Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Die Bedeutung von Pneumolysin für die Entstehung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie

- Eine experimentelle Untersuchung -

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Birgitt Gutbier
Tierärztin
aus Lüdenscheid

Berlin 2008

Journal-Nr.: 3247

Gefördert durch ein Promotionsstipendium der Charité

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin

der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Leo Brunnberg
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Helmut Hartmann
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Norbert Suttorp
Dritter Gutachter:	PD Dr. Dr. Petra Reinhold

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
Mice, laboratory animals, animal models, respiratory diseases, lungs, perfusion, streptococcus pneumoniae, immune response, platelet activating factor (MeSH), Hemolysin Proteins (MeSH)

Tag der Promotion: 08.12.2008

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-704-6
Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008
Dissertation, Freie Universität Berlin
D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.
Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.
No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

alle Rechte vorbehalten | all rights reserved
© **m**ensch und **b**uch **v**erlag 2009
choriner str. 85 - 10119 berlin
verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

„Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.“

Galileo Galilei

Für meine Familie und Freunde

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Definitionen 1

Tabellenverzeichnis 4

Abbildungverzeichnis 4

1 Einleitung 6

2 Literaturübersicht 8

2.1 Die Lunge 8
2.1.1 Anatomie 8
2.1.2 Lungenphysiologie 9
A) Lungenmechanik und Ventilation 9
B) Perfusion in der Lunge 11
C) Atemgase Sauerstoff und Kohlendioxid 13

2.2 Das endotheliale Zytoskelett 16
2.2.1 Aktin- und Myosinfilamente 16
2.2.2 Mikrotubulussystem 17
2.2.3 Interzelluläre Verbindungen des Endothels 19
2.2.4 Endotheliale Permeabilität 20

2.3 Entzündungsmediatoren 21
2.3.1 Lipidmediatoren 21
2.3.2 Arachidonsäure und Thromboxan 22

2.4 Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) 25
2.4.1 Einleitung 25
2.4.2 Chemische Struktur 25
2.4.3 Synthese 26
2.4.4 PAF-Rezeptor 29
2.4.5 Die Funktion des PAF 30
2.4.6 PAF induzierte Permeabilität 33
Intrazelluläre Signalwege bei der Permeabilitätsentstehung 34
2.4.7 PAF induzierte pulmonale Vaso- und Bronchokonstriktion 34
Intrazelluläre Signalwege der Vaso- und Bronchokonstriktion 35

2.5 Pneumonie 36

2.6 Pneumokokkeninfektion 38
2.6.1 *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken) 38
2.6.2 Verlauf 39
2.6.3 Wirtsspezifische Abwehrmechanismen 41
2.6.4 Prävention und Therapie 42

2.7 Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* 43
2.7.1 Pneumolysin 44

2.8 Akutes Lungenversagen (ARDS / ALI) 47

3 Material und Methoden 49

3.1 Tiere 49
3.1.1 Haltung 49

3.2 Infektionsversuche *in vivo* 50
3.2.1 Anzucht von *Streptococcus pneumoniae* 50
3.2.2 Intranasale Inokulation von *Streptococcus pneumoniae* 50
3.2.3 Ermittlung der pulmonalen Permeabilität 51
3.2.4 Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe 52
3.3 Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge (Ipml) 53
3.3.1 Aufbau der Versuchsanlage 53
A) Einleitung 53
B) Unterdruckkammer 53
C) Ventilation 54
D) Perfusion 54
3.3.2 Präparation der Lunge und experimentelles Protokoll 56
3.4 Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten 61
3.5 Extraktion und Bestimmung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) 62
3.6 Hydraulische Konduktivität von Endothelzellen 63
3.7 Transzellulärer elektrischer Widerstand von Endothel- und Epithelzellen 64
3.8 Immunzytochemische Färbung von VE-Cadherin und F-Actin 65
3.9 Statistische Datenanalyse 65
4 Ergebnisse 66
4.1 Eine pulmonale Barrierestörung entsteht in der Frühphase der murinen Pneumokokkenpneumonie unabhängig vom Neutrophileninflux 66
4.2 Aerosoliertes PLY beeinträchtigt die alveolokapilläre Barriere in der isoliert perfundierten Mauslunge 68
4.3 Intravaskulär verabreichtes PLY beeinträchtigt die alveolokapilläre Barriere und den pulmonalarteriellen Druck in der isoliert perfundierten Mauslunge 70
4.4 PLY erhöht die Permeabilität von humanen Endothelzell-Monolayern *in vitro* 74
4.5 PLY induziert an HUVEC-Monolayern die Bildung von interzellulären Spalten und Stressfasern 76
4.6 PLY erhöht die Permeabilität von humanen Epithelzell-Monolayern *in vitro* 78
4.7 Das modifizierte PLY Pd-B hat keinen Einfluss auf den pulmonalarteriellen Druck 79
4.8 Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) und Thromboxan (TXA_2) sind an der PLY-induzierter pulmonaler Hypertonie beteiligt 81
4.9 PC-PLC und PKC sind an der PLY-induzierten Signaltransduktion beteiligt, jedoch nicht die PI-PLC und IP_3 86
4.10 Die Rolle der Rho-Kinase in der PLY-induzierten Druckantwort 87
4.11 PAF ist an der Vermittlung PLY-induzierter Hyperpermeabilität beteiligt 88
5 Diskussion 90
5.1 Bedeutung von PLY im Verlauf der Pneumokokkeninfektion 91
5.2 PLY erhöht die epitheliale Permeabilität 93
5.3 PLY erhöht die endotheliale Permeabilität und den pulmonalarteriellen Widerstand in der isolierten Mauslunge 94
5.4 PLY erhöht endotheliale Permeabilität *in vitro* 95

5.5 Das modifizierte PLY Pd-B erzeugt keine pulmonale Hypertonie in der isolierten Mauslunge ... 96
5.6 PLY-induzierte pulmonale Hypertonie wird über PAF vermittelt ... 96
5.7 Die Beteiligung von TXA2 bei der PLY-induzierten und PAF-vermittelten pulmonalen Hypertonie ... 98
5.8 Der Signalweg der PLY-induzierten pulmonalen Hypertonie verläuft hauptsächlich über PC-PLC und PKC ... 99
5.9 Die Signalvermittlung bei der PLY-induzierten pulmonalen Hypertonie involviert den Rho-Kinase Weg ... 101
5.10 Die PLY-induzierte pulmonale Hyperpermeabilität wird über PAF vermittelt ... 102
5.11 Die Bedeutung von PLY und PAF für die Entstehung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie ... 102
6 Zusammenfassung ... 104
7 Summary ... 106
8 Literaturliste ... 108
9 Anhang ... 130
9.1 Studiendesign ... 130
9.1.1 Untersuchung im in vivo Modell der murinen Pneumokokkempneumonie ... 130
9.1.2 Untersuchung im ex vivo Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge ... 130
Intratracheale PLY-Applikation ... 130
Intravaskuläre PLY-Applikation ... 131
9.2 Material für das in vivo Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie ... 132
9.2.1 Geräte ... 132
9.2.2 Substanzen und Verbrauchsmaterialien ... 132
9.2.3 Herstellung eines Arbeitsstocks von *Streptococcus pneumoniae* ... 133
9.2.4 Herstellung der Nährlösung zur Anzucht von *Streptococcus pneumoniae* ... 133
9.3 Material für die Durchflusszytometrie ... 134
9.3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial ... 134
9.3.2 Substanzen und Antikörper ... 134
9.4 Material für das ex vivo Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge 135
9.4.1 Geräte ... 135
9.4.2 Substanzen ... 135
9.5 Material für Zellkulturversuche, die immunohistochemische Färbung des Lungengewebes und die PAF-Bestimmung ... 137
9.5.1 Geräte ... 137
9.5.2 Zellen, Substanzen und Antikörper ... 137
9.6 Immunoassays ... 139
9.7 Allgemeine Geräte, Substanzen und Verbrauchsmaterialien ... 140
Danksagung ... 141
Publikationen ... 143
Selbstständigkeitserklärung ... 144

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen und Definitionen

AA-8615: Lipoxygenase Inhibitor	FITC: Fluoreszeinisothiocynat
AK: Antikörper	GEF-H1: Guanine nucleotide Exchange Factor H1
ALI: Acut Lung Injury	GDP: Guanosin-di-Phosphat
2-APB: D9754 2-Aminoethyldiphenylborinat	GTP: Guanosin-tri-Phosphat
ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome	h: Stunde
AP: Alkalische Phosphatase	H^+: Wasserstoff-Ionen
AUC: Area Under Curve	HAP: Hospital Acquired Pneumonia
Aqua dest.: Aqua destillata	HBSS: Hanks Balanced Salt Solution
BAL: Bronchoalveoläre Lavage	HCO_3^-: Hydrogencarbonat (Bicarbonat)
BALF: Bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit	H_2O: Wasser
BIM: Bisindolylmaleimide	H_2O_2: Wasserstoffperoxyd
BM-13505: Daltroban	HIV: Humanes Immundefizienz -Virus
C: Compliance	HPLC: High Performance Liquid Chromatography
cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat	HRP: Horseradish Peroxidase (Merrettichperoxidase)
cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat	HSA: Humanes Serumalbumin
Ca^{2+}: Kalzium-Ionen	HUVEC: Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells
CAP: Community Acquired Pneumonia	Hz: Hertz
CDCs: Cholesterol-Dependent Cytolysins	I.E.: Internationale Einheit
CFU: Colony Forming Unit	Ig: Immunglobulin
CO_2: Kohlendioxid	i.n.: intranasal
COX: Cyklooxygenase	IP_3: Inositoltriphosphat
CbpA: Cholinbindingprotein A	i.p.: intraperitoneal
DAB: 3,3'- Diaminobenzidin	Ipml: isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge
D-609: O-Tricyclo[5.2.1.0 ^{2,6}] dec-9-yl Dithiocarbonat Potassium Salz	i.t.: intratracheal
EIA: Enzym-Immunoassay	i.v.: intravenös
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay	IRDS: Infant Respiratory Distress Syndrome
EP: Prostaglandinrezeptor	K^+: Kalium-Ionen
F-Aktin: filamentöses Aktin	kDa: Kilodalton
FACS: Fluorescence Activated Cell Sorting	KM: Körpermasse
FCS: Foetal Calf Serum	KO: knock out

kPa: Kilopascal	Pco_2: Kohlendioxidpartialdruck
LytA: Autolysin	Pd-B: Pneumolysoid Pd-B
L-108: 1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine	PEEP: Positive End-Expiratory Pressure
M: molar	PFA: Paraformaldehyd
MaP: Mikrotubulus-assoziiertes-Protein	Pg: Pikogramm
MAP: Mitogen Aktiviertes Protein	PGD_2, PGE_2, PGF_2: Prostaglandine der Zweierreihe
MF: Mikrofilamente	PGI_2: Prostacyklin
MLC: Myosin-Light-Chain	PI: Phosphatidylinositol
MLCK: Myosin-Light-Chain-Kinase	PI-PLC: phospatidylinositolspezifische Phospholipase C
mmHg: Millimeter Quecksilbersäule	PKC: Proteinkinase C
mΩ: Milliohm	PLA_2: Phospholipase A2
m-RNA: Messenger-Ribonuclein-Acid	PLC: Phospholipase C
MT: Mikrotubuli	PLY: rekombinantes Pneumolysin
n: Anzahl	PMN: Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
NaCl: Natriumchlorid	Po_2: Sauerstoffpartialdruck
NaOH: Natriumhydroxid	Ppa: pulmonalarterieller Druck
O_2: Sauerstoff	Ppl: intrapleuraler Druck
OCT: Optimal Cutting Temperature	PspA: Pneumococcal surface protein A
OD: Optische Dichte	P_{tm}: transmurale Druckdifferenz
P: Druckdifferenz	ΔP_{tm}: Zuwachs der transmuralen Druckdifferenz
PAF: Plättchen-aktivierender Faktor	r: Radius
PAF- C_{16}: β-Acetyl-γ-O-hexadecyl-L-α-phosphatidylcholine	R_L: Resistance
PAF-R: Plättchen-aktivierender Faktor Rezeptor	RZB: Relative Zentrifugationsbeschleunigung
PAF-$R^{-/-}$: PAF-Rezeptor defizient (knock out)	s: Sekunde
PBS : Phosphat Buffered Saline	SD: Standardabweichung
PC-PL: Phosphatidylcholinspezifische Phospholipase C	SpsA: Streptococcus pneumoniae sekretorisches IgA-Bindungsprotein

TER: transzellulärer elektrischer Widerstand	Vol.-%: Volumen-Prozent
TXA_2: Thromboxan	ΔV : Dehnung
TXB_2: Abbauprodukt von Thromboxan	WT: Wildtyp
V: Volumen	y: Oberflächenspannung
$\dot{V}$: Atemstromstärke	Y-27632: (R)-(+)-trans-N-(4-Pyridyl)-4-(1-aminoethyl) Cyclohexan carboxamid
VE-Cadherin: Vascular Endothelial Cadherin	

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Nomenklatur plättchenaktivierender Phospholipide (PAF)

Tab. 2.2: Definition von ALI und ARDS

Tab. 3.1: Substanzen für Experimente in der isoliert perfundierten Mauslunge

Abbildungverzeichnis

Abb. 2.1.: Dehnungskurve

Abb. 2.2.: Sauerstoffbindungskurve

Abb. 2.3.: Äquivalenz von Bohr- und Haldane-Effekt

Abb. 2.4.: Membranphospholipide und Präkursorfreisetzung

Abb. 2.5.: Struktur von 1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin (PAF)

Abb. 2.6.: Metabolismus von PAF

Abb. 2.7.: Juxtakrine Signalübertragung durch PAF

Abb. 3.1.: Versuchsaufbau für die isoliert perfundiert und ventilierte Mauslunge

Abb. 3.2.: Schematische Übersicht der Signalwege und der verwendeten Antagonisten

Abb. 4.1.: Ergebnisse aus dem in vivo-Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie
- A) Hyperpermeabilität der Lunge
- B) Neutrophile Granulozyten des Lungengewebes

Abb. 4.2.: Intratracheal aerosoliertes PLY beeinträchtigt die alveolokapilläre Barriere
- A) alveolokapilläre Permeabilität
- B) Bildung eines Lungenödems

Abb. 4.3.: Intravaskulär infundiertes PLY beeinträchtigt die alveolokapilläre Barriere
- A) vaskuläre Permeabilität
- B) HSA-Extravasation

Abb. 4.4.: Intravaskulär infundiertes PLY erzeugt pulmonale Hypertonie
A) Verlauf des Ppa
B) Area under curve (AUC) des Ppa
C) Lokalisation von PLY im Lungengewebe

Abb. 4.5.: PLY erhöht die Permeabilität in HUVEC-Monolayern
A) Hydraulische Konduktivität
B) Transzellulären elektrischen Widerstand (TER)

Abb. 4.6.: A-D) PLY-induzierte Bildung interzellulärer Spalten und Stressfasern an HUVEC's

Abb. 4.7.: PLY senkt den transzellulären Widerstand (TER) von A549-Monolayern.

Abb. 4.8.: Modifiziertes PLY Pd-B hat keinen Einfluss auf den pulmonalarteriellen Druck
A) Verlauf des Ppa
B) Area under curve (AUC) des Ppa

Abb. 4.9.: Intravaskulär infundiertes PLY erhöht den PAF-Gehalt im Lungengewebe
A) Erhöhter PAF-Gehalt in homogenisiertem Lungengewebe
B+C) PAF ist an der Induktion der pulmonalen Hypertonie durch PLY beteiligt
B) Verlauf des Ppa
C) Area under curve (AUC) des Ppa

Abb. 4.10.: Thromboxan (TXA_2) ist an der PLY- oder PAF-induzierten pulmonalen Hypertonie beteiligt
A) Nachweis von TXB_2 bzw. TXA_2
B) Verlauf des Ppa
C) Area under curve (AUC) des Ppa

Abb. 4.11.: Beeinflussung der PLY-induzierten pulmonalen Hypertonie

Abb. 4.12.: PAF ist an der Vermittlung PLY-induzierter Hyperpermeabilität beteiligt
A) vaskuläre Permeabilität
B) alveolokapilläre Permeabilität

1 Einleitung

Die ambulant erworbene Pneumonie (CAP = community acquired pneumonia) des Menschen ist die in den westlichen Industrieländern am häufigsten zum Tode führende Infektionskrankheit, und sie steht in der Mortalitätsstatistik weltweit an dritter Stelle.

Allein in Deutschland erkranken schätzungsweise 800.000 Menschen pro Jahr an einer Pneumonie. Knapp ein Drittel (ca. 240.000) musste nach Angaben des Statistischen Bundesamtes im Jahre 1998 ins Krankenhaus aufgenommen werden. Damit führte die ambulant erworbene Pneumonie häufiger zur stationären Aufnahme als beispielsweise Herzinfarkt (132.000 Aufnahmen) und Schlaganfall (162.000 Aufnahmen) (1). Insbesondere Menschen mit geschwächtem Immunsystem sind gefährdet (z.B. AIDS-Patienten, Menschen nach Organtransplantationen oder mit malignen Erkrankungen), sowie solche mit einer chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung.

Bakterielle Infektionen stehen als Ursache einer CAP im Vordergrund, und *Streptococcus pneumoniae* ist weltweit der häufigste Erreger. Beispielsweise werden in Deutschland mehr als 45% der ambulant erworbenen Pneumonien durch *Streptococcus pneumoniae* verursacht (2). Obwohl hochwirksame Antibiotika gegen Pneumokokken und andere Erreger der CAP zur Verfügung stehen, ist die Mortalität der ambulant erworbenen Pneumonie bei hospitalisierten Patienten mit etwa 10% weiterhin hoch (1;3). Darüber hinaus wurde ein deutlicher Anstieg Antibiotika-resistenter Pneumokokken verzeichnet. Während in Deutschland der Anteil Penicillin-resistenter Pneumokokken mit ca. 5% relativ gering ist, liegt er in den USA, Spanien, Griechenland und anderen europäischen Ländern bei über 40%. Ferner spielt die zunehmende Makrolid-Resistenz eine wichtige klinische Rolle und vereinzelt wurden bereits Cephalosporin-resistente Pneumokokken isoliert (4-6).

Ein komplizierter Pneumonieverlauf kann in ein akutes Lungenversagen münden, dessen Charakteristika die Bildung eines Lungenödems sowie die Entstehung einer pulmonalarteriellen Hypertonie sind. Die Gasaustauschfunktion der Lunge ist dadurch stark beeinträchtigt, und eine Beatmungstherapie wird notwendig. Bei diesem Krankheitsverlauf liegt die Mortalität bei 40-60% (7).

Das Ödem entsteht durch eine erhöhte Permeabilität der alveolokapillären Barriere. Dabei sind verschiedene Mechanismen während einer bakteriellen Infektion möglich:

Einerseits können im Alveolarraum bakterielle Produkte und Entzündungsreaktionen die alveolokapilläre Membran lokal schädigen. Andererseits kann eine Bakteriämie durch Erregerausschwemmung aus der Lunge in den Blutkreislauf verursacht werden und konsekutiv eine Lungenschädigung durch zirkulierende bakterielle Bestandteile oder sekundär freigesetzte Mediatoren des Wirtes bewirken. Insgesamt wird vermutet, dass eine inadäquate Reaktion des Wirtes auf den Erreger und seine Pathogenitätsfaktoren eine wesentliche Rolle für die hohe Morbidität und Mortalität der Pneumonie spielt (8). Die Kenntnis der hierfür relevanten pathophysiologischen Mechanismen könnte neue therapeutische Perspektiven bei der Pneumonie eröffnen.

Ziel des Vorhabens war es daher, für Pneumokokkenpneumonie-induziertes Lungenversagen relevante Effektorsysteme zu identifizieren. Besondere Beachtung fand dabei das zytoplasmatische Toxin Pneumolysin. Dieses kommt als wichtiger Pathogenitätsfaktor in allen klinisch relevanten Pneumokokkenisolaten vor. In einer experimentellen Studie sollte die Rolle des Pneumolysins für die Enstehung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie beurteilt werden. Im Fokus standen insbesondere Untersuchungen zum Einfluss von Pneumolysin auf die alveolokapilläre Barriere und auf die pulmonalvaskuläre Hämodynamik.

Dafür wurden geeignete Modelle auf verschiedenen Integritätsebenen eingesetzt: *in vivo* infizierte Versuchstiere, *ex vivo* isoliert ventilierte und blutfrei perfundierte intakte Mauslungen sowie *in vitro* Zellkulturen.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Lunge

Die Lunge ist ein Organ mit vielfältigen Aufgaben. Bei der äußeren Atmung wird Sauerstoff (O_2) mit der Inspirationsluft durch Atemwege in die Alveolen geleitet. Dort diffundiert er über die alveolokapilläre Membran zu den Erythrozyten, während Kohlendioxid (CO_2), das Produkt der inneren Atmung, in entgegengesetzter Richtung abgegeben wird.
Der unmittelbare Kontakt der Lungenoberfläche mit der kontaminierten Außenluft macht die Entwicklung eines komplexen Abwehrsystems gegen die verschiedensten von außen kommenden Schädigungen erforderlich. Daher ist die Lunge auch als spezifisches und unspezifisches Abwehrorgan zu verstehen, welches eng mit dem Immunsystem des Körpers verknüpft ist. Außerdem übernimmt die Lunge metabolische Aufgaben und nimmt Einfluss auf das Säure-Base-Gleichgewicht, die Temperaturregulation und den Wasserhaushalt des Organismus (9).

2.1.1 Anatomie

Die Lunge liegt im knöchernen Thorax und wird von der Pleura visceralis überzogen, die am Lungenhilus kontinuierlich in die Pleura parietalis übergeht. Gemäß der Verzweigung des Bronchialbaumes (Haupt-, Lappen-, Segmentbronchien) besteht das Organ aus zwei Flügeln (rechte und linke Lunge), die je nach Spezies unterschiedliche Lappungen und Segmentierungen aufweisen.
Beim Menschen besteht die rechte Lunge aus Ober-, Mittel- und Unterlappen, während linksseitig nur ein Ober- und Unterlappen vorhanden ist. Durch die Bronchusaufzweigung hinter dem jeweiligen Lappenbronchus ergeben sich pro Lappen eine unterschiedliche Anzahl an Segmenten (rechts sind es 10 und links meist 9) (9).
Die weitere Aufteilung der Bronchien in den einzelnen Lungenarealen geht von den mittleren und kleinen Bronchien über die Bronchioli zu den Bronchioli terminales. Diese münden in die Bronchioli respiratorii, welche in den Azini liegen. Diese bilden die terminale Grundeinheit, in der die Bronchioli respiratorii in den Alveolarsäckchen bzw. Alveolen enden, dem Ort des Gasaustausches (9).
Die Lunge der Maus weist einige anatomische Unterschiede zur menschlichen Lunge auf. So besteht die linke Hälfte nur aus einem Lappen, und die rechte Hälfte hat neben dem Ober-, Mittel- und Unterlappen noch einen Anhangslappen.

