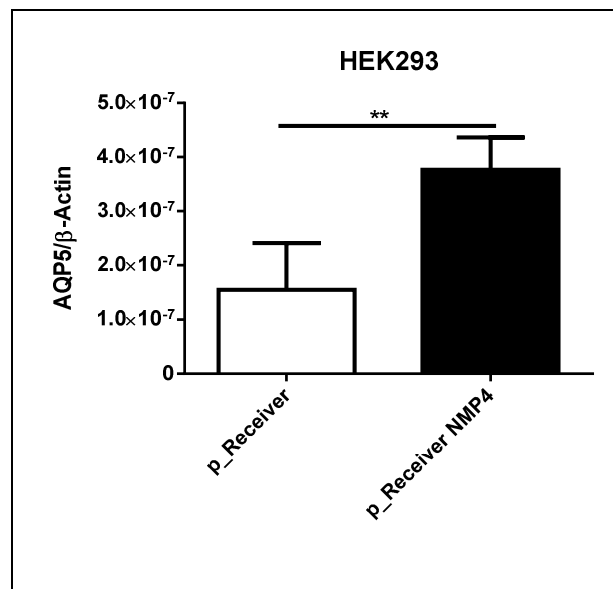
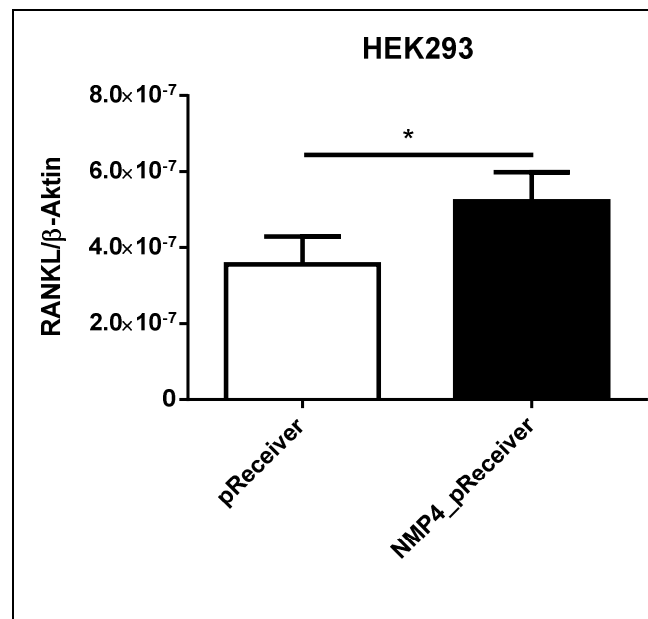


Abbildung 26: AQP5- mRNA Expression unter Überexpression von NMP4 in HEK 293 Zellen. Die Zellen wurden entweder mit dem Kontrollvektor pReceiver oder NMP4\_pReceiver transfiziert und Gesamt-RNA 24 Std. nach der Transfektion gewonnen. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels Real-Time PCR analysiert. Die Expression von AQP5 im Verhältnis zu Aktin wurde aus den Ct-Werten bestimmt. n=4, ungepaarter t-Test

Hierbei konnte eine signifikante Erhöhung der AQP5-mRNA-Expression unter Überexpression von NMP4 detektiert werden ( $p=0,0057$ , Abbildung 26). Da über die Rolle von NMP4 in der Sepsis noch nichts bekannt ist, dieser aber einen positiven Feedback-Mechanismus mit *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B Ligand (RANKL)* bildet (Sakuma et al. 2012) und RANKL eine Rolle bei der Inflammation spielt (Walsh, Choi 2014), könnte RANKL ein mögliches Bindeglied zwischen NMP4 und einer Sepsis darstellen. Um erste Hinweise auf eine Bestätigung dieser Hypothese zu erhalten, wurde die Expression von RANKL ebenfalls nach NMP4 Überexpression gemessen. Das Ergebnis der Real-Time-PCR ist in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 27: RANKL- mRNA Expression unter Überexpression von NMP4 in HEK 293 Zellen.** Die Zellen wurden entweder mit dem Kontrollvektor pReceiver oder NMP4\_pReceiver transfiziert und die Gesamt-RNA 24 Std. nach der Transfektion gewonnen. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels Real-Time PCR analysiert. Die Expression von RANKL im Verhältnis zu Aktin wurde aus den Ct-Werten bestimmt.  $n=4$ , ungepaarter t-Test

NMP4 führte zu einer signifikant erhöhten RANKL-Expression (Abbildung 27,  $p=0,02$ ).

Die gezeigten Daten demonstrieren, dass NMP4 spezifisch an den AQP5-Promotor bindet und somit die AQP5-mRNA-Expression steigert. EMSA Experimente deuten zwar auf eine unterschiedliche Bindung um den Polymorphismus hin, verantwortlich für die unterschiedliche AQP5-Expression von A- und C-Allelträgern scheint dieser Transkriptionsfaktor jedoch nicht zu sein, da im Reporterassay keine Unterschiede in der Aktivierung beider Allele detektiert werden konnten. Deshalb haben wir einen weiteren möglichen Mechanismus untersucht. Ein weiterer möglicher

Erklärungsansatz könnte die unterschiedliche Promotormethylierung zwischen A- und C-Allelträgern darstellen. Dieser Fragestellung wird im Folgenden nachgegangen.

### 3.2 Regulation der AQP5-Expression über Methylierung

#### 3.2.1 Methylierung des AQP5-Promotors bei septischen Patienten in Abhängigkeit vom AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus

Um herauszufinden, ob sich die Methylierung des AQP5-Promotors genotypabhängig in einzelnen Positionen unterscheidet, wurde die DNA aus dem Vollblut von septischen Patienten isoliert. Anschließend wurden alle Positionen analysiert und genotypabhängig verglichen.

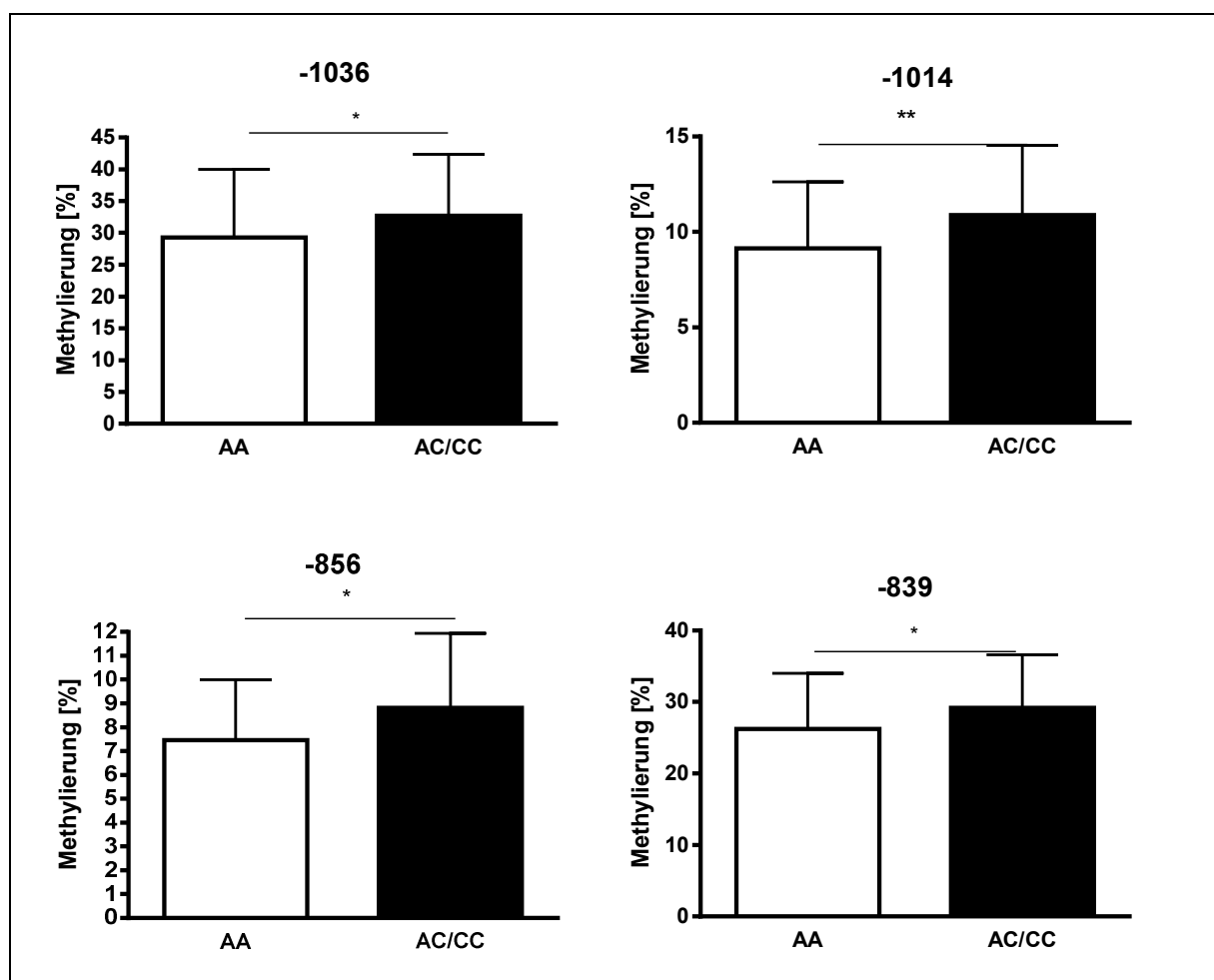
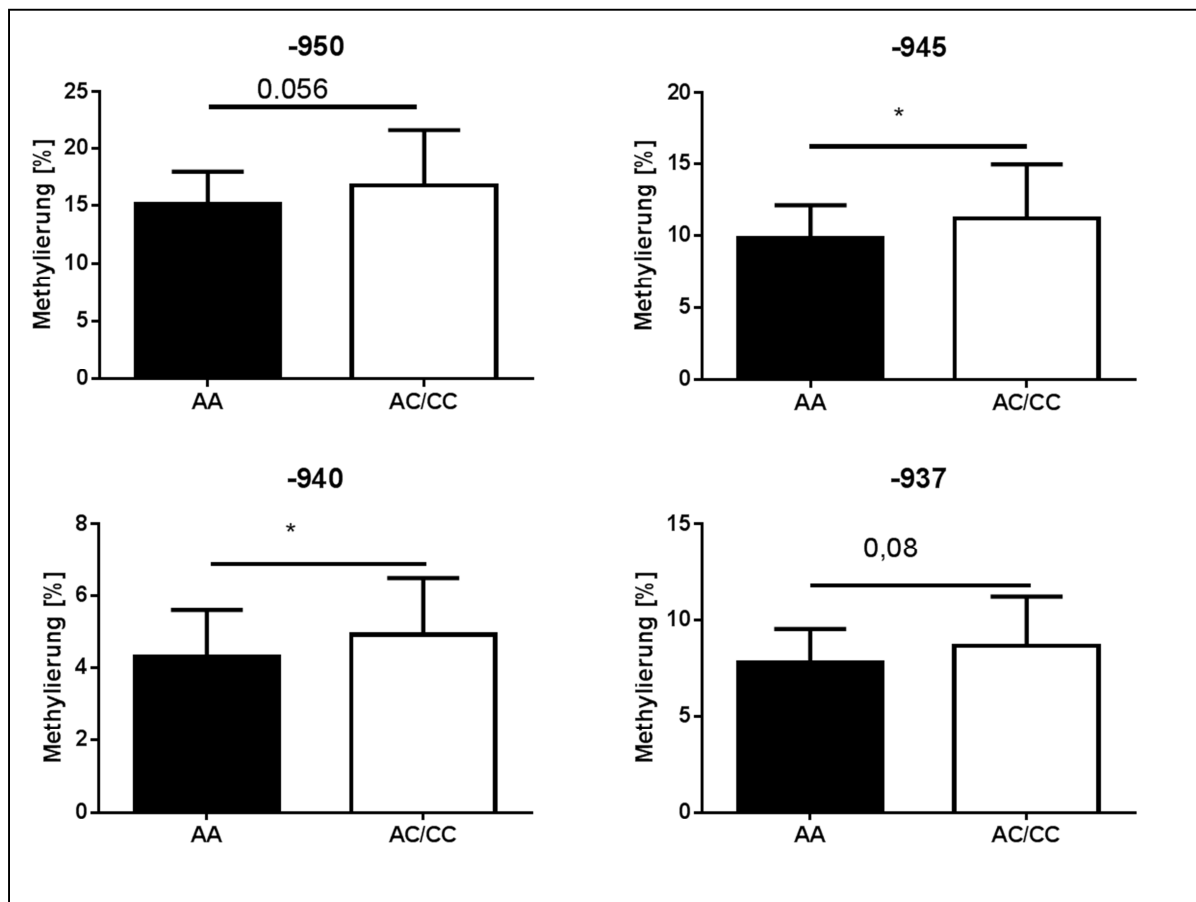


Abbildung 28: Untersuchungen zur der Methylierung des AQP5-Promotors bei Patienten mit schwerer Sepsis (Sep). DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. Angegeben sind die Positionen (bezogen auf ATG), in denen sich die prozentuale Methylierung zwischen Patienten mit AA-Genotyp von denen mit AC/CC-Genotyp unterschieden, n=100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

Es konnten vier Positionen detektiert werden, in denen ein Unterschied vorlag (Abbildung 28). In den Positionen nt-1036 ( $p=0,01$ ), nt-1014 ( $p=0,007$ ), nt-856

( $p=0,023$ ) und nt-839 ( $p=0,048$ ) konnte ein Unterschied detektiert werden (Abbildung 28). Hierbei war jeweils die Methylierung beim AC/CC-Genotyp signifikant um wenige Prozente erhöht, im Vergleich zum AA-Genotyp.

Findet man diese Methylierung auch bei Kontrollpatienten oder handelt es sich um ein Phänomen, das man nur bei Septikern findet? Um diese Frage zu beantworten, wurde nun die Methylierung des AQP5-Promotors von postoperativen Kontrollprobanden, die keine Sepsis entwickelten, genotypabhängig untersucht.



**Abbildung 29: Untersuchungen zur Methylierung des AQP5-Promotors bei postoperativen Patienten mit unterschiedlichen AQP5 A(-1364)C Genotypen. DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. Angegeben sind die Positionen (bezogen auf ATG), in denen sich die Methylierung genotypabhängig unterscheidet n=100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test**

Bei den postoperativen Patienten konnte in den Positionen nt-945 ( $p=0,048$ ) und nt-940 ( $p=0,044$ ) eine signifikant stärkere Methylierung bei C-Allelträgern festgestellt werden. Auch in den angrenzenden Methylierungspositionen nt-950 und nt-937 zeigten C-Allelträger tendenziell eine stärkere Methylierung (Abbildung 29). C-Allelträger weisen also sowohl bei postoperativen als auch bei septischen Patienten eine höhere Methylierung des AQP5-Promotors auf. Wichtig hierbei scheinen die Positionen nt-945, nt-940, nt-1035, nt-1013, nt-857 und nt-840 zu sein.



Interessanterweise sind bei septischen und postoperativen Patienten andere Positionen genotypabhängig unterschiedlich methyliert. Die Daten lassen die Vermutung zu, dass eine Sepsis die Methylierung des AQP5 Promotors beeinflusst. Somit stellt sich im Folgenden die Frage: Gibt es Positionen im AQP5-Promotor, die zwischen septischen und postoperativen Patienten unterschiedlich methyliert sind?

### 3.2.2 Untersuchungen zum Methylierungsmuster des AQP5-Promotors bei septischen und postoperativen Patienten

Im Folgenden wurde die Methylierung des AQP5-Promotors bei septischen und postoperativen Patienten betrachtet. Hierbei wurde zunächst die Methylierung des Gesamtpromotors bei Patienten mit schwerer Sepsis und postoperativen Patienten analysiert. In der folgenden Abbildung ist das Ergebnis für die Methylierung des Gesamtpromotors von nt-646 bis nt-1044 bei septischen und postoperativen Patienten dargestellt.

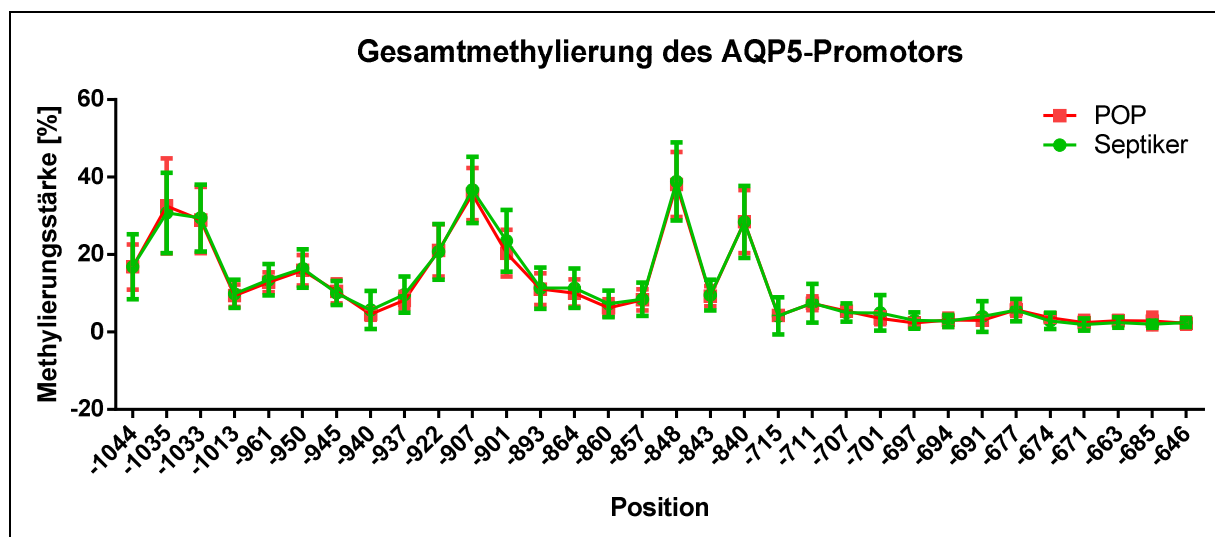
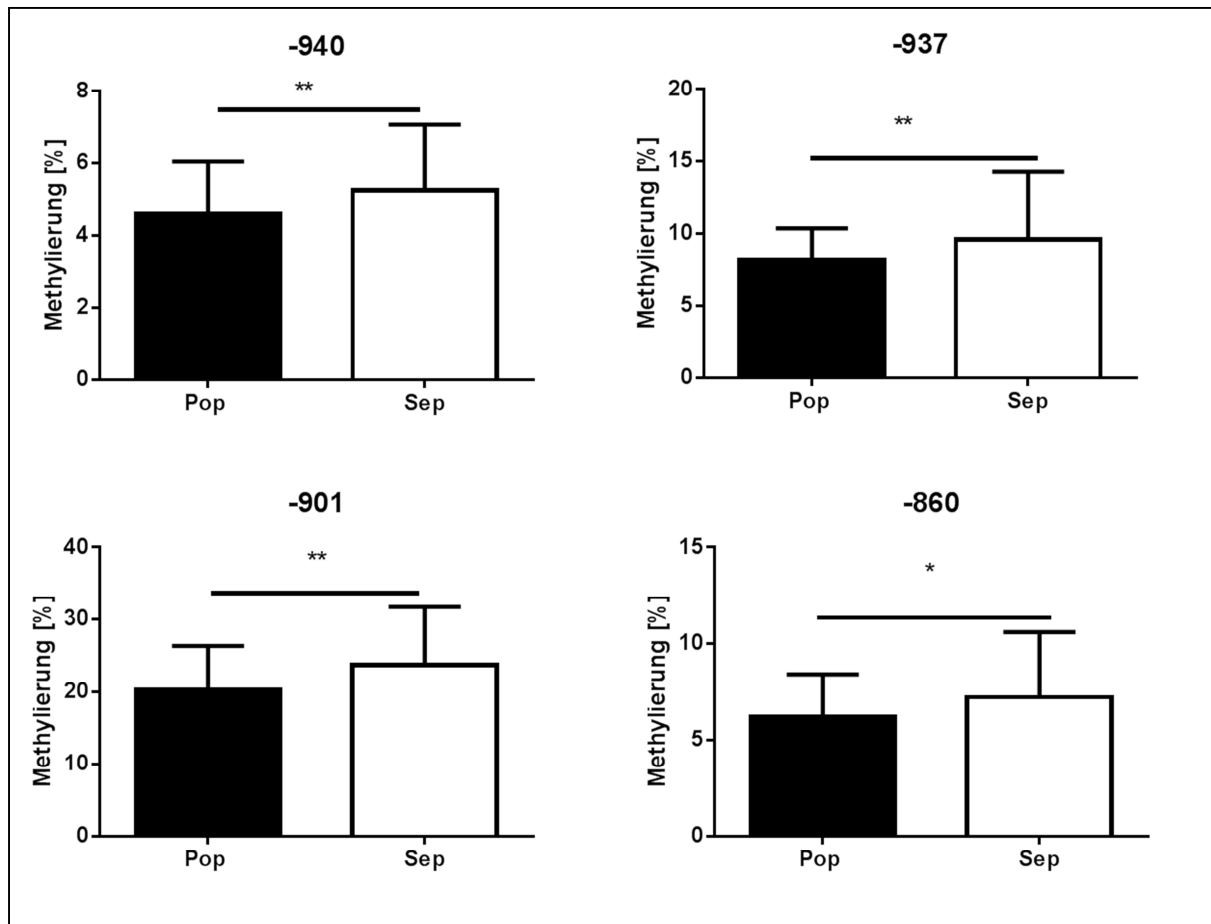


Abbildung 30: Methylierungsgrad des AQP5 Promotors bei septischen (Septikern) und postoperativen (POP) Patienten im Bereich von nt-646 bis nt-1044 (bezogen auf ATG), (bezogen auf Transkriptionsstartpunkt sind es die Positionen: nt-522 bis nt-124). DNA wurde aus dem Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. n=100, zwei-Weg-ANOVA,

Hierbei war auffällig, dass besonders in den Bereichen von nt-1044 bis nt-1033, nt-937 bis nt-893 und von nt-857 bis nt-840 hohe prozentuale Methylierungsraten auftraten. Prozentual sind hier ca. 30 bis 40% der Cytosine an diesen Positionen im Vollblut von septischen und postoperativen Patienten methyliert. Der Bereich von nt-715 bis nt-646 war hingegen sehr schwach methyliert (Abbildung 30). Die Gesamt-methylierung des AQP5-Promotors unterschied sich jedoch nicht zwischen septischen und postoperativen Patienten ( $p = 0,162$ ; Abbildung 30). Daher könnten

einzelne, spezifische Positionen zwischen beiden Gruppen unterschiedlich methyliert zu sein. Diese wurden nun einzeln miteinander verglichen.

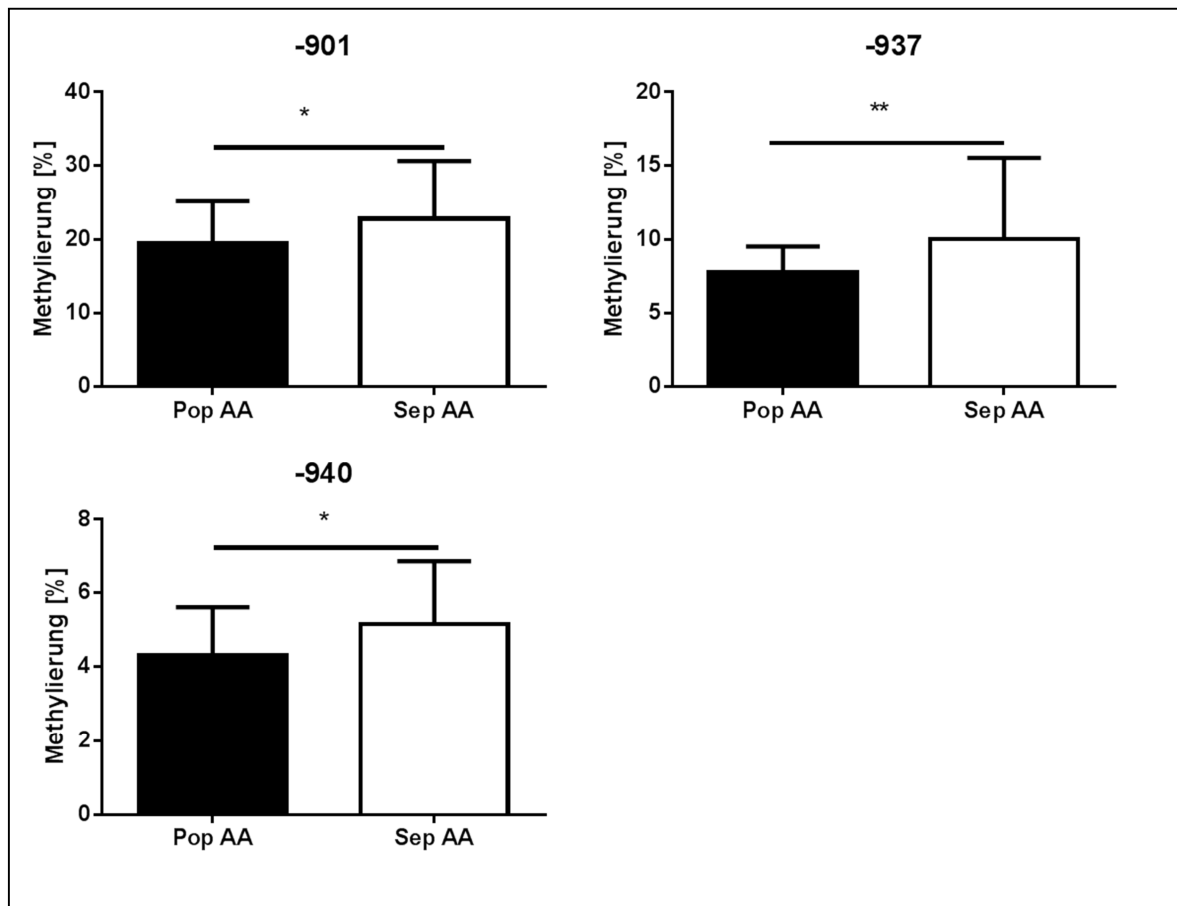
Die Ergebnisse der Analyse werden in Form von Balkendiagrammen in der nächsten Abbildung präsentiert.



**Abbildung 31:** Untersuchungen zur Methylierung des AQP5-Promotors bei postoperativen Patienten (Pop) und Patienten mit schwerer Sepsis (Sep). DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. Angegeben sind die Positionen (bezogen auf ATG), in denen sich die prozentuale Methylierung zwischen Patienten mit schwerer Sepsis und postoperativen Patienten unterschieden, n=100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

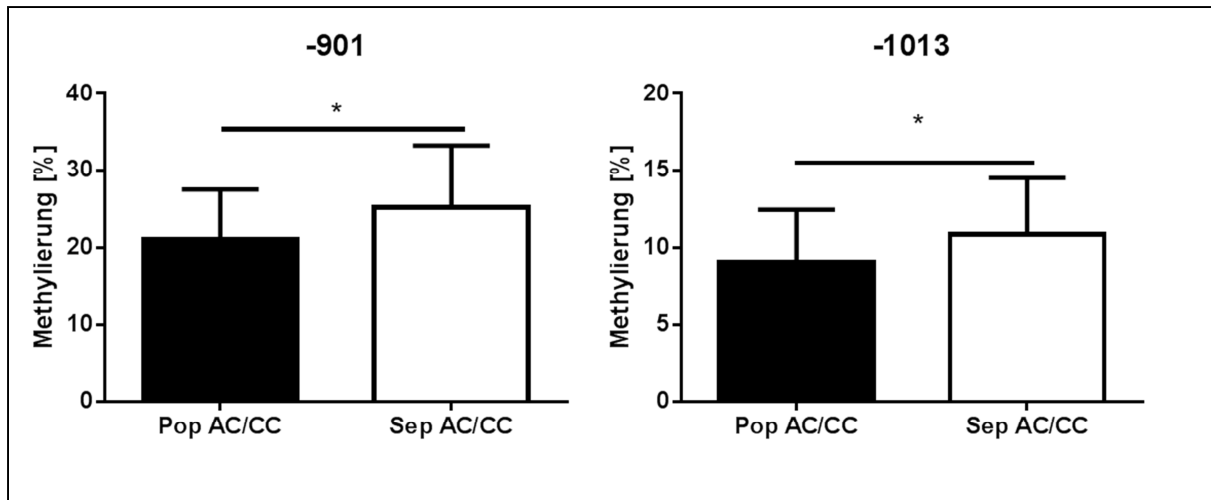
Es konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit schwerer Sepsis eine stärkere Methylierung in den Positionen nt-940 ( $p=0,0072$ ), nt-937 ( $p=0,0095$ ), nt-901 ( $p=0,0026$ ) und nt-860 ( $p=0,0171$ ) aufwiesen, im Vergleich zu den postoperativen Patienten (Abbildung 31). In allen anderen Positionen waren keine signifikanten Unterschiede nachweisbar. Bemerkenswert ist, dass in dieser Analyse Positionen auffällig waren, die bei der genotypabhängigen Betrachtung nicht unterschiedlich waren. Daher wurde weiter analysiert, welche Positionen sich zwischen beiden Gruppen genotypabhängig unterschieden.

Betrachtet man die Ergebnisse der Analyse zwischen septischen und postoperativen Patienten genotypabhängig, so zeigt sich, dass sich die Methylierung in den Positionen nt-940 ( $p=0,0038$ ), nt-937 ( $p=0,0091$ ) und nt-901 ( $p=0,032$ ) auch bei A-Allelträgern zwischen Patienten mit schwerer Sepsis und postoperativen Patienten unterschieden (Abbildung 32).