Eine weitere Besonderheit besteht im Wandaufbau des Bronchialsystems. Bei der Maus kommen nur in der Trachea offene, und weiter distal in den Hauptbronchien geschlossene Knorpelspangen vor. Im weiteren Verlauf des Bronchialsystems fehlen Knorpelanteile.
Beim Menschen sind bis zu den großen Bronchien Knorpelspangen vorhanden, und bis zu einer Bronchiengröße von 1mm Durchmesser kommen Knorpelinseln vor (10-12).
Ferner besitzt die Mauslunge kein bronchiales Gefäßsystem zur nutritiven Versorgung (Vasa privata) (13).

2.1.2 Lungenphysiologie

Zur Aufrechterhaltung der Lebensprozesse in den Körperzellen ist Energie nötig, zu deren Gewinnung die Zellen auf Sauerstoff (O_2) angewiesen sind. Dieser gelangt aus der Umgebung zu den Zellen. Gleichzeitig muss das im oxidativen Stoffwechsel entstandene Kohlendioxid (CO_2) abtransportiert werden.
Für diesen Gasaustausch bestehen spezielle Transportvorgänge, bei denen erstens die äußere Atmung - O_2-Transport in den Alveolarraum durch die Lungenbelüftung (Ventilation) und die dortige Diffusion ins Blut (pulmonaler Gasaustausch) - und zweitens die innere Atmung - Verbrauch von O_2 und Bildung von CO_2 im Zellstoffwechsel (Gewebeatmung) - unterschieden werden kann. Äußere und innere Atmung sind über den erythrozytären Gastransport im Blut miteinander verbunden (14).
Die Regulation der Atmung wird durch verschiedene zentrale, chemische und mechanische Vorgänge gesteuert (15).

A) Lungenmechanik und Ventilation

Das Ein- und Ausatmen der Luft wird durch die Aktivität der Atemmuskeln erzeugt, die zu einer rezidivierenden Volumenveränderung der Lunge führt. Nicht nur die Stärke der Muskelkraft bestimmt dabei die Tiefe der Atemzüge, sondern auch die Elastizität der Lunge und des Thorax. Das passiv-elastische Verhalten von Lunge und Thorax wird durch die Ruhedehnungskurve bestimmt, welche die Abhängigkeit des Volumens (V) vom dehnenden Druck (Innendruck minus Außendruck = transmurale Druckdifferenz P_{tm}) beschreibt.
Die Kurvenkrümmung zeigt an, dass der Zuwachs der transmuralen Druckdifferenz (ΔP_{tm}), der zur Dehnung (ΔV) benötigt wird, mit zunehmender Füllung ansteigt.
Das Verhältnis dieser beiden Größen, und somit die Steigung der Kurve, wird als Dehnbarkeit oder Compliance bezeichnet ($C = \Delta V / \Delta P_{tm}$). Diese nimmt mit steigendem Volumen ab (siehe Abb.2.1).

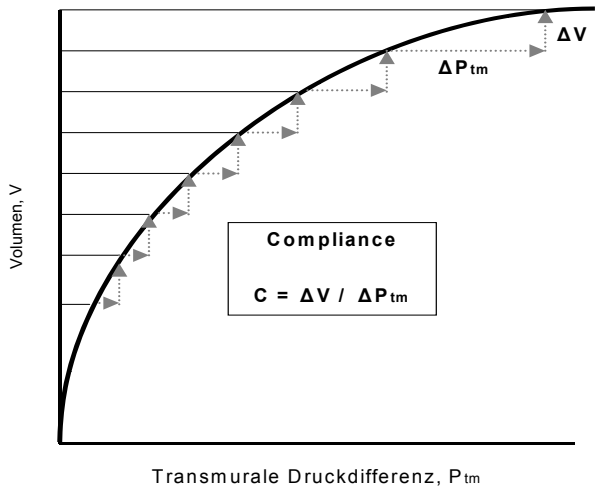


Abbildung 2.1: Dehnungskurve
Mit ansteigendem Volumen (V) wird der zur Dehnung (ΔV) benötigte Zuwachs der transmuralen Druckdifferenz (ΔPtm) größer, und somit die Dehnbarkeit oder Compliance kleiner (Abbildung nach (14)).

Die Compliance der Lunge wird durch drei Faktoren bestimmt:

1) Durch die eigenen elastischen Fasern und ihre Anordnung.
2) Durch Oberflächenkräfte in den Alveolen und einen Film oberflächenaktiver Substanzen.
3) Durch Verankerung jeder Alveole im umgebenden Lungengewebe, wodurch der Kollaps einer Alveole durch die Retraktionskräfte des umgebenden Gewebes verhindert wird.

An gekrümmten Grenzflächen zwischen einer flüssigen und gasförmigen Phase, also in den Alveolen, entstehen Oberflächenkräfte, die der Lungendehnung entgegenwirken. Nach Laplace ist die entstehende transmurale Druckdifferenz in einer von Flüssigkeit umgebenen Gasblase abhängig vom Radius (r) der Blase und von der Oberflächenspannung (γ) der Flüssigkeit an der Grenzfläche ($P_{tm} = 2\gamma / r$). Danach müsste sich in der Atemruhelage eine sehr hohe transmurale Druckdifferenz bilden. Durch einen Film oberflächenaktiver Substanzen auf der Alveolarinnenfläche, dem Surfactant, wird die Oberflächenspannung jedoch herabgesetzt, und somit auch die Druckdifferenz. Diese Phospholipide werden von Alveolarepithelzellen Typ II (Septalzellen) gebildet. Sie wirken ähnlich wie ein Detergens und haben Anteil an der Immunabwehr.

Die Atemmuskeln, insbesondere das Zwerchfell, beeinflussen bei der Ventilation aktiv die Ausdehnung des Thorax. Dabei entsteht im selbigen ein Unterdruck, wodurch die Luft in die Lunge strömen kann. Die Expiration erfolgt passiv durch die elastischen Rückstellkräfte. Nur bei vermehrter Atmung wird die Exspiration, insbesondere von der Bauchmuskulatur, aktiv unterstützt. Eine Luftströmung im Atemtrakt kann nur erfolgen, wenn eine treibende Druckdifferenz (Strömungsdruck) besteht. Beim Einatmen muss der Druck am Mund höher sein als in den Alveolen (P_A), bei der Ausatmung ist es umgekehrt. Das Verhältnis dieser Druckdifferenz zur Atemstromstärke ($\dot{V}$) ist der Atemwegswiderstand, oder Resistance ($R_L = (P_A - P_{Mund}) / \dot{V}$), der hauptsächlich vom Atemwegsquerschnitt abhängt. Je mehr Luft pro Zeiteinheit ein- und ausgeatmet wird, desto höher muss folglich die treibende Druckdifferenz sein, wenn die Resistance konstant bleibt. Je höher andererseits die Resistance ist, desto höher muss die treibende Druckdifferenz zur Erzeugung einer gegebenen Atemstromstärke sein. Des Weiteren sinkt die Resistance mit zunehmendem Lungenvolumen und steht unter der Kontrolle des vegetativen Nervensystems. Die glatte Bronchialmuskulatur wird durch den Parasympathikus (mit u.a. Acetylcholin als Transmitter) kontrahiert, der Sympathikus (u.a. Noradrenalin) und zirkulierendes Adrenalin führen zur Relaxation (über β2 – Adrenozeptoren) (14).

B) Perfusion in der Lunge

Die intravasalen Drücke in der Lungenstrombahn sind im Vergleich zum Systemkreislauf sehr niedrig. Die Blutströmung hängt wesentlich von hydrostatischen Effekten und von perivaskulären Drücken ab. Diese sind entlang der Lungenstrombahn nicht einheitlich, so dass vereinfacht drei Gefäßabschnitte unterschieden werden können:

1) Die großen extrapulmonalen Gefäße liegen im Mediastinum, wo intrapleuraler Druck (P_{pl}) herrscht. In der Regel ist dieser negativ und „zieht“ von außen an den Gefäßen, so dass sie offen gehalten werden (bei Inspiration ist dieser Effekt verstärkt, da P_{pl} einen größeren negativen Wert annimmt).
2) Arterien- und Venenäste, welche die Bronchien begleiten, sind von elastischem Lungengewebe umgeben. Auch in diesem Kompartiment ist der perivaskuläre Druck ähnlich dem Pleuradruck.
3) Wenn man den Zug der Oberflächenkräfte vernachlässigt, sind die alveolären Kapillaren vom Alveolardruck umgeben.

Des Weiteren ist der pulmonale vaskuläre Widerstand gering, so dass trotz geringer treibender Druckdifferenz ein großes Blutvolumen je Zeiteinheit die Lunge passieren kann.

Der Widerstand wird durch Erweiterung bereits durchströmter Gefäße und durch Eröffnung zuvor nicht durchströmter Gefäße (Rekrutierung) erniedrigt.
Dieses druckpassive Verhalten ist auch der Grund dafür, dass die unteren basalen Lungenbezirke besser durchblutet werden als die oberen apikalen.
Durch die Schwerkraft ist der hydrostatische Druck beim aufrechten Thorax des Menschen in den unteren Arealen höher als in den oberen. Es gibt daher einen starken vertikalen Durchblutungsgradienten in der aufrechten Lunge, der nach einem Modell von West et al. von apikal nach basal in drei Zonen einteilbar ist (14).
In den apikalen Lungenspitzen (Zone I) ist teilweise der Druck in den Alveolen höher als in den Kapillaren, wodurch diese komprimiert werden. Das Areal wird nicht mehr durchblutet, und somit findet kein Gasaustausch statt (Totraumbelüftung).
Dem gegenüber sind die Kapillaren an der Basis immer durchblutet. Denn hier übersteigt der hydrostatische Druck den alveolären, wodurch die Gewäße geweitet werden. (Zone III).
In dem Bereich dazwischen (Zone II) ist der Alveolardruck höher als in den pulmonalvenösen Gefäßen, aber niedriger als in den pulmonalarteriellen. Somit kommt es an den Stellen, wo der Blutdruck der Kapillare den alveolären Druck unterschreitet, zum Gefäßkollaps.

Auch die Ventilation ist nicht homogen in der Lunge verteilt. Die basalen Lungenabschnitte hängen an den apikalen, dehnen sie und machen ihre Alveolenwände steif. In den apikalen Lungenabschnitten ist daher die Ventilation schlechter als in den basalen, allerdings ist der vertikale Gradient nicht so stark ausgeprägt wie bei der Perfusion.
Diese Inhomogenität führt dazu, dass insbesondere die alveolären und kapillären O_2-Partialdrücke regional unterschiedlich sind, wodurch die Gasaustauscheffizienz beeinträchtigt wird (14).
Auch die Lunge von Tieren weist diese ungleichmäßige Verteilung von Perfusion und Ventilation auf. Allerdings verlaufen hier die Gradienten von den ventralen Lungenabschnitten zu den dorsalen. Das heißt, die ventralen Lungenanteile sind stärker durchblutet und ventiliert als die dorsalen, wobei auch hier der Gradient der Ventilation nicht so stark ausgeprägt ist wie der für die Perfusion (16).

Dem Verteilungsmodus von Ventilation und Perfusion liegt zudem eine aktive Beeinflussung des Strömungswiderstandes der Lungengefäße zugrunde. Die regional stattfindende hypoxische pulmonale Vasokonstriktion, welche nach den Erstbeschreibern als Euler-Liljestrand Mechanismus bezeichnet wird, führt zu einer Umverteilung des Blutes aus hypoxischen Arealen in besser oxygenierte Gebiete der Lunge, um damit den physiologischen Shunt-Anteil gering zu halten.

Das Absinken des O_2-Partialdrucks in den Alveolen verursacht diese Konstriktion der Arteriolen (Ø 200-400 µm). Die Hypoxie wirkt vermutlich direkt auf die glatten Muskelzellen in den Gefäßwänden. Die hypoxische Vasokonstriktion ist eine Besonderheit der Lungenstrombahn, denn im Körperkreislauf führt Hypoxie zur Vasodilatation, um die Oxygenierung des Gewebes zu intensivieren und gleichzeitig die CO_2-Eliminierung zu gewährleisten.
Die Wirkung der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion kann durch Medikamente, z.B. Vasodilatoren wie Stickstoffmonoxid (gebildet im Endothel erhöht es cGMP, wodurch Gefäßmuskeln relaxieren), eingeschränkt werden (14).

C) Atemgase Sauerstoff und Kohlendioxid

a) Sauerstoff:

Die treibenden Kräfte der Gasdiffusion in der Lunge zwischen Alveolarraum und dem Inneren der Erythrozyten sind die Partialdruckgefälle. Auf dem Weg von der Lunge hin zur Zelle nimmt der Po_2 kontinuierlich ab. Zwischen Alveole und Kapillare ist ein Druckunterschied für O_2 von ca. 8 kPa vorzufinden (Po_2 in den Alveolen ca. 13,3kPa; Po_2 im venösen Blut ca. 5,33 kPa). Durch dieses Partialdruckgefälle kann O_2 in physikalischer Form durch die alveolokapilläre Membran in das Blut diffundieren. Der Diffusionsweg misst dabei 1-2 µm und ist somit kurz genug, um einen Partialdruckausgleich innerhalb der Kontaktzeit zwischen Alveole und Erythrozyt zu erreichen. Der Sauerstoff bindet im Blut zum größten Teil in chemischer Form an das Hämoglobin der Erythrozyten, und gelangt auf diesem Wege zu den Gewebezellen, in die er hinein diffundiert.
Die O_2-Affinität des Hämoglobins wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, z.B. durch den Po_2, pH-Wert und Pco_2 des Blutes, den Elektrolythaushalt, die Körpertemperatur und die chemischen Struktur des Hämoglobins. Das Verhältnis zwischen Po_2 und der O_2-Konzentration im Blut (bzw. die Konzentration oxygenierten Hämoglobins), lässt sich in der Sauerstoff-Bindungskurve (siehe Abb. 2.2) darstellen, in der beide Werte gegeneinander aufgetragen werden. Eine Verminderung oder Zunahme der O_2-Affinität des Hämoglobins, zeigt sich entweder in einer Rechts- oder Linksverschiebung dieser Kurve (14).
Eine Rechtsverschiebung zeigt sich z.B. im peripheren Gewebe. Durch hohen Pco_2 bzw. relativ niedrigen pH-Wert wird O_2 vermehrt vom Hämoglobin abgegeben.
Die Linksverschiebung ist z.B. in Lungenkapillaren zu beobachten. Der pH steigt hier wieder und Pco_2 ist niedrig, daher kann viel O_2 aufgenommen werden (Bohr-Effekt).

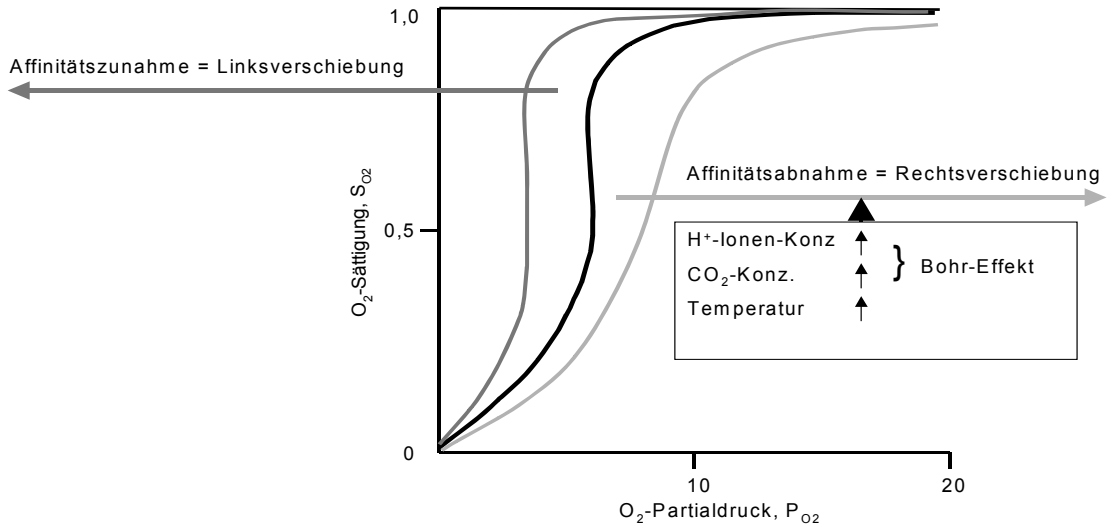


Abbildung 2.2: Sauerstoffbindungskurve
Faktoren in Erythrozyten, die die O_2-Affinität beeinflussen und so zu einer Rechts- (Affinitätsabnahme) oder Linksverschiebung (Affinitätszunahme) der Sauerstoffbindungskurve führen (Abbildung modifiziert nach (14)).

b) Kohlendioxid:

Kohlendioxid, das Endprodukt des aeroben Stoffwechsels, wird durch das Herz-Kreislauf-System aus dem Gewebe zur Lunge befördert, wo es anschließend abgeatmet wird. CO_2 liegt im Blut in drei Formen vor. Zum einen physikalisch gelöst und zum anderen in zwei unterschiedlichen chemischen Bindungen.

Das in den Körperzellen gebildete CO_2 wird physikalisch gelöst und diffundiert entlang des Partialdruckgefälles (Pco_2 in der Zelle 6,13 kPa, im arteriellen Blut 5,33 kPa) in die benachbarten Blutkapillaren. Dadurch wird der Pco_2 des Blutes auf ca. 6,13 kPa erhöht. Dieses venöse Blut gelangt zu den Lungenalveolen, in denen der Pco_2 ca. 5,33 kPa beträgt, womit wieder ein Druckgradient gegeben ist, der die Diffusion ermöglicht.

Nur ein geringer CO_2-Anteil bleibt bei diesem Transport physikalisch gelöst. Der größte Teil des CO_2 im Blut wird chemisch gebunden. Zum einen an Hämoglobin in Form von Hydrogencarbonat (Bicarbonat/ HCO_3^-) was den größten Teil ausmacht, und zum anderen als Carbamat an freie Aminogruppen der Proteinenden (besonders des Hämoglobins).

Hydrogencarbonatgleichgewicht: $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$

Carbamatgleichgewicht: $CO_2 + R - NH_2 \rightleftharpoons R - NH + H^+$

Der Gehalt an CO_2 im Blut ist vom Pco_2 abhängig, was graphisch in einer CO_2-Bindungskurve dargestellt werden kann. Der Verlauf dieser Kurve ist von der O_2-Sättigung des Hämoglobins abhängig. Bei gleichem Pco_2 kann vollständig O_2-gesättigtes Blut weniger CO_2 binden, als O_2-freies. Dieses Phänomen wird Haldane-Effekt genannt und beruht wie der Bohr-Effekt auf der allosterischen Wechselwirkung der H^+- und O_2-Bindung am Hämoglobin (siehe Abb. 2.3). Außerdem ist ein Teil der Carbamatbindung des CO_2 von der O_2-Sättigung abhängig. Die Erhöhung des Po_2 in der Lunge erleichtert die Freisetzung von CO_2 aus der chemischen Bindung. Folglich erniedrigt sich die Konzentration von HCO_3^- und Carbamat und der Pco_2 steigt an, wodurch CO_2 besser in die Alveolen diffundieren kann. Im Gewebe bewirkt die O_2-Entsättigung eine Zunahme der CO_2-Bindung im Blut.

Aus den oben abgebildeten Gleichgewichtsreaktionen des CO_2 wird ersichtlich, dass die chemische CO_2-Bindung mit Bildung von H^+-Ionen einhergeht. Wird eine größere Menge gebunden, muß für die Pufferung dieser H^+-Ionen gesorgt werden. Eine wichtige Pufferfunktion übernimmt z.B. das Hämoglobin bedingt durch die allosterische Wechselwirkung der H^+- und O_2-Bindung.

Die Atmung hat somit über den Kohlendioxidaustausch Einfluss auf den Säure-Base-Haushalt des Organismus. Zum Beispiel kann eine Azidose oder Alkalose durch Hyper- bzw. Hypoventilation bis zu einem gewissen Grad kompensiert aber auch verursacht werden (14).

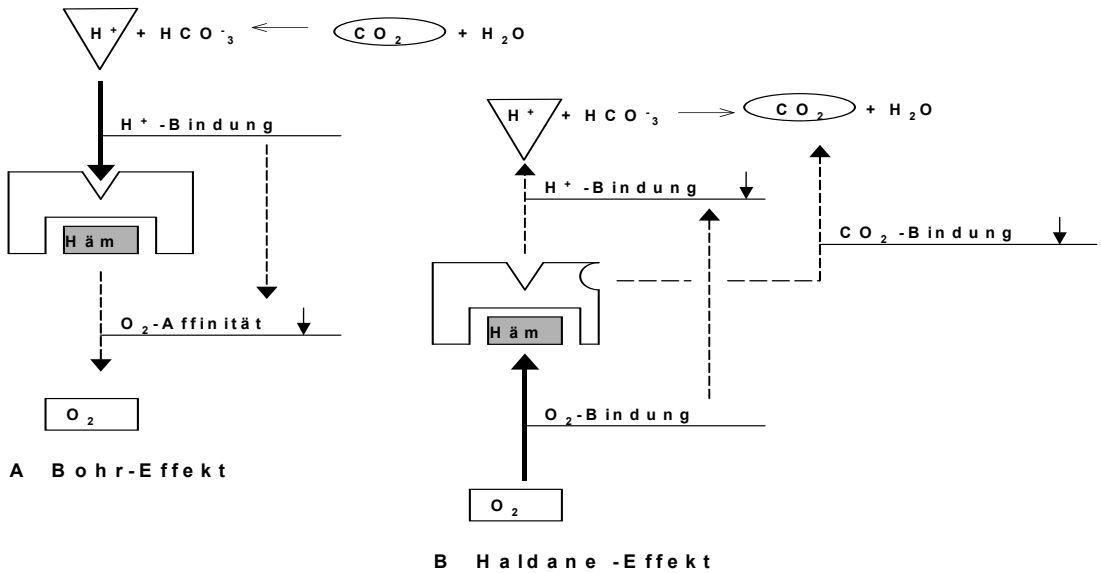


Abbildung 2.3: Äquivalenz von Bohr- und Haldane-Effekt

A Der Bohr-Effekt beschreibt die Auswirkung einer Änderung der H^+-Konzentration für die O_2-Bindung am Hämoglobin.

B Beim Haldane-Effekt beeinflusst eine Änderung der O_2-Beladung die H^+-Bindung am Hämoglobin (Abbildung modifiziert nach (14)).