**Abbildung 32: Untersuchungen zur Methylierung des AQP5-Promotors bei postoperativen Patienten (Pop) und Patienten mit schwerer Sepsis (Sep) mit AQP5 A(-1364)C-Genotyp. DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. Angegeben sind die Positionen (bezogen auf ATG), in denen sich die prozentuale Methylierung zwischen Patienten mit schwerer Sepsis und postoperativen Patienten unterscheidet, n=100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test**

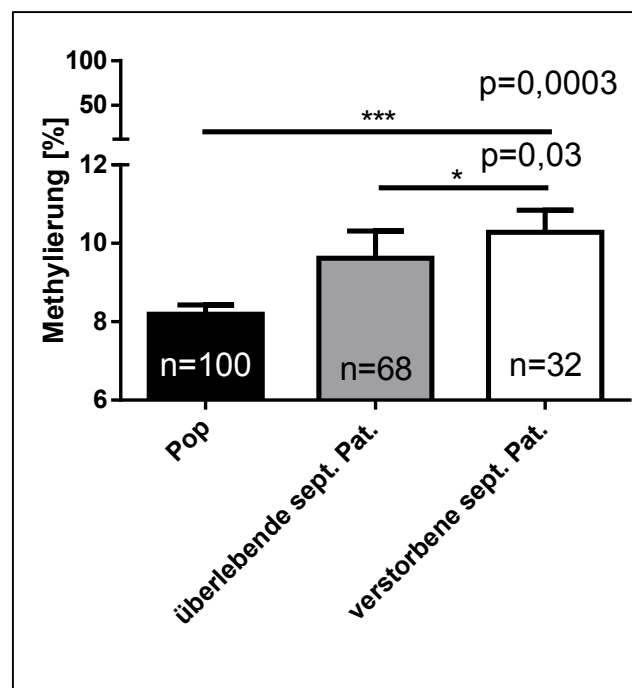
In den Positionen war die Methylierung bei Septikern erhöht. In Abbildung 33 wird näher auf die Methylierung von isoliert betrachteten C-Allelträgern eingegangen.



**Abbildung 33:** Vergleichende Untersuchungen zur Methylierung des AQP5-Promotors in Position -1013 (bezogen auf ATG) zwischen postoperativen Patienten und Patienten mit schwerer Sepsis, die das C-Allel tragen. DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. n= 100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

Bei C-Allelträgern konnte ein Unterschied in Position nt-901 ( $p=0,018$ ) und in Position nt-1013 ( $p=0,03$ ) detektiert werden (Abbildung 33). Ebenfalls war auch hier die Methylierung bei Patienten mit schwerer Sepsis stärker.

Nun blieb die spannende Frage offen, ob die unterschiedliche Methylierung auch einen Einfluss auf das Überleben bei septischen Patienten hat. Dieses wurde für alle Positionen untersucht und das Ergebnis wird in der nächsten Abbildung gezeigt.



**Abbildung 34:** Untersuchungen zur Methylierung des AQP5-Promotors bei von postoperativen und septischen Patienten. DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ, n=100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test

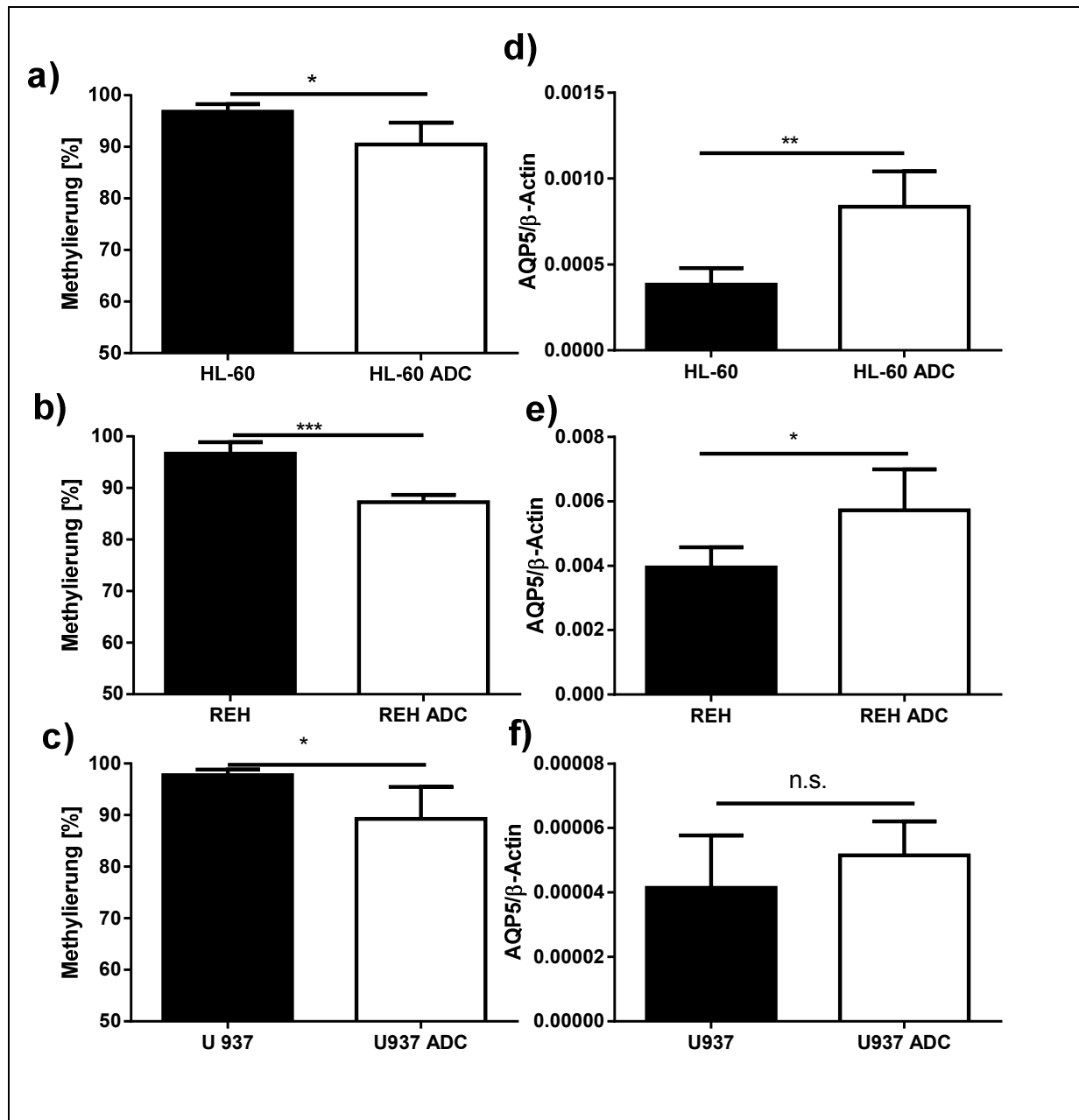
Der AQP5-Promotor war an Position nt-937 bei verstorbenen septischen Patienten im Vergleich zu Überlebenden oder postoperativen Patienten deutlich stärker methyliert (Abbildung 34). Position -937 scheint einen essenziellen Einfluss auf das Überleben von septischen Patienten zu haben. Eine *in silico* Analyse für die Region nt-920 bis nt-950 ergab, dass genau um die Position -937 wichtige Transkriptionsfaktoren für die Inflammation (NF $\kappa$ B, HIF-1 $\alpha$ ) sowie die AQP5-Expression (CREB) binden.

Fasst man die Daten zum Methylierungsmuster einzelner Positionen im Promotorbereich von AQP5 zusammen, so demonstrieren die Daten, dass Patienten mit schwerer Sepsis an einigen Positionen eine stärkere Methylierung aufweisen als postoperativen Patienten. Die genotypabhängige Betrachtung der Ergebnisse zeigen, dass bei C-Allelträgern sowohl von Patienten mit schwerer Sepsis, als auch von postoperativen Patienten, die Methylierung an einigen Positionen im AQP5 Promotor signifikant höher ist, im Vergleich zu A-Allelträgern. Des Weiteren scheint der Promotorbereich von nt-840 bis nt-1035 für die genotypabhängige Methylierung zuständig zu sein und die Position nt-937 scheint wichtig für das Überleben bei einer Sepsis zu sein.

Im Folgenden wurde nun betrachtet, ob die unterschiedliche Methylierung auch zu einer unterschiedlichen AQP5-Expression führt.

### **3.2.3 Regulation der AQP5-Expression durch Methylierung in unterschiedlichen Immunzellen**

In diesem Teil der Doktorarbeit sollte überprüft werden, ob die AQP5-Expression in Immunzellen über Methylierung reguliert wird. Dabei sollten verschiedene Kompartimente des Immunsystems betrachtet werden, weshalb Zelllinien von Neutrophilen (HI-60), Monozyten (U937) und B-Zellen (REH) in die Untersuchung eingeschlossen wurden. Hierfür wurden die Zellen mit dem DNA-Methyltransferaseinhibitor ADC inkubiert. Dabei wurde nicht die Methylierung einzelner Positionen im AQP5-Promotor betrachtet, sondern ein repräsentativer Ausschnitt, welcher mehrere Methylierungsstellen beinhaltet. Das Ergebnis ist in der folgenden Abbildung dargestellt (Abbildung 35)



**Abbildung 35:** Untersuchungen zum Methylierungsstatus des AQP5-Promotors (a) bis c)) und der AQP5-Expression (d) bis f)) nach 7-tägiger Inkubation mit dem DNA-Methyltransferaseinhibitor ADC. n, n=6, ungepaarter T-Test.

Die AQP5-Promotormethylierung konnte in den untersuchten Zelllinien REH, HL-60 und U937 durch ADC-Inkubation vermindert werden (a) HL-60  $p=0,031$ ; b) REH  $p=0,0004$ ; c) U937  $p=0,04$ , Abbildung 35). Dies führte in den Zelllinien REH und HL-60 zu einer signifikanten Erhöhung der AQP5-Expression (d) HL-60  $p=0,002$ ; e) REH  $p=0,046$ ; f) U937  $p=0,6$ , Abbildung 35). Diese Daten legen nahe, dass die AQP5-Expression in Immunzellen über Methylierung reguliert wird. Da nun gezeigt werden konnte, dass die AQP5-Expression in Immunzellen über Methylierung reguliert wird und auch der Polymorphismus mit dem Methylierungsmuster assoziiert ist, könnte

dies den Mechanismus darstellen, der eine unterschiedliche Expression bei A- und C-Allelträgern in der Sepsis bedingt.

Die bisherigen Daten dieser Doktorarbeit lassen die Vermutung zu, dass die AQP5-Expression in Immunzellen über Methylierung reguliert wird. Ebenso konnte gezeigt werden, dass der Polymorphismus mit dem Methylierungsmuster assoziiert ist. Dies könnte erklären, warum A-Allelträgern eher bei einer Sepsis sterben.

Eine weitere offene Frage beschäftigt sich damit, ob bakterielle Bestandteile wie LPS, die Auslöser einer Sepsis sein können, einen Einfluss auf die Methylierung des AQP5-Promotors haben könnten. Daher wurde die Hypothese überprüft, ob bakterielle Zellwandbestandteile wie LPS die AQP5-Promotormethylierung sowie die Expression verändern. Hierfür wurden die monozytären Zelllinien U937 und THP-1 mit LPS stimuliert. Die Ergebnisse werden in der nächsten Abbildung gezeigt.

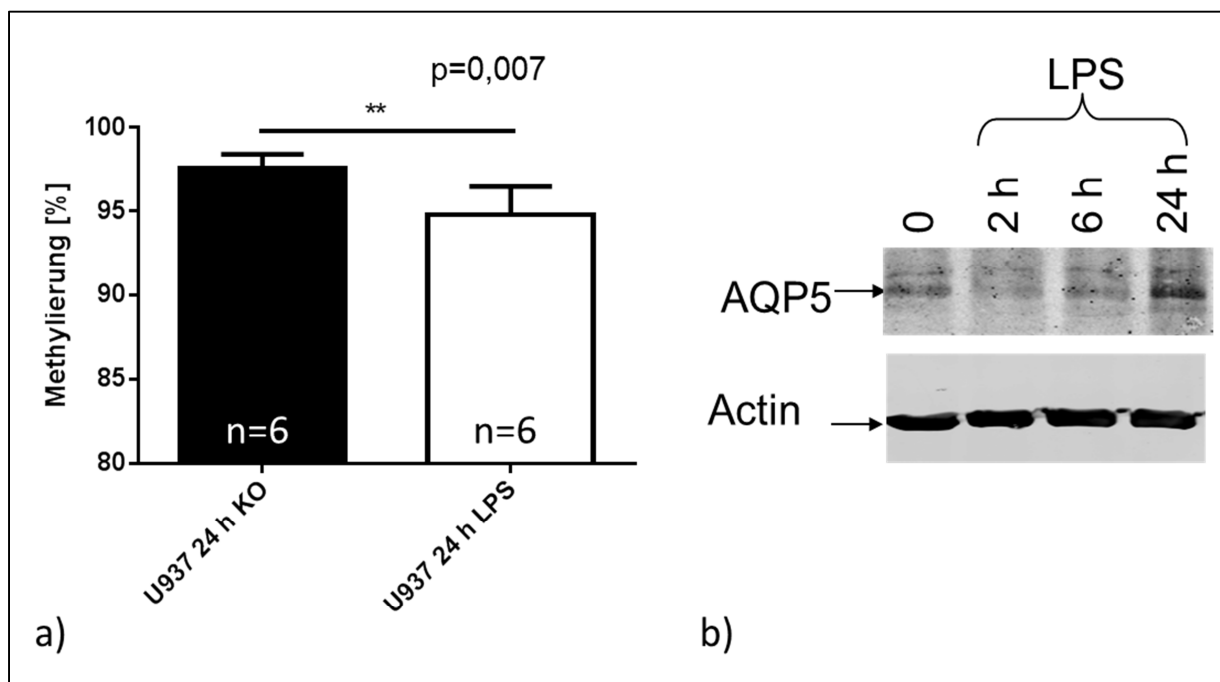
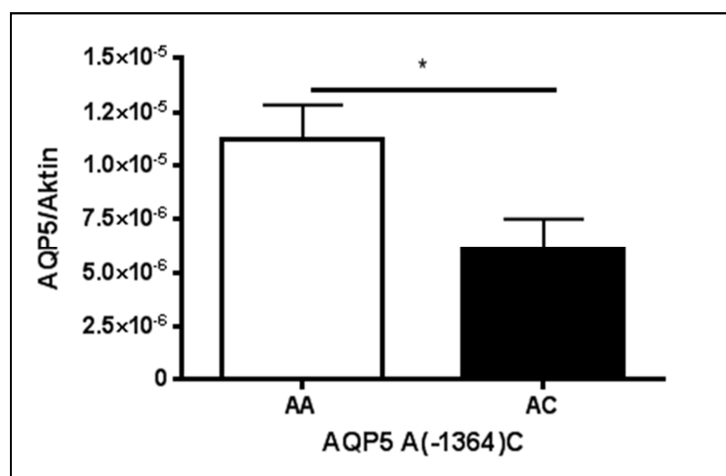


Abbildung 36: 24 stündige Stimulation der monozytären Zelllinien U937 und THP-1 mit LPS (1 µg/ml) und anschließender Untersuchung der a) AQP5-Promotormethylierung in U937 und b) AQP5-Expression in THP-1; ungepaarter T-Test, n=3

LPS führte zu einer Reduktion der AQP5-Promotor-Methylierung um 5% ( $p=0,006$ ;  $n=3$ ), aber zu einer Verdopplung der AQP5-Proteinexpression. Die AQP5-Expression scheint also durch Methylierungsprozesse am AQP5-Promotor reguliert zu werden. Dies könnte eine Rolle in der Sepsis spielen, da LPS die AQP5-Methylierung und Expression in Zellkulturexperimenten veränderte. Das Überleben bei einer schweren Sepsis scheint durch epigenetische Prozesse wie Methylierung reguliert zu werden.

### 3.3 AQP5 A(-1364)C genotypabhängige AQP5-Expression sowie Cytokinkonzentration

Bisher konnte gezeigt werden, dass sich die Methylierung des AQP5 Promotors an einigen Positionen zwischen nt-840 und nt-1035 unterschied. Dies müsste auch einen Einfluss auf die AQP5-Expression haben. Somit stellt sich die Frage, ob der AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus mit der AQP5-Expression sowie der Cytokinkonzentration im Blut von septischen Patienten assoziiert. Zunächst wurde die AQP5-Expression zwischen A-Allel und C-Allelträgern verglichen. Dieses Ergebnis wird in nachfolgender Abbildung dargestellt.



**Abbildung 37: AQP5-Expression von septischen Patienten abhängig vom AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus.** Das Vollblut wurde innerhalb der ersten 24 Std. nach Erfüllen der Sepsiskriterien entnommen und die Gesamt-RNA isoliert. Die Quantifizierung von AQP5 erfolgte mittels RT-PCR. Als Referenzgen fungierte Aktin. n= 25, ungepaarter t-Test.

Dabei zeigten AA-Träger eine signifikant erhöhte AQP5-Expression, im Vergleich zu AC-Trägern ( $p=0,03$ ; Abbildung 37).

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob der AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus mit dem Cytokinmuster assoziiert ist. Hierfür wurden die in der Sepsisdatenbank vorhandenen Cytokindaten analysiert. Die Daten der Cytokinkonzentrationsbestimmung werden in der Abbildung 38 dargestellt.



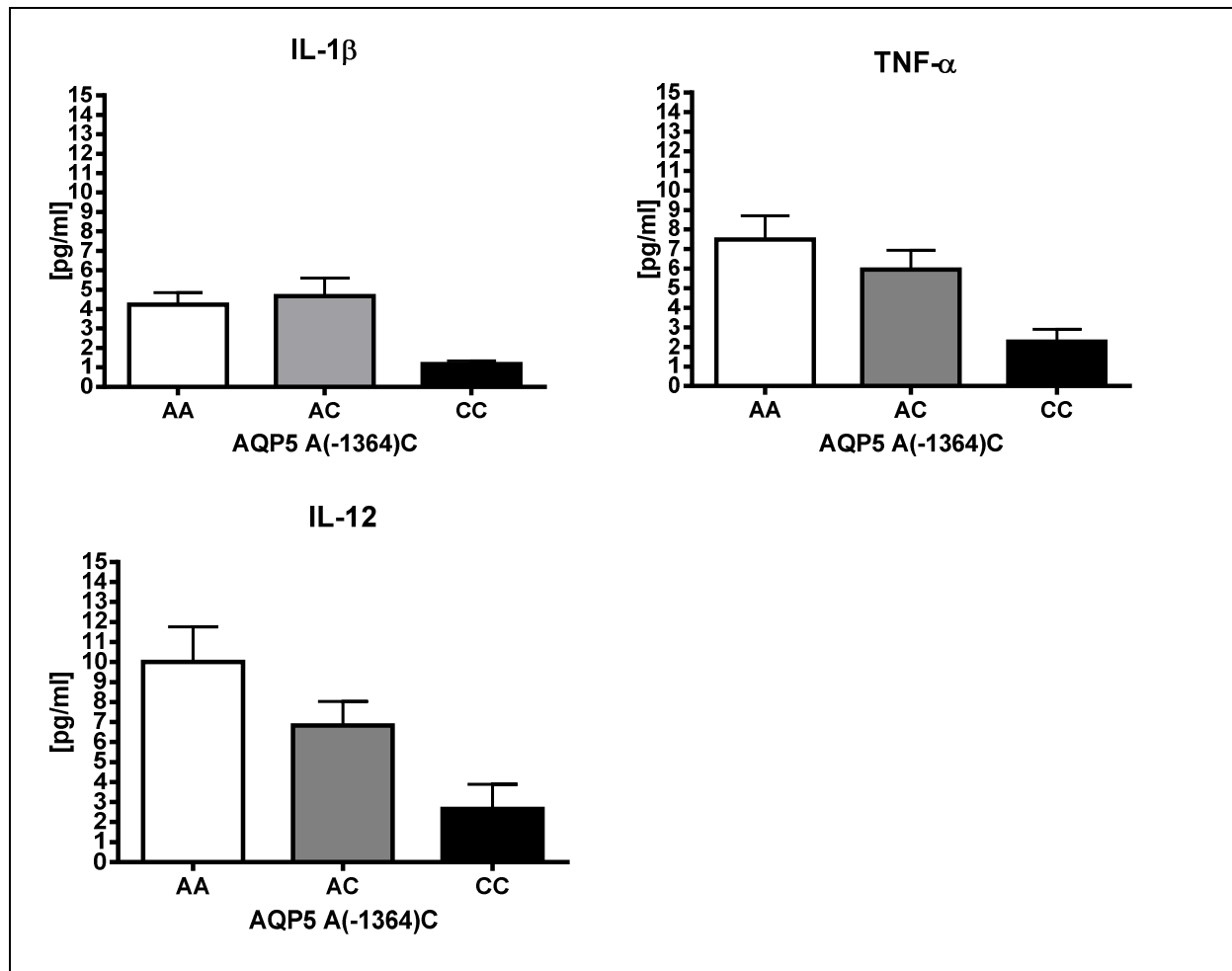


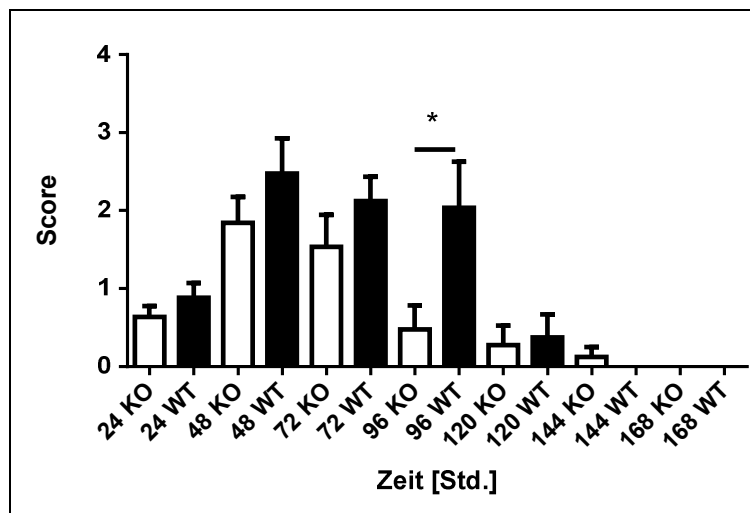
Abbildung 38: Cytokin-Konzentration bei Patienten mit schwerer Sepsis in Abhängigkeit vom AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus. Die Cytokinmessungen wurden in Vollblutproben von Patienten mit schwerer Sepsis durchgeführt (n= 50). Die statistische Analyse erfolgte mittels einer Ein-Weg-ANOVA mit anschließendem Tukey Mehrfache-Vergleiche-Test.

Die Analyse der Cytokin-Konzentration im Blut zwischen den beiden Genotypen zeigte, dass eine hohe Variabilität der Cytokin-Konzentration innerhalb eines Genotyps vorherrschte. Aus diesem Grund ließen sich auch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen feststellen. Jedoch konnte bei den beiden proinflammatorischen Cytokinen IL-1 $\beta$  ( $p=0,52$ ), TNF- $\alpha$  ( $p=0,44$ ) und IL-12 ( $p=0,32$ ) eine Tendenz eines genotypabhängigen Effekts erkennen (Abbildung 38). Die Konzentration der Cytokinen IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-12 scheint jedoch bei AA-Allelträgern doppelt so hoch zu sein, im Vergleich zu CC-Allelträgern. Alle anderen Cytokine zeigten keine Genotyp-Abhängigkeit.

Die AQP5-Expression und Cytokinexpression könnten also einen Einfluss auf das Überleben haben. Dieses wurde im Folgenden mit einem AQP5-Knockout-Mausmodell im Tierversuch überprüft.

### 3.4 Einfluss der AQP5-Expression bei der Inflammation *in vivo*

Mit Hilfe eines Sepsis-Mausmodells sollte untersucht werden, ob AQP5 einen Einfluss auf das Überleben hat. Hierfür wurde bei AQP5-KO Mäuse sowie deren WT Geschwister eine LPS-induzierte Inflammation ausgelöst und das Überleben der Tiere beobachtet. Hierfür wurde in Zusammenarbeit mit den Tierärzten des Zentralen Tierlabors ein Score Sheet ausgearbeitet, um den Allgemeinzustand der Tiere zu beurteilen. Die Ergebnisse werden in der nachfolgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 39: Beurteilung des Gesundheitszustands der Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der LPS-Injektion (20 mg/kg KGW). Die Beurteilung des Allgemeinzustandes erfolgte mittels Score-Sheet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus der Punkteverteilung zum Allgemeinzustand, Spontanverhalten, Klinischer Befund und Ausscheidungen. Während 0 ein guter Zustand bedeutet, zeigt eine höhere Zahl einen schlechten Zustand an. Die Werte zwischen KO und WT-Tieren wurde zu jedem Zeitpunkt mittels ungepaarten T-Tests miteinander verglichen. (n=18)**

Der Vergleich zwischen WT und KO zeigte, dass die WT einen schlechteren Allgemeinzustand aufwiesen ( $p=0,02$ ; Abbildung 39). Während die KO-Tiere nach 96 Std. schon eine deutliche Verbesserung des Zustands zeigten, konnte dieses bei den WT-Tieren erst nach 120 Std. beobachtet werden (Abbildung 39, 96 Std. WT vs. 96 Std. KO:  $p=0,02$ ). Zusätzlich konnte bei den weiblichen Tieren eine Diarrhö beobachtet werden. Dieses ging mit einem Gewichtsverlust einher, welcher in der folgenden Abbildung dargestellt ist.

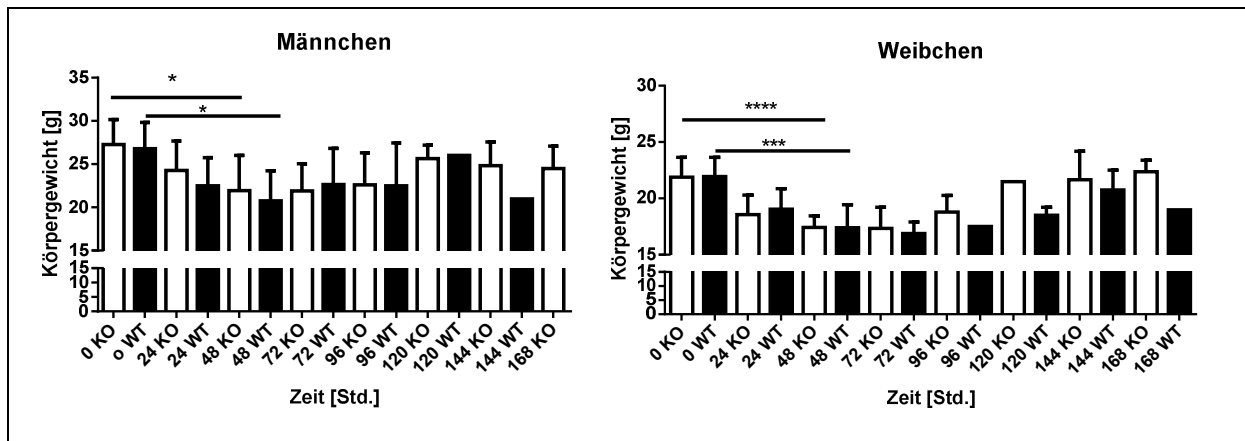


Abbildung 40: Überwachung des Körpergewichtes der Versuchstiere. Das Gewicht wurde zu Beginn des Versuchs und zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS Injektion (20 mg/kg KGW) bestimmt. Die Werte zwischen KO und WT-Tieren wurde zu jedem Zeitpunkt mittels ungepaarten T-Tests miteinander verglichen. (n=18)

Sowohl bei Männchen als auch bei Weibchen konnte ein signifikanter Gewichtsverlust beobachtet werden, der nach 48 Std. am stärksten ausgeprägt war (Abbildung 40; Männchen: 0 Std. KO vs. 48 Std. KO:  $p=0,027$ ; 0 Std. WT vs. 48 Std. WT:  $p=0,0107$ ; Weibchen: 0 Std. KO vs. 48 Std. KO:  $p<0,0001$ ; 0 Std. WT vs. 48 Std. WT:  $p=0,0004$ ). Allerdings unterschied sich der Gewichtsverlust zwischen den Genotypen nicht signifikant (Abbildung 40; Männchen WT vs. KO 48 Std.:  $p=0,6$ ; Weibchen WT vs. KO 48 Std.:  $p=0,98$ ). Weiter wurde das Überleben der Mäuse betrachtet. Die Überlebenskurve der Mäuse wird in der Abbildung 41 gezeigt.

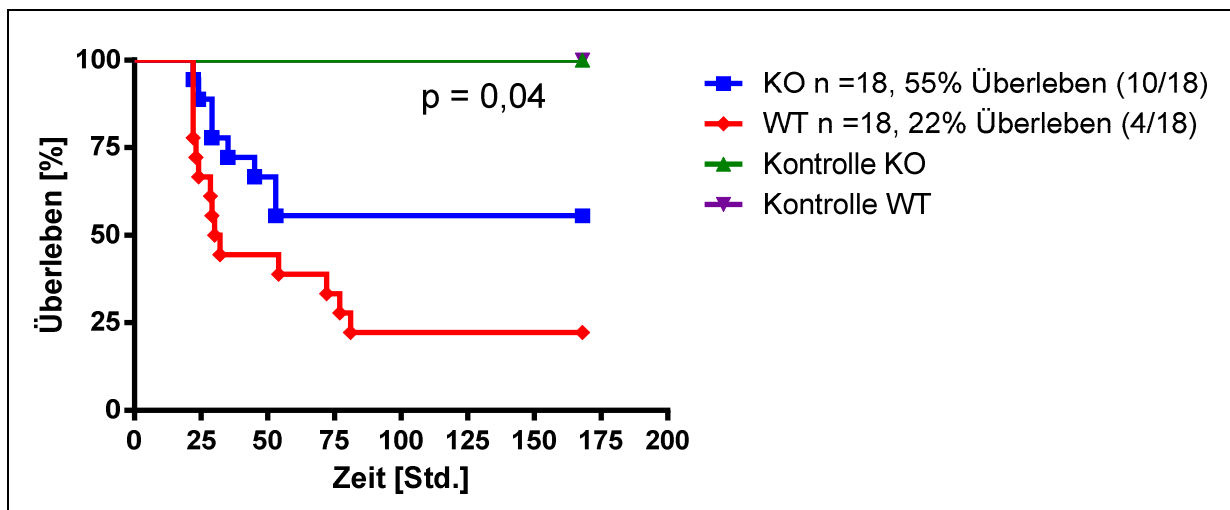
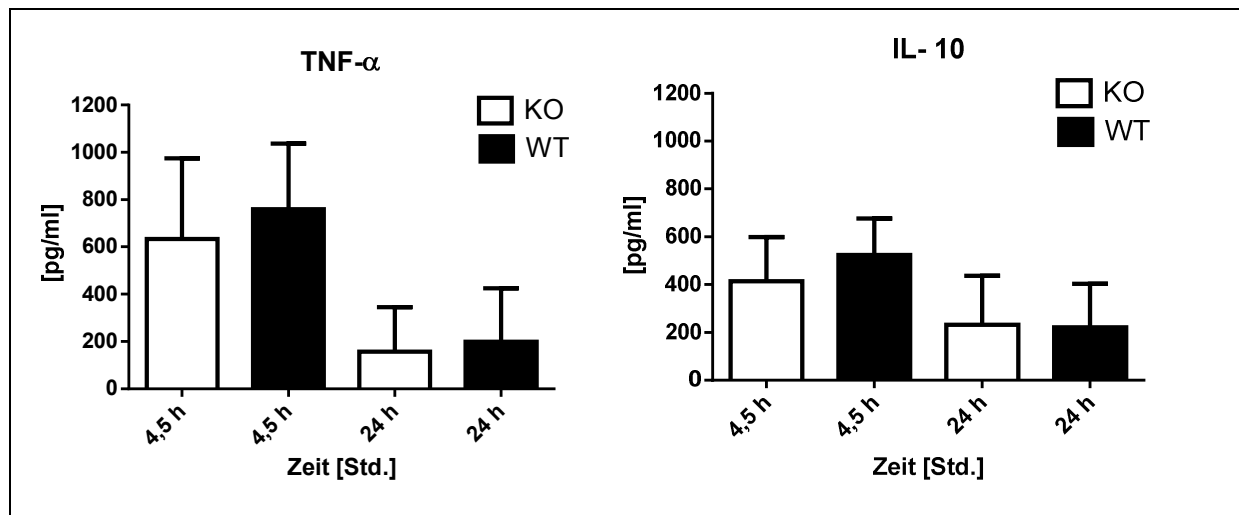


Abbildung 41: Überleben der Versuchstiere nach LPS-Injektion (20 mg/kg KGW) und unter Kontrollbedingungen (Injektion von 0,9%iger NaCl-Lösung). Kaplan-Meier Analyse n= 18.

34 % der Wildtypiere verstarben bereits innerhalb der ersten 24 Std., während in diesem Zeitraum nur 12 % der Knockout-Tiere verstarben (Abbildung 41). Außerdem zeigten AQP5-KO-Mäuse im Beobachtungszeitraum von 168 Stunden ein um 30

Prozent verbessertes Überleben (Abbildung 41). Bei den AQP5-KO-Mäusen überlebten 10 von 18 (55,5%) Tieren, bei den Wildtypieren hingegen nur 4 von 18 (22,2%) Tieren. Den Mäusen wurde während des Versuchs nach 4,5 Std. und 24 Std. nach der LPS-Injektion retrobulbär Blut entnommen. Hiervon wurde Serum gewonnen und dieses auf das Vorhandensein von pro- und antiinflammatorischen Cytokinen untersucht. Die Ergebnisse der Cytokinanalyse werden in der Abbildung 42 zusammengefasst.



**Abbildung 42:** Untersuchung der Cytokinkonzentration 4,5 Std. und 24 Std. nach der LPS-Injektion (20 mg/kg KGW) im Serum mittels ELISA; abhängig vom Genotyp. Die Bestimmung erfolgte in Serumproben aus retrobulbär entnommenem Blut mittels ELISA; abhängig vom Genotyp. n=12, ungepaarter t-Test.

Die Cytokinkonzentration der Cytokine Tnf-α, IL-10 und IL-1β der Kontrolltiere lag unter Nachweißgrenze des verwendeten ELISAs. Auch konnte das Cytokin IL-1β in den Proben der Tiere mit LPS-Injektion nicht in relevanten Mengen nachgewiesen werden. Innerhalb der untersuchten Gruppen kam es zu einer hohen Variabilität in der Cytokinkonzentration der Cytokine Tnf-α und IL-10. Die höchsten gemessenen Serumkonzentrationen wurden bei allen Tieren 4,5 Std. nach der LPS-Injektion erreicht, woraufhin es bis zu 24 Std. zu einem Absinken der Cytokinkonzentration kam (Abbildung 42). Die WT Mäuse zeigten nach 4,5 Std. eine höhere Cytokinkonzentration im Vergleich zu den AQP5-KO Mäusen. Nach 24 Std. fiel die Cytokinkonzentration wieder ab. Tiere, welche den Beobachtungszeitraum von 168 Std. überlebt hatten, zeigten zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nicht nachweisbare Cytokinkonzentrationen (Daten nicht gezeigt). Aufgrund der hohen Variabilität der Daten konnten keine Signifikanzen nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass AQP5 ein Schlüsselprotein in der LPS-induzierten Sepsis ist. Das verbesserte Überleben der AQP5 KO Mäusen kann

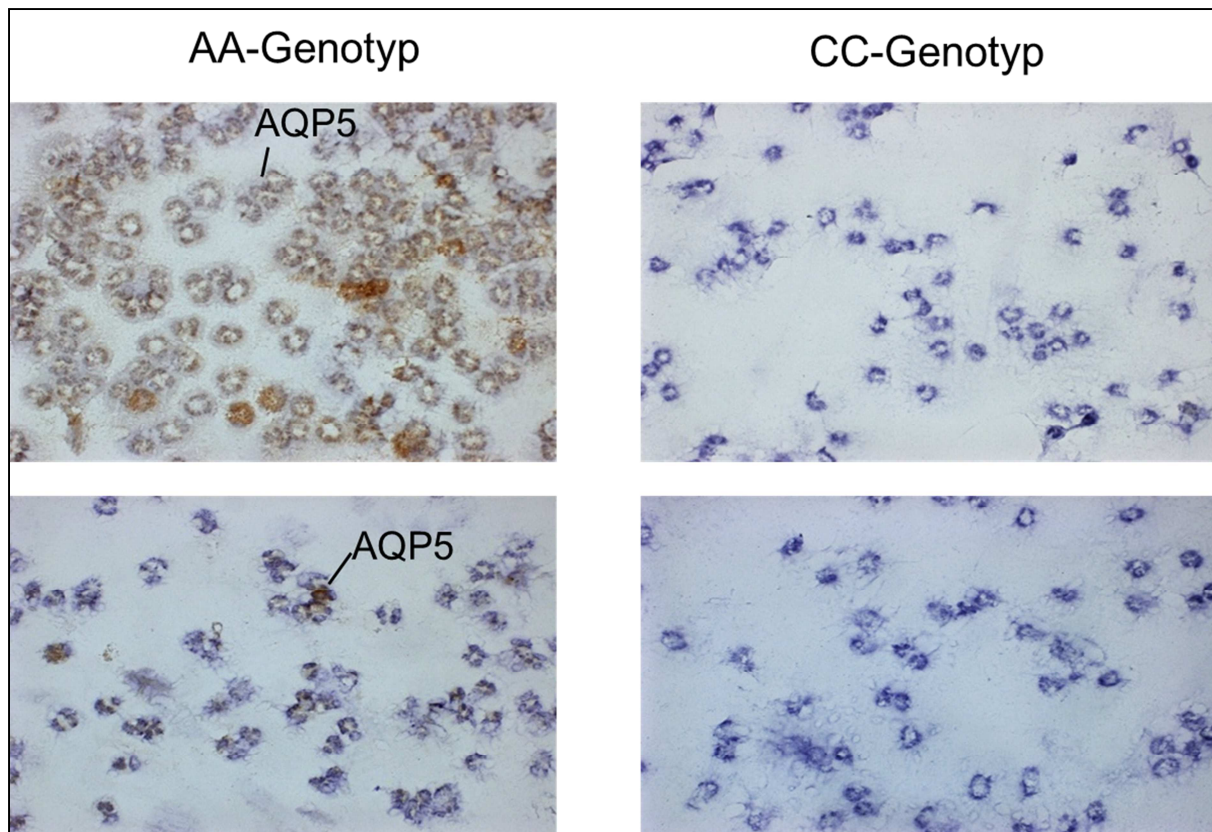
aber nicht direkt auf eine verminderte Inflammation zurückgeführt werden, da die Cytokinkonzentration nicht eindeutig bestimmt werden können. Deshalb sollten diese Daten in nachfolgenden Daten verifiziert werden. Im Weiteren sollte deshalb analysiert werden, welcher Mechanismus hinter den Beobachtungen steckt. Einen möglichen Mechanismus könnte die eine veränderte Immunzellmigration oder Proliferation durch AQP5 darstellen.

### **3.5 AQP5-abhängige Zellmigration und Proliferation von Immunzellen**

In diesem Teil der Experimente soll die Frage geklärt, welcher physiologische Mechanismus für das bessere Überleben von C-Allelträgern und den AQP5-KO Mäusen verantwortlich ist. Hierzu sollten folgende Fragen beantwortet werden: Beeinflusst der AQP5 A(-1364)C-Promotorpolymorphismus die Migration neutrophiler Granulozyten oder die Proliferation von Immunzellen?

#### **3.5.1 Untersuchungen zur genotypabhängigen Migration von neutrophilen Granulozyten**

Zunächst wurden neutrophile Granulozyten aus dem Vollblut von gesunden Probanden isoliert und die AQP5-Expression mittels immunologischer Färbemethoden sichtbar gemacht. Repräsentative Färbungen sind in der Abbildung 43 dargestellt.



**Abbildung 43:** Immunologische Färbung von neutrophilen Granulozyten mit Hämatoxylin (blau) und AQP5-Antikörper. AQP5-Protein stellt sich durch die immunologische Färbung braun dar (n=4, je Genotyp zwei Objektträger, repräsentativer Ausschnitt aus 8 zufälligen Fotos) Vergrößerung: 40x.

Die Auswertung der immunologischen Färbung zeigte, dass A-Allelträgern eine erhöhte AQP5-Expression in neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu C-Allelträgern aufweisen (Abbildung 43). Dieses ist an der starken Braunfärbung bei neutrophilen Granulozyten von A-Allelträgern zu erkennen.

Im Folgenden wurde untersucht, welchen Einfluss eine erhöhte AQP5-Expression auf die Zellmigration von neutrophilen Granulozyten hat.

Die neutrophilen Zellen von gesunden Probanden wurden mit fMLP (N-Formylmethinyl-leucyl-phenylalanine) in einer Konzentration von  $10^{-8}$  M stimuliert. Neben einer zielgerichteten Migration, weisen neutrophile Granulozyten auch eine spontane Migration auf. Die spontane Migration wurde zum leeren Zellkulturmedium betrachtet. Die migrierten Zellen wurden nach 0,5 Std. und 1,5 Std. mittels MUSE Count and Viability Kit gezählt. Die Ergebnisse der Zellzählung werden in Form von Balkendiagrammen in der folgenden Abbildung abgebildet.

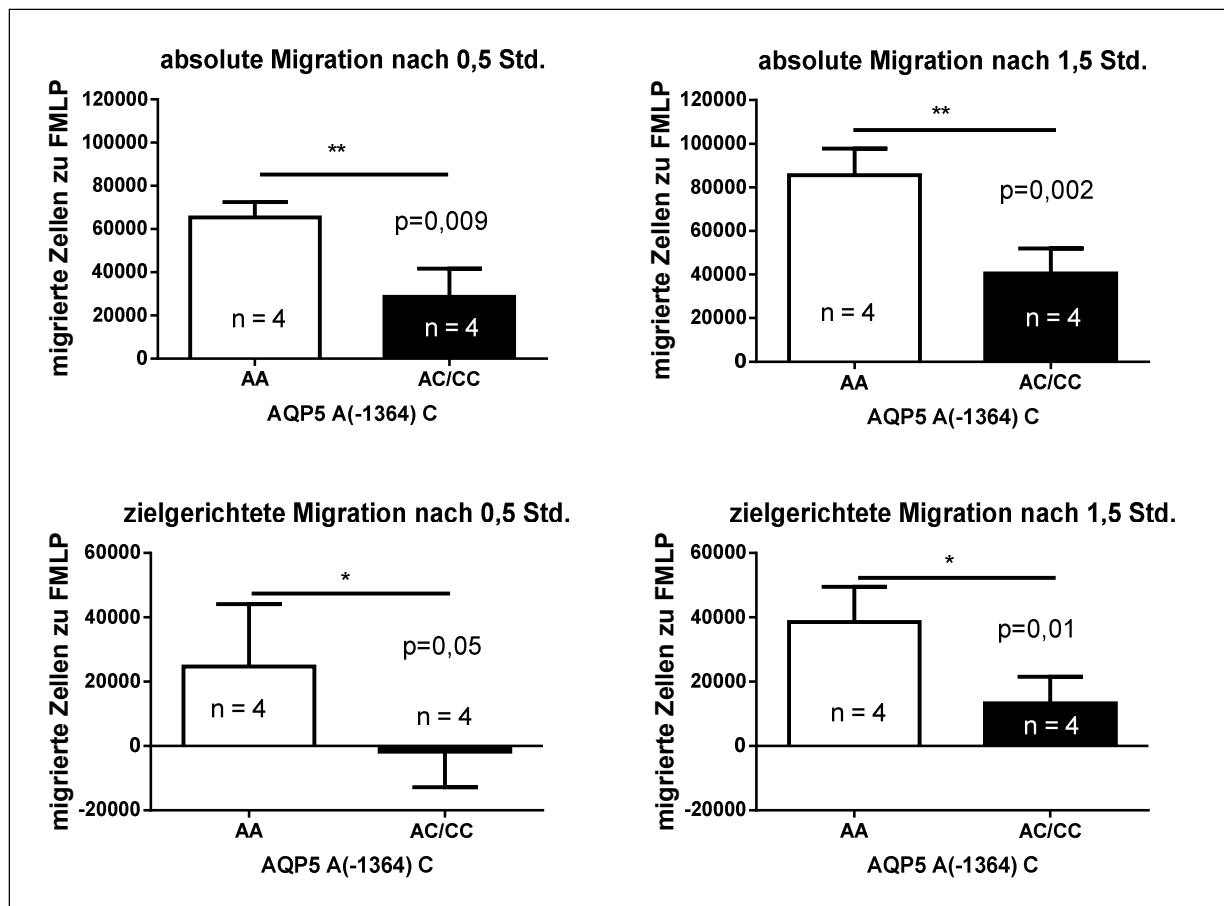
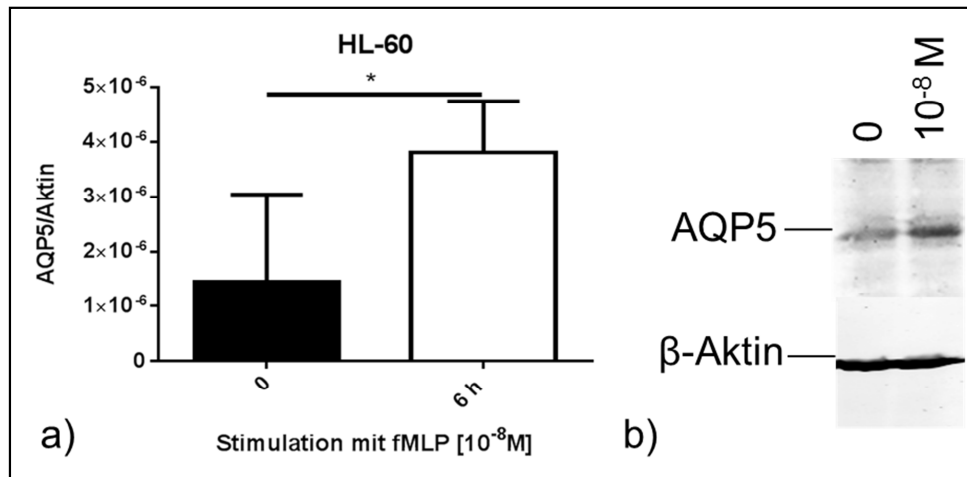


Abbildung 44: Migrationsassays von neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut von 8 gesunden Probanden. Die neutrophilen Zellen wurden mit fMLP stimuliert und die migrierten Zellen wurden nach 0,5 Std. und 1,5 Std. gezählt. Als Positivkontrolle (PK) wurde fMLP verwendet. Als Negativkontrolle (NK) fungierte leeres Zellkulturmedium, n=4, ungepaarter t-test.

Wie aus der Abbildung 44 erkennbar, migrierten sowohl die neutrophile Granulozyten von A-Allelträgern, als auch von C-Allelträgern nach 0,5 Std.. Jedoch wanderten die neutrophilen Granulozyten von A-Allel-Trägern zu diesem Zeitpunkt um mehr als 100 % stärker im Vergleich zu den AC/CC Allel-Trägern ( $p=0,009$ , Abbildung 44). Interessanterweise wiesen nur die neutrophilen Granulozyten von A-Allelträgern nach 0,5 Std. eine zielgerichtete Migration auf, während die Zellen der C-Allelträger über eine spontane Migration noch nicht hinaus kamen ( $p=0,05$ ). Nach 1,5 Std. zeigten sowohl Neutrophile Zellen von A- als auch C-Allelträgern eine zielgerichtete Migration. Die Migration bei A-Allelträgern war allerdings mehr als doppelt so stark ( $p=0,01$ ). Neutrophile Granulozyten von A-Allelträgern wandern schneller und doppelt so stark zielgerichtet zu fMLP, im Vergleich zu Zellen von C-Allelträgern.

### 3.5.2 AQP5-Expression in neutrophilen Zellen unter fMLP-Stimulation

Ob das Stimulans fMLP einen Einfluss auf die AQP5-Genexpression sowie Proteinsynthese in neutrophilen Granulozyten hat, wurde als Nächstes untersucht. Die Ergebnisse werden in der Abbildung 45 präsentiert.



**Abbildung 45: AQP5-Expression nach fMLP-Stimulation in HL-60 Zellen: a) Untersuchung der AQP5 mRNA Expression nach Stimulation mit fMLP( $10^{-8}$ M) ermittelt mittels Real-Time PCR. (n=5, ungepaarter t-Test) b) Untersuchung der AQP5-Proteinexpression nach der Stimulation mit fMLP ( $10^{-8}$ M) ermittelt mittels Western Blot.**

Nach 6 Std. konnte eine signifikante Steigerung der AQP5-mRNA-Expression nachgewiesen werden ( $p=0,03$ ; Abbildung 45a). Nach 24 Std. war kein signifikanter Einfluss auf die Expression zu erkennen, da die Expression auf Basallevel zurückgegangen war (Daten nicht gezeigt). Die Daten der Genexpressionsanalyse konnten auch auf Proteinebene verifiziert werden. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die AQP5 Proteinsynthese nach 6 Std. durch eine fMLP Stimulation erhöht war (Abbildung 45)

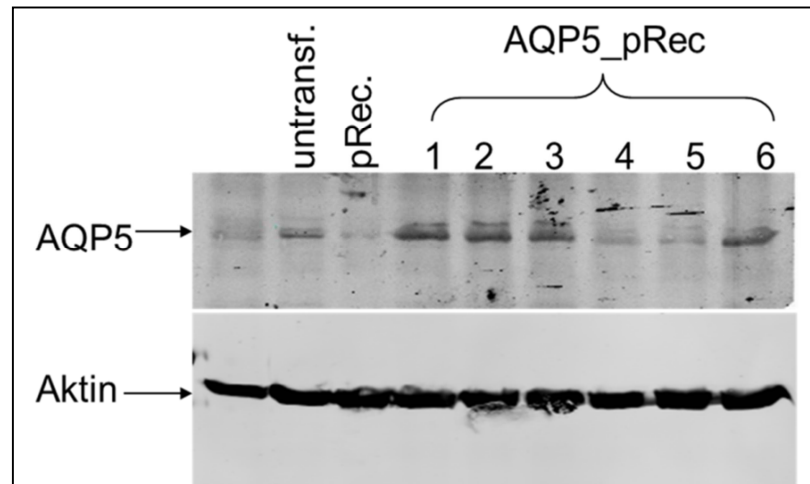
Die hier gezeigten Daten demonstrieren, dass die AQP5-Expression durch bestimmte bakterielle Bestandteile wie fMLP in Neutrophilen Zellen gesteigert wird.

### 3.5.3 Immunzellmigration unter AQP5-Überexpression

Um zu überprüfen, ob AQP5 auch die Migration von anderen Immunzellen wie beispielsweise T-Zellen moduliert, wurde eine neue Zelllinie verwendet. Weiter wurde mittels dieser Zelllinie auch überprüft, ob tatsächlich eine gesteigerte AQP5-Expression für die verstärkte Migration neutrophiler Granulozyten von A-Allelträgern verantwortlich ist. Hierbei handelt es sich um die Jurkat Zelllinie, eine T-Lymphozyten-Zelllinie. Diese Zelllinie wurde stabil mit einem AQP5-



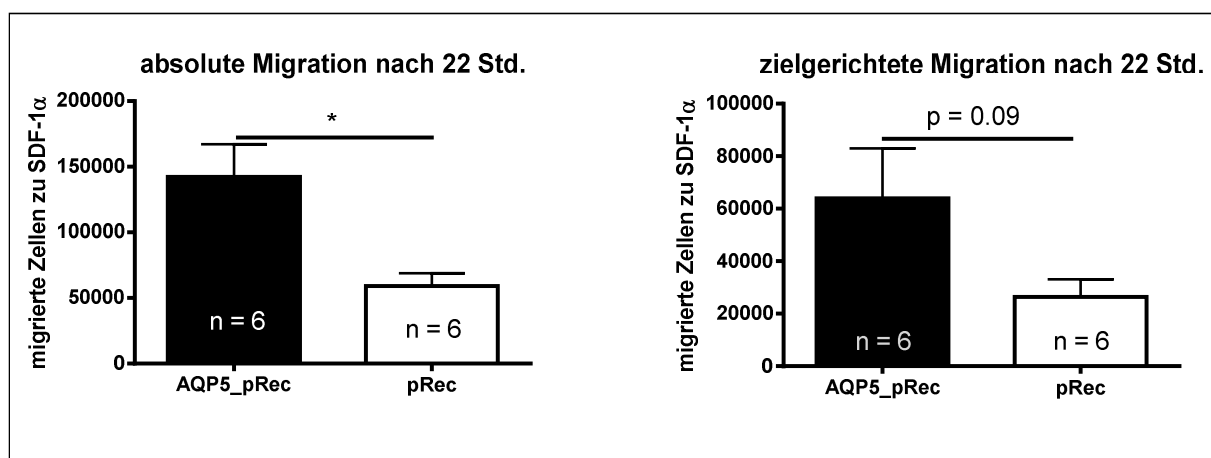
Expressionsplasmid transfiziert. Der Erfolg der Transfektion wurde mit einem Western Blot überprüft. Der Western Blot ist in der Abbildung 46 abgebildet.



**Abbildung 46:** Untersuchungen zur AQP5-Expression in transfizierten Jurkat Zellen mittels Western Blot. In der ersten Spur sind Hela-Proteinextrakte aufgetragen. Die Jurkat Zellen wurden untransfiziert, mit Kontrollplasmid (pRec.) oder mit linearisiertem AQP5-Überexpressionsplasmid transfiziert, lysiert und Proteine daraus gewonnen.

Im Western Blot konnte eine verstärkte AQP5 Proteinsynthese für vier der sechs transfizierten Klone, detektiert werden (Abbildung 46).

Die Klone, die eine verstärkte Expression zeigten, konnten in den Migrationsassay genommen werden. Neben der zielgerichteten Migration zu dem Stimulans SDF-1 $\alpha$  wurde auch die spontane Migration zu leerem Zellkulturmedium betrachtet. Die absolute Migration ist die Gesamtmigration zu SDF-1 $\alpha$  und die rein zielgerichtete Migration setzt sich aus der Migration zu SDF-1 $\alpha$  minus spontane Migration zusammen. Die Ergebnisse werden in der nachfolgenden Abbildung zusammengefasst.



**Abbildung 47:** Untersuchungen zur Migration von Jurkat-Zellen mit AQP5-Überexpression (AQP5\_pRec) und Kontrollplasmid (pRec). Die migrierten Zellen wurden nach 22 Std. gezählt. PK = SDF-1 $\alpha$ , NK: leeres Zellkulturmedium, n=6, ungepaarter t-Test.

Der Migrationsassay zeigte, dass eine AQP5-Überexpression zu einer verstärkten SDF-1 $\alpha$  induzierten Migration von Jurkat Zellen führte (Abbildung 47). Die absolute Migration der AQP5 überexprimierenden Jurkat Zellen war nach 22 Std. signifikant erhöht gegenüber den Kontrollzellen ( $p=0,01$ ; Abbildung 47). Auch bei der zielgerichteten Migration waren die AQP5 überexprimierenden Jurkat Zellen zweifach erhöht, gegenüber den Kontrollzellen. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant (Abbildung 47).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl der AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus, als auch die AQP5-Expression die Migration von Neutrophilen und T-Zellen beeinflusst. Dies ist auf eine verstärkte AQP5-Expression bei A-Allelträgern zurückzuführen, wie Expressionsanalysen und Kontrollexperimente in AQP5 überexprimierten Jurkat-Immunzellen zeigten.

### 3.5.4 AQP5 A(-1364)C-genotypabhängigen Proliferation von monozytären Zellen

Neben der Migration wurde auch untersucht, ob der AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus einen Einfluss auf die Proliferation von Immunzellen ausübt. Neben den neutrophilen Granulozyten wurden auch monozytären Zellen aus dem Blut von den freiwilligen, gesunden Probanden isoliert. Durch PHA wurden die monozytären Zellen zur Proliferation angeregt. Die Ergebnisse der Zellproliferation wurden in Form eines Balkendiagramms zusammengefasst und in der Abbildung 48 präsentiert.

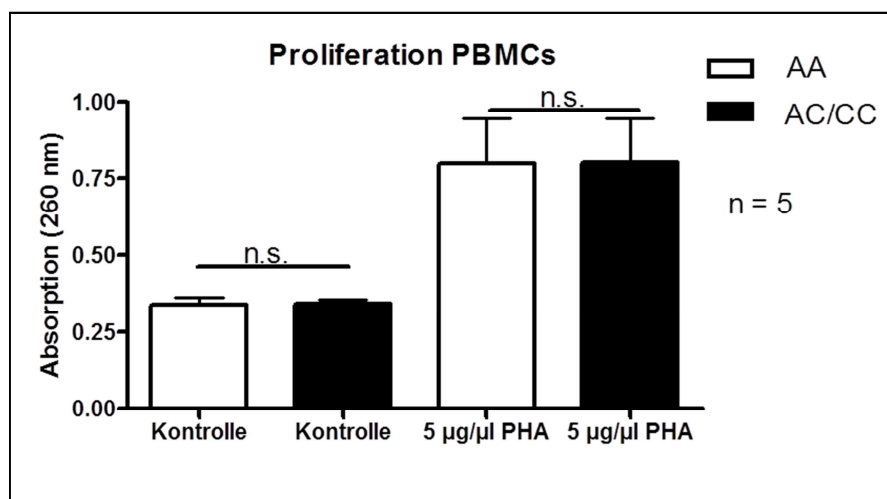


Abbildung 48: Proliferation von monozytären Zellen (PBMCs) unter Stimulation von 5 µg/µl PMA in Abhängigkeit vom AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus, n=5, ungepaarter t-Test

Hierbei zeigte sich, dass PHA zu einer ca. dreifach verstärkten Proliferation der monozytären Zellen führte. Sowohl bei AA-Genotypenträgern ( $p=0,014$ ), als auch bei

C-Allelträgern ( $p=0,016$ ) führte PMA zu einer signifikant erhöhten Proliferation (Abbildung 48). Jedoch ist diese Proliferation nicht vom AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus abhängig (Abbildung 48).

Alles in allem zeigten die Proliferationsassays, dass der AQP5 Promotorpolymorphismus keinen Einfluss auf die Proliferation monozytärer Zellen hat. Einen wichtigen Mechanismus scheint jedoch die AQP5-abhängige Immunzellmigration darzustellen.

### 3.6 Einfluss von LPS und cAMP Stimulation auf THP-1-Zellen

Im letzten Teil dieser Arbeit sollte die AQP5-Expression im Zuge einer Inflammation betrachtet werden und die Möglichkeit einer Therapie mit  $\beta_2$ -Agonisten untersucht werden. Dazu wurde folgende Hypothese getestet:  $\beta_2$ -Agonisten heben LPS-induzierte Effekte auf die AQP5-Expression auf.

Um diese Regulationsmechanismen aufklären zu können, wurden die monozytäre Zelllinie THP-1 mit LPS sowie cAMP stimuliert und der zeitliche Verlauf der AQP5-Expression bei einer LPS-induzierten Inflammation betrachtet.

#### 3.6.1 AQP5-Expression nach Stimulation mit LPS und cAMP in THP-1 Zellen

Als Erstes werden die Daten zur Genexpressionsstudie in Form eines Balkendiagramms zusammengefasst.