2.2 Das endotheliale Zytoskelett

2.2.1 Aktin- und Myosinfilamente

Das pulmonal-endotheliale Zytoskelett setzt sich aus filamentären Polymeren zusammen, dem F-Aktin (Mikrofilamente), dem Mikrotubulussystem und den Intermediärfilamenten.
Im Zusammenspiel mit spezifischen Bindeproteinen formen diese drei Filamenttypen ein dynamisches dreidimensionales Netzwerk, das formgebend für die Zelle ist (17).
Die innere Oberfläche des gesamten vaskulären Gefäßsystems wird von einem kontinuierlichen Endothelzellmonolayer ausgekleidet. Als semipermeable Grenze ist seine Hauptaufgabe die Regulation der Barrierefunktion zwischen Blut und Interstitium.
Aufgrund seiner anatomischen Lokalisation ist der Endothelzellverband permanent hämodynamischen Belastungen (Blutfluss und -druck, Gefäßwandausdehnung) und anderen Einflüssen (Ischämie, Hypoxie etc.) ausgesetzt. Um trotzdem seine Funktion erfüllen zu können, muss die strukturelle innere Integrität des Zellverbandes gegeben sein, was eine aktive Veränderung der Zellform und gleichzeitige Anpassung der intrazellulären isometrischen Kräfte erfordert (18-21).
Ein durch Aktin und Myosin gesteuertes kontraktiles Zytoskelett ist mit verantwortlich für aktive zelluläre Formveränderungen. Auch dem Mikrotubulussystem kommt in der Regulation der kontraktilen Prozesse eine wesentliche Bedeutung zu (22-24). In den verschiedenen Muskelzellen führen Aktinfilamente (f-Aktin) im Zusammenspiel mit Myosin zu einem geordneten Kontraktionsablauf. In Endothelzellen ist f-Aktin hauptsächlich in der Zellperipherie zu finden. Im engen Kontakt zur Zellmembran bildet es dort ein dichtes Netzwerk, welches der Zelle Stabilität verleiht und über spezifische Bindeproteine Kontakt zu Nachbarzellen und zur extrazellulären Matrix aufrecht hält (17;18;25;26).
Bestehend aus polymerisierten Aktinmonomeren, die im Zytoplasma vorliegen (G-Aktin), stellen Aktinfilamente die dünnste filamentäre Struktur des Zytoskeletts dar (Ø ca. 5-7 nm). Sie werden daher auch als Mikrofilamente bezeichnet. Drei Gruppen können in Endothelzellen unterschieden werden:

1) F-Aktinnetz des Zellkortex,
2) F-Aktin des Adhäsionsgürtels und der Fokalkontakte
3) F-Aktin der Stressfasern.

Alle haben unterschiedliche Aufgaben, die über Aktin bindende Proteine gesteuert werden.

Zu 1) Der Zellkortex ist ein dichtes Netzwerk aus F-Aktin mit der Hauptkomponente Myosin und Fodrin, welches in der Zellperipherie mit engem Kontakt zur Plasmamembran liegt. Er trägt zur Zellstabilisierung bei, beteiligt sich an Umformungen der Plasmamembran und steuert Prozesse der Endo- und Exozytose (17;19;26).

Zu 2) Junktionale Aktinfilamente kommen in der gesamten Peripherie der Endothelzellen vor und werden als „peripheral dense band“ bezeichnet. Durch verschiedene Bindeproteine bestehen indirekte lokale Verknüpfungspunkte zwischen intrazellulären Mikrofilamenten und der extrazellulären Matrix (Fokalkontakte) sowie zwischen intrazellulären Mikrofilamenten und den benachbarten Endothelzellen (Adhäsionsgürtel) (18;19;25;27). Solche Mikrofilamente sind an der Aufrechterhaltung der Barrierefunktion des Endothels beteiligt (19;25;28-30).

Zu 3) Mikrofilamentäre Stressfasern sind in ihrem Aufbau den Sarkomeren der Muskulatur ähnlich. Hauptsächlich bestehen sie aus gebündeltem F-Aktin. Es kommen aber auch Myosinfilamente und andere Proteine vor (Myosinleichtekettenkinase, Caldesmon etc.) (19;31;32). Innerhalb von Endothelzellen und dem Endothelzellverband haben sie eine protektive Funktion gegenüber Verletzungen durch erhöhte Scherkräfte (19;26;33). Endothelzellen, die strömungsbedingt erhöhten Scherkräften ausgesetzt sind, bilden mehr Stressfasern (17;19;26). Durch die Nähe zur oberflächlichen Plasmamembran, die Fähigkeit zur Kontraktion und die Verbindung mit Fokalkontakten innerhalb der Plasmamembran haben Stressfasern die Möglichkeit, Zugkräften nach außen entgegenzuwirken und die Zelle vor Verletzungen zu schützen (26;31;33;34).

Im Zusammenwirken mit Myosin und der Myosinleichtekettenkinase können Stressfasern kontraktile Einheiten bilden, die zu Lückenbildung und Permeabilitätszunahmen pulmonaler Endothelzellen führen (30;35-38).

2.2.2 Mikrotubulussystem

Die aus Tubulin bestehenden zylindrisch geformten Mikrotubuli (MT) sind mit einem Ende an das Zentrosom gekoppelt (MT-Keimbildungszentrum) und strahlen von dort sternförmig in die Zellperipherie aus. 13 Protofilamente bilden den 25 nm starken Zylinder. Diese sind jeweils aus einer Folge von polymerisierten Heterodimeren, bestehend aus α- und β-Tubulin, aufgebaut (18;39;40).

Die Protofilamente sind alle parallel und mit der gleichen Ausrichtung der Heterodimere aneinander gelagert, so dass jedes Mikrotubulusfilament eine Polarität mit einem „Plus-“ und „Minus-Ende“ erhält. Das „Plus-Ende“ zeigt vom Zellkern in Richtung Zellmembran, das „Minus-Ende“ ist im Zentrosom verankert (18;39;41).

Mikrotubuli sind hochdynamische Strukturen, die ständig am „Plus-Ende“ bei GTP-GDP-Nukleotid-Hydrolyse polymerisieren bzw. depolymerisieren (18;39;42). Durch stetiges Wachstum oder raschen Zerfall kann sich die Ausrichtung bzw. Lage der Mikrotubuli in der Zelle ständig ändern, wodurch die Ausrichtung von Zellorganellen neu strukturiert und die Zellpolarität verändert werden kann (18;40). Für die Ausbildung und Organisation der Mikrotubulusstruktur sind Mikrotubulus-assoziierte-Proteine (MaP) verantwortlich (18;39).

Die Aufgabe des Mikrotubulussystems besteht demnach in der Aufrechterhaltung der strukturellen Stabilität von Zytoskelett und Zellform, sowie der Beeinflussung der Zellpolarität (18;40). Studien mit Fibroblasten, bei denen depolymerisierende Substanzen zum Einsatz kommen, lassen noch auf weitere Funktionen des MT-Systems schließen. Denn nach der MT-Depolymerisation kommt es zur Zunahme unkoordinierter Zellmotilität und Ausreifung fokaler Adhäsionen kombiniert mit Stressfaserbildung (43;44). Dies deutet auf eine Beteiligung der MT an der Koordination und Regulation von Zellbewegungen, Zell/Zell- und Zell/Matrixverbindungen hin.

Durch diese unterschiedlichen Aufgaben des MT-Systems kann vermutet werden, dass es auch zur Aufrechterhaltung der endothelialen Barrierefunktion beiträgt. Zum Beispiel zeigen Untersuchungen von Verin et al. (45) anhand elektrischer transendothelialer Widerstandsmessungen eine direkte Korrelation zwischen der MT-Depolymerisation und endothelialer Barrierefunktionsstörung (45).

Die unterschiedlichen Bausteine des Zytoskeletts sind miteinander verwoben, was biochemisch von Griffith und Pollard für Interaktionen zwischen MT- und Aktinfilamentsystemen gezeigt werden konnte (46-48). MaPs spielen bei diesen Interaktionen eine wichtige Rolle, da sie die Möglichkeit haben, an Aktinfilamente zu binden (49;50). Werden MaPs, Aktin- und MT-Filamente zusammengemischt, entstehen gelartige Netzwerke, was vermuten lässt, dass MaPs mindestens zwei Bindungsregionen (Mikrotubulus/Aktin-Domäne) aufweisen müssen, die getrennt auf dem Molekül lokalisiert sind (49;50). Nur durch exaktes Zusammenspiel der einzelnen Zytoskelettfilamente bleibt die Struktur der Endothelzellen, und somit auch der Endothelzellmonolayer, bestehen, was Voraussetzung für eine intakte semipermeable Barriere zwischen intra- und extravasalem Raum ist. Kommt es zur Verschlechterung dieser Barrierefunktion (z.B. durch inflammatorische Prozesse), entsteht durch Permeabilitätszunahme eine vaskuläre „Leckage“ und ein interstitielles Ödem (19;25).

2.2.3 Interzelluläre Verbindungen des Endothels

Interzelluläre Verbindungen sind spezielle Regionen der Plasmamembran, die sich beim Kontakt zweier benachbarter Zellen bilden. Sie bestehen aus adhäsiven Proteinen, welche komplexe Strukturen bilden. Meistens handelt es sich dabei um Transmembranproteine, die in der Zelle mit einem Netzwerk aus Zytoskelettkomponenten verknüpft sind.

Bei benachbarten Endothelzellen wird dies durch die Zonula adhaerens (adherens junction) und Zonula occludens (tight junction) organisiert. Diese Strukturen spielen eine wichtige Rolle in der vaskulären Hämostase, unterscheiden sich aber in ihrer Lokalisation an der Außenmembran, ihrer Verteilung innerhalb des gesamten Gefäßsystems und in ihren Strukturproteinen (51).

Ein wichtiges Strukturprotein der Zonula adhaerens ist das endothelspezifische VE-Cadherin, welches wichtige Funktionen in der Angiogenese und vermutlich auch in der vaskulären Permeabilitätskontrolle und Leukozyteninfiltration übernehmen kann.

Der intrazelluläre Teil von VE-Cadherin interagiert mit β-Catenin und Plakoglobin (Proteine der Armadillofamilie). Sie binden an α-Catenin und vermitteln so eine Bindung von VE-Cadherin an das Aktinskelett (52).

Findet eine Tyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin statt, nimmt seine Affinität zu β-Catenin und Plakoglobin ab, und es bindet an p120, einem weiteren Protein der Armadillogruppe. P120 kann aber nicht an α-Catenin binden, und somit entsteht auch keine Verbindung von VE-Cadherin zum Zytoskelett (52). In dieser Form ist es VE-Cadherin nur möglich, Einfluss auf die gegenseitige Erkennung und Adhäsion von benachbarten Zellen zu nehmen, nicht aber auf die parazelluläre Permeabilität (53). Dies lässt vermuten, dass der VE-Cadherin-Komplex für die Stabilisierung der Zonula adhaerens erforderlich ist.

Deutlich wird dies auch durch *in vivo*-Studien, bei denen VE-Cadherin durch die Verabreichung von monoklonalen Antikörpern geblockt wird. Die vaskuläre Permeabilität nimmt dabei jeweils dramatisch zu. In einer Studie konnten gleichzeitig Endothelschäden sowie die Deposition von Thrombozyten und Leukozyten ins Subendothelium beobachtet werden (54). In einer anderen *in vivo*-Untersuchung wird die Emigration von Neutrophilen in das inflammatorisch veränderte Peritoneum beobachtet (55).

Des weiteren geht die stabilisierende Funktion des VE-Cadherin-Catenin-Komplexes bei der Permeabilitätskontrolle konform mit der Beobachtung, dass er in seiner Struktur durch permeabilitätserhöhende Agenzien beeinflusst wird, wie Thrombin und Histamin (56;57).

Wärend die Strukturen der Zonula adhaerens ubiquitär innerhalb des Gefäßsystems verteilt sind, kommt die Zonula occludens nur in begrenzten Regionen vor.

Sie sind besonders dort zu finden, wo die genaue Kontrolle der Permeabilität gefordert ist, wie in den arteriellen Endothelien und Gehirnkapillaren. An den Zellen selbst befindet sich diese Struktur apicaler als die Zonula adhaerens. Wichtige Bausteine in der Zonula occludens sind die Transmembranproteine Ocludin, das endothelspezifische Claudin-5 und das Junctionale Adhäsionsmolekül 1 (JAM1). Diese drei Proteine sind mit intrazellulären Molekülen (ZO-1, ZO-2, ZO-3, Cingulin, AF6 und Symplekin) verbunden, über die Kontakt zum Aktinskelett besteht.

Neben der Zonula adhaerens und occludens gibt es noch andere adhäsive Proteine für interzelluläre Kontakte im Endothel, wie z.B. PECAM (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule), S-Endo-1, CD34, Endoglin und VE-Cadherin 2. Einige Strukturen, wie PECAM und CD34, werden nicht nur im Endothel exprimiert, sondern auch in zirkulierenden Monozyten, Neutrophilen und Thrombozyten (52).

2.2.4 Endotheliale Permeabilität

Als Antwort auf verschiedene endogene und exogene Endzündungsmediatoren bilden sich interzelluläre Spalten (Gaps) zwischen den Endothelzellen (25;30;58). Bei der Regulation parazellulärer endothelialer Permeabilität übernimmt das kontraktile aktinfilamentäre-Zytoskelett eine Kontrollfunktion (19;25;30;59;60). Werden z.B. durch Botulinum 2-Toxin Aktin-Filamente depolarisiert, ist die endotheliale Barrierefunktion gestört (25;29;61), während bei einer Stabilisierung der Mikrofilamente (MF) mit Phalloidin die Permeabilität des Monolayers sinkt (19;28;29).

Untersuchungen von Schnittler et al. (30) zeigen, dass Gap-Formierungen durch Aktomyosin-abhängige, kontraktile Mechanismen über die Myosin-leichte-Kette-Kinase (MLCK) gesteuert werden. Die dabei entstehenden Kontraktionen finden im Bereich der junktionalen Netzwerke statt (30;35;37).

Zell/Zell- bzw. Zell/Matrixverbindungen werden durch Aktin-basierende Systeme verankert. Im Bereich fokaler Kontakte sind z.B. F-Aktine indirekt über Transmembranrezeptoren (wie Integrine) bzw. junktionale Bindeproteine (wie α–Actinin), miteinander verbunden.

Als Antwort auf Entzündungsmediatoren werden Signalwege diskutiert, die über junktionale Aktin-Systeme zu einer Permeabilitätszunahme führen. Einer dieser Wege geht über die Proteinkinase C spezifische Phosphorylierung junktionaler Bindungsproteine, was zur Aktin-Reorganisation, Zellabrundung und Zunahme parazellulärer Permeabilität führt (25;44).

Ein anderer möglicher Weg ist die Aktivierung der MLCK, worauf eine Aktomyosin-basierende Zellkontraktion erfolgt (23;43).

Wie bereits erwähnt, zeigen neuere Studien, dass auch das Mikrotubulussystem an der Regulation kontraktiler Prozesse beteiligt ist (22-24;45;62;63).
Einige Untersuchungen weisen auf eine GEF-H1 Freisetzung sowie auf eine Aktivierung der kleinen GTP-bildenden Rho-Proteine hin, die zu einer Zunahme der MLC-Phosphorylierung führt (23;43;45). Die genauen biochemischen Abläufe, die zytoskelettäre Veränderungen und Kontraktionen nach Störung der Mikrotubuli verursachen, sind jedoch nicht vollständig geklärt.

2.3 Entzündungsmediatoren

Die Widerstände der pulmonalen Bronchialwege und Gefäßbahnen werden durch nervale und humorale Einflussfaktoren kontinuierlich modifiziert. Ziel ist die Anpassung von Ventilation und Perfusion unter physiologischen Bedingungen.
Unter pathophysiologischen Bedingungen können jedoch auch inadäquate Reaktionen dominieren. Als „inflammatorisch kompetentes“ Organ kann die Lunge beispielsweise auf inflammatorische Stimuli hin unterschiedliche Mediatoren bilden.
Diese tragen im Rahmen einer lokalen Entzündung zur Infektabwehr bei, können aber bei Ausbreitung der entzündlichen Prozesse und überschießender Reaktion die Funktion der Lunge in Mitleidenschaft ziehen (64).

2.3.1 Lipidmediatoren

Lipidmediatoren werden in einer Vielzahl von biologischen Systemen gebildet. Als Reaktion auf verschiedene Stimmuli können unter anderem zahlreiche Lipidmediatoren in vaskulären und perivaskulären Arealen der Lunge gebildet und freigesetzt werden. Sie haben z.B. Einfluss auf die glatte Muskulatur der Bronchien und pulmonalen Gefäße sowie auf inflammatorische Prozesse.
Die Oxygenationsprodukte Arachidonsäure und der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) sind wichtige Vertreter der Lipidmediatoren. Des Weiteren lenkten Untersuchungen der letzten Jahre den Fokus auf Thromboxan sowie eine Vielzahl von Lipoxygenaseprodukten der Arachidonsäure einschließlich der Leukotriene.
Im folgenden wird kurz auf die Arachidonsäureprodukte und Thromboxan eingegangen, und im Anschluss daran der Plättchen-aktivierende Faktor näher beschrieben (64).

2.3.2 Arachidonsäure und Thromboxan

Die Produkte der Arachidonsäure gehören zu den Eicosanoiden. Diese leiten sich von vielfach ungesättigten geradkettigen C_{20}-Fettsäuren ab.

Über den Cyclooxygenaseweg entstehen aus der Arachidonsäure z.B. die „klassischen" Prostaglandine der 2er-Reihe (z.B. PGD_2, PGE_2, $PGF_{2\alpha}$) sowie die „nicht-klassischen" Prostanoide Thromboxan A_2 und Prostacyclin (PGI_2).

Die vaskulären, perivaskulären und peribronchialen Gewebe der Lunge sind zu einer ausgeprägten Bildung dieser Metabolite befähigt.

Zum Beispiel wird Thromboxan nicht nur von endotheladhärenten Thrombozyten freigesetzt, sondern auch von anderen pulmonalen Zellen. Die Synthese erfolgt insbesondere in intravasal-residenten, interstitiellen und alveolären Makrophagen. Seine Freisetzung führt zu einer vorwiegend präkapillär lokalisierten Vasokonstriktion, kann aber auch zu einer postkapillären Widerstandserhöhung beitragen. Unter physiologischen Bedingungen wird Thromboxan nur in geringem Umfang in die Zirkulation abgegeben. Die pulmonale Gefäßwand reagiert jedoch auf eine Vielzahl von partikulären (z.B. Mikroembolie) und humoralen (z.B. bakterielle Exotoxine, Bradykinin) Stimuli mit einer schnellen Bildung und Freisetzung von Thromboxan (64).

Die Regulation des Deazylierungs-Reazylierungs-Gleichgewichts der Membranphospholipide hat eine zentrale Bedeutung für die Syntheserate von Eicosanoiden. Ihre Produktion ist bei einer erhöhten Phospholipaseaktivität und/oder verminderten Reazylierungsgeschwindigkeit gesteigert. Denn die Konzentration der freien Arachidonsäure - die annähernd in allen Membranphospholipiden vorliegt – nimmt dadurch zu und somit auch das Substratangebot für die Bildung der verschiedenen Eicosanoide.

In erster Linie ist die Arachidonsäure an die Membranphospholipide Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol und den PAF-Präkursor (1-Alkyl-2-acyl-glycerophosphocholin) gebunden. Die Freisetzung kann somit aus verschiedenen Pools erfolgen (siehe Abb. 2.5).

1) Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin:
   Durch die Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration wird membranständige Phospholipase A_2 stimuliert. So können Lysophosphatidylcholin bzw. –ethanolamin sowie freie Arachidonsäure entstehen. Eine solche kalziumabhängige Steigerung der Phospholipase A_2–Aktivität kann in verschiedenen pulmonalen Zellen auch nach Einwirkung von membranpermeabilisierenden bakteriellen Exotoxinen (z.B. Staphylokokken α-Toxin) nachgewiesen werden.
2) Phosphatidylinositol (PI):
   Durch Bindung eines externen Stimulus an einen (spezifischen) Rezeptor erfolgt, unter der Vermittlung von G-Proteinen, die Aktivierung einer PI-diphosphat spezifischen Phospholipase C. Daraus resultiert die Freisetzung von Diacylglycerid und Inositoltriphosphat (IP_3) als Second-messenger. IP_3 kann über die Freisetzung von Kalziumionen (Ca^{2+}) aus dem endoplasmatischen Retikulum Ca^{2+}-abhängige Stoffwechselwege triggern. Diacylglycerid aktiviert hingegen die Proteinkinase C. Somit können durch die Phosphorylierung verschiedener Zielproteine viele Stoffwechselwege beeinflusst werden. Des Weiteren ist Diacylglycerid das Substrat einer Lipase, welche unter gleichzeitiger Bildung eines Monoacylglycerids die Arachidonsäure freisetzen kann. Wenn also ein Rezeptor, der an die Auslösung der PI-Antwort gekoppelt ist, besetzt wird, erfolgt in der Summe die Induktion zellspezifischer Eicosanoidbildung parallel mit zahlreichen weiteren Aktivierungsschritten der betroffenen Zellen. Eine Induktion dieser Reaktionskette konnte z.B. nach Einwirkung von Peptiden (z.B. Bradykinin, Thrombin) und von bakteriellen Produkten (z.B. Escherichia-coli-Hämolysin) auf unterschiedliche pulmonale Zellen nachgewiesen werden (64).
3) PAF-Präkursor:
   Eine wichtige Membrankomponente ist der PAF-Präkursor. Durch sequentielle Einwirkung einer Phospholipase A_2 und einer Acetyltransferase entstehen sowohl freie Arachidonsäure als auch – über die Zwischenstufe des Lyso-PAF – der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) (65). Dadurch wird deutlich, dass PAF und Eicosanoide bereits auf der Bildungsebene dieser Lipidmediatoren eng miteinander verbunden sind. Der Mechanismus hierzu wird weiter unten genauer beschrieben (64).

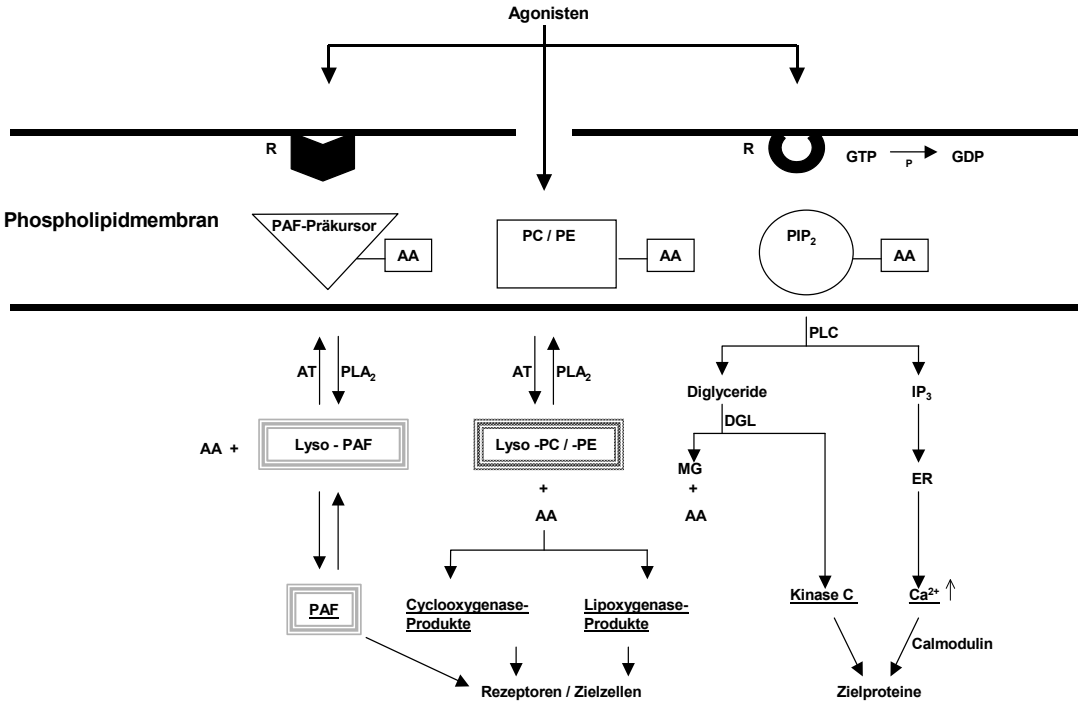


Abbildung 2.5: Membranphospholipide und Präkursorfreisetzung
AA = Arachidonsäure
R = Rezeptor
PC /PE = Phosphatedylcholin / -ethanolamin
PIP2 = Phosphatidylinositoldiphosphat
AT = Acyltransferase
PLA_2 = Phospholipase A_2
PLC = Phospholipase C
IP3 = Inositoltriphosphat
DGL = Diglyceridlipase
MG = Monoglycerid
ER = endoplasmatisches Retikulum

Die einzelnen Schritte der Freisetzung von AA und Lyso-PAF aus den verschiedenen Membranphospholipidpools sind imText erläutert.
Als wichtige Komponenten des Membran-Signal-Transfers, die der AA-Liberierung vorangehen und zum Teil parallel geschaltet sind, sind Diacylglycerid und Proteinkinase C, IP_3 und Kalzium sowie Kalzium/Calmodulin angedeutet (Abbildung modifiziert nach (64)).