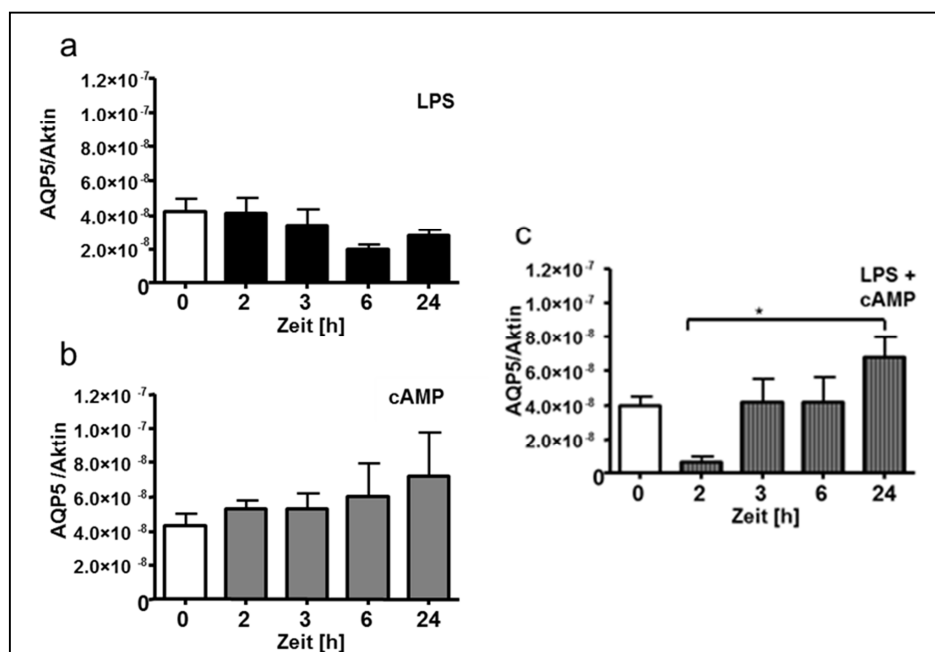
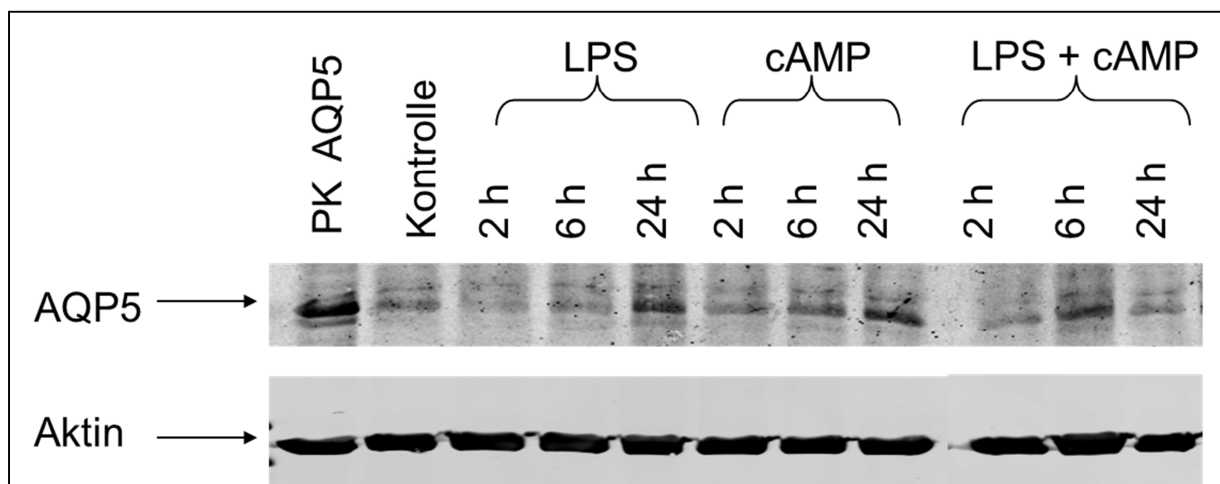


Abbildung 49: Zeitabhängige AQP5 RNA-Expression nach der Stimulation mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und cAMP (1 mM) einzeln oder mit beiden Stimulanzen zusammen. Die Zellen wurden ausgesät und mit den Stimulanzen stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 2, 3, 6, 24 Std.) nach der Stimulation wurde

die Gesamt-RNA isoliert und cDNA gewonnen. Die Expression von AQP5 und Aktin wurde mittels Real-Time PCR bestimmt und aus den Ct-Werten die Expression bestimmt. Analysiert mit Zwei-Weg ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfache-Vergleiche-Test n=6.

Weder bei LPS (Abbildung 49 a) noch bei cAMP (Abbildung 49 b) konnte eine signifikante Änderung in der AQP5-Expression nachgewiesen werden. Jedoch verursachte LPS nach 6 Std. eine Reduktion in der AQP5-Expression, während cAMP zu einem Anstieg in der Genexpression führte. Die simultane Stimulation mit LPS und cAMP induziert zunächst nach 2 Std. einer massiven Inhibition der AQP5-Expression. Überraschenderweise steigt die AQP5-Expression 24 Std. nach der Stimulation über den basalen Level an ( $p=0,148$ ) (Abbildung 49). Die Daten der Genexpressionsstudie sollten auf Proteinlevel verifiziert werden. Die Ergebnisse des Western Blots sind in der Abbildung 50 grafisch dargestellt.

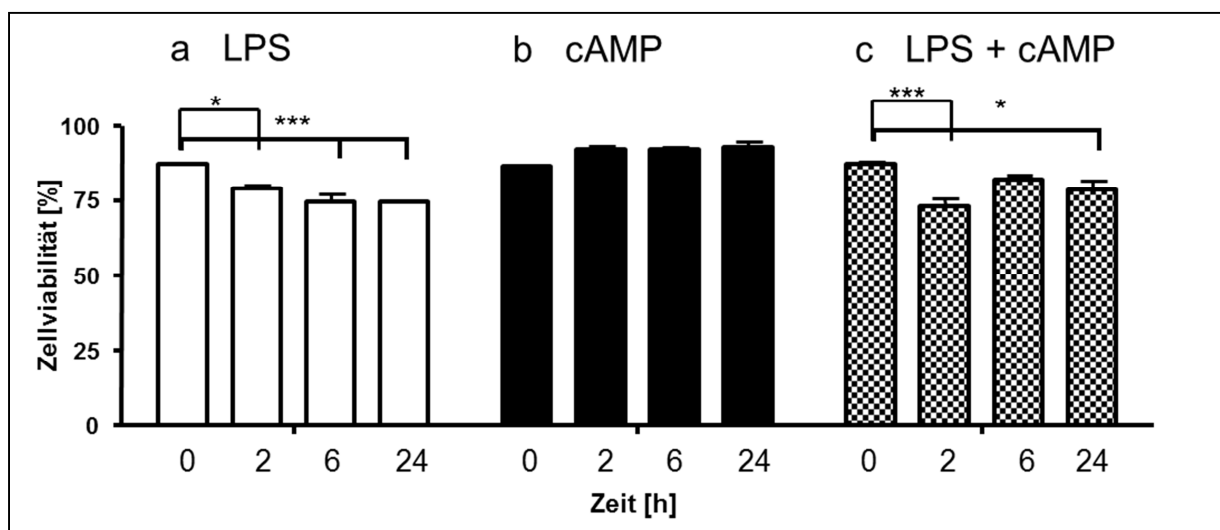


**Abbildung 50:** Zeitabhängige AQP5 Proteinkonzentration in THP-1 Zellen nach der Stimulation mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und cAMP (1 mM) einzeln oder mit beiden Stimulanzen zusammen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Stimulation (0, 2, 6, 24 Std.) wurden die Zellen lysiert und Proteine gewonnen. PK = Positivkontrolle, Kontrolle: ohne Stimulation zum Zeitpunkt 0 h, n= 3.

2 Std. nach der LPS-Stimulation war die AQP5 Proteinkonzentration in den THP-1 Zellen vermindert, im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch kam es 24 Std. nach der Stimulation zu einem starken Anstieg in AQP5 Proteinkonzentration. Zunächst führte die Stimulation von cAMP zu keiner Veränderung auf Proteinebene. Allerdings konnte 24 Std. nach der Stimulation eine vermehrte Proteinkonzentration im Western Blot detektiert werden. Eine simultane Applikation von cAMP und LPS beschleunigt diesen Effekt. Nach 6 Std. konnte ein deutlicher Anstieg in der AQP5 Proteinkonzentration nachgewiesen werden, welcher 24 Std. nach der Stimulation wieder auf den Basalwert gesunken war (Abbildung 50).

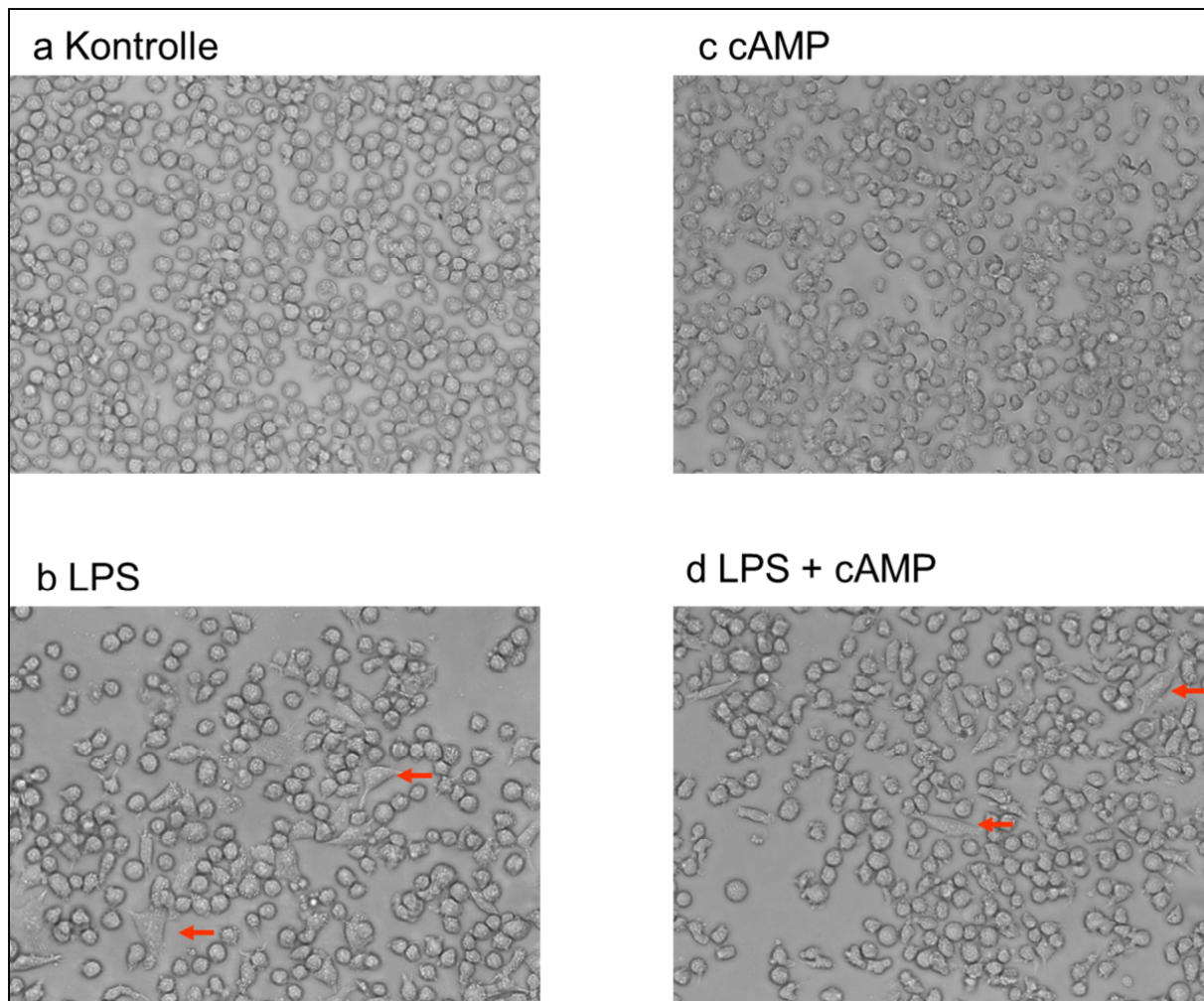
### 3.6.2 Zellmorphologie und Viabilität nach LPS und cAMP-Stimulation von THP-1-Zellen

Um Informationen über den potentiellen therapeutischen Nutzen von cAMP in der Sepsistherapie zu erhalten, wurden neben Proteinen und Gesamt-RNA auch die Zellviabilität und die Zellmorphologie von THP-1 nach LPS und cAMP Stimulation untersucht. Ein weiteres Ziel war es herauszufinden, ob cAMP LPS induzierte Effekte aufheben kann. Nach der simultanen Stimulation wurden Zellen zu bestimmten Zeitpunkten abgenommen und deren Viabilität mittels MUSE Count and Viability Kit bestimmt. Der prozentuale Anteil an vitalen THP-1 Zellen wird in der folgenden Abbildung gezeigt.



**Abbildung 51:** Zeitabhängige Zellviabilität von (a) THP-1 Zellen nach der Stimulation mit LPS (1 µg/ml) und cAMP (1 mM) (b) einzeln oder (c) mit beiden Stimulanzien zusammen. Die Analyse erfolgte mittels MUSE Cell Analyzer n=2. Analyse mit einer zwei-Weg-ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Mehrfach-Vergleiche-Test.

Bereits 2 Std. nach LPS Stimulation konnte eine signifikante Reduktion ( $p=0,016$ ; 2 Std.) in der Zellviabilität nachgewiesen werden, welche im weiteren Verlauf noch weiter abnahm. Im Gegensatz zur LPS Stimulation, konnte bei der cAMP Stimulation ein leichter Anstieg in der Viabilität beobachtet werden. Jedoch ist dieser Anstieg statisch nicht signifikant. Im weiteren Verlauf nahm die Zellviabilität noch zu. Die Applikation von LPS und cAMP führte zu einer Beschleunigung der Abnahme der Zellviabilität, die bereits nach 2 Std. statistisch signifikant war ( $p=0,0002$ ; 2 Std.) (Abbildung 51). Außerdem wurde die Auswirkung der Stimulanzien auf die Morphologie von THP-1 Zellen mikroskopisch betrachtet. Repräsentative mikroskopische Bilder werden in der nachfolgenden Abbildung gezeigt.



**Abbildung 52: Zellmorphologie** von THP-1 Zellen 24 Std. nach der Stimulation mit (b) LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und cAMP (1 mM) (c) einzeln oder (d) mit beiden Stimulanzen zusammen. Dargestellt ist eine 40-fache Vergrößerung.  $n=2$ .

24 Std. nach der Stimulation wurde die Morphologie der Zellen untersucht. Wie aus der Abbildung 52 b ersichtlich ist, verändert LPS die Zellmorphologie von THP-1 Zellen. LPS beschleunigt die Differenzierung von monozytären Vorläuferzellen zu Makrophagen. Dadurch kommt es zur Ausbildung von Lamellipodien und die runden Monozyten werden länglich (rote Pfeile, Abbildung 52 b). Diese Effekte konnten bei cAMP stimulierten THP-1 Zellen nicht beobachtet werden. Eine gleichzeitige Stimulation von THP-1 Zellen mit LPS und cAMP konnte den von LPS ausgelösten Effekt nicht aufheben (Abbildung 52). Unsere Daten zeigen, dass LPS und cAMP gegenteilige Effekte in THP-1 Zellen auslösen. Eine simultane Stimulation der Zellen mit beiden Stimulanzen führt jedoch nicht zur direkten Aufhebung dieser Effekte. Vielmehr wird der LPS-vermittelte Effekt beschleunigt.

## 4 Diskussion

In den vergangenen Jahren konnten Adamzik *et. al* nachweisen, dass der AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus mit der Sepsisletalität assoziiert ist (Adamzik et al. 2011). Dabei konnte gezeigt werden, dass C-Allelträger sowohl eine verringerte AQP5-Expression wie auch ein verbessertes Überleben bei schwerer Sepsis aufwiesen. Die zugrundeliegenden Mechanismen konnten allerdings nicht aufgeklärt werden.

Mit dieser Doktorarbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass AQP5 ein Schlüsselprotein in der LPS induzierten Inflammation darstellt. Damit scheinen die Ergebnisse von Adamzik *et. al* nicht durch ein Kopplungsungleichgewicht des AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus mit einem anderen Zielgen bedingt zu sein. Es wurden AQP5-KO Mäusen sowie deren WT Wurfgeschwistern LPS injiziert und deren Überlebenswahrscheinlichkeit untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass die KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen eine bessere Überlebensrate aufwiesen. Diese *in vivo* Daten wurden auch *in vitro* verifiziert. Hauptsächlich wurde mit den *in vitro* Experimenten versucht, den molekularen Mechanismus, wie AQP5 eine Sepsis moduliert, aufzuklären. Die Daten legen nahe, dass AQP5 die Migration von Immunzellen beeinflusst. Des Weiteren zeigen die Daten der vorliegenden Arbeit, dass das C-Allel, welches mit einer geringeren AQP5-Expression assoziiert ist, ebenfalls mit einer verminderten Migration von neutrophilen Granulozyten begleitet ist. Ein weiterer Teil dieser Arbeit war die Untersuchung des transkriptionellen Mechanismus, der die unterschiedliche AQP5-Expression bei A- und C-Allelträgern bedingt. Dieser beschäftigte sich unter anderem mit der Bindung von Transkriptionsfaktoren an den AQP5-Promotor. Dabei wurde untersucht, welche Transkriptionsfaktoren für die unterschiedliche Expression bei A und C-Allelträgern verantwortlich sein könnten. Dabei konnte gezeigt werden, dass NMP4 an den AQP5-Promotor um den Polymorphismus bindet, jedoch nicht der Transkriptionsfaktor zu sein scheint, der die unterschiedliche Expression bei A- und C-Allelträgern bedingt. Auch das Methylierungsmuster des AQP5 Promotors wurde untersucht. Dieses unterschied sich in einigen Positionen zwischen A- und C-Allelträgern bei Patienten mit schwerer Sepsis und Kontrollpatienten. Da die AQP5-Expression in Immunzellen über Methylierung reguliert wird, könnte dieser

Mechanismus für die unterschiedliche Expression bei A-und-C-Allelträgern verantwortlich sein. Ferner wird die Methylierung von Immunzellen durch LPS beeinflusst. Dieses untermauert die Stimulation der Zellen mit LPS, welche demonstrierte, dass die AQP5-Expression in THP-1 Zellen durch LPS verändert wird. Auch der therapeutische Aspekt wurde in dieser Arbeit untersucht. Hierfür wurden THP-1 Zellen mit cAMP stimuliert. Die Daten zeigten jedoch, dass cAMP LPS induzierte Effekte nicht aufheben kann. Dieses konnte ebenfalls *in vivo* bestätigt werden.

#### **4.1 Untersuchungen zum Überleben von AQP5-KO und WT-Mäusen bei einer Sepsis**

Mit dem Modell der LPS induzierten Inflammation sollte *in vivo* aufgeklärt werden, ob AQP5 ein Schlüsselprotein in der Sepsis darstellt. Dabei wiesen die AQP5-KO Mäuse eine verringerte Letalität auf, im Vergleich zu ihren WT-Geschwistern.

Die Injektion von LPS, als Modell für die Sepsis, stellt ein bewährtes und etabliertes Modell dar. Denn LPS induziert die Ausschüttung zahlreicher Cytokine aus vielen Immunzellen und repräsentiert die initiale Phase der Sepsis sehr gut (Poli-de-Figueiredo et al. 2008). Die Initiation der angeborenen Immunantwort wird vor allem über die Interaktion mit dem CD14-Rezeptor und TLR-4 vermittelt. Dadurch werden zahlreiche inflammatorische Signalkaskaden und die Expression von inflammatorischen Genen initiiert (Dyson, Singer 2009). Außerdem ist die Zusammensetzung von LPS genau bekannt und es kann in allen Mäusen gleich in einer definierten Menge appliziert werden (Poli-de-Figueiredo et al. 2008). Somit ist der Schweregrad der Entzündung in allen Versuchstieren gleich. Die Limitation dieses Modells liegt allerdings in der Beschränkung auf LPS. LPS ist ein Bestandteil der bakteriellen Zellwand. Die Sepsis wird jedoch auch durch weitere bakterielle Bestandteile ausgelöst und zudem stellen gram-negative Infektionen nur in etwa der Hälfte (62,2%) aller Fälle den Auslöser der Sepsis dar (Mayr et al. 2014). Außerdem ist LPS alleine im Gegensatz zu Bakterien bei einer Sepsis nicht vermehrungsfähig, somit kann das komplette Spektrum einer humanen Sepsis mit einer LPS-induzierten Inflammation nicht abgebildet werden (Zanotti-Cavazzoni, Goldfarb 2009). Des Weiteren reagieren Mäuse kaum auf LPS. Dies wird an der Menge klar, die benötigt wird, um bei einer Maus eine LPS-induzierte Inflammation auszulösen. Vergleicht man die Menge, die den Mäusen appliziert werden muss mit der, die einem



Menschen injiziert werden müsste, um die gleiche Reaktion auszulösen, so liegt diese bei der Maus 250-fach höher (Nemzek et al. 2008). Nach der LPS-Applikation kommt es zum Ausbruch zahlreicher klinischer Symptome, wie beispielsweise einer verringerte Beweglichkeit, Lethargie und zu Zittern (Nemzek et al. 2008), diese klinische Symptomen konnten in der vorliegenden Arbeit ebenfalls beobachtet werden. Des Weiteren kommt es bei diesem Modell zu einem schnellen Anstieg der Cytokinkonzentration innerhalb der ersten 1,5 Std. bis 4,5 Std. (Nemzek et al. 2008), welche jedoch relativ rasch wieder abfällt (Dyson, Singer 2009). Die erhobenen Daten dieser Arbeit stimmen mit diesen Beobachtungen von Nemzek *et al.* (Nemzek et al. 2008) und Dyson *et al.* (Dyson, Singer 2009) überein. Allerdings konnte kein Unterschied in der Cytokinkonzentration zwischen AQP5-KO und WT Geschwister Tieren detektiert werden. Jedoch sollte beachtet werden, dass es innerhalb der Gruppen zu hohen Schwankungen kam. Außerdem waren bereits 34% der WT Mäuse nach 24 Std. verstorben, im Gegensatz zu den KO-Mäusen. Hier waren nur 12% der Mäuse innerhalb der ersten 24 Std. verstorben, von denen kein Blut für eine spätere Cytokinanalyse genommen werden konnte.

Auch in der Cytokinkonzentration unterscheidet sich das Modell der LPS Injektion von der humanen Erkrankung. Während es bei dem Modell zu einem schnellen, sehr starken, aber kurzen Anstieg in der Cytokinkonzentration kommt, so findet man bei einer humanen Erkrankung einen geringeren Cytokinspiegel, der aber über einen längeren Zeitraum besteht (Dyson, Singer 2009). Das angewandte Modell hat seine Limitationen, wurde in der vorliegenden Arbeit aufgrund der sehr guten Reproduzierbarkeit an unterschiedlichen Versuchstagen ausgewählt. Es sind weitere Tiermodelle vorhanden, mit denen man eine humane Sepsis studieren kann. Eines der wichtigsten Tiermodelle ist die sogenannte Blinddarmligatur und Punktion (cecal ligation and puncture, CLP) (van der Poll 2012). Es kommt hierbei zu zwei Typen von Verletzungen. Zum einen kommt es zu einer Infektion des Peritoneums hervorgerufen durch verschiedene Darmbakterien. Zum anderen induziert das nekrotische Gewebe eine inflammatorische Reaktion (van der Poll 2012). Dieses Modell spiegelt eine humane Sepsis relativ gut wieder. Nachteil dieser Methode ist, dass es beispielsweise durch den chirurgischen Eingriff zur Abszessbildung kommen kann. Dies findet man im humanen Zustand nicht (van der Poll 2012). Der methodische Nachteil der CLP liegt darin, dass der Experimentator die Methode sehr gut beherrschen muss, um eine gleiche Stärke der Infektion hervorrufen zu können.

Dies ist bei der LPS Methode einfacher. Hier setzt man eine definierte Menge an LPS ein, die durch das Körpergewicht bestimmt wird. Darüber hinaus sind alle Tiermodelle zur Sepsis durch einige weitere Faktoren limitiert. Ein limitierender Faktor ist, dass beim Menschen eine Sepsis häufig bei Älteren oder immungeschwächten Patienten mit Vorerkrankungen auftritt (Mayr et al. 2014). In den Tierstudien werden hingegen zumeist junge und gesunde Tiere eingesetzt (Fink 2014). Außerdem werden in der Sepsistherapie beim Menschen zahlreiche unterstützende Maßnahmen ergriffen, wie Beatmung, Volumenersatztherapie, zusätzliche Nährstoffgabe und antimikrobielle Therapien (Dellinger et al. 2013). Diese Maßnahmen werden im Tiermodell unterlassen (Fink 2014). Zusammenfassend weisen alle Modelle Schwierigkeiten und Abweichungen vom humanen Krankheitsbild auf (Dyson, Singer 2009, Fink 2014). Dennoch kann die LPS-Injektion einen Teil, insbesondere in der initialen Phase, der sehr komplexen Vorgänge bei der humanen Sepsis abbilden (Doi et al. 2009). Die erhobenen Daten dieser Doktorarbeit zeigen, dass AQP5 ein Schlüsselprotein in der LPS induzierten Sepsis ist. TNF- $\alpha$  und IL-10 scheinen nicht für das bessere Überleben der KO-Tiere verantwortlich zu sein. Folglich könnte AQP5 ein mögliches Zielprotein für zukünftige Sepsistherapeutika sein. Im Rahmen weiterer Tierversuche sollten potenzielle Wirkstoffe getestet werden, die gegen AQP5 gerichtet sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *in vivo* Daten des besseren Überlebens weiter *in vitro* verifiziert. Daher wurde zunächst auf zellulärer Ebene die AQP5-abhängige Immunzellmigration- und Proliferation betrachtet.

## **4.2 Untersuchungen zur AQP5-abhängigen Zellmigration und Zellproliferation**

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es, den Mechanismus aufzuklären, der dafür verantwortlich ist, dass AQP5-KO-Mäuse ein verbessertes Überleben bei der LPS-induzierten Sepsis aufweisen. Außerdem sollte auch der Mechanismus beleuchtet werden, der zum besseren Überleben von Patienten mit C-Allel des AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus mit einer schweren Sepsis führt. Da Aquaporine den Wasser- und Salzhaushalt vieler Zellen regulieren (Day et al. 2013) und bei gesunden Probanden der AQP5 A(-1364)C Polymorphismus Einfluss auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) hat (Adamzik et al. 2008), könnte dieses auch einen Einfluss in der Sepsis haben. Adamzik et al. konnten aber zeigen, dass

der Letalitätsunterschied zwischen A- und C-Allelträgern nicht durch Unterschiede im RAAS zu erklären sind (Adamzik et al. 2011). Daher scheinen andere Mechanismen verantwortlich zu sein. Aus der Tumorforschung ist bekannt, dass AQP5 die Migration und Proliferation beeinflusst (Woo et al. 2008c, Jiang et al. 2012, Huang et al. 2013). Diese Mechanismen könnten auch in der Inflammation eine Rolle spielen.

Es wurde zunächst untersucht, ob die AQP5-Expression die Migration von Immunzellen beeinflusst.

Dies wurde zunächst in einer Zelllinie verifiziert. Hierfür wurde die T-Imphozytäre Zelllinie Jurkat ausgewählt. Dazu wurde die Zelllinie mit einem Überexpressionsplasmid von AQP5 transfiziert. Die AQP5-überexprimierenden Zellen wiesen eine verstärkte Migration auf. Dabei war die Migration insgesamt langsam und AQP5 überexprimierte Zellen und Kontrollzellen unterschieden sich nach 22 Std. nach Stimulation signifikant in ihrer Migration.

Nun blieb die Frage offen, ob sich A- und C-Allelträger in neutrophilen Granulozyten in ihrer Migration unterscheiden und ob dies Auswirkung auf die Migration dieser Zellen hat. Um dieses zu beantworten, wurden neutrophile Granulozyten aus dem Vollblut von gesunden Probanden isoliert. Dafür wurde Vollblut von A-Allel und C-Allelträgern des AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus verwendet. Die Ergebnisse der Migrationsassays legen nahe, dass neutrophile Granulozyten von A-Allel Trägern eine frühere bzw. mehr als doppelt so starke Migration aufweisen, im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten von C-Allelträgern. Die Migration der neutrophilen Granulozyten verlief sehr schnell und erste Unterschiede waren bereits nach 0,5 Std. messbar. Neutrophile Granulozyten sind Immunzellen, die als Erstes den Entzündungsherd erreichen, indem sie durch Botenstoffe aus Makrophagen angelockt werden und somit migrieren diese Zellen sehr schnell (ves-Filho et al. 2008). Des Weiteren belegen immunologische Färbungen eine verstärkte AQP5-Expression bei neutrophilen Granulozyten bei A-Allelträgern. Daher kann hier vermutet werden, dass die erhöhte Migration bei A-Allelträgern auf eine erhöhte AQP5-Expression zurückzuführen ist. Die Migration von Zellen basiert auf der Ausbildung von Membranausstülpungen, auch Lamellipodien genannt, in deren Richtung sich die Zelle bewegt (Loitto et al. 2009). Die Membranausstülpungen kommen durch einen Ioneneinstrom in die Zelle zu Stande, auf den ein Wassereinstrom folgt. Im Anschluss kommt es zur Stabilisierung der Ausstülpung

durch Aktinpolymerisation und schließlich zur Bewegung (Schwab, Stock 2014). Der Wassereinstrom wird durch die Aquaporine ermöglicht (Papadopoulos et al. 2008). Für AQP5 konnte gezeigt werden, dass es in die Migration von Tumorzellen involviert ist (Huang et al. 2013, Jung et al. 2011). Die Daten der hier vorliegenden Doktorarbeit zeigen nun erstmalig, dass AQP5 die Migration von neutrophilen Granulozyten moduliert. In der Literatur ist dokumentiert, dass AQP9 die Migration von neutrophilen Granulozyten beeinflusst (Loitto et al. 2002) und dass AQP3 für die chemokinabhängige Migration von T-Zellen wichtig ist (Hara-Chikuma et al. 2012). Welche Aquaporine mehr Einfluss haben, ist jedoch noch nicht aufgeklärt. Aquaporine sind für die Ausbildung der Lamellipodien verantwortlich, denn die Migration konnte durch den Aquaporin Blocker HgCl<sub>2</sub> blockiert werden. Interessanterweise sind AQP9 und fMLP-Rezeptoren an den Lamellipodien kolo-kalisiert (Loitto et al. 2002). Des Weiteren zeigen die hier erhobenen Daten, dass fMLP die AQP5-Expression in der neutrophilen Zelllinie HL-60 erhöht. Dieses deutet auf einen positiven Feedback-Mechanismus der Migration durch fMLP hin, welcher jedoch zeitlich begrenzt ist. Die Expressionssteigerung war nach 24 Std. nicht mehr messbar. Aus diesen Daten lässt sich die Vermutung aufstellen, dass Aquaporine eine wichtige Rolle in der Migration von neutrophilen Granulozyten einnehmen. Zusätzlich demonstrieren die erhobenen Migrationsdaten der Jurkat Zelllinie, dass die Migration von Immunzellen wie neutrophilen Granulozyten und T-Zellen durch AQP5 moduliert wird. Es konnte also erstmalig gezeigt werden, dass die Migration neutrophiler Granulozyten AQP5-abhängig ist. Somit könnte die Assoziation des Promotorpolymorphismus mit der schweren Sepsis durch eine verringerte Migration neutrophiler Granulozyten bedingt sein. Möglicherweise ist also eine moderate Immunreaktion in der Sepsis protektiv und trägt zum besseren Verlauf bei. Zukünftige Versuche sollten sich auf die zugrunde liegenden Signalkaskaden und mögliche therapeutische Optionen fokussieren.

Eine weitere Möglichkeit, wie AQP5 Einfluss in der Sepsis hat, wäre der Einfluss auf die Zellproliferation. Untersucht wurde das Proliferationsverhalten von isolierten PBMCs aus gesunden Probanden mit bekanntem AQP5 A(-1364)C-Genotyp. Im Gegensatz zu den Migrationsversuchen, zeigten die Proliferationsversuche keine AQP5-Abhängigkeit. Hier konnte keine genotypabhängige Beeinflussung von AQP5 auf die Proliferation von Phytohämagglutinin(PHA)-stimulierten PBMCs nachgewiesen werden. Grundsätzlich führte die Stimulation der PBMCs mit PHA zu

einer verstärkten Proliferation, welche sich jedoch nicht zwischen Zellen von A-Allel und C-Allelträgern unterschied. Bei PHA handelt es sich um ein proinflammatorisches Agens mit mitogenen Eigenschaften (Kim et al. 2007), was die Proliferation von Monozyten und Lymphozyten anregt (Nokta, Pollard 1989). Zum einen könnte der fehlende Effekt dadurch begründet sein, dass AQP5 kein Regulator der Immunzellproliferation ist. Zahlreiche Studien gehen davon aus, dass die Regulation der Zellproliferation durch Aquaporine vor allem durch den Einstrom von Glycerol vermittelt wird, der zum intrazellulären Anstieg von ATP und zur Aktivierung des Lipidstoffwechsels führt (Verkman 2011, Verkman 2013, Verkman et al. 2014). Jedoch ist AQP5 kein Glycerolkanal (King et al. 2004, Ishibashi et al. 2013). Zum anderen wird in der Literatur zahlreich beschrieben, dass AQP5 die Zellproliferation beeinflusst (Verkman et al. 2008, Huang et al. 2013, Jung et al. 2011, Lee et al. 2013). AQP5 könnte die Zellproliferation über den Ras-Signalweg beeinflussen (Woo et al. 2008c), denn AQP5 aktiviert den Ras Signalweg direkt. Lectine, zu denen auch das Stimulans PHA gehört, können den Ras-Signalweg ebenfalls aktivieren (Tamma et al. 2003). Dies schließt eine AQP5-unabhängige Stimulation der Zellproliferation nicht aus. Diese Tatsache sollte in nächsten Versuchen beachtet werden. Deshalb sollten Ras-unabhängige Stimulanzen verwendet werden, um eine Proliferation anzuregen. Weiter ist zu beachten, dass es sich bei PHA um einen unspezifischen Stimulator der Zellproliferation handelt (Trickett, Kwan 2003), d.h. es wurden alle Zellen im PBMC-Gemisch stimuliert. In zukünftigen Versuchen könnten spezifische Stimulanzen verwendet werden. So könnten beispielsweise T-Zellen mit CD3/CD28 (Trickett, Kwan 2003) und Monozyten mit CD137 (Langstein et al. 2000) spezifisch zur Proliferation angeregt werden.

Wie in diesem Abschnitt diskutiert wurde, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten von A-Allelträgern nicht nur schneller und stärker zielgerichtet migrieren, sondern darüber hinaus auch eine verstärkte AQP5-Expression ausweisen. Des Weiteren beeinflusst AQP5 auch die Migration anderer Immunzellen. Ein möglicher Mechanismus der zum besseren Überleben von A-Allelträgern führt, könnte also eine verminderte Migration darstellen. Um diese These zu untermauern wurde zunächst überprüft, ob sich A- und C-Allelträger von Patienten mit schwerer Sepsis tatsächlich in ihrer AQP5-Expression unterscheiden. Außerdem wurde untersucht, ob sich A- und C-Allelträger auch in anderen inflammatorischen

Parametern, wie der Cytokinkonzentration im Blut unterscheiden. Dieses wurde im Folgenden untersucht.

### **4.3 Untersuchungen zur genotypabhängigen AQP5-Expression und Cytokinkonzentration bei Patienten mit schwerer Sepsis**

Der Basenaustausch A zu C im Promotor von AQP5 scheint eine wichtige Rolle in der Letalität bei einer schweren Sepsis zu haben (Adamzik et al. 2011). Deshalb wurde im Zuge dieser Doktorarbeit untersucht, ob die AQP5-Expression bei Patienten mit schwerer Sepsis vom Genotypen, also A oder C, abhängt. So ein möglicher Unterschied könnte sich auf zelluläre Mechanismen beim Verlauf einer Sepsis auswirken. In vorherigen Studien aus dem Institut konnte gezeigt werden, dass in anderen Geweben und Zellen wie Erythrozytenmembranen, Herzohrzellen, Meningiomzellen, C-Allelträger eine geringere AQP5-Expression aufweisen (Adamzik et al. 2008, Lambertz et al. 2013). Zusätzlich konnte nun nachgewiesen werden, dass auch im Vollblut von Patienten mit schwerer Sepsis mit einem C-Allel eine geringere AQP5-Expression vorliegt, als im Vollblut von A-Allelträgern. Möglicherweise ist also eine aus der unterschiedlichen Expression resultierende genotypabhängige Migration neutrophiler Granulozyten für das unterschiedliche Überleben von A- und C-Allelträgern bei Sepsis verantwortlich. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, weisen zudem innerhalb des Vollbluts neutrophile Granulozyten von A-Allelträgern eine deutlich verstärkte AQP5-Proteinexpression auf. In dieser Arbeit wurde zudem untersucht, ob sich auch die Cytokinkonzentration zwischen beiden Gruppen unterscheidet.

Cytokine spielen in der Sepsis eine zentrale Rolle, da die initiale Phase der Sepsis durch eine massive Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen gekennzeichnet ist. Im weiteren Verlauf kommt es dann zu einer vermehrten Ausschüttung antiinflammatorischer Cytokine (Cho, Choi 2014). Dass die Cytokinproduktion mit der AQP5-Expression verbunden ist, konnten diverse Studien wie von Yamamura *et al.* (Yamamura et al. 2011) zeigen. Die Forschergruppe um Skowron-Zwarg fand heraus, dass IL-13 zu einer kompletten Inhibition der AQP5-Expression in humanen nasalen Epithelzellen führt (Skowron-zwarg et al. 2007), während die Gruppe um Shen *et al.* bei AQP5-KO Mäusen eine Herunterregulation der TH2-Cytokine, wie z.B. IL-4, und gleichzeitig eine Heraufregulation von TH1-Cytokinen, wie IFN- $\gamma$  und IL-2 detektierten (Shen et al. 2011). Deshalb wurde im

nächsten Schritt untersucht, ob die AQP5-Genotypen mit einem bestimmten Cytokinmuster verknüpft sind. Als Probe diente Vollblut von Patienten mit schwerer Sepsis, das innerhalb der ersten 24 Std. nach Erfüllen der Sepsis-Kriterien nach Bone (Bone et al. 2009) abgenommen wurde. Dabei wurde eine große Variabilität zwischen einzelnen Patienten, aber auch innerhalb eines Genotyps detektiert. Bei den meisten untersuchten Cytokinen zeigte sich keine Abhängigkeit vom AQP5-Genotyp. Bei IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-12 könnte ein Gen-Dosis Effekt vermutet werden. Dieser war jedoch statistisch nicht signifikant. Statistisch signifikante Unterschiede in Cytokinkonzentrationen zwischen zwei Gruppen sind jedoch kaum zu erwarten, da sich in den Cytokingenen selbst zahlreiche Polymorphismen befinden (Belopolskaya et al. 2015). Diese verursachen eine hohe Variabilität, welche auch in dieser Studie beobachtet werden konnte (Belopolskaya et al. 2015).

Betrachtet man dennoch den Trend der untersuchten Daten, so wiesen A-Allelträger eine verstärkte Produktion der Cytokine IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  und IL-12 im Vergleich zu C-Allelträgern auf. Die starke Produktion vieler Cytokine korreliert mit dem schlechten Überleben bei einer schweren Sepsis (Fjell et al. 2013). Zu diesen Cytokinen gehört beispielsweise TNF- $\alpha$ . So fanden Kothari *et al.* heraus, dass eine höhere TNF- $\alpha$  Serumkonzentration mit der Letalität bei einer Sepsis einhergeht (Kothari et al. 2013). Diesen Effekt konnten Lv *et al.* mit der Gabe von TNF- $\alpha$  Antikörpern aufheben (Lv et al. 2014). Der gefundene Trend in dieser Arbeit stimmt mit der Beobachtung von Kothari überein. Die genotypabhängige Betrachtung des Cytokinmusters zeigte, dass A-Allel Träger, die eine schlechtere Prognose bei einer Sepsis haben, tendenziell eine erhöhte TNF- $\alpha$  Serumkonzentration aufweisen (Adamzik et al. 2011).

Wie TNF- $\alpha$  gehören auch IL-1 $\beta$  und IL-12 zu den proinflammatorischen Cytokinen (Hotchkiss et al. 2013a), welche in der Sepsis eine wichtige Rolle zu spielen scheinen (Dinarello 2005a). Der genaue Mechanismus, wie die Cytokine das Überleben bei der Sepsis beeinflussen, ist noch nicht geklärt.

Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Blockierung von IL-1 $\beta$  in einigen Patientengruppen protektive Effekte bei einer Sepsis hat (Dinarello 2005b). Diverse andere Studien konnten aber nachweisen, dass bereits prä-operativ und vor Entwicklung einer Sepsis die Produktion unterschiedlicher Cytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-12 bei isolierten LPS-stimulierten Monozyten aus den Patienten, die später eine letale Sepsis entwickeln, reduziert ist (Weighardt et al. 2002, Mokart et al. 2010,

Novotny et al. 2006). Währenddessen konnte eine weitere Studien zeigen, dass Sepsis Überlebende eine verstärkte IL-12 Produktion aufweisen (Wu et al. 2011). Damit scheint IL-12 eine protektive Wirkung bei einer Sepsis zu haben (Novotny et al. 2005). Diese Daten sind widersprüchlich zu den hier beschriebenen Daten. Diese legten nahe, dass A-Allelträger eine tendenziell erhöhte IL-12 Serumkonzentration aufwiesen, aber eine schlechteres Überleben bei einer Sepsis aufwiesen (Adamzik et al. 2011). Andere Studien, wie beispielsweise von Mera *et al.* deuten auf einen unterschiedlichen zeitlichen Verlauf der IL-12 Produktion bei überlebenden und nicht-überlebenden Patienten mit schwerer Sepsis hin. Während nicht-überlebende Patienten mit schwerer Sepsis zunächst eine geringe IL-12 Produktion aufweisen, die im weiteren Verlauf einer Sepsis ansteigt, so zeigten die überlebenden Patienten einen umgekehrten Verlauf. Zunächst haben diese Patienten mit schwerer Sepsis eine verstärkte IL-12 Produktion, die dann abfällt (Mera et al. 2011). Eine Zeitkinetik für IL-12 und TNF- $\alpha$  wurde im Zuge dieser Arbeit nicht gemacht. Dies wäre ein interessanter Ansatz für weiterführende Experimente. Ein weiterer Punkt, der in weiteren Experimenten beachtet werden sollte, ist ein festgelegter Zeitpunkt der Blutabnahme. Das Vollblut, das in dieser Arbeit verwendet wurde, wurde innerhalb der ersten 24 Std abgenommen. Bei nachfolgenden Experimenten sollten zu definierte Zeitpunkte wie beispielsweise 6 Std., 24 Std. und 48 Std. nach Erfüllung der Sepsiskriterien das Vollblut abgenommen werden. Limitierend in dieser Arbeit ist auch, dass die AQP5-Expression nicht direkt mit der Cytokin-Produktion verglichen wurde. Aufgrund der Tatsache, dass bei den meisten Patienten mit schwerer Sepsis keine Gesamt-RNA bzw. nicht in ausreichender Qualität vorlag, und bei anderen wiederum nicht alle Cytokine bestimmt worden waren, konnte dieser Vergleich nicht gemacht werden.

Bei den Patienten mit schwerer Sepsis wurden nicht nur genotypabhängig die AQP5-Expression und Cytokinkonzentration betrachtet, sondern darüber hinaus auch das Methylierungsmuster des AQP5-Promotors untersucht. Diese Untersuchung könnte einen wichtigen Beitrag zur Aufklärung des Mechanismus, der die unterschiedliche AQP5-Expression bei A- und C-Allelträgern bedingt, liefern.



#### **4.4 Untersuchungen zum Methylierungsmusters des AQP5-Promotors bei Patienten mit schwerer Sepsis und postoperativen Patienten**

In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, welchen Einfluss die DNA-Methylierung besitzt. So konnte bereits gezeigt werden, dass in vielen Tumoren die DNA-Methylierung stark von gesunden Zellen abweicht (Dong et al. 2014). Außerdem beeinflussen auch bakterielle Infektionen das Methylierungsmuster der DNA (Bierne et al. 2012). Dies verdeutlicht, dass die DNA-Methylierung einen wichtigen epigenetischen Regulationsmechanismus in der Sepsis darstellen könnte (Feinberg 2007). In der Regel führt die Methylierung von Cytosinen in CpG Inseln zu einer Erniedrigung der Promotoraktivität, was sich in einer verminderten DNA-Expression widerspiegelt (Dong et al. 2014).

Zunächst wurde untersucht, ob die AQP5-Expression in Immunzellen über Methylierung reguliert wird. Dieses konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. In zwei (HL-60, REH) von drei (U937) Immunzelllinien zeigte sich, dass eine verringerte AQP5-Promotormethylierung mit einer signifikant erhöhten AQP5-mRNA-Expression einhergeht. Dass diese Erhöhung in der Zelllinie U937 nicht signifikant war, könnte auf die geringe AQP5-Expression in dieser Zelllinie zurückzuführen sein. Diese ist in den U937-Zellen im Vergleich zu HL-60-Zellen um den Faktor 10 und im Vergleich zu den REH-Zellen sogar um den Faktor 100 vermindert. Diese Daten werden durch Yamamura *et al.* in einer anderen Zelllinie bestätigt. Yamamura *et al.* konnten zeigen, dass eine Demethylierung in Speicheldrüsenzellen zu einer verstärkten AQP5-Expression führt (Yamamura et al. 2012).

Zusätzlich wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob bakterielle Bestandteile wie LPS die Methylierung am AQP5-Promotor modulieren können. Die generierten Daten dieser Doktorarbeit konnten zeigen, dass die Stimulation der monozytären Zelllinie U937 mit LPS eine verringerten AQP5-Promotormethylierung einhergeht. Dieses führt ebenfalls zu einer verstärkten AQP5-Proteinexpression. In der Literatur konnte eine epigenetische Regulation in der Sepsis beispielsweise bereits für TNF- $\alpha$  nachgewiesen werden. Hierbei führt eine Langzeitexposition mit LPS zu einer Veränderung der Histonmodifikationen, was in diesem Falle jedoch zu einer induzierten Methylierung und damit zur Stilllegung des TNF- $\alpha$ -Gens führt (Liu, Xie 2011). Auch andere Studien deuten eher auf eine erhöhte Methylierung durch bakterielle Bestandteile und Bakterien hin (Bierne et al. 2012, Tolg et al. 2011). Dieses

steht also im Kontrast zu unseren Daten in den U937-Zellen, könnte jedoch ein weiterer Hinweis darauf sein, dass Methylierungsprozesse in der Sepsis wichtig sind. Daher wurde das Methylierungsmuster des AQP5-Promotors bei septischen und postoperativen Patienten betrachtet. Außerdem fanden auch die unterschiedlichen Genotypen des AQP5 A(-1364)C- Promotorpolymorphismus Beachtung.

Die vorliegenden Daten demonstrieren, dass sowohl Patienten mit schwerer Sepsis als auch postoperative Kontrollpatienten mit einem A-Allel in bestimmten Positionen eine geringere Methylierung aufwiesen, im Vergleich zu C-Allelträgern. Dabei waren jeweils andere Positionen von Septikern und Kontrollpatienten betroffen. Auffällig an dem gefundenen Methylierungsmuster ist, dass sich die Methylierung nur in einigen Positionen signifikant genotypabhängig unterschied. Allerdings war der gefundene Unterschied sehr gering. Es stellt sich die Frage der biologischen Relevanz der gefundenen Methylierungsunterschiede. In der Literatur wird beschrieben, dass selbst Methylierungsunterschiede von wenigen Prozent (<10%) zu einer signifikant veränderten Genexpression führen können (Guenin et al. 2012, Leclerc et al. 2013). Über die Unterschiede zwischen A-Allel und C-Allelträgern hinaus zeigten Patienten mit schwerer Sepsis eine verstärkte Methylierung an bestimmten Positionen im Vergleich zu postoperativen Patienten ohne Sepsis. Besonders auffällig war Position nt-937, da diese bei verstorbenen septischen Patienten im Vergleich zu Überlebenden oder postoperativen Patienten deutlich stärker methyliert war. Diese erhöhte Methylierung bei septischen Patienten deckt sich mit unterschiedlichen Studien, in denen eine erhöhte Methylierung durch unterschiedliche Bakterien detektiert wurde (Bierne et al. 2012, Tolg et al. 2011). Auch während einer Sepsis verändert sich der Methylierungsmetabolismus (Semmler et al. 2013). Aus diesem Grund fungiert das Methylierungsmuster bestimmter Gene als Biomarker für eine Sepsis (Tendl et al. 2013). Erste Hinweise aus der Literatur zeigen auf, dass durch LPS die DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3a/b vermehrt exprimiert werden (Kovalchuk et al. 2013). In Folge dessen, wird die DNA stärker methyliert (Kovalchuk et al. 2013). Diese Daten deuten darauf hin, dass es im Zuge einer Infektion/Sepsis kurzfristig zu einer Repression der Methylierung bestimmter Gene kommt, diese langfristig aber verstärkt wird. Dieser Sachbestand würde erklären, warum bei Patienten mit schwerer Sepsis eine verstärkte Methylierung der DNA nachgewiesen werden konnte. Über die Konsequenzen der Methylierung von Position nt-937 und die unterschiedliche Methylierung zwischen A- und C-Allelträgern

kann jedoch nur spekuliert werden. Um erste Hinweise auf die Bedeutung der differentiellen Methylierung im Promotorbereich (nt-702/nt-1035) zu erhalten, wurde dieser Bereich mittels *in silico*-Analyse auf die Bindung von Transkriptionsfaktoren untersucht. So konnte die *in silico* Analyse für Transkriptionsfaktoren für diesen AQP5-Promotorbereich Bindungsstellen für SP1 aufdecken. Somit könnte die Bindung von SP1 (Oeth et al. 1997) Ursache für die unterschiedliche Expression von AQP5 zwischen A- und C-Allelträgern unter basalen Bedingungen sein. Außerdem wurden putative Bindungsstellen für CREB (Hoeffler et al. 1988), Hif1- $\alpha$  (Adams et al. 2009), NF $\kappa$ B (Shames et al. 1999) und AP2 (Eckert et al. 2005) gefunden. AP2 ist ein Transkriptionsfaktor, der sowohl mit der basalen Transkriptionsmaschinerie wie z. B. SP1 interagiert aber auch mit c-Myb kommuniziert (Eckert et al. 2005). AP2 ist vor allem bei der Zellproliferation wichtig und könnte diese beispielsweise auch in der Inflammation beeinflussen (Eckert et al. 2005). Der Transkriptionsfaktor CREB konnte bereits als Modulator für die AQP5-Expression identifiziert werden (Wang, Zheng 2011b). Durch die Stimulation des  $\beta_2$ -AR wird die Konzentration am second messenger cAMP intrazellulär erhöht, was in einer vermehrten Expression von AQP5 endet (Yang et al. 2003, Wang, Zheng 2011b, Wang, Zheng 2011a). Die Transkriptionsfaktoren Hif1- $\alpha$  und NF $\kappa$ B hingegen spielen in der Sepsis eine zentrale Rolle. NF $\kappa$ B beispielsweise induziert die Expression zahlreicher inflammatorischer Cytokine und wird selbst durch LPS induziert (Ye, Liu 2001, Shames et al. 1999). NF $\kappa$ B ist außerdem als Regulator der AQP5-Expression bekannt und führt in unterschiedlichen Geweben zu einer Inhibition der AQP5-Expression (Yao et al. 2010, Wang, Zheng 2011a). Hif1- $\alpha$  hat in der Sepsis unter hypoxischen Bedingungen, die durch eine gestörte Mikrozirkulation auftreten, eine wichtige Rolle und wird dann verstärkt exprimiert (Adams et al. 2009, Westra et al. 2010, Schafer et al. 2013). Darüber hinaus reguliert Hif1- $\alpha$  die AQP5-Expression unter hypoxischen Bedingungen und eine Bindung an den AQP5 Promotor konnte bereits nachgewiesen werden (Zhou et al. 2007, Kawedia et al. 2013). Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass eine Modulation der AQP5-Expression durch die oben beschriebenen Transkriptionsfaktoren im Verlauf einer Sepsis denkbar wäre. In zukünftigen Versuchen könnte die Bindung dieser Transkriptionsfaktoren an den AQP5-Promotor gezielt untersucht werden. Dabei sollte im Besonderen die Bindung an die Positionen untersucht werden, welche unterschiedliche Methylierungen aufwiesen.

Weiterhin demonstrieren die vorliegenden Daten, dass sich die Methylierung nur in einigen Positionen zwischen den Genotypen unterschied. Dabei weist der Promotorbereich (-646/-707) des AQP5 Promotors mit der basal höchsten Aktivität (Adamzik et al. 2008) nur eine geringe Methylierung auf. Die Methylierung in dieser Promotorregion unterschied sich auch nicht zwischen den Genotypen. Jedoch würden insbesondere Methylierungen in diesem Promotorbereich (-646/-707) zu einer verminderten Expression führen. Grund hierfür ist, dass basale Transkriptionsfaktoren wie SP1 binden (Nomura et al. 2007).

Des Weiteren bleibt in dieser Arbeit offen, wie die unterschiedliche Methylierung bei A-Allel und C-Allelträgern zu Stande kommt. Neben Polymorphismen in Genen, die direkt mit der DNA-Methylierung verknüpft sind, wie z.B. DNMT1, DNMT3a oder DNMT3b (Mostowska et al. 2013), konnten auch einige andere Gene, wie z.B. der Tumorsupressor PTCH1, identifiziert werden, in denen ein Polymorphismus das Methylierungsmuster beeinflusst (Wang et al. 2013, Tajuddin et al. 2013). Allerdings waren hier vor allem Auswirkungen von Polymorphismen zu finden, welche sich in unmittelbarer Nähe einer CpG Insel befanden. Die unterschiedliche Methylierung bei A- und C-Allelträgern liegt jedoch nicht in unmittelbarer Promotorregion des Polymorphismus, sondern in weiter entfernten Genabschnitten. Die genauen zugrundeliegenden Mechanismen sind bis dato noch nicht aufgeklärt.

Ein Zusammenspiel aus vielen Faktoren ist bei den regulatorischen Mechanismen einer Sepsis sowie bei der AQP5-Expression wichtig. So spielt neben der Methylierung auch immer die Bindung von Transkriptionsfaktoren eine wichtige Rolle bei der Expression.

Somit stellte einen wichtigen Teil dieser Arbeit dar, die Regulation des AQP5-Promotors um den AQP5 A(-1364)C Polymorphismus mittels Transkriptionsfaktoren zu untersuchen. Dieses ist im folgenden Abschnitt dargestellt.

#### **4.5 Einfluss des Transkriptionsfaktors NMP4 auf die AQP5-Expression**

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit war es gelungen, den AQP5 Promotor in einen pSEAP Vektor zu klonieren und diesen anschließend zu charakterisieren. Dabei zeigte sich eine generelle Stimulierbarkeit des AQP5-Promotors sowie ein stärkere Promotoraktivität unter stimulatorischen Bedingungen bei C-Allelträgern (Adamzik et al. 2008). Des Weiteren zeigten C-Allelträger eine verstärkte Bindung von

Transkriptionsfaktoren im EMSA sowie eine geringere AQP5-Expression. In dieser Arbeit ist es gelungen, einen Transkriptionsfaktor zu identifizieren, der die AQP5-Expression moduliert. Die in dieser Arbeit durchgeführten EMSA Experimente verifizierten die vorherigen EMSA Daten. Auch hier konnte gezeigt werden, dass es zu einer stärkeren Bindung von Transkriptionsfaktoren an den AQP5 Promotor bei C-Allel Trägern kommt (Adamzik et al. 2008, Lambertz et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit konnte der Transkriptionsfaktor NMP4 identifiziert werden. Dies konnte mittels EMSAs, bei denen Supershift-Analysen durchgeführt wurden, bestätigt werden. Dieser Transkriptionsfaktor scheint stärker an das C-Allel zu binden. Weiter wurden Reporterassays in HEK293 Zellen durchgeführt. Diese zeigten, dass NMP4 die Promotoraktivität in allen untersuchten AQP5-Promotorkonstrukten erhöht, denn in allen untersuchten Konstrukten führte NMP4 zu einer stärkeren Promotoraktivität. Aus diesem Grund scheint NMP4 zwar an die AQP5-Promotorregion um nt-1364 zu binden, diese Bindung jedoch nicht die unterschiedliche Expression zwischen A- und C-Allelträgern zu verantworten. Vielmehr konnte in dieser Arbeit eine neue NMP4-Bindungsstelle im AQP5-Promotor identifiziert werden. Diese befindet sich in der hochaktiven Promotorregion um die Positionen –nt592/-602. Zusätzlich führte eine NMP4 Überexpression zu einer verstärkten AQP5 mRNA Expression in HEK293 Zellen. In dieser Arbeit konnte also ein neuer transkriptioneller Regulator der AQP5-Expression gefunden werden. Diese Regulation der AQP5-Expression durch NMP4 ist zusätzlich zellspezifisch. So konnte keine Modulation der AQP5-Promotoraktivität und Expression in HeLa-Zellen durch NMP4 detektiert werden. In HEK293-Zellen kam es jedoch zu einer starken Erhöhung. Eine mögliche Ursache könnte auf das Fehlen notwendiger Kofaktoren, wie beispielsweise CEBPE (ccaat enhancer binding protein) in HeLa-Zellen, zurück zu führen sein. Hierbei handelt es sich um einen potentiellen Kofaktor von NMP4, da aus der Literatur bekannt ist, dass der identifizierte Transkriptionsfaktor NMP4 mit CEBPE (ccaat enhancer binding protein) interagiert (Ravasi et al. 2010).

Über die Rolle von NMP4 in der Sepsis ist bis dato noch nichts bekannt. Allerdings bildet der Transkriptionsfaktor NMP4 einen positiven Feedbackmechanismus mit dem „Receptor activator of NF-kappaB ligand“ (RANKL) aus (Sakuma et al. 2012). Dieser Feedbackmechanismus konnte in der vorliegenden Arbeit in HEK293 Zellen insofern bestätigt werden, als dass eine NMP4 Überexpression zu einer erhöhten RANKL-Expression führte. RANKL seinerseits spielt eine Rolle in der Immunität und

wird durch LPS aktiviert (Walsh, Choi 2014). Somit könnte dieses der Link zwischen NMP4, AQP5 und LPS sein.

Physiologische Bedeutung könnte NMP4 beispielsweise bei der Zellmigration sowie der Proliferation besitzen. Wie bereits in Kapitel 4.2 erläutert wurde, ist AQP5 für die Immunzellmigration essentiell. Über den Transkriptionsfaktor NMP4 könnte AQP5 die Zellmigration sowie die Zellproliferation von Immunzellen modulieren. NMP4 reguliert die Zellmigration und Proliferation und eine verstärkte Expression von NMP4 führt zu einer verstärkten Zellmigration und Proliferation (Sakuma et al. 2012, Shen et al. 2002). Auch dieses könnte Einfluss auf die Immunzellmigration in der Sepsis haben. Daher ist es essentiell, die genaue Rolle von NMP4 in der Sepsis weiter aufzuklären, da sich hieraus mögliche therapeutische Optionen ableiten können.