2.4 Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)

2.4.1 Einleitung

PAF ist ein Phospholipid mit einer Vielzahl physiologischer Wirkungen. Auch bei pathologischen Vorgängen spielt PAF eine Rolle. Zum Beispiel hat er als Mediator bei inflammatorischen Prozessen, wie Sepsis und ARDS, eine besondere Bedeutung (66) und ist auch bei Asthma Bronchiale und ischämischen Reperfusionsschäden involviert (67). Im weitesten Sinne bezeichnet PAF Phospholipide mit plättchenaktivierenden Eigenschaften.
Die PAF-Wirkung wird über einen spezifischen Rezeptor vermittelt, an den auch ähnlich strukturierte Phospholipide binden können.
Synthese und Transport des PAF sowie der Abbau durch die PAF-Acetylhydrolase werden eng reguliert (66).

2.4.2 Chemische Struktur

Chemisch ist PAF als 1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glycero-3-phosphatcholin charakterisiert (Alkylgruppe in Position 1 kann eine 18:0- oder 16:0-Fettsäure sein) (64).

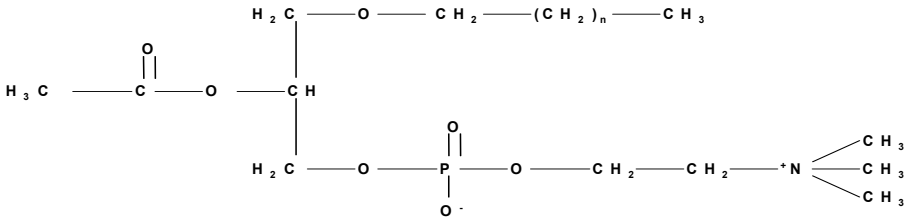


Abbildung 2.6: Struktur von 1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin (PAF) (68)

Aber nicht nur diese Strukturformel ist ein Plättchen-aktivierendes Phospholipid, sondern es wurden noch weitere Abkömmlinge entdeckt (69;70), die McManus et al. 1993 (71) in einer Nomenklatur zusammenfassten (siehe Tabelle 2.1).
Die Substanzen unterscheiden sich in den Substituenten an den drei Glycerinpositionen. Dabei verursachen Veränderungen in der zweiten und dritten Position eine starke Minderung der Plättchen aktivierenden Wirkung, während Änderungen an der ersten Position nur einen geringen Wirkungsverlust bedeuten.

Tabelle 2.1: Nomenklatur plättchenaktivierender Phospholipide (PAF) (71)

PAF	Phospholipide mit plättchenaktivierender Wirkung, die in Position 3 einen Cholinrest haben
AGEPC (Alkyl-PAF)	1-O-Alkyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin Die Alkylkette in Position 1 wird über Kettenlänge (x) und Anzahl der Doppelbindungen (y) bestimmt als x:y-AGEPC
AGPC (Azyl-PAF)	1-O-Azyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin Bestimmung der Azylkette wie bei AGEPC
APPC (Alkenyl-PAF)	1-O-Alk-1´-enyl-2-azetyl-sn-glyzero-3-phosphocholin Bestimmung der Azylkette wie bei AGEPC
PAF-Analoga	Kein Cholin in Position 3 Andere kurze Ketten in Position 2

2.4.3 Synthese

Eine große Anzahl von Zellen sind zur PAF-Bildung befähigt, wie Endothelzellen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten, Makrophagen, polymorphkernige Granulozyten und Thrombozyten (65).

Wie die Eicosanoide wird auch PAF nicht in funktionsfähiger Form in den Zellen gelagert. Auf einen zellspezifischen Stimulus hin kann es jedoch sehr schnell gebildet werden. Hierfür werden zwei mögliche Synthesewege beschrieben, der de novo- und der remodeling-Syntheseweg (siehe Abb. 2.7) (72).

Im de novo-Syntheseweg überträgt eine Phosphocholintransferase eine Phosphocholingruppe auf Position drei des Glycerins von Membranproteinen. Dabei wird die erste und zweite Position nicht beeinflusst. So entstehen verschiedene Substanzen unterschiedlicher Struktur und Wirkstärke (72;73).

Der remodeling-Syntheseweg ist die entscheidende Größe in der PAF-Synthese während der Inflammation (66). Am Anfang dieses Signalweges hydrolisiert die Phospholipase A_2 den PAF-Präkursor bzw. Membranlipide (wie bereits oben beschrieben). Dabei entsteht sowohl freie Arachidonsäure als auch Lyso-PAF (64). Die Seitenketten 1 und 3 werden nicht beeinflusst, wodurch eine Vielzahl an Produkten entstehen kann.

Die Phospholipase A_2 hat also eine wichtige Funktion bei der Arachidonsäurefreisetzung für die Eicosanoidbildung und ist außerdem essentiell für den ersten Schritt der PAF-Synthese (66). Phospholipase A_2-defiziente Mäuse bilden z.B. kein Prostanoid und PAF mehr (74-76).
Phospholipase A_2 wird durch Ca^{2+}-abhängige Phosphorylierung mittels MAP-kinase (MAP = mitogen aktivierte Proteine) reguliert. Für die Ca^{2+}- Stimulation ist eine submikromolare Konzentration ausreichend, weshalb die Aktivität schon durch die intrazelluläre Ca^{2+}- Konzentrationsänderung moduliert werden kann, die in stimulierten Zellen vorzufinden ist (66).
Durch Phospholipase A_2 kann sowohl Alkyl- als auch Azyl-phosphatidylcholin umstrukturiert werden. Denn dieses Enzym differenziert nicht die Struktur an Position 1 des zu bindenden Substrates, sondern benötigt nur den Arachidonrest an Position 2 des Moleküls (77). Das Vorkommen der Alkyl- bzw. Azyl-Variante kann allerdings stark variieren. Zum Beispiel kommt die Alkyl-Form in den meisten Zellen nur in Spuren vor. Dieses Alkyl-phosphatidylcholin macht aber in Zellen, die verstärkt PAF produzieren können, wie Endothelzellen oder neutrophile Granulozyten, ca. 10 – 40% des gesamten Phosphocholin-glycerid-Vorkommens aus (78).
Außerdem sind in Zellen, die auf die PAF-Synthese spezialisiert sind, die Vorläufer (PAF-Präkursor) gespeichert. Im Vergleich zum Azyl-Homolog hat die Alkyl-PAF-Formation eine stärkere Aktivität und Wirkung (66).
Der zweite Schritt, des remodeling-Synthesewegs wird durch die PAF-Azetyltransferase vollzogen. Da dieses Enzym sehr unstabil ist, weiß man nur wenig über seine Aktivität. Doch man konnte auch hier eine Ca^{2+}- und Phosphorylierungsabhängigkeit feststellen (79-81). Die PAF-Azetyltransferase kann ebenfalls Alkyl- als auch Azyl-phosphatidylcholin umstrukturieren, da sie für die Bindung an Position 1 nur eine geringe Spezifität aufweist. Die Beziehung zwischen Substratvorkommen und entstehendem Produkt, welche schon für den ersten Syntheseschritt genannte wurde, setzt sich also auch hier fort: Ist mehr Alkyl-phosphocholin vorhanden, wird im Vergleich zum weniger wirksamen Azyl-Homolog mehr Alkyl-PAF gebildet (82).
Einen weiteren Faktor, der das Verhältnis von Alkyl- zu Azyl-PAF bei der Freisetzung beeinflusst, stellt eine schnell abbauende nukleäre Lysophospholipase dar, die nur das Azyl-lysophosphatidylcholin, die Vorstufe für die Azyl-PAF-Homologe, hydrolisiert (79;83;84).
Der gesamte remodeling-Reaktionsweg kann auch in umgekehrter Reihenfolge ablaufen. Dabei entsteht durch eine Deazetylierung an C_2, mittels der PAF-Azetylhydrolase aus PAF wieder Lyso-PAF. Mit Hilfe einer Azyl-Transferase kommt es anschließend zum Umbau des Lyso-PAF zu einem Membranlipid bzw. PAF-Präkursor.

Die PAF-Azetylhydrolase kommt ubiquitär vor. Daher kann auch extrazelluläres PAF sehr schnell abgebaut werden. Im Körper beträgt seine Halbwertszeit 2,5 Minuten (85).

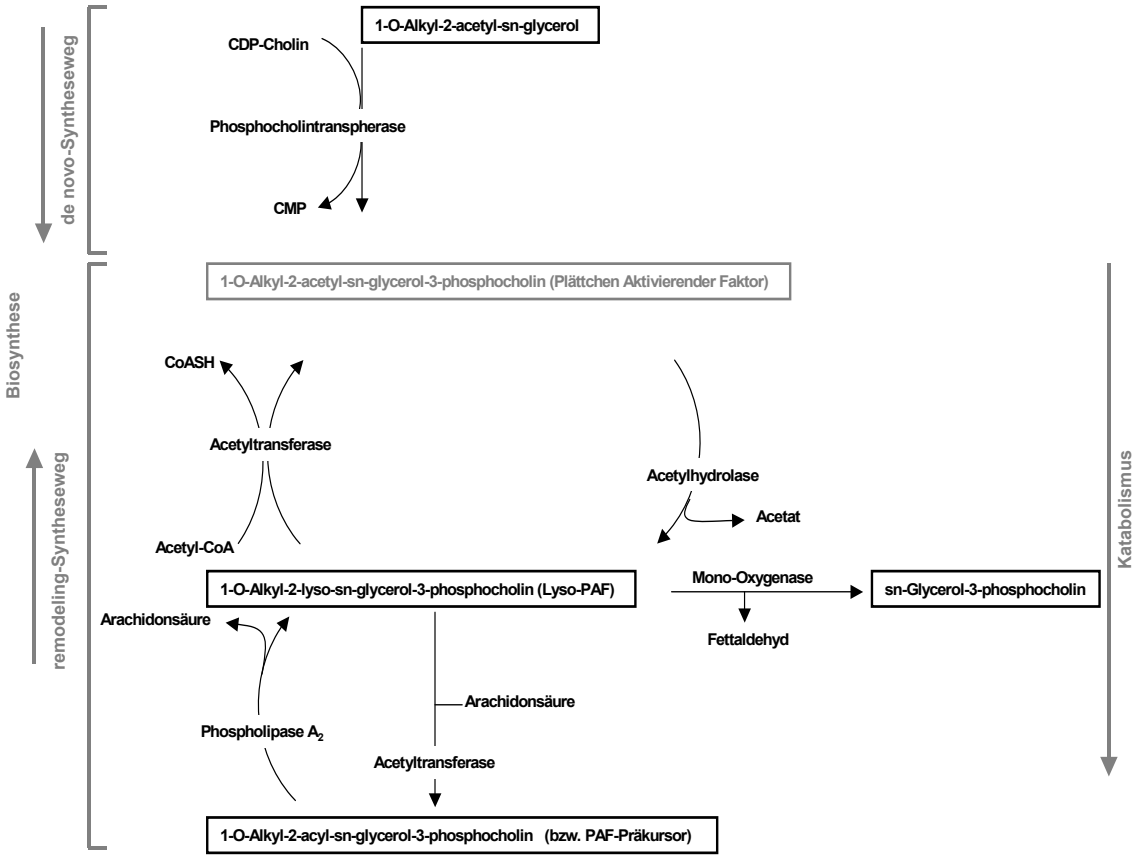


Abbildung 2.7: Metabolismus von PAF
remodelling- und de novo-Syntheseweg sowie der PAF-Katabolismus (68).

PAF wird innerhalb der Zelle gebildet. Der Transportmechanismus in den extrazellulären Bereich ist nicht genau bekannt. Zwei wichtige PAF-Quellen, nämlich die Endothelzellen (86) und die Leukozyten (87;88), können synthetisiertes PAF aufbewahren. Endothelzellen zeigen PAF auch auf ihrer Zelloberfläche, wo es zur interzellulären Kommunikation genutzt wird (89). Im Gegensatz dazu kommt es bei Monozyten grundsätzlich zu einer Freisetzung des von ihnen gebildeten PAF (90). Dieses kann dann unter bestimmten Bedingungen Leukozyten dazu veranlassen, ihr produziertes PAF auszuschütten (91;92).

2.4.4 PAF-Rezeptor

Die interzellulären Aktivitäten von PAF werden über einen G-protein-gekoppelten Rezeptor vermittelt, der auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen exprimiert ist (glatte Muskulatur, weiße Blutzellen, Gewebsmakrophagen etc.) (93-96). Seine Affinität zu PAF liegt im niedrigen Nanomolarbereich (97). Die Rezeptorspezifität für Phospholipide ist jedoch nicht sehr ausgeprägt. Es bindet nicht nur PAF an den Rezeptor, sondern auch oxidativ modifizierte Phospholipide (66;98), Phosphorylcholin und die Teichonsäure von *Streptococcus pneumoniae* (99), Lipoteichonsäure von *Staphylococcus aureus* und *S. pyogenes* (100) und Etherlipide von *Mycoplasma fermentans* (101). Darüber hinaus scheint der PAF-Rezeptor für die Zellinvasion einiger Mikroorganismen (z.B. Pneumokokken) essentiell zu sein (99).

Die Aktivierung des PAF-Rezeptors löst eine Signalkette aus, bei der es zunächst zum Phosphatidylinositolabbau und zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+}-Konzentration kommt.

Durch GTP-Analoge sind diese beiden Vorgänge inhibierbar. Doch die Reaktion auf die Stimulation mit dem Pertussistoxin fällt unterschiedlich aus. Dies lässt vermuten, dass zwei verschiedene G-Protein-vermittelte Signalketten vorkommen (102;103;104;105). Wie andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch, ist der PAF-Rezeptor nach seiner Aktivierung desensitiviert. Ali et al. zeigen, dass dieser Vorgang von einer Phosphorylierung begleitet wird, die teilweise durch Proteinkinase C- Inhibitoren geblockt werden konnte. Die Proteinkinase C (PKC) wird durch PAF aktiviert, so dass diese Ergebnisse auf einen negativen Feedback-Mechanismus für die Desensitivierung schließen lassen (102). Andere Untersuchungen ergeben aber, dass z.B. eine Vorbehandlung mit PKC-Inhibitoren keinen Effekt hat und somit dieses Enzym nicht die verantwortliche Kinase sein kann.

Stattdessen kann festgestellt werden, dass ein Peptid, welches die letzte C-terminale Aminosäure des Rezeptors darstellt, ein sehr gutes Substrat für die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase 1 ist. Fügt man diese beiden Erkenntnisse zusammen, wird deutlich, dass der Carboxyl-Terminus des Rezeptors das Ziel für die Phosphorylierung ist, und dieser Vorgang für die Rezeptordesensitivierung benötigt wird (106). Die zuständige Kinase ist wahrscheinlich ein Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptor Kinase-1 Familie (66).

Auf zellulärer Ebene sind eventuell addierende Desensitivierungsmechanismen auf die PAF-Antwort zu finden. Dieses Phänomen nennt man auch heterologe Desensitivierung. In der oben beschriebenen homologen Desensitivierung verläuft die Regulierung nur durch rezeptoreigene Liganden (oder durch Familienmitglieder). Beim heterologen Mechanismus kann die Herunterregulierung auch durch die Aktivität eines anderen Rezeptortyps erfolgen.

Von einigen Arbeiten ist bekannt, dass der PAF-Rezeptor eine heterologe Desensitivierung durchmacht, wenn bestimmte Peptidrezeptoren aktiviert sind. Andere Arbeiten zeigen, dass dies durch die Phosphorylierung des C-terminalen Endes mit Hilfe der PKC geschieht (107).
Zusammengefasst kann der PAF-Rezeptor auf verschiedenen Wegen herunter reguliert werden. Für den homologen Weg gibt es zwei Mechanismen, die Phosphorylierung des Rezeptors durch die G-Protein gekoppelte Rezeptor-Kinase 1 und die Inaktivierung des Schlüsseleffektors der Signalkette (PLC-β3) durch die PKC (108). Ein dritter Mechanismus wird beim heterologen Vorgang benutzt, nämlich die Phosphorylierung des Rezeptors durch die PKC.
Die Transkription des PAF-Rezeptors kann durch inflammatorische Agonisten, inklusive PAF, reguliert werden (109-112). Es gibt Anzeichen dafür, dass die schnelle PAF-Antwort durch Zellmembranrezeptoren vermittelt wird, wohingegen die Gen-Induktion durch Rezeptoren an der Zellkernmembran erfolgt (113).
Zwei verschiedene Transkripte sind bekannt, die in unterschiedlichen Geweben vorkommen. Eine m-RNA kommt nur in peripheren Leukozyten vor und wird unter PAF-Einfluss vermehrt gebildet. Die Transkription der zweiten m-RNA erfolgt als Reaktion auf Phorbolester und wird nicht durch PAF beeinflusst (110). Die Bildung der ersten m-RNA basiert auf einer durch Entzündungsmediatoren ausgelösten Reaktion, während die Transkription der zweiten m-RNA durch verschiedene Signale reguliert wird.
Die Hauptkontrolle der Rezeptorexpression scheint daher auf der transskriptionalen Ebene zu liegen.

2.4.5 Die Funktion des PAF

PAF ist an der Signalübertragung im Gefäßsystem und an inflammatorischen Prozessen beteiligt. Darüber hinaus übernimmt PAF Aufgaben beim Informationsaustausch zwischen Zellen des zentralen Nervensystems, des Endokriniums, des Gastrointestinaltraktes und anderer Organe.
Etliche Mechanismen regulieren das interzelluläre Signalsystem von PAF. Dazu gehören auch eine gezielte Kontrolle des Syntheseweges, eine lokale Regulation der Ausbreitung und Verfügbarkeit dieses Lipidmediators, eine zellspezifische Expression des PAF-Rezeptors und seine homologe und heterologe Desensitivierung sowie ein schneller PAF-Abbau durch die extrazelluläre und intrazelluläre Acetylhydrolase.
Zusammenfassend betrachtet ist die PAF-Funktion wahrscheinlich auf interzelluläre Signalvermittlung spezialisiert, wobei über den Freisetzungsmechanismus eine präzise Kontrolle der biologischen Aktivität möglich zu sein scheint.

Demnach kann eine unregelmäßige oder falsche Signalgebung durch PAF ein krankheitsauslösender Faktor sein (66). Diese Möglichkeit wurde in Studien mit isolierten Zellsystemen (114-117), in Tierversuchen (72) und durch klinische Beobachtungen (72) bestätigt.

Während der inflammatorischen Antwort vermittelt PAF in nahezu allen Organen Interaktionen zwischen den Zellen. Endothelzellen, verschiedene Leukozyten und andere Zellen sind darin involviert (72). Studien zeigen, dass PAF über eine kurze Distanz sein Signal parakrin vermittelt. Unter bestimmten Bedingungen kann es auch zirkulieren und auf endokrine Weise agieren. Dabei wird der Vorgang durch die PAF-Azetylhydrolase im Plasma kontrolliert. In experimentellen Inflammationsmodellen kann auch gezeigt werden, dass viele durch PAF ausgelöste Signalübertragungen zwischen dicht aneinander angrenzenden Zellen statt finden (siehe Abb. 2.8). In diesem Fall erfolgen PAF-Erkennung und -Bindung durch den PAF-Rezeptor an der Zielzelle (z.B. polymorphkernige Leukozyten = PMN), während diese an einem membranösen Adhäsionsprotein (P-Selektin) der PAF-abgebenden Signalzelle (z.B. eine stimulierte Endothelzelle) haftet. In der Zielzelle kommt es durch die PAF-Bindung unter anderem zur Integrinaktivierung.

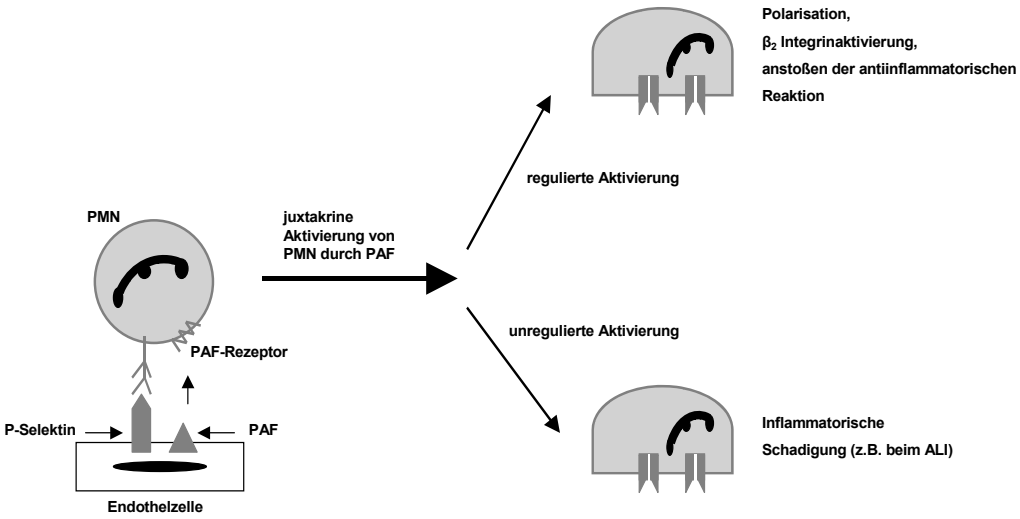


Abbildung 2.8: Juxtakrine Signalübertragung durch PAF
Zwischen einem polymorphkernigen Leukozyten und der Oberfläche einer inflammatorisch stimulierten Endothelzelle erfolgt eine juxtakrine Signalübertragung durch PAF. (Abbildung nach (66;116;118)).