#### **4.6 AQP5-Expression nach LPS und cAMP Stimulation**

Wie die Daten aus der vorliegenden Doktorarbeit zeigten, spielt die AQP5-Expression während einer Sepsis eine zentrale Rolle. Deshalb ist es essentiell, die genaue Regulation der AQP5-Expression während einer Sepsis aufzuklären, um neue wirksame Therapeutika entwickeln zu können. Ein mögliches Targetprotein könnte der adrenerge Rezeptor, Subtyp 2, sein. Dieser reguliert die AQP5-Expression und hat zudem immunmodulatorische Effekte (Adamzik et al. 2008, Ye, Liu 2001, Woo et al. 2008a, Sidhaye et al. 2005, Yang et al. 2003, Wang, Zheng 2011b, Diaz-Munoz et al. 2012)

Um die Hypothese zu überprüfen, wurden monozytäre THP-1 Zellen mit LPS sowie cAMP stimuliert und sich die AQP5-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten auf Protein- wie auch auf Genebene analysiert. Zusammenfassend zeigten die Daten, dass LPS sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene zu einer zeitabhängigen Inhibition führt, die nach 24 Std. aufgehoben ist und dann zu einer Induktion der AQP5-Expression führt. Diese Beobachtungen decken sich mit Beobachtungen aus der Literatur. Auch hier wird von einer Repression der AQP5-Expression nach LPS Stimulation gesprochen (Jiao et al. 2002, Jin et al. 2013, Wang, Zheng 2011a). Laut Literatur könnten zwei mögliche Mechanismen in Frage kommen, die das beobachtete Phänomen erklären könnten. Im ersten Mechanismus induziert LPS eine intrazelluläre Signalkaskade in deren Verlauf der Transkriptionsfaktor NFκB aktiviert wird und direkt (Guha, Mackman 2001), an den AQP5 Promotor bindet (Yao et al. 2010), was in der Inhibition der AQP5-Expression resultiert. Die zweite

Möglichkeit besteht über den p38/JNK Signalweg. Hier konnten Shen et al. bereits zeigen, dass die AQP5-Expression in SPC-A1 Zellen nach LPS Stimulation inhibiert wurde und diese Inhibition der AQP5-Expression durch die Inhibition von p38 und JNK aufgehoben wird (Shen et al. 2010, Shen et al. 2012). Der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt.

Im Gegensatz dazu führte eine cAMP Stimulation sowohl auf RNA als auch auf Proteinebene zu einem deutlicheren Anstieg der AQP5-Expression. Dieser Anstieg der AQP5-Expression unter cAMP wurde in der Literatur für unterschiedliche Zelltypen bereits beschrieben (Sidhaye et al. 2005, Yang et al. 2003, Dong et al. 2012, Wang, Zheng 2011b). cAMP könnte die AQP5-Expression über die Aktivierung der Proteinkinase A modulieren. Die aktivierte Proteinkinase A phosphoryliert den Transkriptionsfaktor CREB. Dieser wandert in den Zellkern (Hoeffler et al. 1988) und bindet an den AQP5 Promotor und aktiviert dort die AQP5-Expression (Wang, Zheng 2011b).

Eine Limitation der Daten liegt in der nicht vorhandenen statistischen Signifikanz der Reduktion bzw. des Anstiegs der AQP5-RNA-Expression. Dieses könnte auf die geringe Expression von AQP5 in THP-1 Zellen zurückzuführen sein. Aquaporine, so auch AQP5, werden in Lymphozyten exprimiert (Moon et al. 2004). Bis dato sind aber keine Daten vorhanden, die die genaue Verteilung und Expression von AQP5 in den Lymphozyten beschreiben. Während dieser Doktorarbeit wurde neben der THP-1 Zelllinie auch die lymphozytären Zelllinie HL-60 und Jurkat auf die Expression von Aquaporin 5 untersucht. Allerdings war die Aquaporin 5 Expression in allen 3 untersuchten Zelllinien moderat bis gering. Die höchste AQP5-Expression weißt in meinen Untersuchungen die B-Lymphozytenzelllinie REH auf. In dieser Arbeit lag der Schwerpunkt auf dem LPS und TLR-4 vermittelten Signalweg, deshalb wurde die monozytären Zelllinie THP-1 benutzt. In der Zelllinie REH hingegen wird der TLR-4 Rezeptor nicht exprimiert (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000136869-TLR4/cell>). In weiterführenden Experimenten könnte jedoch auch die AQP5-Expression während einer Inflammation in anderen Zelllinien wie U937 oder auch der B-Zelllinie REH betrachtet werden.

Ziel der Untersuchungen war es, zu überprüfen, ob cAMP die durch LPS ausgelöste Effekte auf die AQP5-Expression aufheben kann. cAMP ist ein second messenger, der die AQP5-Expression und Membrantranslokation über die PKA beeinflusst. In

einem weiteren Experiment sollte deshalb untersucht werden, ob cAMP antagonistische Eigenschaft besitzt und so eine LPS induzierte AQP5 Inhibition aufheben kann. Hierfür wurden THP-1 Zellen simultan mit LPS und cAMP stimuliert. Die Daten zeigten, dass cAMP die Effekte einer LPS Stimulation nicht aufheben konnte.

Die genauen Mechanismen, warum cAMP, die durch LPS ausgelöste Inhibierung der AQP5-Expression nicht aufheben kann, sind noch nicht bekannt. Ein möglicher Mechanismus könnte über den  $\beta_2$ -AR laufen. Daten belegen, dass LPS zu einer Herunterregulation des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors führt (Kizaki et al. 2008). Dieses würde wiederum bedeuten, dass der Signalweg des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors nach LPS Stimulation herunterreguliert ist und so cAMP möglicherweise nicht wirken kann (Kizaki et al. 2008). Außerdem zeigte diese Studie, dass die Überexpression des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in der Makrophagen Zelllinie RAW zu einer verringerten Aktivierung von NF $\kappa$ B und auch zu einem geringen Abbau des NF $\kappa$ B-Inhibitors (I $\kappa$ B $\alpha$ ) nach LPS-Stimulation kommt (Kizaki et al. 2008). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass LPS-stimulierte Signale die  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor-Expression supprimieren (Kizaki et al. 2008). Dieses führt wiederum zu einer Herunterregulation von Beta-Arrestin 2, was wiederum das cytosolische I $\kappa$ B $\alpha$  stabilisiert. Hierdurch wird die NF $\kappa$ B-Aktivierung verhindert, sodass NF $\kappa$ B nicht in den Zellkern gelangen kann (Kizaki et al. 2008).

Ein anderer Mechanismus könnte die Inhibition der Bindung von CREB an den AQP5-Promotor durch NF $\kappa$ B oder den downstream Effektor IL-1 $\beta$  sein (Wang, Zheng 2011b). IL-1 $\beta$  inhibiert in diesem Fall die Phosphorylierung und somit die Kerntranslokation von CREB (Wang, Zheng 2011a) und NF $\kappa$ B führt zu einer Konkurrenz der Bindung von CREB binding protein (CBP) an CREB (Wang, Zheng 2011a).

Interessanterweise belegen die Daten, dass die Expression von AQP5 nach simultaner Stimulation nach 24 Std. ansteigt. Auf Proteinebene konnte dieser Effekt schon nach 6 Std. beobachtet werden. Diese Daten decken sich mit Beobachtungen von Wu et al. (2009). Die Forscher um Wu zeigten, dass der  $\beta_2$ -AR Agonist Dobutamin zu einer Erhöhung der AQP1- und AQP5-Expression nach einem LPS induzierten Lungenschaden führt (Wu et al. 2009).



Die Daten der *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass eine LPS und cAMP Stimulation zu einer (zeitabhängigen) Regulation der AQP5-Expression führt, wobei cAMP die Effekte von LPS verstärkt. Es sind weitere Experimente notwendig, die aufklären, wie AQP5 Regulation im Zuge einer Sepsis verläuft.

#### 4.7 Ausblick

Die Daten der vorliegenden Doktorarbeit demonstrieren, dass AQP5 ein Schlüsselprotein in der LPS induzierten Sepsis darstellt. Somit scheinen Aquaporine attraktive Kandidatengene zu sein, um eine Sepsis zu behandeln. Die Entwicklung neuer Medikamente, die die Permeabilität von Aquaporinen modulieren, ist jedoch schwierig. Aquaporine sind sehr kleine Poren, die als passive Pore fungieren. Außerdem fehlen die passenden Assays, um die Aktivität von AQP zu messen (Verkman et al. 2014). Ein Ansatz zur Findung neuer Zielstrukturen sollte auf computerbasierten Methoden des Molecular Modelling liegen.

Bisher konnten vier Klassen von auf AQP abgezielten Molekülen identifiziert werden: a) die schwermetallbasierte Inhibitoren, die an das in der Pore befindliche Cystein binden, b) kleinmolekulare Inhibitoren, c) gezielte AQP4 Therapeutika und d) molekulare Chaperone (Verkman et al. 2014). Einen der kleinmolekularen Inhibitoren stellt beispielsweise Azetazolamid dar. Dabei handelt es sich um einen Carbonanhydrase-Inhibitor, wessen inhibitorische Wirkung auf AQP1, AQP4 und auch AQP5 bereits nachgewiesen wurde (Jeyaseelan et al. 2006, Huang et al. 2013, Seeliger et al. 2013). AQP5 besitzt außerdem eine hohe Sequenzhomologie zu AQP2, sodass AQP2-Inhibitoren möglicherweise auch als AQP5 Inhibitoren fungieren können (Jeyaseelan et al. 2006). Ein möglicher AQP5-Inhibitor ist somit 4-Acetyldilphyllin, der die AQP2 Funktion durch Inhibition der Membrantranslokation hemmt (Bogum et al. 2013). Allerdings sollte auch beachtet werden, dass Aquaporine für die Funktion zahlreicher physiologischer Prozesse wie z.B. im Gehirn, in der Lunge oder auch in der Niere essenziell ist. Somit würde eine globale Inhibition der Aquaporine zahlreiche Nebenwirkungen hervorrufen. Die mögliche Inhibition von AQP5 durch Azetazolamid und 4-Acetyldephinin sollte in Zukunft vor allem in Immunzellen betrachtet werden. Dabei würden sich neutrophile Granulozyten, monozytäre Zellen, aber auch B- und T-Lymphozyten sowohl etablierter Zelllinien (HL-60, THP-1, REH und Jurkat), als auch frisch isolierter primärer Zellen anbieten. Sollten sich hier Effekte zeigen, könnten die gefundenen Moleküle im Tiermodell

überprüft werden. Außerdem sollten die zugrundeliegenden Signalkaskaden, die der AQP5 abhängigen Zellmigration zu Grunde liegen näher beleuchten. Die vorliegende Arbeit könnte Hinweise auf neue spezifische Sepsistherapeutika geben, eine weiterführende tiefergehende Forschung bleibt aber weiterhin notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Die Sepsis stellt eine der häufigsten Komplikationen auf Intensivstationen dar und die Letalität ist mit 30 bis 50 % noch immer sehr hoch. Intraindividuelle Unterschiede in Krankheitsverlauf und Letalität können durch klassische Risikofaktoren nicht allein erklärt werden, vielmehr scheinen auch genetische Faktoren eine Rolle zu spielen. Da das C-Allel des funktionellen Aquaporin 5 (AQP5) A(-1364)C – Promotorpolymorphismus sowohl mit einer verringerten AQP5-Expression als auch mit einem verbesserten Überleben bei schwerer Sepsis einhergeht, scheint AQP5 ein Schlüsselprotein in der Sepsis darzustellen. Unklar war allerdings über welchen Mechanismus Genotyp, Aquaporinexpression und Letalität der schweren Sepsis miteinander verknüpft sind. Ziel dieser Arbeit war es daher aufzuklären, 1) über welchen Mechanismus der Polymorphismus die AQP5-Expression verändert und 2) wie die AQP5-Expression Mechanismen der Sepsis beeinflusst. Zur Beantwortung der ersten Frage wurde zum einen untersucht, ob der Polymorphismus zu einer unterschiedlichen Transkriptionsfaktorenbindung führt und ob der Polymorphismus das Methylierungsmuster der DNA im Vollblut septischer Patienten beeinflusst. Eine *in silico*- Analyse ergab, dass die Transkriptionsfaktoren NMP4, c-Myb und NFAT putative Bindungsstellen um Position -1364 tragen. Mittels Electrophoretic mobility Shift Assays (EMSA) konnte eine spezifische Bindung von NMP4 verifiziert werden. Diese scheint beim C-Allel stärker ausgeprägt zu sein. Reporterassays zeigten jedoch, dass NMP4 die Promotoraktivität des AQP5-Promotors unabhängig vom Genotyp erhöht. Auch die AQP5 mRNA-Expression wurde in HEK293 Zellen signifikant durch NMP4 erhöht, wie Real-Time-PCR-Experimente zeigten. Außerdem konnte eine neue Bindungsstelle für NMP4 in der AQP5-Promotoregion von –nt592/-602 identifiziert werden, die für die starke Erhöhung der AQP5-Promotoraktivität durch NMP4 mitverantwortlich zu sein scheint. Da NMP4 also zwar einen transkriptionellen Regulator der AQP5-Expression darstellt, nicht aber die unterschiedliche AQP5-Expression bei A- und C-Allelträgern bedingt, wurde weiter untersucht, ob der Polymorphismus Einfluss auf das Methylierungsmuster hat. Hierbei konnte im Vollblut von septischen Patienten 4 Positionen (nt-1036, nt-1014, nt-856 und nt-839) detektiert werden, in denen C-Allelträger eine signifikant erhöhte Methylierung aufwiesen. Ob dieser Unterschied tatsächlich für die unterschiedliche AQP5-Expression verantwortlich ist, konnte abschließend nicht geklärt werden. Dafür spricht aber, dass eine verringerte AQP5-Promotormethylierung mit einer erhöhten

AQP5-Expression in Immunzellen einhergeht. Ferner wird die Methylierung von Immunzellen durch LPS vermindert. Dieses führte zu einer verstärkten AQP5-Expression in THP-1 Zellen. Dieses untermauert die Stimulation der Zellen mit LPS, welche demonstrierte, dass die AQP5-Expression in THP-1 Zellen durch LPS verändert wird.

Ein weiterer wichtiger Punkt dieser Arbeit war die Frage, ob AQP5 ein Schlüsselprotein in der LPS induzierten Inflammation darstellt. Hierzu wurden AQP5-KO Mäusen sowie deren WT Wurfgeschwistern LPS injiziert und deren Überlebenswahrscheinlichkeit untersucht. Es konnte beobachtet werden, dass die KO-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen eine bessere Überlebensrate aufwiesen. Diese *in vivo* Daten wurden auch *in vitro* verifiziert. Ziel war es aufzuklären, wie AQP5 Mechanismen der Sepsis beeinflusst. Zunächst konnte mittels immunologischer Färbung nachgewiesen werden, dass C-Allelträger eine verringerte AQP5-Expression auf neutrophilen Granulozyten aufweisen. Dieses ging mit einer verminderten Migration dieser Zellen einher. In Übereinstimmung damit zeigen AQP5-überexprimierte Jurkat Zellen eine verstärkte Migration im Vergleich zu nativen Zellen. Demgegenüber unterschied sich die Proliferation monozytärer Zellen nicht zwischen den Genotypen. Nachdem wir zeigen konnten, dass die AQP5-Expression mit der Sepsisletalität assoziiert ist, wurde untersucht, ob die LPS induzierte Änderung der AQP5-Expression durch Therapeutika beeinflussbar ist. Hierfür wurden THP-1 Zellen mit LPS und cAMP stimuliert. Die Daten zeigten jedoch, dass cAMP LPS induzierte Effekte nicht aufheben kann. In folgenden Studien bleibt nun zu klären, wie LPS die Signalkaskade der AQP5-Expression und Translokation beeinflusst. Zusammenfassend scheint AQP5 ein Schlüsselprotein in der Sepsis zu sein, indem es die Migration von neutrophilen Granulozyten beeinflusst. Auch die Methylierung am AQP5-Promotor spielt in der Sepsis und möglicherweise auch bei der unterschiedlichen Expression von A- und C-Allelträgern eine Rolle.

## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Adams, J.M., Difazio, L.T., Rolandelli, R.H., Lujan, J.J., Hasko, G., Csoka, B., Selmeczy, Z., Nemeth, Z.H. (2009): HIF-1: a key mediator in hypoxia. *Acta Physiol. Hung.* 96, 19-28.
- 2 Adamzik, M., Broll, J., Steinmann, J., Westendorf, A.M., Rehfeld, I., Kreissig, C., Peters, J. (2013): An increased alveolar CD4 + CD25 + Foxp3 + T-regulatory cell ratio in acute respiratory distress syndrome is associated with increased 30-day mortality. *Intensive Care Med.* 39, 1743-1751.
- 3 Adamzik, M., Frey, U.H., Bitzer, K., Jakob, H., Baba, H.A., Schmieder, R.E., Schneider, M.P., Heusch, G., Peters, J., Siffert, W. (2008): A novel-1364A/C aquaporin 5 gene promoter polymorphism influences the responses to salt loading of the renin-angiotensin-aldosterone system and of blood pressure in young healthy men. *Basic Res. Cardiol.* 103, 598-610.
- 4 Adamzik, M., Frey, U.H., Mohlenkamp, S., Scherag, A., Waydhas, C., Marggraf, G., Dammann, M., Steinmann, J., Siffert, W., Peters, J. (2011): Aquaporin 5 gene promoter--1364A/C polymorphism associated with 30-day survival in severe sepsis. *Anesthesiology.* 114, 912-917.
- 5 Adamzik, M., Schafer, S., Frey, U.H., Becker, A., Kreuzer, M., Winning, S., Frede, S., Steinmann, J., Fandrey, J., Zacharowski, K., Siffert, W., Peters, J., Hartmann, M. (2013): The NFkB1 promoter polymorphism (-94ins/delATTG) alters nuclear translocation of NF-kappaB1 in monocytes after lipopolysaccharide stimulation and is associated with increased mortality in sepsis. *Anesthesiology.* 118, 123-133.
- 6 Agre, P. (2005): Membrane water transport and aquaporins: looking back. *Biol. Cell.* 97, 355-356.
- 7 Agre, P. (1998): Aquaporin null phenotypes: the importance of classical physiology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9061-9063.
- 8 Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O. (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 124, 783-801.
- 9 Barnes, P.J. (1999): Effect of beta-agonists on inflammatory cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 104, S10-7.
- 10 Barros, S.P., Offenbacher, S. (2009): Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J. Dent. Res.* 88, 400-408.
- 11 Bates, D.W., Sands, K., Miller, E., Lanke, P.N., Hibberd, P.L., Graman, P.S., Schwartz, J.S., Kahn, K., Snyderman, D.R., Parsonnet, J., Moore, R., Black, E., Johnson, B.L., Jha, A., Platt, R. (1997): Predicting bacteremia in patients with sepsis syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *J. Infect. Dis.* 176, 1538-1551.

- 12 Bayarsaihan, D. (2011): Epigenetic mechanisms in inflammation. *J. Dent. Res.* 90, 9-17.
- 13 Belopolskaya, O.B., Smelaya, T.V., Moroz, V.V., Golubev, A.M., Salnikova, L.E. (2015): Clinical associations of host genetic variations in the genes of cytokines in critically ill patients. *Clin. Exp. Immunol.*
- 14 Bender, R., Lange, S. (2001): Adjusting for multiple testing--when and how? *J. Clin. Epidemiol.* 54, 343-349.
- 15 Bensimon, J., Rimbers, J.N. (1977): X-ray sensitivity of human cultivated lymphoblastic cells in media enriched in nickel sulfate. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances. Acad. Sci. D.* 284, 867-869.
- 16 Beutler, B. (2002): TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 270, 109-120.
- 17 Bierne, H., Hamon, M., Cossart, P. (2012): Epigenetics and bacterial infections. *Cold Spring Harb Perspect. Med.* 2, a010272.
- 18 Bissonnette, E.Y., Befus, A.D. (1997): Anti-inflammatory effect of beta 2-agonists: inhibition of TNF-alpha release from human mast cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 100, 825-831.
- 19 Bogum, J., Faust, D., Zuhlke, K., Eichhorst, J., Moutty, M.C., Furkert, J., Eldahshan, A., Neuenschwander, M., von Kries, J.P., Wiesner, B., Trimpert, C., Deen, P.M., Valenti, G., Rosenthal, W., Klussmann, E. (2013): Small-molecule screening identifies modulators of aquaporin-2 trafficking. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24, 744-758.
- 20 Bondy, C., Chin, E., Smith, B.L., Preston, G.M., Agre, P. (1993): Developmental gene expression and tissue distribution of the CHIP28 water-channel protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 4500-4504.
- 21 Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., Sibbald, W.J. (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.
- 22 Bone, R.C., Balk, R.A., Cerra, F.B., Dellinger, R.P., Fein, A.M., Knaus, W.A., Schein, R.M., Sibbald, W.J., ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. (2009): 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. 1992. *Chest.* 136, e28.
- 23 Bone, R.C., Grodzin, C.J., Balk, R.A. (1997): Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest.* 112, 235-243.

- 24 Borok, Z., Li, X., Fernandes, V.F., Zhou, B., Ann, D.K., Crandall, E.D. (2000): Differential regulation of rat aquaporin-5 promoter/enhancer activities in lung and salivary epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 275, 26507-26514.
- 25 Cavaillon, J.M., Adrie, C., Fitting, C., Adib-Conquy, M. (2005): Reprogramming of circulatory cells in sepsis and SIRS. *J. Endotoxin Res.* 11, 311-320.
- 26 Chihara, N., Aranami, T., Oki, S., Matsuoka, T., Nakamura, M., Kishida, H., Yokoyama, K., Kuroiwa, Y., Hattori, N., Okamoto, T., Murata, M., Toda, T., Miyake, S., Yamamura, T. (2013): Plasmablasts as migratory IgG-producing cells in the pathogenesis of neuromyelitis optica. *PLoS One.* 8, e83036.
- 27 Cho, S.Y., Choi, J.H. (2014): Biomarkers of sepsis. *Infect. Chemother.* 46, 1-12.
- 28 Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., Gallo, R.C. (1979): Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J. Exp. Med.* 149, 969-974.
- 29 Crowley, J., Breslow, N. (1984): Statistical analysis of survival data. *Annu. Rev. Public Health.* 5, 385-411.
- 30 Culp, D.J., Quivey, R.Q., Bowen, W.H., Fallon, M.A., Pearson, S.K., Faustoferri, R. (2005): A mouse caries model and evaluation of aqp5<sup>-/-</sup> knockout mice. *Caries Res.* 39, 448-454.
- 31 Day, R.E., Kitchen, P., Owen, D.S., Bland, C., Marshall, L., Conner, A.C., Bill, R.M., Conner, M.T. (2013): Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim. Biophys. Acta.*
- 32 Delano, M.J., Thayer, T., Gabrilovich, S., Kelly-Scumpia, K.M., Winfield, R.D., Scumpia, P.O., Cuenca, A.G., Warner, E., Wallet, S.M., Wallet, M.A., O'Malley, K.A., Ramphal, R., Clare-Salzer, M., Efron, P.A., Mathews, C.E., Moldawer, L.L. (2011): Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *J. Immunol.* 186, 195-202.
- 33 Dellinger, R.P., Levy, M.M., Rhodes, A., Annane, D., Gerlach, H., Opal, S.M., Sevransky, J.E., Sprung, C.L., Douglas, I.S., Jaeschke, R., Osborn, T.M., Nunnally, M.E., Townsend, S.R., Reinhart, K., Kleinpell, R.M., Angus, D.C., Deutschman, C.S., Machado, F.R., Rubenfeld, G.D., Webb, S.A., Beale, R.J., Vincent, J.L., Moreno, R., Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. (2013): Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit. Care Med.* 41, 580-637.
- 34 Diaz-Munoz, M.D., Osma-Garcia, I.C., Fresno, M., Iniguez, M.A. (2012): Involvement of PGE2 and the cAMP signalling pathway in the up-regulation of COX-2 and mPGES-1 expression in LPS-activated macrophages. *Biochem. J.* 443, 451-461.
- 35 Dinarello, C.A. (2005a): Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J. Exp. Med.* 201, 1355-1359.

- 36 Dinarello, C.A. (2005b): Interleukin-1beta. *Crit. Care Med.* 33, S460-2.
- 37 Doi, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S., Star, R.A. (2009): Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. *J. Clin. Invest.* 119, 2868-2878.
- 38 Dong, C., Wang, G., Li, B., Xiao, K., Ma, Z., Huang, H., Wang, X., Bai, C. (2012): Anti-asthmatic agents alleviate pulmonary edema by upregulating AQP1 and AQP5 expression in the lungs of mice with OVA-induced asthma. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 181, 21-28.
- 39 Dong, Y., Zhao, H., Li, H., Li, X., Yang, S. (2014): DNA methylation as an early diagnostic marker of cancer (Review). *Biomed. Rep.* 2, 326-330.
- 40 Dyson, A., Singer, M. (2009): Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit. Care Med.* 37, S30-7.
- 41 Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jager, R., Schorle, H. (2005): The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol.* 6, 246.
- 42 Elenkov, I.J., Wilder, R.L., Chrousos, G.P., Vizi, E.S. (2000): The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol. Rev.* 52, 595-638.
- 43 Faivre, V., Lukaszewicz, A.C., Alves, A., Charron, D., Payen, D., Haziot, A. (2012): Human monocytes differentiate into dendritic cells subsets that induce anergic and regulatory T cells in sepsis. *PLoS One.* 7, e47209.
- 44 Fan, Z., Tardif, G., Boileau, C., Bidwell, J.P., Geng, C., Hum, D., Watson, A., Pelletier, J.P., Lavigne, M., Martel-Pelletier, J. (2006): Identification in human osteoarthritic chondrocytes of proteins binding to the novel regulatory site AGRE in the human matrix metalloprotease 13 proximal promoter. *Arthritis Rheum.* 54, 2471-2480.
- 45 Fang, F., Pan, J., Li, Y., Xu, L., Su, G., Li, G., Wang, J. (2015): Association between interleukin 1 receptor antagonist gene 86-bp VNTR polymorphism and sepsis: A meta-analysis. *Hum. Immunol.* 76, 1-5.
- 46 Feinberg, A.P. (2007): Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature.* 447, 433-440.
- 47 Fink, M.P. (2014): Animal models of sepsis. *Virulence.* 5, 143-153.
- 48 Fjell, C.D., Thair, S., Hsu, J.L., Walley, K.R., Russell, J.A., Boyd, J. (2013): Cytokines and signaling molecules predict clinical outcomes in sepsis. *PLoS One.* 8, e79207.
- 49 Frey, U.H., Bachmann, H.S., Peters, J., Siffert, W. (2008): PCR-amplification of GC-rich regions: 'slowdown PCR'. *Nat. Protoc.* 3, 1312-1317.



- 50 Galli, S.J., Borregaard, N., Wynn, T.A. (2011): Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat. Immunol.* 12, 1035-1044.
- 51 Gillis, S., Watson, J. (1980): Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules. V. Identification of an interleukin 2-producing human leukemia T cell line. *J. Exp. Med.* 152, 1709-1719.
- 52 Gomes, D., Agasse, A., Thiebaud, P., Delrot, S., Geros, H., Chaumont, F. (2009): Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1788, 1213-1228.
- 53 Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-74.
- 54 Guenin, S., Mouallif, M., Deplus, R., Lampe, X., Krusy, N., Calonne, E., Delbecque, K., Kridelka, F., Fuks, F., Ennaji, M.M., Delvenne, P. (2012): Aberrant promoter methylation and expression of UTF1 during cervical carcinogenesis. *PLoS One.* 7, e42704.
- 55 Guha, M., Mackman, N. (2001): LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell. Signal.* 13, 85-94.
- 56 Guimaraes, S., Moura, D. (2001): Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol. Rev.* 53, 319-356.
- 57 Hara-Chikuma, M., Chikuma, S., Sugiyama, Y., Kabashima, K., Verkman, A.S., Inoue, S., Miyachi, Y. (2012): Chemokine-dependent T cell migration requires aquaporin-3-mediated hydrogen peroxide uptake. *J. Exp. Med.* 209, 1743-1752.
- 58 Heckman, K.L., Pease, L.R. (2007): Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat. Protoc.* 2, 924-932.
- 59 Hietbrink, F., Koenderman, L., Rijkers, G., Leenen, L. (2006): Trauma: the role of the innate immune system. *World J. Emerg. Surg.* 1, 15.
- 60 Hoeffler, J.P., Meyer, T.E., Yun, Y., Jameson, J.L., Habener, J.F. (1988): Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science.* 242, 1430-1433.
- 61 Hotchkiss, R.S., Monneret, G., Payen, D. (2013a): Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect. Dis.* 13, 260-268.
- 62 Hotchkiss, R.S., Monneret, G., Payen, D. (2013b): Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 862-874.