Also ist PAF auch in der Lage auf juxtakrine Art Signale zu übertragen, quasi als ein in der Membran verankert bleibender Faktor (116). Bei einer normalen Regulierung steuert diese Adhäsionsreaktion und Signalvermitlung ihren Teil zur Wirtsabwehr bei. Gerät das Geschehen außer Kontrolle, kann jedoch ein akutes Lungenversagen oder eine andere Form des inflammatorischen Organversagens entstehen (66;116;118).

Experimentelle Untersuchungen an Inflammationsmodellen mit PAF-Rezeptor-defizienten Mäusen belegen die wichtige Rolle des PAF bei Inflammation. Die KO-Tiere zeigen eine wesentlich mildere anaphylaktische Reaktion auf eine exogene Antigen-Reizung (Challenge) als die Wildtyptiere (WT-Tiere). Außerdem weisen sie dabei eine geringere kardiovaskuläre Instabilität, verminderte Atemwegskontraktion und reduzierte alveoläre Ödembildung auf (119). Allerdings bleiben diese KO-Tiere empfindlich gegenüber Endotoxinen, denn sie zeigen eine gegenüber WT-Tieren unveränderte vaskuläre Reaktion und Zytokinantwort (66;119). Auch im Modell des akuten Lungenversagens sind die Symptome bei den PAF-Rezeptor-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren deutlich reduziert. PAF-Rezeptor-überexprimierte Tiere zeigen hingegen eine verstärkte Symptomatik (116). Bei diesen Experimenten konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass die lokale Akkumulation oder Sequestration von Leukozyten in pulmonalen Gefäßen bei beiden Tiergruppen keinen Unterschied aufwiesen. Die Tatsache, dass die Erkrankung bei den PAF-Rezeptor-KO-Tieren abgeschwächt verläuft, deutet darauf hin, dass in diesem Modell die Signalübertragung durch den PAF-Rezeptor von entscheidender Bedeutung ist.

Er löst Reaktionskaskaden aus, bei denen es zu einer erhöhten Freisetzung von granulären Enzymen oder zu Radikalbildung kommt. Beides sind mögliche Ursachen für ein Lungenversagen (72).

In der Lunge hat PAF primär Einfluss auf die glatte Muskulatur der Bronchien und pulmonalen Gefäße. Es kann zur Vaso- und Bronchokonstriktion, zur Ödembildung und zur Hyperreagibilität der Atemwege führen (66;98;120).

Bei Patienten mit Asthma, ARDS, hydrostatischem Lungenödem, Trauma, Sepsis oder einem ischämischen Reperfusionsschaden ist der PAF-Gehalt erhöht (121-125). Bei chronischen Veränderungen induziert PAF einen vaskulären Umbau, eine Abnahme der pulmonalen Gefäßcompliance, einen Verlust von Hydroxyprolin und der vaskulären Matrix (126) sowie eine Hyperplasie der Becherzellen und Mucin-Genexpression in den Luftwegen (127). PAF verursacht die Phosphorylierung seines eigenen Rezeptors sowie die Tyrosinphosphorylierung einer Vielzahl von Proteinen.

Darüber hinaus aktiviert es die Phospholipase A_2 (PLA_2) und C (PLC), sowie die Phosphatidylinositol-3-Kinase und die Proteinkinase Akt. Außerdem erhöht es den Umbau von Phosphatidylinositol, führt zur Aktivierung der mitogen aktivierten Protein (MAP)-Kinase und steigert den Kalziumgehalt im Zytosol (128).
Neuerdings werden zwei weitere durch PAF ausgelöste Signalwege beobachtet.
Zum einen der Weg über die saure Sphingomyelinase und Ceramid (129-131), zum anderen die Transaktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors durch eine Metallproteinase (100). Beide führen jeweils zu einer erhöhten vaskulären Permeabilität und Muzinproduktion.

2.4.6 PAF induzierte Permeabilität

PAF erhöht die vaskuläre Permeabilität in der pulmonalen Zirkulation. Ebenso schnell agierende Mediatoren in der Lunge sind Peptidoleukotriene (132;133) und H_2O_2 (134). Obwohl PAF direkt und unabhängig von neutrophilen Granulozyten (135-137), Mastzellen (138) oder hydrostatischem Druck (139;140) die Permeabilität erhöhen kann, findet dies *in vivo* auch indirekt durch Stimulation von Neutrophilen statt (135;137;141;142). PAF-Effekte auf Thrombozyten spielen hierbei keine Rolle (143-145).
Ein Vermittler der PAF-induzierten Ödembildung ist das Eicosanoid PGE_2 (146), dessen Produktion nach PAF-Stimulation erfolgt. Hinsichtlich der vaskulären Permeabilität ist dies ein dichotomer Mediator, da er zu einem Anstieg oder zu einer Senkung der Permeabilität führen kann (146;147), je nachdem welcher Rezeptor aktiviert wird (148). Zum Beispiel erhöht die Aktivierung von EP2- und EP4-Rezeptoren den intrazellulären cAMP-Gehalt, wodurch die Barriere geschützt wird (149). Eine Aktivierung des EP3-Rezeptors hingegen senkt den cAMP-Spiegel und erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration (148). Dadurch kommt es zu einem Anstieg der Permeabilität (149).
Neben diesem cyclooxygenaseabhängigen Reaktionsweg zeigen neuere Studien, dass die saure Sphingomyelinase-abhängige Signaltransduktion auch PAF-induzierte Permeabilität vermittelt (130). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die saure Sphingomyelinase extrazellulär wirkt (130;146), dass ihr Metabolit Ceramid eine tragende Funktion hat (130;150-152) und dieses Enzym bei Sepsis eine wichtige Rolle spielt (153).

Intrazelluläre Signalwege bei der Permeabilitätsentstehung

Nur wenig ist bisher über die intrazelluläre Signalvermittlung bei der PAF-induzierten Hyperpermeabilität bekannt. Die meisten Vorstellungen einer Ödementstehung beruhen auf der Annahme einer Endothelzellkontraktion durch Myosin-leichte-Kette-Kinase (MLC-Kinase) abhängige Phosphorylierung der MLC (149). Eine weitere Reaktionskette könnte über die Thyrosinphosphorylierung von VE-Cadherin ablaufen. Dieses Protein wird in den adherens junctions von Endothelzellen exprimiert und ist an der endothelialen Stabilität beteiligt (154-156).

2.4.7 PAF induzierte pulmonale Vaso- und Bronchokonstriktion

PAF verursacht eine Vaso- und Bronchokonstriktion, wenn es in pulmonale Arterien injiziert wird (140;157). Im systemischen Kreislauf kann die Wirkung von PAF z.B. einen hypotonen Schock auslösen (157).

Die vaskuläre PAF-Antwort ist von Konzentration und Lokalisation des Lipidmediators abhängig (158;159). *In vivo*-Versuche und Experimente in der isolierten Lunge machen deutlich, dass TxA_2 ein hauptverantwortlicher Mediator bei der PAF-induzierten Broncho- und Vasokonstriktion ist (160-164). Dabei wirken im kleinen Umfang Leukotriene mit (157;165-167). Weitere durch PAF freigesetzte Eicosanoide, die bei der Gefäßantwort eine Rolle spielen, sind Prostacyclin als Vasodilatator (168) und PGE_2 (146). Abhängig vom Rezeptortyp, an den PGE_2 bindet, kommt es zur Vasokonstriktion der pulmonalen Arterien (EP3) (169), Vasokonstriktion der pulmonalen Venen (EP1) (170) oder zur Bronchorelaxation (EP2) (171). Darüber hinaus kann PGE_2 auch IP-Rezeptoren aktivieren, was zur Vasodilatation der pulmonalen Venen führt (172).

Der Mechanismus, über den PAF die Eicosanoidsynthese aktiviert, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Offensichtlich wird dafür die Aktivierung von PLA_2 und die der Cyclooxygenase oder der Lipoxygenase benötigt. In einer Vielzahl von Zellen ist die PAF-induzierte Freisetzung von Arachidonsäure oder Eicosanoidprodukten abhängig von der PLA_2-Aktivität (68). Wird die PLA_2 inhibiert, ist der PAF-induzierte Anstieg der pulmonalen sowie vaskulären Resistance reduziert (67).

Blockiert man im nachstehenden Reaktionsschritt die Cyclooxygenase oder die Lipoxygenase, wird die PAF-induzierte Produktion der jeweiligen Enzymprodukte unterdrückt (171). PAF aktiviert in erster Linie die Cyclooxygenase 1 (COX1) (173). In einigen Zelltypen ist auch die Aktivierung der COX2 möglich (174).

Intrazelluläre Signalwege der Vaso- und Bronchokonstriktion

Die durch PAF verursachte Kontraktion der glatten Muskulatur und somit auch die PAF induzierte Druckantwort ist biphasisch. Einem frühen Peak folgt eine anhaltende Kontraktion von ca. 20 Minuten Dauer (67). Solch eine Druckreaktion ist typisch für eine zweiphasige Kalziumantwort, bei der die erste Phase dem intrazellulären und die zweite Phase dem extrazellulären Kalzium zuzuordnen ist (175;176). Die Ursache einer schnellen intrazellulären Kalziumerhöhung ist häufig die Aktivierung des IP_3-Rezeptors (177).

Eine Inhibition der PI-Antwort reduziert jedoch weder die PAF (und TxA_2) induzierte Bronchokonstriktion, noch die frühe Phase der Vasokonstriktion. Der Phosphatidylinositolumbau scheint hingegen für die zweite Phase der PAF-induzierten Druckantwort verantwortlich zu sein. In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass ein Großteil der PAF-induzierten Druckantwort den PI-Weg nicht benötigt (178).
Anders als bei der intrazellulären Signalvermittlung zur Permeabilitätserhöhung werden bei der Bronchokonstriktion und frühen Phase der Vasokonstriktion die Reaktionen zusätzlich über den Rho-Kinase-Weg vermittelt. Dieser wird durch die PAF-induzierte TxA_2-Freisetzung ausgelöst und läuft bei einer relativ niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentration ab (178). Dazu passt, dass extrazelluläres Kalzium für die Thromboxanproduktion benötigt wird, die Bronchokonstriktion aber dadurch nicht induziert wird (178). Bei der Gefäßantwort kann dies anders sein. Es wurde z.B. gezeigt, dass die IP_3-vermittelte Antwort und extrazelluläres Kalzium bei einer U44619 induzierten (TxA_2-Analogon) Vasokonstriktion eine Rolle spielen (179;180). Diese und weitere Ergebnisse verdeutlichen, dass die TxA_2-induzierte Kontraktion der glatten Atemwegs- und Gefäßmuskulatur durch unterschiedliche Signalwege vermittelt werden können.
Doch wie kontrahieren glatte Muskelzellen ohne eine große Kalziumanflutung? Dafür ist der schon oben genannte Kalzium-sensitivierende Mechanismus oder auch Rho-Kinase-Weg identifiziert worden (181). In ihm sind die kleine GTPase Rho und ihr nachgeschalteter Effektor (Rho assoziierte Kinase = Rho-kinase) einbezogen. Für die Rho-Kinase konnte gezeigt werden, dass sie die Phosphatase, die für die Dephosphorylierung der MLC verantwortlich ist, inaktiviert. Dadurch wird eine Kontraktion begünstigt (181;182). Es wird berichtet, dass Y27632, ein Rho-Kinase-Inhibitor, eine Kontraktion der Gefäße und der glatten Muskulatur, verursacht durch Agonisten, komplett inhibieren kann. Dies geschieht durch die selektive Inhibition des Kalzium-sensitivierenden Mechanismus (183).

2.5 Pneumonie

Durch ihren unmittelbaren Kontakt mit der Außenluft ist die Lunge in besonderem Maße potentiell schädigenden Umwelteinflüssen ausgesetzt. Zu diesen gehören z.B. Infektionserreger, toxisch wirkende Gase und partikuläre Inhalate. Ein komplexes Abwehrsystem schützt die Lunge vor solchen Schäden. Wird es geschwächt, ist die Entstehung entzündlicher Prozesse begünstigt. Auch eine überschießende Reaktion des Abwehrsystems auf einen Stimulus kann in bestimmten Fällen schwere Lungenschädigungen hervorrufen (184).

Bei der Pneumonie handelt es sich um eine akute oder chronische Entzündung des Lungengewebes, die meist durch eine Infektion mit Bakterien, Viren oder Pilzen, seltener auch toxisch oder immunologisch verursacht wird.

Anhand von Morphologie und Lokalisation werden Pneumonien in lobäre, lobuläre und interstitielle Pneumonien eingeteilt (185;186). In der Regel werden Lobärpneumonien durch bakterielle Erreger ausgelöst. Sie stellen beim Menschen die häufigste Form der Pneumonie dar (184).

Bei der Entstehung einer Lobärpneumonie kommt es zur Exsudation von Fibrinogen in den Alveolarraum, das die Alveolen mit einem gerüstartigen Maschenwerk ausfüllt (Stadium der Anschoppung). Die Alveolarepithelzellen nekrotisieren und werden abgestoßen. Zeitgleich kommt es zu einer starken Leukozytenemigration (rote und graue Hepatisation). Makrophagen und Leukozyten inaktivieren und eliminieren die Bakterien. Außerdem verflüssigen sie das fibrinöse Exsudat durch Freisetzung lytischer Enzyme (Stadium der Lösung). Dieses wird anschließend überwiegend resorbiert, so dass eine vollständige Ausheilung möglich ist (Restitutio ad integrum).

Eine lobuläre Pneumonie ist hingegen eine deszendierende Luftwegsinfektion, die sich herdförmig um die zentralen lobulären und terminalen Bronchiolen ausbreitet. Sie wird daher auch Bronchopneumonie genannt.

Die interstitiellen Pneumonien spielen sich, im Gegensatz zu den oben genannten Pneumonieformen, überwiegend im Lungengerüst ab. Ätiologisch stehen hier Virusinfektionen, physikalische und chemische Noxen, die primär auf das Gefäßbindegewebe oder die Pneumozyten einwirken und immunologische Reaktionen im Vordergrund. Im Verlauf einer solchen Pneumonie kommt es durch erhöhte Kapillarpermeabilität zu einem interstitiellen Ödem. Eine Verdickung der Alveolarsepten mit gleichzeitiger Lockerung ihrer bindegewebigen Struktur, und eine Aufsplitterung der Basalmembranen von Kapillarwänden und Alveolarepithel, sind weitere Folgen. Auch der Alveolarraum ist vom Geschehen betroffen.

Es kann zur Nekrose von Alveolarepithelien, zur Bildung hyaliner Membranen und zur Surfactantansammlung in den Alveolen kommen. Durch Makrophagen, die überschüssiges Surfactant phagozytieren („desquamative Reaktion“), können die Alveolarräume ausgefüllt werden. Auch interstitielle Pneumonien können ohne wesentliche Folgeschäden ablaufen.

Pneumonien lassen sich auch nach klinischen Aspekten unterteilen. Dabei wird zwischen ambulant erworbener Pneumonie (engl.: community-acquired pneumonia = CAP) und nosokomial erworbener Pneumonie (engl.: hospital acquired pneumonia = HAP) unterschieden (184).

Eine ambulant erworbene Pneumonie wird definiert als Lungenentzündung eines immunkompetenten, d.h. nicht abwehrgeschwächten Patienten, der den Erreger im privaten oder beruflichen Umfeld erworben hat. Dies gilt auch für diejenigen Pneumonien, die innerhalb der ersten zwei Tage eines Krankenhausaufenthaltes erstmals diagnostiziert werden (187). Laut statistischem Bundesamt erkranken in Deutschland ca. 800.000 Menschen pro Jahr an einer CAP. Davon müssen ca. 240.000 Patienten in ein Krankenhaus eingewiesen werden (1;3). Dies macht etwa 4% aller stationären Patienten aus. Die Letalität ist mit > 5% - 29% bei schweren Verläufen weiterhin hoch (188). Auch weltweit ist die CAP die am häufigsten registrierte Infektionskrankheit, welche mit einer recht hohen Morbidität und Mortalität einhergeht und 2,8% aller Krankenhauseinweisungen ausmacht (187;189). Etwa 18-36% der mit einer CAP eingewiesenen Patienten benötigen eine intensivmedizinische Betreuung (189).

In den westlichen Industrieländern wird die Inzidenz der CAP auf 1-11 pro 1000 Einwohner pro Jahr geschätzt (187;190). Bei Bewohnern von Altenheimen ist sie deutlich höher (68-114 pro 1000 Personen pro Jahr) (187).

Das Risiko für das Auftreten einer CAP ist bei Personen mit einer chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung auf Grund der lokal gestörten Immunfunktion mit Schädigung der Mucosa und bakteriellen Kolonisation stark erhöht. Weitere prädisponierende Faktoren sind ein höheres Lebensalter (>65 Jahre), Rauchen, Herzinsuffizienz, chronische Leber- oder Nierenerkrankungen, Diabetes mellitus oder eine vorherige Influenzainfektion (187).

In mehr als 90 % aller CAP sind Bakterien beteiligt (187). Weltweit ist *Streptococcus pneumoniae* der wichtigste Erreger. Beispielsweise werden in Deutschland mehr als 45% der ambulant erworbenen Pneumonien durch *Streptococcus pneumoniae* verursacht (2), gefolgt von *Haemophilus influenza* (10-20%) und *Mycoplasma pneumoniae* (10-12%) (CAPNETZ). Bei schweren Krankheitsverläufen spielen des Weiteren *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* und *Legionella pneumophila* eine wichtige Rolle (187), sowie *Chlamydophila pneumoniae* (191).

Die nosokomialen Pneumonien, einschließlich Pneumonien bei künstlicher Beatmung, stellen mit die wichtigsten Infektionen bei hospitalisierten Patienten dar (188). Auf chirurgischen und internistischen Intensivstationen erkranken etwa 10% der Patienten an einer nosokomialen Pneumonie (192;193). Eine nosokomiale Pneumonie entwickelt sich frühestens 5 Tage nach stationärer Aufnahme. Tritt sie früher während eines stationären Aufenthaltes auf, wird sie „early HAP“ genannt, das Erregerspektrum gleicht im Allgemeinen dem der CAP. Häufige Erreger der HAP sind *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae Pseudomonas* und oxacillinresistente Stämme von *Staphylococcus aureus.* Diese vier Spezies umfassen etwa 3/5 aller bakteriellen nosokomialen Pneumonieerreger. Der Rest verteilt sich auf ein sehr breites Spektrum von Bakterien (184).

2.6 Pneumokokkeninfektion

2.6.1 *Streptococcus pneumoniae* (Pneumokokken)

Streptococcus pneumoniae ist ein wichtiger Pneumonieerreger. Mikrobiologisch gehört dieses Bakterium zur Ordnung der *Lactobacillales,* da es durch Fermentation von Glucose Energie unter Säurebildung gewinnen kann. Die weitere Einteilung in der Systematik sieht wie folgt aus:

Familie: Streptococcaceae
Gattung: Streptococcus
Art: Streptococcus pneumoniae (194).

Pneumokokken sind unbewegliche, nicht sporenbildende, grampositive Diplokokken, die Oxidase- und Katalase-negativ sind und unter fakultativ anaeroben Bedingungen wachsen (195). Sie lassen sich in die Gruppe der α-hämolysierenden (deutliche Vergrünung) Streptokokken (196) einteilen. Durch ihre Gallelöslichkeit und Optochinempfindlichkeit können sie von den anderen α-hämolysierenden unterschieden werden (197).

Da die meisten Pneumokokkenstämme bekapselt sind, kann eine genaue Klassifizierung auf Grund der chemischen Feinstruktur der Kapselpolysaccharide erfolgen. Diese Einteilung wird als „Dänische Nomenklatur“ bezeichnet und beinhaltet bisher ca. 90 Serotypen (198;199).

Pneumokokken gehören als Kommensale zur natürlichen Flora des oberen Respirationstraktes (200). Bei 5-10% der gesunden Erwachsenen, sowie bei 20-40% der Kinder ist er im Nasenrachenraum nachweisbar und kann dort bis zu 6 Monate persistieren.

Die Übertragung erfolgt bei engem Kontakt im Normalfall durch Tröpfcheninfektion, wobei die Ansteckungsgefahr in schlecht belüfteten Räumen, unter schlechten Lebensbedingungen (z.B. enge Verhältnisse) oder bei empfindlichen Personen oft erhöht ist.
Die Inzidenz einer Pneumokokkenbakteriämie ist bei Kindern bis zu zwei Jahren und bei Personen ab dem 65. Lebensjahr relativ hoch. Dabei sind die meisten Bakteriämien nach einer Pneumokokkeninfektion auf eine Pneumonie zurückzuführen (201).

2.6.2 Verlauf

Der Verlauf einer Pneumokokkeninfektion beginnt mit der Kolonisierung der mukosalen Zelloberfläche und Adhärenz an die Epithelzellen des Nasopharynx. Dies geschieht über spezifische Interaktionen von bakteriellen Oberflächenadhäsinen, wie dem „pneumococcal surface antigen A“ oder den Cholinbindungsproteinen mit epithelialen Rezeptoren (201).
Die Besiedlung des Nasopharynx führt zu einer Infektion, sofern die Bakterien in anatomisch nahe gelegene Areale gelangen und dort die Erregerelimination erschwert ist (z.B. durch ein viral bedingtes Ödem der Mukosa) (201). Erkrankungen, wie Mittelohrentzündung, Nasennebenhöhlen- und Luftröhrenerkrankungen sind mögliche Folgen. Zum Beispiel zeigt eine Studie aus den USA, dass fast jedes Kind unter 5 Jahren bereits eine durch Pneumokokken ausgelöste Otitis media erlitten hat (202).
Durch eine Ausbreitung über die Blutbahn sind weiterhin Infektionen des Zentralen Nervensystems, der Herzklappen, der Knochen und Gelenke möglich.
Streptococcus pneumoniae ist unter anderem neben *Neisseria meningitidis* der häufigste Auslöser einer bakteriellen Meningitis bei Erwachsenen. Diese kann nicht nur durch die Erregerausbreitung über die Blutbahn entstehen, sondern auch direkt ausgelöst werden (201).
Eine lobäre Pneumonie kann nach Inhalation oder Aspiration der Organismen in Bronchiolen oder Alveolen auftreten. Häufige Gründe für eine reduzierte Erregerelimination sind auch hier eine virale Infektion, starkes Rauchen und andere toxische Substanzen, die zu einer erhöhten Schleimproduktion und/oder einer verminderten ziliären Funktion führen.
Sobald Pneumokokken in Bereiche gelangen, in denen sie nicht kolonisierend vorkommen, aktivieren sie, bzw. ihre Zellwandkomponenten, eine Reihe inflammatorischer Reaktionen, wie das Komplementsystem und die Zytokinproduktion. Dadurch werden Granulozyten angelockt, die aber den Erreger auf Grund seiner Polysaccharidkapsel nicht phagozytieren können. Auch anderen phagozytierenden Zellen, z.B. den Alveolarmakrophagen der Lunge, ist eine Erregereliminierung nur begrenzt möglich.