- 63 Huang, Y.H., Zhou, X.Y., Wang, H.M., Xu, H., Chen, J., Lv, N.H. (2013): Aquaporin 5 promotes the proliferation and migration of human gastric carcinoma cells. *Tumour Biol.* 34, 1743-1751.
- 64 Ishibashi, K., Tanaka, Y., Morishita, Y. (2013): The role of mammalian aquaporins inside the cell. *Biochim. Biophys. Acta.*
- 65 Jeyaseelan, K., Sepramaniam, S., Armugam, A., Wintour, E.M. (2006): Aquaporins: a promising target for drug development. *Expert Opin. Ther. Targets.* 10, 889-909.
- 66 Jiang, X.X., Xu, K.H., Ma, J.Y., Tian, Y.H., Guo, X.Y., Lin, J., Wu, R.J. (2012): Reduced migration of Ishikawa cells associated with downregulation of aquaporin-5. *Oncol. Lett.* 4, 257-261.
- 67 Jiao, G., Li, E., Yu, R. (2002): Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in rats. *Chin Med. J. (Engl. )*. 115, 963-967.
- 68 Jin, Y., Yu, G., Peng, P., Zhang, Y., Xin, X. (2013): Down-regulated expression of AQP5 on lung in rat DIC model induced by LPS and its effect on the development of pulmonary edema. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 26, 661-665.
- 69 Johnson, M. (2002): Effects of beta2-agonists on resident and infiltrating inflammatory cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 110, S282-90.
- 70 Jung, H.J., Park, J.Y., Jeon, H.S., Kwon, T.H. (2011): Aquaporin-5: a marker protein for proliferation and migration of human breast cancer cells. *PLoS One.* 6, e28492.
- 71 Kawedia, J.D., Yang, F., Sartor, M.A., Gozal, D., Czyzyk-Krzeska, M., Menon, A.G. (2013): Hypoxia and hypoxia mimetics decrease aquaporin 5 (AQP5) expression through both hypoxia inducible factor-1alpha and proteasome-mediated pathways. *PLoS One.* 8, e57541.
- 72 Kim, Y., So, H.S., Youn, M.J., Kim, H.J., Woo, W.H., Shin, S.H., Lee, I., Moon, B.S., Cho, K.H., Park, R. (2007): Anti-inflammatory effect of Sasim extracts in PHA-stimulated THP-1 and peripheral blood mononuclear cells from cerebral infarction patients. *J. Ethnopharmacol.* 112, 32-39.
- 73 King, L.S., Kozono, D., Agre, P. (2004): From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 687-698.
- 74 Kirkeboen, K.A., Strand, O.A. (1999): The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 43, 275-288.
- 75 Kizaki, T., Izawa, T., Sakurai, T., Haga, S., Taniguchi, N., Tajiri, H., Watanabe, K., Day, N.K., Toba, K., Ohno, H. (2008): Beta2-adrenergic receptor regulates Toll-like receptor-4-induced nuclear factor-kappaB activation through beta-arrestin 2. *Immunology.* 124, 348-356.

- 76 Kobilka, B. (1992): Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 15, 87-114.
- 77 Kothari, N., Bogra, J., Abbas, H., Kohli, M., Malik, A., Kothari, D., Srivastava, S., Singh, P.K. (2013): Tumor necrosis factor gene polymorphism results in high TNF level in sepsis and septic shock. *Cytokine.* 61, 676-681.
- 78 Kovach, M.A., Standiford, T.J. (2012): The function of neutrophils in sepsis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 25, 321-327.
- 79 Kovalchuk, I., Walz, P., Thomas, J., Kovalchuk, O. (2013): The increased expression of proteins involved in proliferation, DNA repair and DNA methylation in spleen of mice exposed to *E. coli* O157:H7 lipopolysaccharide. *Environ. Mol. Mutagen.* 54, 421-428.
- 80 Krane, C.M., Fortner, C.N., Hand, A.R., McGraw, D.W., Lorenz, J.N., Wert, S.E., Towne, J.E., Paul, R.J., Whitsett, J.A., Menon, A.G. (2001a): Aquaporin 5-deficient mouse lungs are hyperresponsive to cholinergic stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 14114-14119.
- 81 Krane, C.M., Melvin, J.E., Nguyen, H.V., Richardson, L., Towne, J.E., Doetschman, T., Menon, A.G. (2001b): Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 23413-23420.
- 82 Krauss, G. (2008): *Biochemistry of signal transduction and regulation*. 4, enl and improv. Weinheim: Wiley-VCH;
- 83 Kruse, E., Uehlein, N., Kaldenhoff, R. (2006): The aquaporins. *Genome Biol.* 7, 206.
- 84 Kumpf, O., Schumann, R.R. (2010): Genetic variation in innate immunity pathways and their potential contribution to the SIRS/CARS debate: evidence from human studies and animal models. *J. Innate Immun.* 2, 381-394.
- 85 Kuroki, K., Takahashi, H.K., Iwagaki, H., Murakami, T., Kuinose, M., Hamanaka, S., Minami, K., Nishibori, M., Tanaka, N., Tanemoto, K. (2004): beta2-adrenergic receptor stimulation-induced immunosuppressive effects possibly through down-regulation of co-stimulatory molecules, ICAM-1, CD40 and CD14 on monocytes. *J. Int. Med. Res.* 32, 465-483.
- 86 Lambertz, N., Hindy, N.E., Adler, C., Rump, K., Adamzik, M., Keyvani, K., Bankfalvi, A., Siffert, W., Erol Sandalcioglu, I., Bachmann, H.S. (2013): Expression of aquaporin 5 and the AQP5 polymorphism A(-1364)C in association with peritumoral brain edema in meningioma patients. *J. Neurooncol.* 112, 297-305.
- 87 Langstein, J., Becke, F.M., Sollner, L., Krause, G., Brockhoff, G., Kreutz, M., Andreesen, R., Schwarz, H. (2000): Comparative analysis of CD137 and LPS effects on monocyte activation, survival, and proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 273, 117-122.

- 88 Leclerc, D., Cao, Y., Deng, L., Mikael, L.G., Wu, Q., Rozen, R. (2013): Differential gene expression and methylation in the retinoid/PPARA pathway and of tumor suppressors may modify intestinal tumorigenesis induced by low folate in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 57, 686-697.
- 89 Lee, S.J., Chae, Y.S., Kim, J.G., Kim, W.W., Jung, J.H., Park, H.Y., Jeong, J.Y., Park, J.Y., Jung, H.J., Kwon, T.H. (2013): AQP5 Expression Predicts Survival in Patients with Early Breast Cancer. *Ann. Surg. Oncol.*
- 90 Levy, M.M., Fink, M.P., Marshall, J.C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S.M., Vincent, J.L., Ramsay, G., International Sepsis Definitions Conference. (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 29, 530-538.
- 91 Lieber, D. (2013): Generation of a stable cell line for constitutive miRNA expression. *Methods Mol. Biol.* 1064, 183-200.
- 92 Liu, L., Xie, C. (2011): Effects of downregulation of aquaporin1 by peptidoglycan and lipopolysaccharide via MAPK pathways in MeT-5A cells. *Lung.* 189, 331-340.
- 93 Loitto, V.M., Forslund, T., Sundqvist, T., Magnusson, K.E., Gustafsson, M. (2002): Neutrophil leukocyte motility requires directed water influx. *J. Leukoc. Biol.* 71, 212-222.
- 94 Loitto, V.M., Karlsson, T., Magnusson, K.E. (2009): Water flux in cell motility: expanding the mechanisms of membrane protrusion. *Cell Motil. Cytoskeleton.* 66, 237-247.
- 95 Lv, S., Han, M., Yi, R., Kwon, S., Dai, C., Wang, R. (2014): Anti-TNF-alpha therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. *Int. J. Clin. Pract.* 68, 520-528.
- 96 Ma, T., Fukuda, N., Song, Y., Matthay, M.A., Verkman, A.S. (2000): Lung fluid transport in aquaporin-5 knockout mice. *J. Clin. Invest.* 105, 93-100.
- 97 Martin, G.S., Mannino, D.M., Eaton, S., Moss, M. (2003): The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 348, 1546-1554.
- 98 Mayr, F.B., Yende, S., Angus, D.C. (2014): Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 5, 4-11.
- 99 Mera, S., Tatulescu, D., Cismaru, C., Bondor, C., Slavcovici, A., Zanc, V., Carstina, D., Oltean, M. (2011): Multiplex cytokine profiling in patients with sepsis. *APMIS.* 119, 155-163.
- 100 Mizuno, K., Takahashi, H.K., Iwagaki, H., Katsuno, G., Kamurul, H.A., Ohtani, S., Mori, S., Yoshino, T., Nishibori, M., Tanaka, N. (2005): Beta2-adrenergic receptor stimulation inhibits LPS-induced IL-18 and IL-12 production in monocytes. *Immunol. Lett.* 101, 168-172.

- 101 Mokart, D., Leone, M., Sannini, A., Brun, J.P., Turrini, O., Lelong, B., Houvenaeghel, G., Blache, J.L., Mege, J.L., Martin, C. (2010): Reduced interleukin-12 release from stimulated monocytes in patients with sepsis after major cancer surgery. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 54, 643-648.
- 102 Moon, C., Rousseau, R., Soria, J.C., Hoque, M.O., Lee, J., Jang, S.J., Trink, B., Sidransky, D., Mao, L. (2004): Aquaporin expression in human lymphocytes and dendritic cells. *Am. J. Hematol.* 75, 128-133.
- 103 Moon, C., Soria, J.C., Jang, S.J., Lee, J., Obaidul Hoque, M., Sibony, M., Trink, B., Chang, Y.S., Sidransky, D., Mao, L. (2003): Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis. *Oncogene.* 22, 6699-6703.
- 104 Mostowska, A., Sajdak, S., Pawlik, P., Lianeri, M., Jagodzinski, P.P. (2013): DNMT1, DNMT3A and DNMT3B gene variants in relation to ovarian cancer risk in the Polish population. *Mol. Biol. Rep.* 40, 4893-4899.
- 105 Motegi, K., Azuma, M., Tamatani, T., Ashida, Y., Sato, M. (2005): Expression of aquaporin-5 in and fluid secretion from immortalized human salivary gland ductal cells by treatment with 5-aza-2'-deoxycytidine: a possibility for improvement of xerostomia in patients with Sjogren's syndrome. *Lab. Invest.* 85, 342-353.
- 106 Murphy, K.P.1., Janeway, C.1. (2008): *Janeway's immunobiology.* 7 . New York [u.a.]: Garland;
- 107 Muta, T., Takeshige, K. (2001): Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur. J. Biochem.* 268, 4580-4589.
- 108 Nedvetsky, P.I., Tamma, G., Beulshausen, S., Valenti, G., Rosenthal, W., Klussmann, E. (2009): Regulation of aquaporin-2 trafficking. *Handb. Exp. Pharmacol.* (190):133-57. doi, 133-157.
- 109 Nemzek, J.A., Hugunin, K.M., Opp, M.R. (2008): Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comp. Med.* 58, 120-128.
- 110 Nielsen, S., King, L.S., Christensen, B.M., Agre, P. (1997): Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. *Am. J. Physiol.* 273, C1549-61.
- 111 Nokta, M.A., Pollard, R.B. (1989): Differential reconstitution of zidovudine-induced inhibition of mitogenic responses by interleukin-2 in peripheral blood mononuclear cells from patients with human immunodeficiency virus infection. *Antiviral Res.* 11, 191-202.
- 112 Nomura, J., Hisatsune, A., Miyata, T., Isohama, Y. (2007): The role of CpG methylation in cell type-specific expression of the aquaporin-5 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 1017-1022.

- 113 Novotny, A., Emmanuel, K., Bartels, H., Siewert, J.R., Holzmann, B. (2005): Indicators for early prediction of outcome in sepsis. *Chirurg.* 76, 837-844.
- 114 Novotny, A.R., Emmanuel, K., Ulm, K., Bartels, H., Siewert, J.R., Weighardt, H., Holzmann, B. (2006): Blood interleukin 12 as preoperative predictor of fatal postoperative sepsis after neoadjuvant radiochemotherapy. *Br. J. Surg.* 93, 1283-1289.
- 115 Oeth, P., Parry, G.C., Mackman, N. (1997): Regulation of the tissue factor gene in human monocytic cells. Role of AP-1, NF-kappa B/Rel, and Sp1 proteins in uninduced and lipopolysaccharide-induced expression. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 365-374.
- 116 Ohinata, A., Nagai, K., Nomura, J., Hashimoto, K., Hisatsune, A., Miyata, T., Isohama, Y. (2005): Lipopolysaccharide changes the subcellular distribution of aquaporin 5 and increases plasma membrane water permeability in mouse lung epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326, 521-526.
- 117 Osuchowski, M.F., Welch, K., Siddiqui, J., Remick, D.G. (2006): Circulating cytokine/inhibitor profiles reshape the understanding of the SIRS/CARS continuum in sepsis and predict mortality. *J. Immunol.* 177, 1967-1974.
- 118 Papadopoulos, M.C., Saadoun, S., Verkman, A.S. (2008): Aquaporins and cell migration. *Pflugers Arch.* 456, 693-700.
- 119 Poli-de-Figueiredo, L.F., Garrido, A.G., Nakagawa, N., Sannomiya, P. (2008): Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock.* 30 Suppl 1, 53-59.
- 120 Ramirez, M. (2013): Multiple organ dysfunction syndrome. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health. Care.* 43, 273-277.
- 121 Ravasi, T., Suzuki, H., Cannistraci, C.V., Katayama, S., Bajic, V.B., Tan, K., Akalin, A., Schmeier, S., Kanamori-Katayama, M., Bertin, N., Carninci, P., Daub, C.O., Forrest, A.R., Gough, J., Grimmond, S., Han, J.H., Hashimoto, T., Hide, W., Hofmann, O., Kamburov, A., Kaur, M., Kawaji, H., Kubosaki, A., Lassmann, T., van Nimwegen, E., MacPherson, C.R., Ogawa, C., Radovanovic, A., Schwartz, A., Teasdale, R.D., Tegner, J., Lenhard, B., Teichmann, S.A., Arakawa, T., Ninomiya, N., Murakami, K., Tagami, M., Fukuda, S., Imamura, K., Kai, C., Ishihara, R., Kitazume, Y., Kawai, J., Hume, D.A., Ideker, T., Hayashizaki, Y. (2010): An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell.* 140, 744-752.
- 122 Reiner, S., Ambrosio, M., Hoffmann, C., Lohse, M.J. (2010): Differential signaling of the endogenous agonists at the beta2-adrenergic receptor. *J. Biol. Chem.* 285, 36188-36198.
- 123 Rittirsch, D., Flierl, M.A., Ward, P.A. (2008): Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 776-787.

- 124 Rodriguez, A., Catalan, V., Gomez-Ambrosi, J., Fruhbeck, G. (2006): Role of aquaporin-7 in the pathophysiological control of fat accumulation in mice. *FEBS Lett.* 580, 4771-4776.
- 125 Rump, K., Brendt, P., Frey, U.H., Schafer, S.T., Siffert, W., Peters, J., Adamzik, M. (2013): Aquaporin 1 and 5 Expression Evoked by the ss-2 Adrenoreceptor Agonist Terbutaline and LPS in Mice and in the Human Monocytic Cell Line THP-1 is Differentially Regulated. *Shock*.
- 126 Rusnak, F., Mertz, P. (2000): Calcineurin: form and function. *Physiol. Rev.* 80, 1483-1521.
- 127 Russell, J.A. (2006): Management of sepsis. *N. Engl. J. Med.* 355, 1699-1713.
- 128 Russell, J.A., Boyd, J., Nakada, T., Thair, S., Walley, K.R. (2011): Molecular mechanisms of sepsis. *Contrib. Microbiol.* 17, 48-85.
- 129 Sagy, M., Al-Qaqaa, Y., Kim, P. (2013): Definitions and pathophysiology of sepsis. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health. Care.* 43, 260-263.
- 130 Sakuma, T., Nakamoto, T., Hemmi, H., Kitazawa, S., Kitazawa, R., Notomi, T., Hayata, T., Ezura, Y., Amagasa, T., Noda, M. (2012): CIZ/NMP4 is expressed in B16 melanoma and forms a positive feedback loop with RANKL to promote migration of the melanoma cells. *J. Cell. Physiol.* 227, 2807-2812.
- 131 Schafer, C., Borm, B., Born, S., Mohl, C., Eibl, E.M., Hoffmann, B. (2009): One step ahead: role of filopodia in adhesion formation during cell migration of keratinocytes. *Exp. Cell Res.* 315, 1212-1224.
- 132 Schafer, S.T., Frede, S., Winning, S., Bick, A., Roshangar, P., Fandrey, J., Peters, J., Adamzik, M. (2013): Hypoxia-inducible factor and target gene expression are decreased in patients with sepsis: prospective observational clinical and cellular studies. *Anesthesiology.* 118, 1426-1436.
- 133 SCHERER, W.F., SYVERTON, J.T., GEY, G.O. (1953): Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 97, 695-710.
- 134 Schwab, A., Stock, C. (2014): Ion channels and transporters in tumour cell migration and invasion. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 369, 20130102.
- 135 Seeliger, D., Zapater, C., Krenc, D., Haddoub, R., Flitsch, S., Beitz, E., Cerda, J., de Groot, B.L. (2013): Discovery of novel human aquaporin-1 blockers. *ACS Chem. Biol.* 8, 249-256.
- 136 Semmler, A., Prost, J.C., Smulders, Y., Smith, D., Blom, H., Bigler, L., Linnebank, M. (2013): Methylation metabolism in sepsis and systemic inflammatory response syndrome. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 73, 368-372.

- 137 Shames, B.D., Selzman, C.H., Pulido, E.J., Meng, X., Meldrum, D.R., McIntyre, R.C., Jr, Harken, A.H., Banerjee, A. (1999): LPS-Induced NF-kappaB activation and TNF-alpha release in human monocytes are protein tyrosine kinase dependent and protein kinase C independent. *J. Surg. Res.* 83, 69-74.
- 138 Shen, Y., Chen, Z., Wang, Y., Song, Z., Zhang, Z., Jin, M., Wang, X., Bai, C. (2010): Aquaporin 5 expression inhibited by LPS via p38/JNK signaling pathways in SPC-A1 cells. *Respir. Physiol Neurobiol.* 171, 212-217.
- 139 Shen, Y., Wang, X., Wang, Y., Wang, X., Chen, Z., Jin, M., Bai, C. (2012): Lipopolysaccharide decreases aquaporin 5, but not aquaporin 3 or aquaporin 4, expression in human primary bronchial epithelial cells. *Respirology.* 17, 1144-1149.
- 140 Shen, Y., Wang, Y., Chen, Z., Wang, D., Wang, X., Jin, M., Bai, C. (2011): Role of aquaporin 5 in antigen-induced airway inflammation and mucous hyperproduction in mice. *J. Cell. Mol. Med.* 15, 1355-1363.
- 141 Shen, Z.J., Nakamoto, T., Tsuji, K., Nifuji, A., Miyazono, K., Komori, T., Hirai, H., Noda, M. (2002): Negative regulation of bone morphogenetic protein/Smad signaling by Cas-interacting zinc finger protein in osteoblasts. *J. Biol. Chem.* 277, 29840-29846.
- 142 Shuto, T., Furuta, T., Oba, M., Xu, H., Li, J.D., Cheung, J., Gruenert, D.C., Uehara, A., Suico, M.A., Okiyoneda, T., Kai, H. (2006): Promoter hypomethylation of Toll-like receptor-2 gene is associated with increased proinflammatory response toward bacterial peptidoglycan in cystic fibrosis bronchial epithelial cells. *FASEB J.* 20, 782-784.
- 143 Sidhaye, V., Hoffert, J.D., King, L.S. (2005): cAMP has distinct acute and chronic effects on aquaporin-5 in lung epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 280, 3590-3596.
- 144 Silva, E., Passos, R.H., Ferri, M.B., de Figueiredo, L.F. (2008): Sepsis: from bench to bedside. *Clinics (Sao Paulo).* 63, 109-120.
- 145 Simon, J.A., Kingston, R.E. (2009): Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 697-708.
- 146 Sitkauskienė, B., Sakalauskas, R. (2005): The role of beta(2)-adrenergic receptors in inflammation and allergy. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy.* 4, 157-162.
- 147 Skowron-zwarg, M., Boland, S., Caruso, N., Coraux, C., Marano, F., Tournier, F. (2007): Interleukin-13 interferes with CFTR and AQP5 expression and localization during human airway epithelial cell differentiation. *Exp. Cell Res.* 313, 2695-2702.
- 148 Song, H., Tang, L., Xu, M., Li, H., Xu, S., Li, G., Bao, X., Sun, B., Cheng, T., Yang, Q., Bai, J. (2014): CD86 Polymorphism Affects Pneumonia-Induced Sepsis by Decreasing Gene Expression in Monocytes. *Inflammation.*



- 149 Song, Y., Verkman, A.S. (2001): Aquaporin-5 dependent fluid secretion in airway submucosal glands. *J. Biol. Chem.* 276, 41288-41292.
- 150 Sun, R.L., Wang, H.Y., Yang, X.Y., Sheng, Z.J., Li, L.M., Wang, L., Wang, Z.G., Fei, J. (2011): Resistance to lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in heterozygous Zfp191 gene-knockout mice. *Genet. Mol. Res.* 10, 3712-3721.
- 151 Sundstrom, C., Nilsson, K. (1976): Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int. J. Cancer.* 17, 565-577.
- 152 Swaminath, G., Xiang, Y., Lee, T.W., Steenhuis, J., Parnot, C., Kobilka, B.K. (2004): Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. *J. Biol. Chem.* 279, 686-691.
- 153 Tajuddin, S.M., Amaral, A.F., Fernandez, A.F., Rodriguez-Rodero, S., Rodriguez, R.M., Moore, L.E., Tardon, A., Carrato, A., Garcia-Closas, M., Silverman, D.T., Jackson, B.P., Garcia-Closas, R., Cook, A.L., Cantor, K.P., Chanock, S., Kogevinas, M., Rothman, N., Real, F.X., Fraga, M.F., Malats, N., Spanish Bladder Cancer/EPICURO Study Investigators. (2013): Genetic and non-genetic predictors of LINE-1 methylation in leukocyte DNA. *Environ. Health Perspect.* 121, 650-656.
- 154 Tamma, S.M., Kalyanaraman, V.S., Pahwa, S., Dominguez, P., Modesto, R.R. (2003): The lectin jacalin induces phosphorylation of ERK and JNK in CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.* 73, 682-688.
- 155 Tang, H., Goldberg, E. (2012): A-MYB (MYBL1) stimulates murine testis-specific *Ldhc* expression via the cAMP-responsive element (CRE) site. *Biol. Reprod.* 86, 30.
- 156 Taylor, F.B., Jr, Wada, H., Kinasewitz, G. (2000): Description of compensated and uncompensated disseminated intravascular coagulation (DIC) responses (non-overt and overt DIC) in baboon models of intravenous and intraperitoneal *Escherichia coli* sepsis and in the human model of endotoxemia: toward a better definition of DIC. *Crit. Care Med.* 28, S12-9.
- 157 Tendl, K.A., Schulz, S.M., Mechtler, T.P., Bohn, A., Metz, T., Greber-Platzer, S., Kasper, D.C., Herkner, K.R., Item, C.B. (2013): DNA methylation pattern of CALCA in preterm neonates with bacterial sepsis as a putative epigenetic biomarker. *Epigenetics.* 8, 1261-1267.
- 158 Theron, A.J., Steel, H.C., Tintinger, G.R., Feldman, C., Anderson, R. (2013): Can the anti-inflammatory activities of beta2-agonists be harnessed in the clinical setting? *Drug Des. Devel. Ther.* 7, 1387-1398.
- 159 Thiagarajah, J.R., Verkman, A.S. (2002): Aquaporin deletion in mice reduces corneal water permeability and delays restoration of transparency after swelling. *J. Biol. Chem.* 277, 19139-19144.
- 160 Tolg, C., Sabha, N., Cortese, R., Panchal, T., Ahsan, A., Soliman, A., Aitken, K.J., Petronis, A., Bagli, D.J. (2011): Uropathogenic *E. coli* infection provokes

- epigenetic downregulation of CDKN2A (p16INK4A) in uroepithelial cells. *Lab. Invest.* 91, 825-836.
- 161 Tomar, N., De, R.K. (2014): A brief outline of the immune system. *Methods Mol. Biol.* 1184, 3-12.
- 162 Towne, J.E., Harrod, K.S., Krane, C.M., Menon, A.G. (2000): Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22, 34-44.
- 163 Towne, J.E., Krane, C.M., Bachurski, C.J., Menon, A.G. (2001): Tumor necrosis factor-alpha inhibits aquaporin 5 expression in mouse lung epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 18657-18664.
- 164 Tran, D.D., Groeneveld, A.B., van der Meulen, J., Nauta, J.J., Strack van Schijndel, R.J., Thijs, L.G. (1990): Age, chronic disease, sepsis, organ system failure, and mortality in a medical intensive care unit. *Crit. Care Med.* 18, 474-479.
- 165 Trickett, A., Kwan, Y.L. (2003): T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J. Immunol. Methods.* 275, 251-255.
- 166 Tsiotou, A.G., Sakorafas, G.H., Anagnostopoulos, G., Bramis, J. (2005): Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med. Sci. Monit.* 11, RA76-85.
- 167 Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K. (1980): Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer.* 26, 171-176.
- 168 TUKEY, J.W. (1949): Comparing individual means in the analysis of variance. *Biometrics.* 5, 99-114.
- 169 van der Poll, T. (2012): Preclinical sepsis models. *Surg. Infect. (Larchmt).* 13, 287-292.
- 170 Verkman, A.S. (2013): Aquaporins. *Curr. Biol.* 23, R52-5.
- 171 Verkman, A.S. (2011): Aquaporins at a glance. *J. Cell. Sci.* 124, 2107-2112.
- 172 Verkman, A.S. (2006): Aquaporins in endothelia. *Kidney Int.* 69, 1120-1123.
- 173 Verkman, A.S., Anderson, M.O., Papadopoulos, M.C. (2014): Aquaporins: important but elusive drug targets. *Nat. Rev. Drug Discov.*
- 174 Verkman, A.S., Hara-Chikuma, M., Papadopoulos, M.C. (2008): Aquaporins--new players in cancer biology. *J. Mol. Med. (Berl).* 86, 523-529.
- 175 Verkman, A.S., Matthay, M.A., Song, Y. (2000): Aquaporin water channels and lung physiology. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278, L867-L879.

- 176 ves-Filho, J.C., de, F.A., Spiller, F., Souto, F.O., Cunha, F.Q. (2008): The role of neutrophils in severe sepsis. *Shock*. 30 Suppl 1, 3-9.
- 177 von Boehmer, H. (2005): Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat. Immunol.* 6, 338-344.
- 178 Walsh, M.C., Choi, Y. (2014): Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front. Immunol.* 5, 511.
- 179 Wang, W., Zheng, M. (2011a): Nuclear factor kappa B pathway down-regulates aquaporin 5 in the nasal mucosa of rats with allergic rhinitis. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 268, 73-81.
- 180 Wang, W., Zheng, M. (2011b): Role of cAMP-PKA/CREB pathway in regulation of AQP 5 production in rat nasal epithelium. *Rhinology.* 49, 464-469.
- 181 Wang, Z., Wang, L., Shanguan, S., Lu, X., Chang, S., Wang, J., Zou, J., Wu, L., Zhang, T., Luo, Y. (2013): Association between PTCH1 polymorphisms and risk of neural tube defects in a Chinese population. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 97, 409-415.
- 182 Weighardt, H., Heidecke, C.D., Westerholt, A., Emmanuilidis, K., Maier, S., Veit, M., Gerauer, K., Matevossian, E., Ulm, K., Siewert, J.R., Holzmann, B. (2002): Impaired monocyte IL-12 production before surgery as a predictive factor for the lethal outcome of postoperative sepsis. *Ann. Surg.* 235, 560-567.
- 183 Werdan, K. (2005): Sepsis und MODS. 4, voll überarb u aktual Aufl . Berlin: Springer;
- 184 Westra, J., Brouwer, E., van, R., I, Doornbos-van der, van Leeuwen, M.A., Posthumus, M.D., Kallenberg, C.G. (2010): Expression and regulation of HIF-1alpha in macrophages under inflammatory conditions; significant reduction of VEGF by CaMKII inhibitor. *BMC Musculoskelet. Disord.* 11, 61.
- 185 WILCOXON, F. (1946): Individual comparisons of grouped data by ranking methods. *J. Econ. Entomol.* 39, 269.
- 186 Williams, S.C. (2012): After Xigris, researchers look to new targets to combat sepsis. *Nat. Med.* 18, 1001-1001.
- 187 Woo, J., Chae, Y.K., Jang, S.J., Kim, M.S., Baek, J.H., Park, J.C., Trink, B., Ratovitski, E., Lee, T., Park, B., Park, M., Kang, J.H., Soria, J.C., Lee, J., Califano, J., Sidransky, D., Moon, C. (2008a): Membrane trafficking of AQP5 and cAMP dependent phosphorylation in bronchial epithelium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 321-327.
- 188 Woo, J., Lee, J., Chae, Y.K., Kim, M.S., Baek, J.H., Park, J.C., Park, M.J., Smith, I.M., Trink, B., Ratovitski, E., Lee, T., Park, B., Jang, S.J., Soria, J.C., Califano, J.A., Sidransky, D., Moon, C. (2008b): Overexpression of AQP5, a putative oncogene, promotes cell growth and transformation. *Cancer Lett.* 264, 54-62.