Dadurch kommt es zu einer starken Vermehrung des Erregers, die zunächst eine Nährstoffknappheit bedingt, was die Zunahme der Selbstlyse der Bakterien durch Autolysin zur Folge hat (196). Dabei werden zum einen Zellwandbestandteile frei, was die Inflammation verstärkt, und zum anderen der wichtige Virulenzfaktor Pneumolysin (PLY), welcher zytotoxisch auf Zielzellen wirkt und somit ein entscheidender Faktor für die Progression der Bakterien darstellt (203). Diese ausgeprägten Entzündungsreaktionen führen zu schweren Schäden des Lungengewebes, was besonders für ältere Menschen und Kinder einen hohen Letalitätsfaktor darstellt (204).

Die frei werdenden Zytokine, besonders Interleukin 1 und 6 sowie der Tumornekrosefaktor-α, induzieren außerdem die verstärkte Expression des membrangebundenen Rezeptors für den Plättchen-aktivierenden Faktor (PAF-R) auf Endothelzellen (205). Pneumokokken sind in der Lage über das Phosphorylcholin der Bakterienwand an den PAF-Rezeptor zu binden, wonach anschließend eine rasche Internalisierung des Rezeptors erfolgt (99;204). Über diesen endozytotischen Vorgang gelangen die Bakterien mit dem Rezeptor in die Zelle, überwinden durch zelluläre Transmigration die Endothelzellbarriere und können so in den Blutkreislauf gelangen (201;206). So ist eine weitere Ausbreitung über die Blutbahn, bei der eine Infektion der Hirnhäute, der Knochen, der Gelenkspalten und des Bauchraumes möglich ist, denkbar. Häufig geht eine derartige Erregerinvasion von einem reorganisierten Infektionsherd im Respirationstrakt aus (201).

Ein Teil der Krankheitssymptome sind der inflammatorischen Antwort des Wirtes und der damit verbundenen Gewebszerstörung zuzuschreiben. Sie wird durch die verschiedenen Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* verursacht (siehe auch Kapitel 2.9.).

Die Symptome einer Pneumokokkeninfektion sind meist produktiver Husten, Fieber und ein radiologisch nachweisbares Infiltrat. Die Bandbreite der Symptome ist allerdings recht groß, und nicht immer müssen alle auftreten.

Wenn Erreger in den Pleuralspalt gelangen, entweder über die Blutbahn oder durch Verschleppung aus benachbarten Arealen, kann ein Empyem entstehen. Es ist eine der häufigsten Komplikationen der Pneumokokkenpneumonie (201). Weitere Komplikationen sind eine Bakteriämie mit Erregerausbreitung in andere Organe und möglicherweise Sepsis, sowie die Entstehung eines akuten Lungenversagens (201).

2.6.3 Wirtsspezifische Abwehrmechanismen

Der Wirt bringt dem Erreger unspezifische und spezifische Abwehrmechanismen entgegen.
Zu den unspezifischen gehören z.B. die dichotome Aufzweigung des Bronchialsystems, der Hustenreflex, die Mukusproduktion, die mukoziliäre Clearance sowie der hohe IgA Gehalt des Bronchialsekretes.
Die Erkennung bakterieller Bestandteile („pathogen associated molecular patterns“, PAMPs), wie Oberflächenmoleküle und bakterielle Toxine durch „pattern recognition receptors“ (PRRs) sowie der Phagozytoseprozess selbst induzieren die Synthese proinflammatorischer Zytokine. Die nachfolgende Sekretion von u.a. TNF-α und IL-1β aktiviert ortsständige Epithelzellen, die dadurch in die antimikrobielle Abwehr integriert werden. Auch effiziente Abwehrzellen, wie die ortsständigen Alveolarmakrophagen, gehören dazu. Sie können Mikroorganismen direkt oder nach erfolgter Opsonierung über ihre FC- und Komplementrezeptoren phagozytieren.
Auch chemotaktische Zytokine werden freigesetzt, was zur Rekrutierung von weiteren Leukozyten in den Alveolarraum führt, wie neutrophile Granulozyten, die durch ihre Phagozytosekapazität die Elemination der Bakterien beschleunigen. Ferner produzieren Monozyten Entzündungsmediatoren und modulieren somit den Abwehrprozess und die begleitende inflammatorische Reaktion. Die Lymphozyten initiieren eine spezifische Abwehr (207;208).
Als spezifischer Abwehrmechanismus können Antikörper gegen die Kapsel des Erregers oder gegen andere Bestandteile gebildet werden. Kapselantikörper erscheinen nach den ersten Wochen, wenn eine Kolonisierung, Infektion oder Impfung stattgefunden hat. Sie sind bei den meisten gesunden Erwachsenen nicht nachweisbar. Dagegen scheinen Antikörper gegen andere Pneumokokkenbestandteile in der Bevölkerung verbreitet zu sein.
Personen mit Beeinträchtigung dieser Abwehrmechanismen sind prädisponiert für eine schwere Pneumokokkeninfektion. Zu diesen Personenkreisen gehören unter anderem ältere Menschen, HIV-Infizierte, Diabetiker, chronisch Lungenkranke, Raucher, Personen mit bösartigen Erkrankungen, Herzerkrankungen, Leberzirrhose, Anämie, Niereninsuffizienz und Patienten nach Splenektomie. Besonders die letztgenannte Gruppe ist für einen schweren Krankheitsverlauf prädisponiert, da nur die langsame Milzpassage des Blutes eine ausreichende Erregereliminierung ermöglicht. Deshalb können diese Patienten aus einem guten Gesundheitsstatus heraus an einer Pneumokokkenpneumonie und Sepsis innerhalb von 24 Stunden sterben noch ehe eine Lungeninfektion röntgenologisch nachweisbar ist (201).

2.6.4 Prävention und Therapie

Zur Prävention ist ein Pneumokokkenimpfstoff gegen die 23 häufigsten Serotypen vorhanden. Er erzeugt bei den Empfängern Antikörper gegen die meisten Serotypen. Der Schutz dauert ca. 5 Jahre an, bei älteren Menschen (über 65 Jahre) häufig kürzer (meist nur 3 Jahre). Außerdem entwickeln Personen mit einer schlechten Antikörperantwort, die also einen Impfschutz dringend nötig hätten, eine reduzierte Impfantwort (201).

Die kausale Behandlung der Pneumonie erfolgt durch eine Antibiotikatherapie. Eine Resistenztestung der Pneumokokkenisolate ist von Bedeutung, denn in den letzten 20 Jahren ist in Europa die Anzahl der Antibiotikaresistenzen stetig gestiegen.

In Deutschland liegt derzeit die Rate der penicillinresistenten Pneumokokken um 5% (201). Wesentlich ausgeprägter ist die Entwicklung der Makrolidresistenzen in Deutschland, die mittlerweile im Durchschnitt bei ca. 15% liegt (209). In anderen Ländern ist die Resistenzlage für Penicillin meist schlechter. Sie liegt in den USA bei 22,2% und in Frankreich bei 40,7%. Auch in typischen Urlaubsländern, wie Griechenland (Penicillinresistenz hier bei 15,7%) liegt die Resistenzrate höher als in Deutschland, was eventuell bei der Antibiotikawahl für eine Pneumokokkentherapie berücksichtigt werden muss (210). Eine Hauptursache für die rasche globale Zunahme von Penicillin- aber auch von Makrolidresistenzen ist die internationale Verbreitung einiger multiresistenter Pneumokokkenklone (z.B. „Spain^{23F}-1“, der aus Spanien stammt) (211). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sich auf diesem Weg weitere Antibiotikaresistenzen verbreiten, was die Behandlung einer Pneumokokkenpneumonie erschweren würde. Neue Therapieansätze sind daher dringend erforderlich.

2.7 Pathogenitätsfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*

Eine wichtige Rolle bei der Adhärenz an Epithelzellen des Nasopharynx, der Invasion und der Etablierung des Erregers in der Lunge spielen Pathogenitätsfaktoren (Virulenzfaktoren) der Pneumokokken (204).

Bei den bisher charakterisierten Virulenzfaktoren handelt es sich im Wesentlichen um Zelloberflächenstrukturen und um zytoplasmatische Proteine.

Die Kapsel ist ein wichtiger Virulenzfaktor der Pneumokokken. In Studien sind unbekapselte Varianten gegenüber Phagozytose deutlich empfindlicher als bekapselte (212). Eine Infektion mit unbekapselten Erregern führt im Gegensatz zu bekapselten Erregern des gleichen Stammes in gleicher Infektionsdosis bei Mäusen nicht zu einer Erkrankung.

Die bekapselten Stämme sind ca. 10^5-mal virulenter (213). Die Kapsel dient den Pneumokokken als Schutz vor Phagozytose durch polymorphkernige Leukozyten (214). Außerdem verhindert sie eine Opsonierung (215) und somit die Aktivierung der alternativen Komplementkaskade (216).

Weiterhin wirken bestimmte Oberflächenstrukturen auf der Bakterienzellwand als Pathogenitätsfaktoren. Diese Zellwandbestandteile erzeugen Entzündungsprozesse während des Infektionsverlaufs, z.B. die Aktivierung der Komplementkaskade, von polymorphkernigen Granulozyten und der Mastzelldegeneration (217). Bei unbekapselten Stämmen sind solche Oberflächenstrukturen außerdem am Anheftungsprozess an humanen Endothelzellen beteiligt (218). Unter den Zellwandkomponenten befinden sich viele Cholinbindungsproteine, die im Phosphorylcholin der Zellwandpolysaccharide Teichonsäure oder Lipoteichonsäure verankert sind (216;219;220). Diese Oberflächenproteine vermitteln verschiedene Funktionen. Das Pneumococcal-surface-protein-A (PspA) z.B. kommt in allen klinischen Isolaten vor (219;221). Es inhibiert vermutlich die Komplementkaskade und spielt bei der Adhärenz eine wichtige Rolle.

Autolysin (LytA) ist hingegen inaktiv in der Zellwand verankert und wird frei bzw. aktiviert, wenn die Zellwandbiosynthese vermindert ist (z.B. bei Nährstoffmangel, Antibiotikawirkung). Seine Aktivität führt zur Autolyse der Bakterienzelle im Verlauf der Infektion, wodurch die Freisetzung zytosolischer und zellwandassoziierter Pathogenitätsfaktoren (Pneumolysin, Neuramidas) ermöglicht wird (222-224).

Das Cholinbindungseprotein A (cbpA) (225) – es wird auch *Streptococcus pneumoniae* sekretorisches IgA-Bindungsprotein (SpsA) (226;227) genannt - gehört ebenfalls zur Gruppe der Oberflächenproteine. Über dieses Protein sind Pneumokokken in der Lage, das sekretorische IgA der humanen Körperflüssigkeit zu binden.

Das IgA repräsentiert einen wichtigen Faktor der spezifischen Immunabwehr auf mukosalen Oberflächen gegen infektiöse Agenzien (228;229). Wird es gebunden, ist die Anheftung für die Pneumokokken an Epithelzellen des Nasopharynx wesentlich leichter (225).
Weitere Zellwand-assoziierte Enzyme sind die Neuraminidase und Hyaluronidase.
Erstere vermindert die Viskosität von Mukusschleim und legt Rezeptoren der Zelloberfläche frei, so dass eine bessere Adhäsion und Kolonisierung erfolgen kann (230). Die Hyaluronidase katalysiert die Depolymerisierung von Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix, wodurch die Invasivität und Ausbreitung der Pneumokokken im Gewebeverband gefördert wird (231;232). Neben diesen extrazellulären besitzen Pneumokokken intrazelluläre Pathogenitätsfaktoren. Zu diesen gehören z.B. Autolysin und das sehr wichtige Toxin Pneumolysin.

2.7.1 Pneumolysin

Pneumolysin (PLY) ist ein zytoplasmatisches Enzym aus der Gruppe der Thiol-aktivierten Toxine (233;234), das von fast allen bisher klinisch isolierten Pneumokokkenisolaten gebildet wird (219;233;234). Thiol-aktivierte Toxine sind Pathogenitätsfaktoren grampositiver Bakterien, deren Aktivität auf der Bindung an das Cholesterol der zytoplasmatischen Membran der Wirtszelle basiert (daher auch cholesterol-dependent cytolysins = CDCs) (219;233;234).
Pneumolysin ist ein 53-kDa großes Protein mit vier Domänen. Die erste und dritte Domäne sind miteinander verbunden und binden nie an die Zellmembran. Die aus negativ geladenen Aminosäuren gebildete erste Domäne scheint eine Orientierungsrolle des Moleküls bezüglich der Membran zu übernehmen. Ist die erste Domäne zerstört, kommt es zu einer starken Reduzierung der hämolytischen Aktivität des Proteins. Die Fähigkeit zur Bindung an die Zellmembran und das Cholesterol bleiben hingegen unbeeinflusst (235). Die Verminderung der hämolytischen Aktivität resultiert aus einer Beeinträchtigung der Oligomerisation nach der Membranbindung.
Die zweite Domäne besitzt eine β-Faltblattstruktur und verbindet die erste mit der vierten Domäne (233). Diese vierte Domäne macht etwa 25% der Länge von Pneumolysin aus und bindet an Cholesterol und an Erythrozytenmembranen (235). Diese initiale Bindung ist für den Lyseprozess essentiell (235). Es handelt sich bei dieser Domäne um eine Tryptophan-reiche Schleife, welche den einzigen Cysteinrest des gesamten Moleküls enthält (219).
Mutationen, die die Konformationen dieser Schleife ändern, bewirken eine Abnahme der zytolytischen Aktivität, was möglicherweise eine Folge des Verlustes der Bindungsaktivität ist (219;235).

Pneumolysin ist für die Virulenz der Pneumokokken von essenzieller Bedeutung. Untersuchungen an Mäusen demonstrieren, dass Pneumolysin-defiziente Pneumokokkenstämme im Gegensatz zu Wildtypstämmen keine Infektion hervorrufen können (236). Das Toxin wird möglicherweise durch Autolysin-induzierte Lyse, beispielsweise in der späten Wachstumsphase wenn die Wachstumskurve einen asymptotischen Verlauf einnimmt, freigesetzt (233;237). Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass bei klinisch relevanten Typ-3-Pneumokokkenstämmen die Pneumolysinfreisetzung am Anfang der Wachstumsphase autolysinunabhängig auftritt. Außerdem zeigen Infektionsstudien an Mäusen, dass der Verlust der Autolysinbildung die Fähigkeit der Kokken zur Infektion nicht wesentlich beeinflusste (236).

Dies verdeutlicht, dass die Autolysinaktivität keine Voraussetzung für die virulente Wirkung von Pneumolysin darstellt. Möglicherweise nutzen unterschiedliche Stämme auch verschiedene Mechanismen der Pneumolysinfreisetzung (236).

Die lytische Wirkung des Pneumolysins an der Lipiddoppelmembran ist das Resultat einer komplexen Kombination von Ereignissen. Zunächst erfolgt die Bindung des Toxins an die zytoplasmatische Membran der Wirtszelle, für die das membrangebundene Cholesterol essentiell ist. Danach kommt es zum Einbau in die Zellmembran, mit anschließender Porenbildung, woraufhin die Zielzelle lysiert wird (219;233;234). Bei diesen Vorgängen kommt es zur Extraktion der Lipide in freie Oligokomplexe, zur Aggregation und Fusion von Membranen und zur Membrandestabilisierung, was in der Bildung kleiner Vesikel resultiert. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass Pneumolysin, und auch die anderen Toxine dieser Proteingruppe, eventuell nicht nur die Zellmembranen permeabilisieren, sondern die Zellen zur Vesikelbildung, Aggregation und Fusion veranlassen (238).

Dieser Vorgang ist bei der Meningitis und der Otitis media schon gut dokumentiert. Für die Gehirnschäden, die bei einer Pneumokokkenmeningitis auftreten sind vermutlich zwei Mechanismen verantwortlich. Erstens die direkte inflammatorische Neurotoxizität aufgrund der Freisetzung bakterieller Produkte und Wirtsmediatoren. Zweitens entsteht ein Gehirnödem durch den Integritätsverlust der Blut-Hirn-Schranke. In einem *in vitro*-Blut-Hirn-Schranken-Modell mit humanen Zelllinien von Endothelzellen aus Gehirnkapillaren zeigen Zysk et al. (239), dass Pneumolysin und Pneumolysin produzierende Pneumokokken schwere Schäden verursachen. Ein Pneumolysin-defizienter Stamm oder isolierte Zellwandkomponenten von Pneumokokken haben hingegen keinen schädigenden Effekt.

Dies deutet darauf hin, dass Pneumolysin eine wichtige Rolle bei der Schädigung der Blut-Hirn-Schranke einnimmt und einen Beitrag zur Erregerinvasion ins zentrale Nervensystem, mit nachfolgender Entwicklung eines Gehirnödems, leisten kann (239).

In vivo-Versuche, mit Pneumokokken-infizierten Mäusen, unterstützen diese Behauptung. Die Infektion mit einem Pneumolysin-defizienten Stamm erzeugt bei den Tieren nur eine milde Meningitis (240).

Außer über den hämatogenen Weg können die Pneumokokken auch direkt aus dem Nasopharynx über die olfaktorischen Neuronen in das zentrale Nervensystem gelangen (241). Bei der Otitis media verursachen die frei gesetzten Zellwandkomponenten der Pneumokokken eine Inflammationsreaktion und die Haarzellen in der Cochlea sind gegenüber der zytotoxischen Wirkung von Pneumolysin sehr empfindlich. In Experimenten verursacht das Toxin schwere Schäden am Cortiorgan, was bisher für keinen anderen Virulenzfaktor der Pneumokokken gezeigt wurde, außer für Neuramidase (242).

Pneumolysin ist allerdings noch für weitere Reaktionen verantwortlich, die auch bei der Pathogenese einer Pneumonie eine Rolle spielen. Schon in geringen Konzentrationen verstärkt es die proinflammatorische Aktivität von Monozyten durch die Stimulierung der Produktion von Zytokinen wie TNFα und Interleukin 1β (243). Vermutlich wird dies durch einen Einstrom extrazellulären Kalziums verursacht, der durch die Pneumolysin verursachte Porenbildung der Membran zustande kommt (233). Auch auf respiratorische Epithelzellen wirkt es zytotoxisch. Dabei werden Zellverbindungen zerstört und der Zilienschlag des Flimmerepithels vermindert. Diese Pneumolysinfunktion ist besonders zu Beginn einer Pneumokokkeninfektion sehr ausgeprägt und auch in Zellkulturen nachweisbar. Durch den Einfluss auf Flimmerepithelzellen sind diese nicht mehr in der Lage, den unteren Respirationstrakt genügend von Schleim zu reinigen, so dass eine Ausbreitung der Infektion gefördert wird (219). Außerdem könnten Interaktionen des Pneumolysin mit Alveolarepithelzellen und pulmonalen Endothelzellen möglicherweise an der Entstehung eines alveolären Ödems während einer Pneumokokkenpneumonie beteiligt sein. Eine Überflutung der Alveolen mit eiweißreicher Ödemflüssigkeit könnte dann einen guten Nährboden für das bakterielle Wachstum bieten. Somit würde den Erregern die weitere Ausbreitung in Lungengewebe und in die Blutbahn erleichtert (233;237).

Der zytotoxische Effekt des Pneumolysins könnte darüber hinaus die Funktion von phagozytierenden und anderen Immunzellen blockieren, wodurch die inflammatorische und die Immunantwort des Wirtes unterdrückt wird. Unter anderem wird die Lymphokin- und Immunglobulinproduktion gehemmt und die Chemotaxis blockiert (219).

2.8 Akutes Lungenversagen (ARDS / ALI)

Ashbaugh et al. beschrieben 1967 erstmalig das Auftreten einer akuten respiratorischen Insuffizienz ohne kardiale oder pulmonale Primärerkrankung. Sie bezeichneten diese, zur Unterscheidung des Atemnotsyndroms der Neugeborenen („Infant respiratory distress syndrome“ = IRDS), als „Adult respiratory distress syndrome“ (ARDS) (244;245). Im Jahre 1992 beschloss das Komitee der American-European Consensus Conference, dass die Abkürzung richtiger für „Acute respiratory distress syndrome“ stehen sollte, da dieses Syndrom nicht nur auf Erwachsene limitiert ist (245;246).

ARDS wurde dort als ein Syndrom beschrieben, das durch Inflammation und Permeabilitätsanstieg geprägt ist.

Gleichzeitig schlugen sie den Begriff „Acut lung injury“ (ALI) vor, um den Zusammenhang zwischen den pathologischen Ereignissen und den Schäden am Lungenparenchym zu verdeutlichen (247).

ALI wurde als ein Syndrom definiert, welches durch Inflammation und Permeabilitätsanstieg geprägt ist (Tabelle 2.2). Gleichzeitig treten pathologische, klinische, radiologische und physiologische Veränderungen auf, die zwar mit einer linksarteriellen oder pulmonalen Hypertension koexistieren aber nicht dadurch erklärt werden können.

ARDS wurde als eine schwere Form der ALI definiert (Tabelle 2.2). Bei Patienten mit dieser Erkrankung wirkt sich der Lungenschaden schwerer auf die Sauerstoffversorgung im Blut aus (245;247). Bei beiden Erkrankungen können ferner folgende Charakteristika gefunden werden: Ein akuter Krankheitsverlauf, ein bilaterales Infiltrat, welches in der Thorax-Röntgenaufnahme nachweisbar ist, ein nichtkardiales Lungenödem und eine pulmonale Hypertonie (245;248;249).

Tabelle 2.2: Definition von ALI und ARDS
nach der American-European Consensus Conference on ARDS (1992) (248)

ALI	ARDS
akuter Beginn	akuter Beginn
p_aO_2/F_iO_2 < 300 mmHg (unabhängig vom PEEP)	p_aO_2/F_iO_2 < 200 mmHg (unabhängig vom PEEP)
radiologisch diffuse Verschattungen beidseits	radiologisch diffuse Verschattungen beidseits
Pulmonalkapillärer Verschlussdruck < 18 mmHg (falls gemessen) oder fehlender klinischer Anhalt für einen erhöhten linksatrialen Druck	Pulmonalkapillärer Verschlussdruck <18 mmHg (falls gemessen) oder fehlender klinischer Anhalt für einen erhöhten linksatrialen Druck

Die Mortalität liegt bei diesen Krankheitsbildern trotz intensiver Forschung und differenzierter Therapie, seit vielen Jahren unverändert bei 40 – 60% (248).

Die Ätiologie des akuten Lungenversagens ist vielschichtig. Neben einem komplizierten Pneumonieverlauf kommen z.B. Sepsis, die Inhalation oder Aspiration toxischer Substanzen (mit Schädigung der alveolokapillären Membran), Polytrauma, hochgradige Verbrennungen, Pankreatitis oder Schock als Ursache infrage. Daher kann ein ARDS auch bei bisher Lungengesunden auftreten (244;247;250). Trotz der unterschiedlichen Ursachen besteht ein einheitliches Bild der pulmonalen Läsionen.

Am Anfang wird die Schädigung von einer Permeabilitätszunahme (Leckagesyndrom) und Ödembildung an der alveolokapillären Membran bestimmt. Durch Zerstörung der Gefäßendothelzellen und der Alveolarepithelzellen erhöht sich die Permeabilität der alveolokapillären Schranke für Flüssigkeit, Makromoleküle und Zellen, was zu einem eiweißreichen Ödem im Alveolarraum führt. Dies wird durch die Aktivierung potenter inflammatorischer Endzündungsmediatoren, wie z.B. das Komplementsystem (z.B. durch Endotoxine), dessen Mediatoren polymorphkernige neutrophile Granulozyten aggregieren.

Diese „kleben“ dann am Kapillarendothel, und durch ihren stimulierten Metabolismus setzen sie toxische Sauerstoffradikale und Elastase frei, welche die endotheliale Läsion und Ödembildung anstoßen. Auch Mediatoren der Arachidonsäurekaskade und PAF können daran beteiligt sein (250). Das entstandene proteinreiche Lungeninfiltrat trägt zur Schädigung der Typ II-Pneumozyten bei und somit zur Behinderung des Surfactantsystems (251).

Durch die Verminderung der Surfactantproduktion entstehen im weiteren Verlauf Mikroatelektasen, die eine Vergrößerung des Shunt-Volumens bewirken und in eine akute pulmonale Hypertonie münden. Insgesamt resultiert aus diesen Veränderungen eine Verringerung der Gasaustauschfläche und konsekutiv eine ausgeprägte arterielle Hypoxie, was häufig eine Beatmung des Patienten mit einem hohen positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) und hoher Sauerstoffkonzentration erfordert (250).

Werden die pathogenetischen Abläufe, die das Leckagesyndrom induzieren, nicht fortgesetzt unterhalten, setzen sich reparative Vorgänge durch. Schreitet die Erkrankung fort, zeigt sich das Nebeneinander von Ödem und Fibrosierung, wobei letztere zunehmend überwiegt (250). Durch den fibrotischen Umbau der Lungenstruktur entwickelt sich das Bild der „steifen Lunge“, deren Volumendehnbarkeit nachhaltig herabgesetzt ist (250).

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Für Experimente an isoliert perfundierten Mauslungen wurden weibliche Balb/ C –Mäuse aus „specific pathogen-free“ Haltung von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Mäuse, die eine Defizienz für den Rezeptor des Plättchen-Aktivierenden Faktors aufwiesen (PAF-$R^{-/-}$), wurden freundlicherweise von Professor Satoshi Ishii (Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Tokyo, Japan) zur Verfügung gestellt. Die Tiere waren mindestens 10mal auf Balb/C-Hintergrund rückgekreuzt, um Stammunterschiede zu verhindern. Das Alter der Tiere lag zwischen 8 und 12 Wochen und das Gewicht betrug 18-21 Gramm.
Die Pneumokokken-Infektion fand an weiblichen C57/Black6-Mäusen (Charles River Laboratories) statt. Die 8 - 11 Wochen alten Tiere hatten ein Gewicht von 16-18 Gramm.

Die Anzahl der verwendeten Tiere pro Versuchsgruppe ist im Anhang in Form eines Studiendesigns angegeben (Kapitel 9.1, Seite 130).

Die Versuchsvorhaben waren zuvor vom zuständigen Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin genehmigt worden (Antragsnummern: G-0034/04, O-0215/05, O-0281/06).

3.1.1 Haltung

Vor den Versuchen wurden die Tiere auf Standardeinstreu in geschlossenen Käfigen mit Filterhaube (Typ II-L, EHRET, Emmendingen, Deutschland) gehalten, in denen ihnen pelletiertes Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung stand. Der Wechsel zwischen Hell- und Dunkelphase erfolgte alle 12 Stunden.

3.2 Infektionsversuche *in vivo*

3.2.1 Anzucht von *Streptococcus pneumoniae*

Für die Erregeranzucht wurden aus einem Arbeitsstock des *Streptococcus pneumoniae* Typ 3 Stammes NCTC 7978 mehrere Verdünnungsausstriche auf Columbiaagar (mit 5% Schafblut) über 10-12 Stunden bei 37°C und 5%-CO_2-Atmosphäre gezüchtet.
Anschließend erfolgte eine Überimpfung einzelner Kolonien in steriles Flüssignährmedium (Todd-Hewitt +0,5% Yeast, ergänzt mit 10% FCS). Die Kokkenanzahl in diesem Medium wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) mittels Photometer (UVIKON $_{xs,}$ Biotek Instruments, Winooski, VT, USA) auf OD = 0,03 – 0,04 eingestellt, und eine zweistündige Inkubation folgte anschließend bei 37°C und 5%-CO_2. Durch repetitive OD-Messungen wurde das Wachstum überwacht und bei Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (bei OD = 0,3) die Anzucht unterbrochen, indem durch Zentrifugation (2009 RZB für 10 Min.) die Kokken aus dem Nährmedium isoliert wurden. Da eine OD von 0,1 einer Kokkendichte von 1 x 10^8 CFU/ml entspricht, konnte nachfolgend die für die i.n. Inokulation erforderliche - Keimkonzentration durch Resuspension mit PBS eingestellt werden.
Bei jeder Inokulation erfolgte die nachträgliche Kontrolle der Keimanzahl in der Erregersuspension durch Anfertigung einer Verdünnungsreihe und Beimpfen von Blutagarplatten.

3.2.2 Intranasale Inokulation von *Streptococcus pneumoniae*

Um bei den Mäusen eine *Streptococcus pneumoniae* Infektion zu induzieren, wurde eine intranasale Inokulation dieses Erregers vorgenommen. Dafür erfolgte zunächst die Kontrolle des Körpergewichts der Versuchstiere. Dann wurde den Tiere nach intraperitonealer (i.p.) Injektionsnarkose (90 mg/kg Ketamin und 15 mg/kg Xylazin) transnasal 10 µl der Erregersuspension pro Nasenloch appliziert (Infektionsdosis: 1 x 10^7 oder 5 x 10^6 CFU/Tier).
Die Behandlung der Kontrolltiere, die 20 µl steriles PBS verabreicht bekamen, fand auf die gleiche Weise statt.
Bis zum Erwachen standen die Mäuse unter ständiger Beobachtung, und auch während der übrigen Versuchszeit fand regelmäßig mehrmals täglich eine Kontrolle des Gesundheitszustandes statt. Es wurde das Allgemeinbefinden, insbesondere Sozialverhalten, Körperhaltung, Fell und Atmung sowie die Körpermasse kontrolliert.

3.2.3 Ermittlung der pulmonalen Permeabilität

Zur Quantifizierung der pulmonalen Permeabilität mit *Streptococcus pneumoniae* infizierter Tiere wurden diese 12, 24 und 48 Stunden nach der i.n. Inoculation (Infektionsdosis: 1 x 10^7 CFU/Tier) präpariert und deren Lungen lavagiert (siehe auch Kapitel 3.3.2).

Jeweils eine Stunde vor Präparationsbeginn wurde 1 mg humanes Serumalbumin (HSA) in 75 µl 0,9%-iger NaCl-Lösung in die Schwanzvene der Tiere appliziert. Die Fixierung der Mäuse erfolgte dazu in einer speziell angefertigten Apparatur. Zur besseren Darstellung der Schwanzgefäße wurden diese mit Hilfe einer Wärmerotlichtlampe dilatiert.

Die Präparation diente in diesem Versuchsmodell vornehmlich dem Zweck, Blut- und Lungenlavageproben zu gewinnen, und die Lungengefäße schonend blutfrei zu spülen. Daher wurde das unter 3.3.2 beschriebene Vorgehen in wenigen Punkten wie folgt modifiziert.

Nach der intracardialen Applikation von Heparin (50 µl Heparin 2500 I.E./ml) erfolgte eine finale Blutentnahme aus der Vena cava caudalis. Die Blutprobe wurde unverzüglich bei 1500 RZB (Relative Zentrifugationsbeschleunigung) für 10 Minuten zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bei -80°C gelagert.

Zur Perfusion wurde ein Katheter in die Pulmonalarterie gelegt. Durch eine Inzision in die linke Kammerwand konnte der venöse Abfluss geschaffen werden. Nach Beendigung der Präparation fand eine drei Minuten dauernde Ventilation mittels Unterdruckbeatmung und gleichzeitige Perfusion mit 0,9%-iger Natriumchloridlösung statt. Anschließend wurde die Lunge mit 0,9%-iger NaCl-Lösung lavagiert (2 x 650 µl), die BALF gepoolt und ebenfalls bei -80°C gelagert.

Im Plasma und in der BALF ließ sich die HSA-Konzentration mittels ELISA-Kits (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA) messen. Anschließend konnte das HSA-BALF/Plasma- Verhältnis errechnet werden. Je größer dieser Quotient war, desto größer auch die Schädigung an der alveolokapillären Barriere infolge der Pneumonie.

Die Durchführung dieses ELISA's erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Messung der optischen Dichte (OD) bei 450 nm diente ein Anthos ht2 Mikroplatten Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) mit zugehöriger Software (WinRead Anthos).

3.2.4 Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe

Die Quantifizierung der neutrophilen Granulozyten aus dem Lungengewebe wurde freundlicher Weise von Frau Katrin Wricke (Charité-Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie) durchgeführt und fand in separaten Experimenten statt. Sie erfolgte mittels Durchflusszytometrie mit dem FACS Calibur von BD Biosciences (FACS steht für fluorescence activated cell sorter).

Die zu untersuchenden Lungen wurden den infizierten Tieren (Infektionsdosis: 5 x 10^6 CFU/Tier) nach erfolgter Tötung 12 h, und 24 h *post inoculationem* entnommen. Zur Gewinnung der neutrophilen Granulozyten musste das Organ in 5 ml RPMI-Medium (mit 3% DNase und 0,7 mg Kollagenase) aufgenommen und zerkleinert werden. Nach 1 h Inkubation bei 37°C erfolgte eine weitere Homogenisierung der Gewebesuspension durch ein Sieb (Porengröße 70 µm). Das Lungenhomogenat wurde dabei in 15 ml DNase-versetzten RPMI-Medium aufgenommen. Nach Zentrifugation (301 RZB, 10 Minuten) konnte der Überstand verworfen und die Zellen mit 3 ml PBS aufgefüllt werden.

Zur Bestimmung der Zellzahl/ml mussten 5 µl der Zelllösung mit der gleichen Menge Methylviolett versetzt und damit eine Neubauer Zählkammer befüllt werden. Dann wurden die Zellen in 16 Großquadraten gezählt und unter Berücksichtigung der Verdünnungsschritte und des Zählkammervolumens die Zellzahl/ml berechnet (Zahl x 2 x 10000). Diese Zahl multipliziert mit dem Volumen der Suspension (3 ml) ergab die Gesamtzellzahl.

Für die Messung wurde ein Verhältnis von 3 µl Antikörpern zu 300000 Zellen angestrebt. Dementsprechend erfolgte nach der Zählung die Entnahme der gewünschten Menge an Zellen, die mit PBS überschichtet und dann zentrifugiert wurden (470 RZB, 5 Minuten). Nach Entfernen des Überstandes konnten die Zellen mit 2 µl Fc-Block 10 Minuten inkubiert werden. 50 µl dieser Zelllösung wurden zu den bereits vorgelegten Fluoreszensantikörpern (jeweils 3 µl von GR-1 PE, CD45 PerCP und F4-80 APC) gegeben und das ganze 30 Minuten bei + 4°C inkubierte. Dann erfolgte die Zugabe von 450µl BD-Lyse mit anschließender 10-minütigen Inkubation bei + 4°C. Danach wurde die Probe mit Cellwash aufgefüllt und zentrifugiert (470 RZB, 5 Minuten), der Überstand verworfen und die Probe mit 300 µl Cellwash aufgefüllt.

Im Anschluss daran konnte die Analyse der Probe mittels Durchflusscytometrie im FACS Calibur durchgeführt werden. Es wurden insgesamt 20.000 Zielzellen ausgezählt und die Fraktionen von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten bestimmt. Die absoluten Zahlen von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten errechnete sich aus den gemessenen prozentualen Anteilen der Zellen und der zuvor ermittelten Gesamtzellzahl.

3.3 Isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge (Ipml)

3.3.1 Aufbau der Versuchsanlage

A) Einleitung

Die Mauslunge wird bei kontinuierlicher Beatmung vom Blutkreislauf des tief narkotisierten Tieres separiert. Für die folgende blutfreie Perfusion der Lunge wird eine spezielle Elektrolytlösung verwendet. Dieser Versuchsaufbau (siehe Abb. 3.1) bietet die Möglichkeit, das native, intakte Organ unabhängig von humoralen oder nervalen Funktionen des Gesamtorganismus zu untersuchen. Es können physiologische Parameter wie die dynamische Compliance der Lunge und die Resistance der Atemwege kontinuierlich gemessen, sowie hämodynamische Veränderungen der pulmonalen Strombahn erfasst werden. Darüber hinaus kann sowohl die Ausprägung des Lungenödems quantifiziert, als auch die endotheliale Permeabilität gemessen und Proben des Perfusates oder des Lungengewebes auf vielfältige Weise untersucht werden. Über den transbronchialen oder den vaskulären Zugang besteht die Möglichkeit der pharmakologischen Beeinflussung des Organs (252).

B) Unterdruckkammer

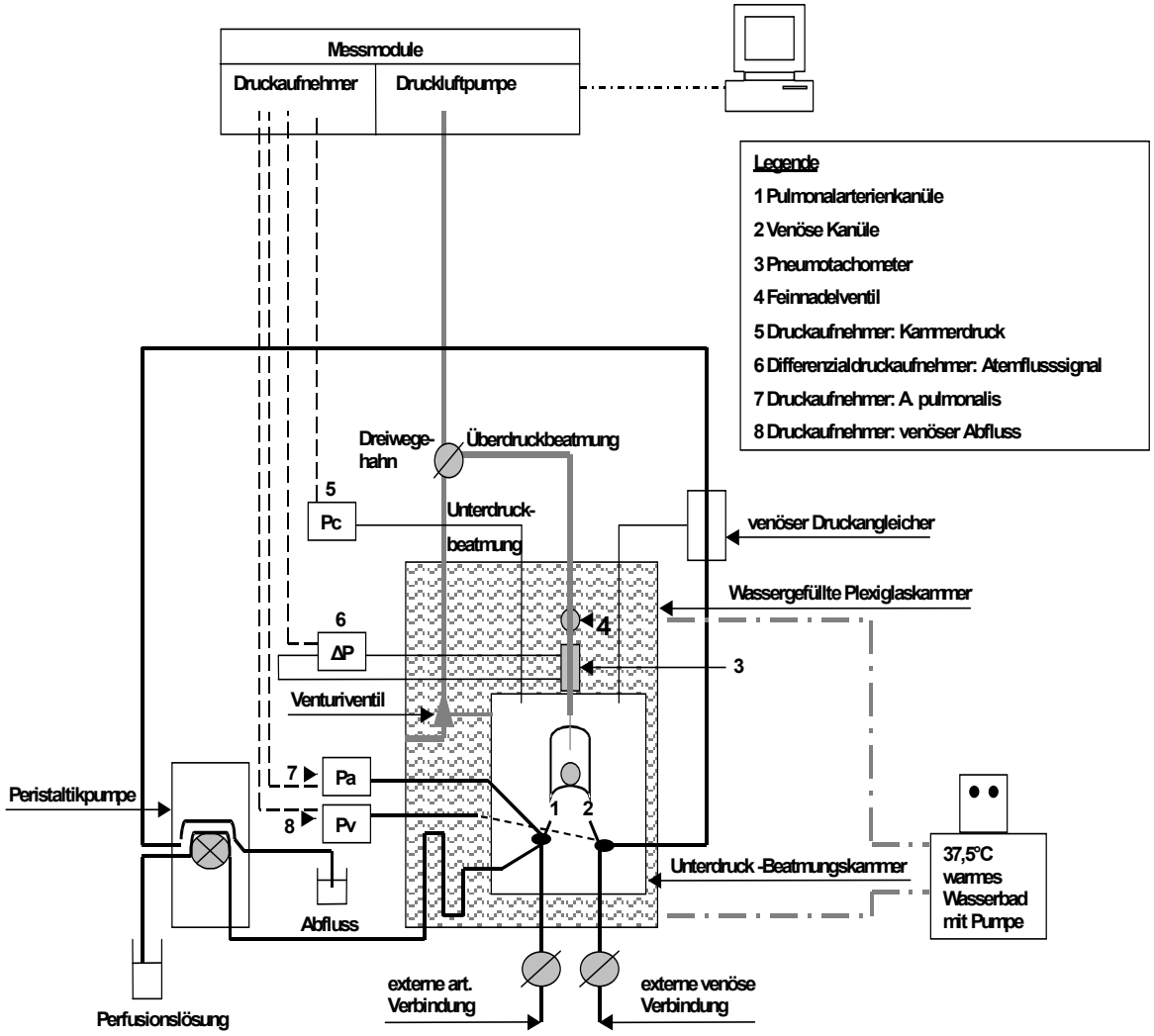
Die Perfusionsanlage (Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus GmbH) aus Plexiglas bestand aus einer doppelwandigen Kammer mit zugehörigem Deckel. Diese wurde mit einer Neigung von 20° zur Horizontalen aufgestellt, so dass die Trachea höher positioniert war als die Lungenbasis. Durch Füllen des Doppelwandsystems mit 37,5°C warmen Wassers konnte die Temperatur des Kammerinnenraumes konstant bei 37,0°C gehalten werden. Die zur Perfusion, Ventilation und Messung diverser Parameter notwendigen Anschlüsse waren in die Doppelwandkammer eingelassen.

C) Ventilation

Die Ventilation des Organs konnte wahlweise durch Über- oder Unterdruckbeatmung mittels einer Druckluftpumpe (Ventilation Control Module (VCM); Hugo Sachs Elektronik) erfolgen. Zur Überdruckbeatmung führte eine direkte Schlauchverbindung von der Pumpe zur Trachea. Ein Feinnadelventil diente zur Regulierung des Luftflusses. Dieser konnte durch einen Drei-Wege-Hahn zu einer Venturidüse umgeleitet werden, welche mit dem Innenraum in Verbindung stand. Diese Düse erzeugte einen negativen Kammerinnendruck.
Der endexpiratorische und endinspiratorische Druck wurden auf -4,5 und -9 cm H_2O justiert, die Atemfrequenz auf 90 Atemzüge/min. Das Verhältnis der Inspirationszeit zur Expirationszeit war 1:1.
Das Atemflusssignal wurde mit Hilfe eines Pneumotachometers in ein proportionales Drucksignal umgewandelt. Die elektrische Messung erfolgte durch einen Differenzialdruckaufnehmer (Differential Pressure Transducer Validyne DP45-14, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland). Veränderungen des Kammer- und Trachealdrucks konnten durch weitere Druckaufnehmer registriert werden (Pressure Transducer MPX, Typ 399/2, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland).

D) Perfusion

Die in einem Wasserbad erwärmte Perfusionslösung (37,5°C) wurde in konstantem Fluss (1 ml/min) mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Reglo-Analog Isamtec SA, Glattbrugg, Schweiz) aus dem Vorratsgefäß über einen Wärmetauscher und eine Blasenfalle in die Lungengefäße gepumpt. In diesem nicht-rezirkulierenden System erfolgte der venöse Abfluss durch einen zweiten Pumpenkanal und über ein Druckausgleichsgefäß. Die Aufzeichnung des pulmonalarteriellen und pulmonalvenösen Druckes konnte mittels Druckaufnehmern (Pressure Transducer P75, Typ 379, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) durchgeführt werden. Des Weiteren bestand, über externe Verbindungen zu den Kathetern, die Möglichkeit zur direkten Infusion in die Pulmonalkanüle und zur Gewinnung von Perfusatproben aus dem venösen Abfluss.
Eine spezielle Software (Pulmodyn Software, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) ermöglichte die Registrierung und Speicherung der Messdaten.



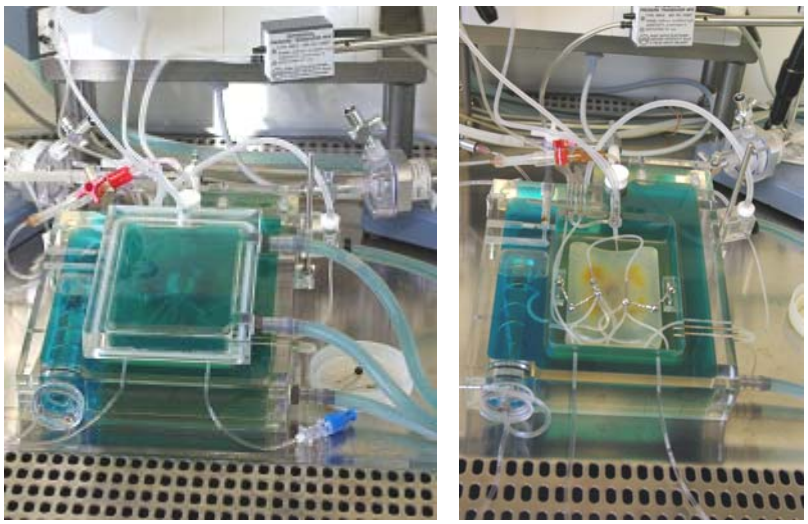


Abbildung 3.1: Versuchsaufbau für die isoliert perfundierte und ventilierte Mauslunge
Das Perfusionssystem ist schwarz dargestellt, das Ventilationssystem grau und der Warmwasserkreislauf zur Erwärmung der Unterdruckkammer in Wellenlinien und als unterbrochene Linie (Abbildung modifiziert nach (253)).

3.3.2 Präparation der Lunge und experimentelles Protokoll

Zur Lungenisolierung wurde die Maus tief narkotisiert (100 mg/kg KM Ketamin, 20 mg/kg KM Xylazin i.p.) und in Rückenlage in der Kammer fixiert. Nach Tracheotomie, Einführen einer Trachealkanüle und Etablierung der Überdruckbeatmung (90 Atemzüge/min., Raumluft), erfolgte eine mediane Laparotomie, Eröffnung des Diaphragmas, intracardiale Heparinisierung (50 µl Heparin 2500 I.E./ml) und rasche Entblutung des Tieres, während der der Tod eintrat.

Nach Eröffnung des Brustkorbes und Darstellung der Lungenarterie wurde diese kanüliert, dann ein zweiter Katheter in den linken Herzvorhof eingebunden, und die Perfusion der Lunge mit sterilem Krebs-Henseleit-hydroxyethylamylopectin Puffer (Temperatur: 37,5°C, Flussgeschwindigkeit: 1 ml/min; Hersteller: Serag, Deutschland) gestartet.

Die Ventilation mittels Unterdruckbeatmung (-4,5 zu -9,0 cm H_2O), sowie das Justieren des venösen Abflussdruckes auf + 2,2 cm H_2O erfolgte nach dem Schließen der Kammer. Zur Vermeidung von Atelektasen fand in regelmäßigen Abständen von 4 Minuten ein automatisch durchgeführter vertiefter Atemzug (-24 cm H_2O) statt (Zeitmodul TCM; Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland).

Um einen physiologischen Säure-Base-Haushalt zu erhalten, wurde dem Perfusionsmedium 8,4% Natriumhydrogencarbonat-Lösung beigemischt, so dass eine 20 mM Lösung entstand, und eine gleichzeitige Begasung mit einem Kohlendioxid-haltigen Gas (5% CO_2, 20% O_2, 75% N_2) via Glasfritte durchgeführt. Außerdem gelangte dieses Gasgemisch über eine der Trachealkanüle vorgeschaltete Verbindung in die Atemwege.