- 189 Woo, J., Lee, J., Kim, M.S., Jang, S.J., Sidransky, D., Moon, C. (2008c): The effect of aquaporin 5 overexpression on the Ras signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367, 291-298.
- 190 Wu, H.P., Shih, C.C., Lin, C.Y., Hua, C.C., Chuang, D.Y. (2011): Serial increase of IL-12 response and human leukocyte antigen-DR expression in severe sepsis survivors. *Crit. Care.* 15, R224.
- 191 Wu, X.M., Wang, H.Y., Li, G.F., Zang, B., Chen, W.M. (2009): Dobutamine enhances alveolar fluid clearance in a rat model of acute lung injury. *Lung.* 187, 225-231.
- 192 Yamamura, Y., Aota, K., Yamanoi, T., Kani, K., Takano, H., Momota, Y., Motegi, K., Azuma, M. (2012): DNA Demethylating Agent Decitabine Increases AQP5 Expression and Restores Salivary Function. *J. Dent. Res.*
- 193 Yamamura, Y., Motegi, K., Kani, K., Takano, H., Momota, Y., Aota, K., Yamanoi, T., Azuma, M. (2011): TNF-alpha inhibits aquaporin 5 expression in human salivary gland acinar cells via suppression of histone H4 acetylation. *J. Cell. Mol. Med.*
- 194 Yamanishi, Y., Takahashi, M., Izawa, K., Isobe, M., Ito, S., Tsuchiya, A., Maehara, A., Kaitani, A., Uchida, T., Togami, K., Enomoto, Y., Nakahara, F., Oki, T., Kajikawa, M., Kurihara, H., Kitamura, T., Kitaura, J. (2012): A soluble form of LMIR5/CD300b amplifies lipopolysaccharide-induced lethal inflammation in sepsis. *J. Immunol.* 189, 1773-1779.
- 195 Yang, F., Kawedia, J.D., Menon, A.G. (2003): Cyclic AMP regulates aquaporin 5 expression at both transcriptional and post-transcriptional levels through a protein kinase A pathway. *J. Biol. Chem.* 278, 32173-32180.
- 196 Yang, J.H., Shi, Y.F., Cheng, Q., Deng, L. (2006): Expression and localization of aquaporin-5 in the epithelial ovarian tumors. *Gynecol. Oncol.* 100, 294-299.
- 197 Yao, C., Purwanti, N., Karabasil, M.R., Azlina, A., Javkhlan, P., Hasegawa, T., Akamatsu, T., Hosoi, T., Ozawa, K., Hosoi, K. (2010): Potential down-regulation of salivary gland AQP5 by LPS via cross-coupling of NF-kappaB and p-c-Jun/c-Fos. *Am. J. Pathol.* 177, 724-734.
- 198 Ye, X., Liu, S.F. (2001): Lipopolysaccharide regulates constitutive and inducible transcription factor activities differentially in vivo in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 927-932.
- 199 Zanotti-Cavazzoni, S.L., Goldfarb, R.D. (2009): Animal models of sepsis. *Crit. Care Clin.* 25, 703-19, vii-viii.
- 200 Zhou, B., Ann, D.K., Li, X., Kim, K.J., Lin, H., Minoo, P., Crandall, E.D., Borok, Z. (2007): Hypertonic induction of aquaporin-5: novel role of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* 292, C1280-C1290.

## 7 Verzeichnisse

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AQP	Aquaporin
CARS	Kompensatorisches Antiinflammatorisches Responsesyndrom
CD	engl. cluster of differentiation, Differenzierungskluster
cDNA	engl. complementary DNA, komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
CT-Wert	engl. cycle threshold, Fluoreszenzschwellenwert
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
DNA	engl. Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNase	Deoxyribonuclease
eGFP	engl. enhanced-green fluorescent protein, verbessertes grün-fluoreszierendes Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl. enzyme-linked immunosorbant assay
EMSA	engl. electrophoretic mobility shift assay
et al.	lat. et alia, und andere
FCS/FKS	engl. fetal calf serum, Fötales Kälberserum
Foxp3	engl. forkhead box protein P3
GFP	engl. green fluorescent protein, grün-fluoreszierendes Protein
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
i.p.	intraperitoneal

IL	Interleukin
IVC	engl. individual ventilated cage, individuell ventilierter Käfig
KO	engl. knock-out
NFκB	engl. nuclear factor kappa of activated B-cells
NMP	nuclear matrix protein
PBS	engl. phosphate buffer solution, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl. polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PMA	engl. Phorbol 12-myristate 13-acetate
RNA	engl. ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	Reverse Transkription
SIRS	Systemisches Inflammatorisches Responsesyndrom
Tab.	Tabelle
TGF-β	engl. Transforming Growth Factor β
TLR	engl. toll like receptor, Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	engl. tumor necrosis factor, Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WT	Wildtyp

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Gleichgewicht zwischen inflammatorischer (SIRS) und antiinflammatorischer Reaktion (CARS) des Körpers auf ein Trauma. Eine bakterielle Infektion (Trauma) löst zunächst eine inflammatorische Reaktion aus, welche ihrerseits zur Ausbildung der antiinflammatorischen Reaktion führt. Eine zu starke inflammatorische Reaktion kann zum frühen Multiorganversagen führen. In der Phase der Antiinflammation führt häufig eine nosokomiale Infektion zu einem späten Multiorganversagen durch Immunsuppression. (SIRS= systemisches inflammatorisches Responsesyndrom; CARS= kompensatorisches antiinflammatorisches Responsesyndrom, MOF= Multiorganversagen). Modifiziert nach Kumpf, Schumann und Hietbrink (Kumpf, Schumann 2010, Hietbrink et al. 2006). ..... 15
- Abbildung 2: Struktur der Aquaporine: Aquaporine bestehen aus sechs membrandurchspannenden Domänen (I bis VI), welche durch die Schleifen A bis E verbunden sind. In Schleife B und E befindet sich das Asparagin-Prolin-Alanin (NPA) Strukturmotiv. Die Aminosäuren Serin 156 (S), Tyrosin 243 (Y) und Threonin 259 (T) stellen putative Phosphorylierungsstellen (P) dar. Intra.: intrazellulärer Raum, extra.: extrazellulärer Raum. Modifiziert nach Kruse (Kruse et al. 2006)..... 18
- Abbildung 3: Physiologische Rolle der Aquaporine a) Funktionen der Aquaporine im Körper. Aquaporine regulieren den Wasserhaushalt im Gehirn in den Alveolen, im Darm, in den Erythrozyten, im Auge, in den Speicheldrüsen und in den Nieren. b) Rolle der Aquaporine in der Zellmigration c) Rolle der Aquaporine beim Wasseraustausch in den Lungenalveolen (www. fineartamerica.com, (Verkman 2011, Nielsen et al. 1997)). ..... 19
- Abbildung 4: AQP5-Signalwege. Die Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) mit Forskolin, Isoprenalin und Terbutalin führt zur Aktivierung der Adenylatzyklase (AC), welche durch Bildung von cAMP die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. Diese phosphoryliert AQP5 und induziert damit die Membrantranslokation. Außerdem wird durch die PKA der Transkriptionsfaktor CREB aktiviert, welcher die AQP5-Expression induziert (+). LPS welches an das LPS-Bindungsprotein (LBP) bindet, bindet an CD-14 und TLR-4 und induziert somit die Aktivierung verschiedener Kinasen und anderer Faktoren (Interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK), TNF receptor associated factor (TRAF), Mitogen-activated

---

protein kinase kinase (MKK) c-Jun N-terminal kinases (JNK), wozu es schließlich zur Dissoziation von NFκB und Inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase subunit beta (IKKB) kommt und NFκB in den Kern transloziert. NFκB inhibiert CREB und bindet an den AQP5 Promotor, wodurch die Expression gehemmt wird (modifiziert nach: Ohinata et al. 2005, Nedvetsky et al. 2009, Shen et al. 2010, Wang et al. 2013, Yang et al. 2003).....	24
Abbildung 5: Vorgehensweise bei der Untersuchung des Einflusses der AQP5-Expression und des AQP5 A(-1364) auf die Sepsisletalität.....	29
Abbildung 6: Aufreinigungsschema von mononukleären und neutrophilen Zellen aus Blut von gesunden Probanden. Die Trennung erfolgte mittels Polymorphprep. Erythrozyten sedimentieren nach der Zentrifugation, während sich polymorphe Zellen (PMNC) in einer Schicht im Separationsmedium ansammeln. Monozytäre Zellen (PBMC) befinden sich zwischen Plasma und Separationsmedium. ....	55
Abbildung 7: Aufreinigungsschema der monozytären Zellen. Nach der Reinigung der Zellen mit PBS erfolgten die Zugabe von Zellkulturmedium (RPMI) und das Überführen in eine Zellkulturflasche. Durch 10-maliges auf- und abpipettieren wurden monozytäre Zellen aktiviert und adhärirten an den Boden.....	56
Abbildung 8: Messung der Absorption bei 450 nm mittels „CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay“ in Abhängigkeit von einer unterschiedlichen Anzahl eingesetzter Zellen .....	57
Abbildung 9: Aufbau des Transwellmigrationsassays. Die Zellen wurden in einer definierten Zellzahl in das Transwellinsert gegeben, welches sich in einer 24-Lochplatte befindet. Im unteren Teil des Lochs befindet sich ein Stimulans, welches die Zellen zur Migration durch die Membran anregt. ....	58
Abbildung 10: Prinzip eines EMSAs. Zunächst wurden einzelsträngige Oligonukleotide (ssDNA) zu doppelsträngigen Oligonukleotiden (dsDNA) hybridisiert. Diese wurden mit Hilfe der terminalen Transferase mit Digoxigenin markiert. Anschließend erfolgte das Auftragen der markierten Oligonukleotide in unterschiedlichen Verdünnungen auf eine Nylonmembran. Der Nachweis der DIG-Markierung erfolgte durch die Antikörper gegen Digoxigenin (anti-DIG-AK), an die die Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Durch Zugabe von CSPD wurde dieses zum Phenolat-Anion hydrolysiert, welches Licht der Wellenlänge 477 nm emittiert.....	63



- Abbildung 11: EMSA-Polyacrylamidgelelektrophorese: Es wurden unterschiedliche Kombinationen aus markierten und unmarkierten Oligonukleotiden, sowie Zellkernextrakten und Antikörpern auf das Gel aufgetragen. Markierte Oligonukleotide erzeugen dabei eine sichtbare Bande, ZKE: Zellkernextrakte, DIG: Digoxigenin..... 65
- Abbildung 12: Prinzip der Immundetektion: Die Proteine werden auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der erste Antikörper (AK) erkennt spezifisch ein Protein. Der zweite AK erkennt den ersten AK und ist entweder mit der Meerrettich-Peroxidase (HP) gekoppelt, welche Luminol oxidiert und so Licht der Wellenlänge 428 nm emittiert wird, oder mit einem IR-Farbstoff (IR-Dye) gekoppelt ist und Licht im Bereich von 680 nm bis 800 nm emittiert..... 67
- Abbildung 13: Aufbau der Blotting – Apparatur zum Western Blot: Der Transfer der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf die Nitrozellulose erfolgt zwischen zwei in Transferpuffer getränkten Blotting Papieren. Durch das Anlegen einer konstanten Spannung wandern die Proteine von der Kathode zur Anode und somit aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran. .... 69
- Abbildung 14: Darstellung der Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zykluszahl. Die Zykluszahl, bei der der Schwellenwert überschritten wird ist der CT-Wert..... 72
- Abbildung 15: a) Prinzip der Bisulfit-Behandlung. Nicht methylierte Cytosine werden durch die Behandlung und PCR zum T und methylierte Cytosine bleiben ein C. b) Prinzip der Pyrosequenzierung. Durch Einbau eines komplementären Nukleotids durch die Polymerase wird Pyrophosphat (PPi) frei, wodurch die Enzymreaktion der Sulfurylase aktiviert wird, welche ATP bildet und die Luziferase aktiviert, die wiederum das Substrat abbaut und dabei wird Licht emittiert. Nicht eingebaute Nukleotide werden durch die Apyrase abgebaut (Quelle: varionostic GmbH) ..... 76
- Abbildung 16: Standardkurve zur Berechnung des Anteils an methylierter DNA aus einer Probe. Datenreihe 1: mittels RT-PCR bestimmte Werte, Datenreihe 2: mittels oben genannter Formel berechneter Werte aus gegebenen DeltaCT-Werten. Die Datenreihen stimmen fast zu 100 % überein. .... 77
- Abbildung 17: *in silico* Analyse zur putativen Bindung von Transkriptionsfaktoren an den AQP5-Promotor 18 bp vor und 21 bp nach dem AQP5 A(-1364)C SNPs mittels

- genomatrix. Es konnten die Tanskriptionsfaktoren NFAT, NMP4 und c-Myb identifiziert werden..... 85
- Abbildung 18: Untersuchung der Expression von c-Myb, NFAT und NMP4 in Zellkernextrakten aus HEK293 Zellen (+ mit Überexpressionsplasmid transfiziert, - untransfiziert). Um sicherzustellen, dass sich die zu untersuchenden Tanskriptionsfaktoren in den Zellkernextrakten befinden, wurden die HEK293 Zellen zunächst mit den entsprechenden Überexpressionsplasmiden transfiziert. .... 86
- Abbildung 19: EMSA mit Oligonukleotiden, des AQP5 Promotors um A(-1364)C(Beispiel aus n=3) mit Zellkernextrakten, in denen C-Myb und NFAT überexprimiert sind. Es kommt zur Ausbildung einer stärkeren spezifischen Bande (Spur 2, 5, 8 und 11), die jedoch durch Zugabe eines Überschusses an ungelabeltem Oligonukleotid nicht (Spur 3, 6, 9, 12). Legende zur Abbildung: C-Myb A: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): A-Allel; C-Myb \_C: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): C-Allel; ZKE: Zellkernextrakte mit C-Myb oder NFAT-Überexpression aus HEK293; unlab Olig: ungelabeltes Oligonukleotid in 50x Überschuss..... 87
- Abbildung 20: EMSA mit Oligonukleotiden, des AQP5 Promotors um A(-1364)C(Beispiel aus n=3) mit Zellkernextrakten, in denen NMP4 überexprimiert ist. Es kommt zur Ausbildung einer stärkeren spezifischen Bande beim C-Allel (Spur 6) im Vergleich zum A-Allel (Spur 2). Durch Zugabe eines NMP4 Antikörpers kam es zur Ausbildung eines Supershifts (Spur 4; roter Pfeil, Spur 8). (Legende zur Abbildung:NMP4\_A: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): A-Allel; NMP4\_C: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): C-Allel; ZKE-NMP4:NMP4 überexprimierende Zellkernextrakte aus HEK293; ungelabeltes Olig: ungelabeltes Oligonukleotid in 50x Überschuss; NMP4 AK: NMP4 Antikörper) ..... 88
- Abbildung 21: EMSA mit Gegenkompetition mit dem jeweils gegenteiligen Oligonukleotid und mit Zellkernextrakten, in denen NMP4 überexprimiert war. (Legende zur Abbildung:NMP4\_A: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): A-Allel; NMP4\_C: AQP5-Promotor-Abschnitt (nt-1339/-1371): C-Allel; ZKE-NMP4:NMP4 überexprimierende Zellkernextrakte aus HEK293; ungelabeltes Olig: ungelabeltes Oligonukleotid in 50x Überschuss; NMP4 AK: NMP4 Antikörper) ..... 89
- Abbildung 22: Reporterassays in HEK 293 Zellen mit AQP5 Promotorkonstrukten, die den Bereich um den Polymorphismus (-1144/-1734) charakterisieren. AA/CC

- pReceiver: Zellen mit Promotorkonstrukt mit entsprechendem Genotyp und leerem pReceiver transfiziert; AA/CCpReceiver NMP4: Zellen mit Promotorkonstrukt mit entsprechendem Genotyp und NMP4 Expressionsplasmid transfiziert. Die Messung wurde 24 Std. nach der Transfektion durchgeführt. n=8, ungepaarter t-Test. .... 90
- Abbildung 23: Reporterassays in HEK293 Zellen mit drei AQP5 Promotorkonstrukten. Der untersuchte Promotorabschnitt ist durch die Basenangaben bezogen auf ATG gekennzeichnet. Die Überexpression von NMP4 (pReceiver\_NMP4) führte zu einer Erhöhung der Promotoraktivität im Vergleich zur Transfektion mit dem Kontrollplasmid (pReceiver). Die Messung wurde 24 Std. nach der Transfektion durchgeführt. n=8, ungepaarter t-Test. .... 91
- Abbildung 24: Lokalisation der Oligonukleotide zur Untersuchung der Bindung von NMP4 im AQP5 Promotorbereich von nt-442/ -651 (die markierten Regionen kennzeichnen die Lokalisation der Oligonukleotide im AQP5 Promotorbereich, der Pfeil kennzeichnet den Transkriptionsstartpunkt ) ..... 92
- Abbildung 25: Durchführung des EMSA mit dem Oligonukleotid NMP4.1. Als Zellkernextrakte wurden Zellkernextrakte aus HEK293 Zellen verwendet, bei denen NMP4 überexprimiert wurde. Es wurde eine Kompetition mit einem 100x und einem 50x Überschuss des ungelabelten Oligonukleotids durchgeführt. Außerdem wurde eine Supershift-Analyse mit einem NMP4 Antikörper durchgeführt (n=3)..... 92
- Abbildung 26: AQP5- mRNA Expression unter Überexpression von NMP4 in HEK 293 Zellen. Die Zellen wurden entweder mit dem Kontrollvektor pReceiver oder NMP4\_pReceiver transfiziert und Gesamt-RNA 24 Std. nach der Transfektion gewonnen. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels Real-Time PCR analysiert. Die Expression von AQP5 im Verhältnis zu Aktin wurde aus den Ct-Werten bestimmt. n=4, ungepaarter t-Test..... 93
- Abbildung 27: RANKL- mRNA Expression unter Überexpression von NMP4 in HEK 293 Zellen. Die Zellen wurden entweder mit dem Kontrollvektor pReceiver oder NMP4\_pReceiver transfiziert und die Gesamt-RNA 24 Std. nach der Transfektion gewonnen. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und mittels Real-Time PCR analysiert. Die Expression von RANKL im Verhältnis zu Aktin wurde aus den Ct-Werten bestimmt. n=4, ungepaarter t-Test..... 94

- Abbildung 28: Untersuchungen zur der Methylierung des AQP5-Promotors bei Patienten mit schwerer Sepsis (Sep). DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. Angegeben sind die Positionen (bezogen auf ATG), in denen sich die prozentuale Methylierung zwischen Patienten mit AA-Genotyp von denen mit AC/CC-Genotyp unterschieden, n=100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test..... 95
- Abbildung 29: Untersuchungen zur Methylierung des AQP5-Promotors bei postoperativen Patienten mit unterschiedlichen AQP5 A(-1364)C Genotypen. DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. Angegeben sind die Positionen (bezogen auf ATG), in denen sich die Methylierung genotypabhängig unterscheidet n=100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test..... 96
- Abbildung 30: Methylierungsgrad des AQP5 Promotors bei septischen (Septikern) und postoperativen (POP) Patienten im Bereich von nt-646 bis nt-1044 (bezogen auf ATG), (bezogen auf Transkriptionsstartpunkt sind es die Positionen: nt-522 bis nt-124). DNA wurde aus dem Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. n=100, zwei-Weg-ANOVA, . 97
- Abbildung 31: Untersuchungen zur Methylierung des AQP5-Promotors bei postoperativen Patienten (Pop) und Patienten mit schwerer Sepsis (Sep). DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. Angegeben sind die Positionen (bezogen auf ATG), in denen sich die prozentuale Methylierung zwischen Patienten mit schwerer Sepsis und postoperativen Patienten unterschieden, n=100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ..... 98
- Abbildung 32: Untersuchungen zur Methylierung des AQP5-Promotors bei postoperativen Patienten (Pop) und Patienten mit schwerer Sepsis (Sep) mit AQP5 A(-1364)C-Genotyp. DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. Angegeben sind die Positionen (bezogen auf ATG), in denen sich die prozentuale Methylierung zwischen Patienten mit schwerer Sepsis und postoperativen Patienten unterscheidet, n=100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test..... 99
- Abbildung 33: Vergleichende Untersuchungen zur Methylierung des AQP5-Promotors in Position -1013 (bezogen auf ATG) zwischen postoperativen Patienten

---

und Patienten mit schwerer Sepsis, die das C-Allel tragen. DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ. n= 100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.....	100
Abbildung 34: Untersuchungen zur Methylierung des AQP5-Promotors bei von postoperativen und septischen Patienten. DNA wurde aus Vollblut isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend erfolgte die PCR und Analyse mit PSQ, n=100, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test .....	100
Abbildung 35: Untersuchungen zum Methylierungsstatus des AQP5-Promotors (a) bis c)) und der AQP5-Expression (d) bis f)) nach 7-tägiger Inkubation mit dem DNA-Methyltransferaseinhibitor ADC. n, n=6, ungepaarter T-Test. ....	102
Abbildung 36: 24 stündige Stimulation der monozytären Zelllinien U937 und THP-1 mit LPS (1 µg/ml) und anschließender Untersuchung der a) AQP5-Promotormethylierung in U937 und b) AQP5-Expression in THP-1; ungepaarter T-Test, n=3 .....	103
Abbildung 37: AQP5-Expression von septischen Patienten abhängig vom AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus. Das Vollblut wurde innerhalb der ersten 24 Std. nach Erfüllen der Sepsiskriterien entnommen und die Gesamt-RNA isoliert. Die Quantifizierung von AQP5 erfolgte mittels RT-PCR. Als Referenzgen fungierte Aktin. n= 25, ungepaarter t-Test. ....	104
Abbildung 38: Cytokinkonzentration bei Patienten mit schwerer Sepsis in Abhängigkeit vom AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus. Die Cytokinmessungen wurden in Vollblutproben von Patienten mit schwerer Sepsis durchgeführt (n= 50) Die statistische Analyse erfolgte mittels einer Ein-Weg-ANOVA mit anschließendem Tukey Mehrfache-Vergleiche-Test.....	105
Abbildung 39: Beurteilung des Gesundheitszustands der Mäuse zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der LPS-Injektion (20 mg/kg KGW). Die Beurteilung des Allgemeinzustandes erfolgte mittels Score-Sheet. Dargestellt sind die Mittelwerte aus der Punkteverteilung zum Allgemeinzustand, Spontanverhalten, Klinischer Befund und Ausscheidungen. Während 0 ein guter Zustand bedeutet, zeigt eine höhere Zahl einen schlechten Zustand an. Die Werte zwischen KO und WT-Tieren wurde zu jedem Zeitpunkt mittels ungepaarten T-Tests miteinander verglichen. (n=18) .....	106

- Abbildung 40: Überwachung des Körpergewichtes der Versuchstiere. Das Gewicht wurde zu Beginn des Versuchs und zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS Injektion (20 mg/kg KGW) bestimmt. Die Werte zwischen KO und WT-Tieren wurde zu jedem Zeitpunkt mittels ungepaarten T-Tests miteinander verglichen. (n=18) .. 107
- Abbildung 41: Überleben der Versuchstiere nach LPS-Injektion (20 mg/kg KGW) und unter Kontrollbedingungen (Injektion von 0,9%iger NaCl-Lösung). Kaplan-Meyer Analyse n= 18..... 107
- Abbildung 42: Untersuchung der Cytokinkonzentration 4,5 Std. und 24 Std. nach der LPS-Injektion (20 mg/kg KGW) im Serum mittels ELISA; abhängig vom Genotyp. Die Bestimmung erfolgte in Serumproben aus retrobulbär entnommenem Blut mittels ELISA; abhängig vom Genotyp. n=12, ungepaarter t-Test. .... 108
- Abbildung 43: Immunologische Färbung von neutrophilen Granulozyten mit Hämatoxylin (blau) und AQP5-Antikörper. AQP5-Protein stellt sich durch die immunologische Färbung braun dar (n=4, je Genotyp zwei Objektträger, repräsentativer Ausschnitt aus 8 zufälligen Fotos) Vergrößerung: 40x. .... 110
- Abbildung 44: Migrationsassays von neutrophilen Granulozyten aus dem Vollblut von 8 gesunden Probanden. Die neutrophilen Zellen wurden mit fMLP stimuliert und die migrierten Zellen wurden nach 0,5 Std. und 1,5 Std. gezählt. Als Positivkontrolle (PK) wurde fMLP verwendet. Als Negativkontrolle (NK) fungierte leeres Zellkulturmedium, n=4, ungepaarter t-test. .... 111
- Abbildung 45: AQP5-Expression nach fMLP-Stimulation in HL-60 Zellen: a) Untersuchung der AQP5 mRNA Expression nach Stimulation mit fMLP( $10^{-8}$ M) ermittelt mittels Real-Time PCR. (n=5, ungepaarter t-Test) b) Untersuchung der AQP5-Proteinexpression nach der Stimulation mit fMLP ( $10^{-8}$ M) ermittelt mittels Western Blot. .... 112
- Abbildung 46: Untersuchungen zur AQP5-Expression in transfizierten Jurkat Zellen mittels Western Blot. In der ersten Spur sind Hela-Proteinextrakte aufgetragen. Die Jurkat Zellen wurden untransfiziert, mit Kontrollplasmid (pRec.) oder mit linearisiertem AQP5-Überexpressionsplasmid transfiziert, lysiert und Proteine daraus gewonnen..... 113
- Abbildung 47: Untersuchungen zur Migration von Jurkat-Zellen mit AQP5-Überexpression (AQP5\_pRec) und Kontrollplasmid (pRec). Die migrierten Zellen

---

wurden nach 22 Std. gezählt. PK = SDF-1 $\alpha$ , NK: leeres Zellkulturmedium, n=6, ungepaarter t-Test. ....	113
Abbildung 48: Proliferation von monozytären Zellen (PBMCs) unter Stimulation von 5 $\mu$ g/ $\mu$ l PMA in Abhängigkeit vom AQP5 A(-1364)C Promotorpolymorphismus, n=5, ungepaarter t-Test .....	114
Abbildung 49: Zeitabhängige AQP5 RNA-Expression nach der Stimulation mit LPS (1 $\mu$ g/ml) und cAMP (1 mM) einzeln oder mit beiden Stimulanzen zusammen. Die Zellen wurden ausgesät und mit den Stimulanzen stimuliert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 2, 3, 6, 24 Std.) nach der Stimulation wurde die Gesamt-RNA isoliert und cDNA gewonnen. Die Expression von AQP5 und Aktin wurde mittels Real-Time PCR bestimmt und aus den Ct-Werten die Expression bestimmt. Analysiert mit Zwei-Weg ANOVA mit anschließendem Tukey-Mehrfache-Vergleiche-Test n=6.....	115
Abbildung 50: Zeitabhängige AQP5 Proteinkonzentration in THP-1 Zellen nach der Stimulation mit LPS (1 $\mu$ g/ml) und cAMP (1 mM) einzeln oder mit beiden Stimulanzen zusammen. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Stimulation (0, 2, 6, 24 Std.) wurden die Zellen lysiert und Proteine gewonnen. PK = Positivkontrolle, Kontrolle: ohne Stimulation zum Zeitpunkt 0 h, n= 3. ....	116
Abbildung 51: Zeitabhängige Zellviabilität von (a) THP-1 Zellen nach der Stimulation mit LPS (1 $\mu$ g/ml) und cAMP (1 mM) (b) einzeln oder (c) mit beiden Stimulanzen zusammen. Die Analyse erfolgte mittels MUSE Cell Analyzer n=2. Analyse mit einer zwei-Weg-ANOVA, gefolgt von einem Tukey-Mehrfach-Vergleiche-Test.....	117
Abbildung 52: Zellmorphologie von THP-1 Zellen 24 Std. nach der Stimulation mit (b) LPS (1 $\mu$ g/ml) und cAMP (1 mM) (c) einzeln oder (d) mit beiden Stimulanzen zusammen. Dargestellt ist eine 40-fache Vergrößerung. n=2 .....	118

### 7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Kriterien für SIRS .....	9
Tabelle 2: Übersicht über die humanen Aquaporine, ihre chromosomale Lokalisation, ihre Permeabilität sowie die Gewebeverteilung (King et al. 2004, Ishibashi et al. 2013) .....	17
Tabelle 3: Oligonukleotide für die Überprüfung der Bindung der Transkriptionsfaktoren c-Myb, NFAT und NMP4 im AQP5-Promotor (-1340/-1380) um den A(-1364)C Promotorpolymorphismus. Die unterstrichenen Bereiche zeigen die direkten Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren an. In rot ist Position -1364 dargestellt. ....	33
Tabelle 4: Oligonukleotide zur Untersuchung der Bindung von NMP4 im Bereich -470/-634 .....	33
Tabelle 5: Oligonukleotide zur PCR und Real-Time-PCR mit Zielgen, Sequenz, Annealingtemperatur, Produktgröße und Anwendung .....	34
Tabelle 6: Oligonukleotide für Pyrosequenzierung .....	35
Tabelle 7: verwendete Antikörper. Sofern nicht anders angegeben bezieht sich die Verdünnung auf den Western Blot (WB).....	36
Tabelle 8: Bakterienmedien .....	37
Tabelle 9: Medien für die Zellkultur.....	38
Tabelle 10: Zusammensetzung der verwendeten Medien .....	38
Tabelle 11: Puffer für Western Blot.....	39
Tabelle 12: Gele für Western Blot.....	40
Tabelle 13: Puffer für EMSA .....	41
Tabelle 14: Gele für EMSA.....	41
Tabelle 15: Material für die Blutentnahme und die Zellaufreinigung .....	42
Tabelle 16: Verwendete Kits.....	42
Tabelle 17: verwendete Zelllinien .....	43
Tabelle 18: Vektoren zur Klonierung .....	44



---

Tabelle 19: Expressionskonstrukte .....	44
Tabelle 20: PCR-Ansatz zur Promotorklonierung .....	47
Tabelle 21: Protokoll für Slowdown-PCR.....	47
Tabelle 22: AQP5-Promotorkonstrukte in pGI4.10.....	50
Tabelle 23: Transfektionsansatz.....	52
Tabelle 24: Ansatz zur Markierung der Oligonukleotide .....	62
Tabelle 25: Vorbereitung der Proben für die Gelshiftreaktion .....	65
Tabelle 26: Schritte der Immundetektion .....	70
Tabelle 27: Protokoll zur Umschreibung von RNA in cDNA.....	73
Tabelle 28: Ansatz zur Real-Time PCR.....	74
Tabelle 29: Thermoprofil zur Real-Time PCR.....	74
Tabelle 30: Protokoll zur Methylierungsanalyse mittels PSQ.....	78
Tabelle 31: Darstellung des Score Sheets zur Beurteilung des Allgemeinzustands der Tiere .....	81

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## **Danksagung**

Die Danksagung ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## Erklärungen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Einfluss genetischer Varianten im Aquaporin 5-Promotor-Gen auf Schlüsselmechanismen der Sepsis*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von *Katharina Rump* befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_ Prof. Dr. med. Michael Adamzik \_\_\_\_\_

Name des wissenschaftl	Unterschrift d. wissenschaftl.
Betreuers/Betreuers/Mitglieds	Mitglieds der Universität
der Universität Duisburg-Essen	Duisburg-Essen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des/r Doktoranden/in

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des/r Doktoranden/in