Unter „Baseline“-Bedingungen erfolgte initial eine 25 minütige Perfusion und Ventilation der Lunge, bevor - für die spätere Bestimmung der Lungenpermeabilität - humanes Serumalbumin (HSA; Human Albumin Grifols® 20%, Grifols Deutschland GmbH) mittels Perfusor (Perfusor F Typ 871332/4, BRAUN, Melsungen) über eine externe arterielle Verbindung dem Perfusat in einer Konzentration von 0,04% beigemischt wurde.

Um die Rolle des PAF-abhängigen Signalweges im PLY-induzierten Lungenversagen zu analysieren, kamen unterschiedliche spezifische Inhibitoren und Antagonisten zum Einsatz (siehe Abb. 3.2). Sie wurden in ihren entsprechenden Konzentrationen zeitgleich mit der HSA-Applikation verabreicht (siehe Tabelle 3.1).

Die intravenöse (infundiert über 1 Minute) oder intratracheale (25 µl Spray) Applikation des rekombinanten Pneumolysins (PLY), des Pneumolysoids PD-B (1µg/ml) oder der 0,9%-igen NaCl-Lösung fand 10 Minuten später statt. Folgende Mengen des PLY wurden für die verschiedenen Dosisreihen und Inhibitionsversuche verwendet:

- 0,025 µg, 0,125 µg, 0,25 µg und 2,5 µg für die HSA-Quantifizierung nach intratrachealer PLY-Applikation
- 0,25 µg und 2,5 µg für die Bestimmung der wet-to-dry weight ratio nach intratrachealer PLY-Applikation
- 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 2,5 µg/ml jeweils über 1 Minute infundiert für die HSA-Quantifizierung nach intravenöser PLY-Applikation
- 1 µg/ml über 1 Minute infundiert für die verschiedenen Inhibitionsversuche (s. Tabelle 4), sowie zur Gewinnung von Perfusatproben für die Thromboxan- und PAF-Quantifizierung.

Das rekombinante Pnemolysin sowie das Pneumolysoid PD-B wurden freundlicherweise von Prof. Timothy J. Mitchell (Division of Infection and Immunity, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, United Kingdom) zur Verfügung gestellt.

Eine bronchoalveoläre Lungenlavage (2 x mit 650 µl 0,9%-iger NaCl-Lösung) erfolgte 30 Minuten nach der PLY-Verabreichung.

Die gewonnene Lavageflüssigkeit einer BAL wurde gepoolt, in Flüssigstickstoff schockgefroren und bis zur Bestimmung der HSA-Konzentration mittels ELISA (Human Albumin ELISA Quantitation Kit, Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA, siehe dazu 3.2.3) bei -80°C gelagert.

Auf gleiche Weise erfolgten die dazugehörigen Kontrollversuche. Anstatt des PLY wurde 0,9%-ige NaCl-Lösung verabreicht. Während der Versuche wurden Perfusatproben 5 Minuten vor, und 2, 5, 10 und 20 Minuten nach PLY-Applikation aus dem venösen Abfluss entnommen.

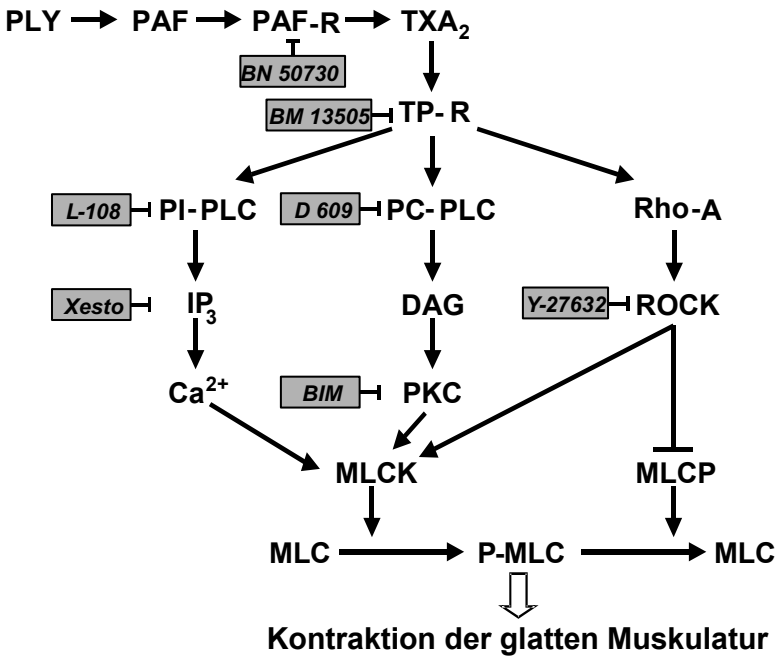


Abbildung 3.2: Schematische Übersicht der Signalwege und der verwendeten Antagonisten
PLY = Pneumolysin; PAF = Plättchen-aktivierender Faktor; PAF-R = PAF-Rezeptor;
TXA_2 = Thromboxan A_2; TP-R = TXA_2-Rezeptor;
PI-PLC = Phosphatidylinositol spezifische Phospholipase C;
PC-PLC = Phosphatidylcholin spezifische Phospholipase C; IP_3 = Inositol tri-Phosphat;
DAG = Diacylglycerol; ROCK = Rho-Kinase; PKC = Proteinkinase C; MLC = Myosin-leichte-Kette;
MLCK = Myosin-leichte-Kette-Kinase; MLCP = MLC-Phosphatase; P-MLC = phosphorylierte MLC;
BN 50730 = PAF-Rezeptor Antagonist; BM 13505 = Daltroban, TP-R Antagonist;
L-108 = PI-PLC Inhibitor; D 609 = PC-PLC Inhibitor; Xesto = Xestospongin C, IP_3 Antagonist;
BIM = Bisindolylmaleimid, PKC Inhibitor; Y 27632 = ROCK Inhibitor

Tabelle 3.1: Substanzen für die Experimente in der isoliert perfundierten Mauslunge
Daltroban (BM-13505) wurde von Herrn Dr. Wolters (Boehringer, Mannheim) und BN-50730 von Prof. Thureau (Institut Henri Beaufoue, Les Ulis, Frankreich) freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Substanz	Funktion	Konzentration
Xestospongin C	IP_3-Rezeptor Antagonist	1 µM
L-108	PI-PLC Inhibitor	30 µM
BIM	PKC Inhibitor	10 µM
Y-27632	Rho-kinase Inhibitor	5 µM
Daltroban (BM-13505)	Thromboxan-Rezeptor Antagonist	10 µM
BN-50730	PAF-Rezeptor Antagonist	10 µM
AA861	Lipoxygenaseinhibitor	10 µM
D609	PC-PLC Inhibitor	100 µM
2-APB	Inositol (1,4,5)-tri-Phosphat –Rezeptor Inhibitor	50 µM
PAF-C_{16}	Plättchen-Aktivierender-Faktor	100 nM
U46619	Thromboxan A_2-Analogon	100 nM

.

Separate Versuche wurden für die Bestimmung der „Wet-dry weight ratio“ (n=5 pro Versuchsgruppe), für immunhistologische Untersuchungen an Lungenproben (n=3 pro Versuchsgruppe), für die PAF-Quantifizierung aus Lungengewebe (n=7 pro Versuchsgruppe) und für die Thromboxanbestimmung aus Perfusat (n= 5-7 pro Versuchsgruppe, siehe auch Erläuterung zu Abb. 4.10 A) durchgeführt.

a) Für die Bestimmung der „Wet-to-dry weight ratio“ erfolgte eine Gewichtsbestimmung der Lungen direkt nach dem Versuch, eine anschließende Trocknung des Gewebes bei 60°C für 48 h, danach eine erneute Wägung, und die darauffolgende Quantifizierung des Lungenödems durch die Bestimmung des Verhältnisses zwischen Feucht- und Trockengewicht.
Während des Experiments erfolgte keine HSA-Applikation und anschließende BAL.

b) Die Versuche für die anschließende immunhistochemische Färbung des HSA fanden nach folgendem Protokoll statt.
10 Minuten nach dem Start der HSA-Applikation wirkte 1 µg/ml PLY, infundiert über einen Zeitraum von 10 Minuten, auf das Lungengewebe. Die Perfusion wurde 30 Minuten nach dem Start der PLY-Gabe beendet, worauf die bronchoalveoläre Lavage (2 x 650 µl 0,9%-ige NaCl-Lösung) und eine anschließende Instillierung der Lunge mit 475 µl Cryofixans (OCT : PBS im Verhältnis 1 : 1) erfolgte.
Nach Abbinden der Trachea wurde das Herz-Lungen-Paket entnommen, langsam über Stickstoffdampf gefroren und dann in einem Coulter-Counter-Gefäß mit OCT-PBS überschichtet. Gleichzeitig erfolgte dabei eine starke Kühlung des Gefäßes, so dass das OCT-PBS-Gemisch sofort gefror. Anschließend konnte das Präparat bis zum Schneiden bei -20°C gelagert werden.

Ähnlich verliefen die Experimente zur Gewinnung von Proben für den immunhistochemischen Toxinnachweis im Lungengewebe. Auch hier wurde 10 Minuten nach dem Start der HSA-Applikation PLY intravenös verabreicht. Allerdings handelte es sich dabei um eine Gabe von 1 µg/ml PLY über einen Zeitraum von 5 Minuten, und die Perfusion wurde 20 Minuten nach dem Beginn der PLY-Applikation beendet.
Kontrollversuche für die immunhistochemische Färbung, mit Verabreichung von 0,9%-iger NaCl-Lösung anstelle von PLY, fanden ebenfalls statt.

c) Die Thromboxanquantifizierung erfolgte aus Perfusatproben, die zu den Zeitpunkten 5 Minuten vor, 2, 5, 10 und 20 Minuten nach der PLY-Applikation direkt aus dem pulmonalvenösen Perfusionsfluss entnommen wurden. Nach dem Schockgefrieren in Flüssigstickstoff konnten sie bis zur Messung der Thromboxankonzentration mittels EIA (TXB_2-Enzym-Immunoassay, Cayman, Ann Arbor, MI, USA) bei -80°C gelagert werden.

Auf die gleiche Weise wurden Positivkontrollen mit PAF- C_{16} (100nM) (β-Acetyl-γ-O-hexadecyl-L-α-phosphatidylcholine, Sigma, Deisenhofen) und Kontrollen mit 0,9%-iger NaCl-Lösung durchgeführt.

Da Thromboxan (TXA_2) schnell abgebaut wird, ließ es sich vorzugsweise über sein stabiles Nebenprodukt TXB_2 indirekt quantifizieren. TXB_2 wird in weitgehend konstanter Relation zu TXA_2 gebildet.

Durch einen Enzym-Immunoassay, der als gebrauchsfertiges Kit im Handel erhältlich ist (Cayman, Ann Arbor, MI, USA), wurde die TXB_2-Konzentration in den Perfusatproben bestimmt. Anhand des Ergebnisses konnte anschließend auf das ursprüngliche TXA_2-Vorkommen rückgeschlossen werden.

Bei der Durchführung dieser Quantifizierung erfolgten das Lösen der verschiedenen Substanzen sowie alle anderen erforderlichen Arbeitsschritte (Standardverdünnung, Plattenbelegung, Inkubationszeiten, ect.) nach Herstellerangaben. Mit einem Mikroplatten Photometer (Anthos ht2, Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld, Software: WinRead Anthos) wurde die optische Dichte der Proben als Doppelbestimmung bei 405 nm gemessen.

d) Für die Quantifizierung von PAF im Lungengewebe wurde das jeweilige Experiment nach dem Erreichen des maximalen Anstiegs des pulmonalarteriellen Drucks (Ppa) (4-5 Minuten nach der intravenösen PLY-Applikation von 1 µg/ml / über 1 Minute) beendet, und das Lungengewebe nach der Entnahme mittels flüssigen Stickstoffs schockgefroren. Anschließend erfolgte eine Homogenisierung der gefrorenen Probe, die daraufhin bis zur Extraktion bei -80°C lagerte. Kontrollversuche ohne PLY-Applikation, wurden mit gleichem zeitlichem Ablauf durchgeführt.

3.4 Immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten

In Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Andreas Hocke (Charité, Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie u. Pneumologie) konnte eine immunhistochemische Untersuchung der Lungen aus den Ipml-Versuchen (siehe auch Kapitel 3.3.2 b) erfolgen. So bestand die Möglichkeit, die genaue Verteilung von Pneumolysin und HSA im Lungengewebe nachzuvollziehen.

Für die Anfärbung von Pneumolysin in gefrorenen Lungenschnitten wurden diese in einem Gefriermikrotom (Micron HM560, Microm GmbH, Walldorf) bei -20° C mit 10 µm Dicke geschnitten. Anschließend fand die PFA-Fixierung (3% PFA), die Permeabilisierung durch $Triton_{xi}$ (1% Triton), sowie die Blockade falsch positiver Antikörperbindungen mittels Blockademedium (0,01% Tween20; 0,05% bovines Serumalbumin; 5% Wirtsserum des Sekundärantikörpers; gelöst in 0,01 M PBS; pH 7,6) statt (254;255). Danach schloss sich die Inkubation mit einem Kaninchen Anti-PLY-Antikörper an, der freundlicher Weise von Prof. de los Toyos (Oviedo, Spanien) zur Verfügung gestellt wurde. Später erfolgte auf gleiche Weise die Markierung mit dem dazugehörigen zweiten Antikörper (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase) und danach die enzymatische Farbreaktion mittels Vector Red Kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Eine Blockade der endogenen AP wurde durch Zusatz von 50 µM Levamisol zum Farbsubstrat durchgeführt.

Zum Nachweis von HSA musste das Protokoll wie folgt modifiziert werden: Nach der Präparatfixation mit PFA (3%) wurde zunächst eine Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität durch 1,5% H_2O_2 durchgeführt. Darauf folgte eine Inkubation mit HRP-konjugiertem Ziegen anti-human HSA-Antikörper (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA) und die anschließende enzymatische Farbreaktion mit dem DAB- Substrat-Kit (Vector, Peterborough, Großbritannien). Für die Gegenfärbung wurde jeweils Methylgrün verwendet. Die Kontrollfärbung erfolgte unter Ausschluss des primären Antikörpers und Substitution mit nichtspezifischem Serum.

Die Beurteilung mittels Breitfeldmikroskopie fand bei 200-facher Vergrößerung an einem Axioskop 2 mit AxioCam HRc (Zeiss, Jena) statt.

3.5 Extraktion und Bestimmung des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF)

Das Lungenhomogenat für die PAF-Bestimmung wurde 1 Stunde in einem Glasröhrchen mit Teflondeckel, gefüllt mit 1,4 ml destilliertem Wasser + 2 ml Chloroform + 4 ml Methanol + 1 Tropfen Eisessig und 400 pg d3-PAF, inkubiert. Durch anschließende Zentrifugation konnten die noch vorhandenen Feststoffe von der Flüssigkeit getrennt und somit für eine eventuelle Proteinbestimmung isoliert werden. Um das Chloroform von der wässrigen Phase zu trennen erfolgte eine Zugabe von 2 ml destilliertem Wasser und 2 ml Chloroform. Die Chloroformphase wurde in ein neues Glasröhrchen pipettiert, das übriggebliebene Methanol erneut mit 4 ml Chloroform gewaschen, und die so entstandene zweite Chloroformschicht mit dem ersten Extrakt gepoolt. Nach der Verdunstung des Chloroforms durch eine Argon-Belüftung fand die Wiederherstellung mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch (1:1, v/v) statt. Die Lagerung der Lungenproben erfolgte bei –80°C.

Später wurde in Gegenwart von 400 pg d3-PAF eine Lipidextraktion vorgenommen (256). Zur Untersuchung dieses Lipidextraktes auf den Phosphat- und PAF-Gehalt wurden die gleichen Verfahren, wie in G. Rouser et al. (257) und J. Owen et al. (256) beschrieben, angewendet.

Darauf folgte die Isolierung von PAF aus dem Lipidextrakt mittels Normalphasen-Verteilungs-Chromatographie (normal-phase HPLC) und die Quantifizierung mittels Umkehrphasen-Chromatographie (reversed-phase HPLC), gekoppelt an eine Tandem-Massenspektrometrie (257). Die Herstellung des benötigten Standards für die Messung des Plättchen aktivierenden Faktors erfolgte nach der Methode von Clay (258;258).

Die durch Zentrifugation gewonnenen Reste des Lungengewebes wurden luftgetrocknet, mit 1 M NaOH-Lösung bei 60°C aufgeschlossen bis die Lösung klar war, und nachfolgend der Proteingehalt des Aufschlussproduktes quantifiziert. Diese Untersuchung erfolgte nach Lowry et al. (259), allerdings wurden Reagenz A 0,16% Natriumtatrat und 1% Natriumdodecylsulfat zugefügt.

Das aufwendige Verfahren zur exakten PAF-Quantifizierung aus Lungenhomogenat wurde von Dr. John Owen, Department of Biochemistry, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC 27157, USA entwickelt (256) und von diesem in Kooperation durchgeführt.

3.6 Hydraulische Konduktivität von Endothelzellen

Die in den Kapiteln 3.6 – 3.8 beschriebenen Zellkulturversuche wurden freundlicher Weise von Kerstin Möhr und Katharina Berger (Charité, Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie u. Pneumologie) im Rahmen dieses Projektes durchgeführt, und die dabei erhobenen Daten zur Verfügung gestellt. Endothelzellen humaner Nabelstrangvenen (Human umbilical cord vein endothelial cells = HUVEC) wurden isoliert, kultiviert und anschließend auf Polycarbonatfiltermembranen überimpft, so dass auf diesen ein konfluenter Endothelzellmonolayer wachsen konnte (30;260-263). Dann wurde eine Filtermembran in der speziell dafür angefertigten Versuchskammer befestigt, so dass diese zweigeteilt war und die luminale Seite der Zellen oben lag. Ein Kammerdeckel verschloss das System, und das Volumen zwischen diesem und der Filtermembran betrug 1 ml. Im Deckel befanden sich zwei Zugänge, der eine für den Zufluss einer Pufferlösung (HBSS + Ca/Mg) um einen kontinuierlichen hydrostatischen Druck auf die Zellen auszuüben, der andere um Stimulanzien verabreichen zu können.

Der Kammerbereich unterhalb des eingespannten Filters gehörte zu einem halboffenen rezirkulierenden Perfusionssystem, welches ein Gesamtvolumen von 10ml umfasste und mit Pufferlösung (HBSS + Ca/Mg) gefüllt war, die durch eine Rollerpumpe auf einen kontinuierlichen Fluss von 10 ml pro Minute gebracht wurde.

Wenn durch den Endothelmonolayer ein gewisses Volumen hindurchfiltrierte, addierte sich dieses zum Gesamtvolumen und konnte mittels skalierter Glaskapillare quantifiziert werden.

Ein hydrostatischer Druck von 10 cm H_2O wirkte auf die luminale Seite, und nach einer Beobachtungsphase unter Basalbedingungen wurden die HUVECs mit 0,4 mg PLY provoziert.

Anhand kontinuierlicher Messung der Filtrationsrate des Monolayers konnte die hydraulische Konduktivität aus der Filtration (Volumen/Zeit) pro Oberflächeneinheit pro hydrostatischer Druckdifferenz berechnet werden.

3.7 Transzellulärer elektrischer Widerstand von Endothel- und Epithelzellen

Zellen der humanen Alveolarepithelzelllinie A549 (ATCC, Rockville, MD, USA) wurden in HAM's Medium mit 10% FCS angezüchtet.

Die Kultivierung von A549-Zellen oder HUVECs erfolgte (264-266) direkt auf Goldelektroden, die in einer Versuchsanordnung mit 8 Messkammern (wells) (Applied BioPhysics, Troy, NY, USA) integriert waren (264-266). Darüber hinaus befanden sich in den Kammern jeweils eine Arbeitselektrode und eine größere Gegenelektrode.

Zur Messung wurden die Elektroden an einen von einem PC gesteuerten Impedanz-Analysator angeschlossen. Die ermittelten Messdaten wurden ebenfalls von dem PC erfasst und gespeichert.

Während der Messung befand sich die Messkammer in einem Brutschrank bei 37°C und 5 Vol.-% CO_2. Zur Angleichung eines konstanten Stromflusses wurde eine Spannung von 1 V und eine Stromstärke von 4000 Hz angelegt, bis ein Widerstand von 1-MΩ erreicht war. Nach 15-minütiger Messzeit zur Feststellung des Grundwiderstandes erfolgte eine Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen PLY-Dosierungen (0,01 µg, 0,05 µg, 0,1 µg, 1,0 µg), wobei Werte jeder Elektrode kontinuierlich aufgezeichnet, und als Verhältnis zwischen gemessenem Widerstand zum Grundwiderstand normiert wurden.

3.8 Immunzytochemische Färbung von VE-Cadherin und F-Actin

HUVECs wurden über 30 Minuten der Wirkung von PLY ausgesetzt, danach mit 3% PFA bei pH 7,6 für 20 Minuten fixiert und mit 1% TritonX-100 15 Minuten lang permeabilisiert.
Um falsch positive Antikörperbindungen zu verhindern fand anschließend eine 30-minütige Inkubation in einem Blockademedium (0,05% Tween 20, 1% Rinderserumalbumin, 5% Wirtsserum des Sekundärantikörpers) statt. Darauf folgte über Nacht eine Inkubation bei + 4°C mit dem Primärantikörper gegen das tight junctionprotein VE-Cadherin (Chemicon, Hofheim, Deutschland).
Die Färbung mit dem danach benutzten Sekundärantikörper konnte auf die gleiche Weise durchgeführt werden. Dieser war mit Alexa 546 konjugiert (Molecular Probes, Leiden, Niederlande). Für die anschließende Inkubation mit Phalloidin Alexa 488 (Molecular Probes) zur Anfärbung des F-Actins wurden die Zellen 30 Minuten lang bei + 4°C gelagert. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten fand jeweils eine dreimalige Spülung mit 0,01 M PBS bei pH 7,6 statt. Die Schnitte wurden später mit einem Pascal-5 Konfokal-Laser-Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) bei 200-facher Vergrößerung beurteilt.

3.9 Statistische Datenanalyse

Zur Datenauswertung wurde das Statistikprogramm GraphPad PRISM 4 der Firma Graph Pad Software Incorporated San Diego verwendet. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung (SD) angegeben. Die in den Abbildungen 4.1, 4.2 B, 4.3, 4.4 sowie 4.5 B – 4.7 wiedergegebenen Daten wurden mittels Varianzanalyse (one-way analysis, ANOVA) überprüft, gefolgt von einem Student-Newman-Keuls Test. Die statistische Prüfung der Werte in Abbildung 4.2 A erfolgte mit dem Mann-Whitney U-Test, die Auswertung der hydraulischen Konduktivität (Abbildung 4.5 A) mit einem unabhängigen t-Test. Mittels Varianzanalyse (one-way analysis, ANOVA), gefolgt von einem post-hoc Tukey Test, wurde die Auswertung für Abbildung 4.8, 4.9 C und 4.10 durchgeführt. Für alle übrigen Abbildungen erfolgte die Analyse mit dem Mann-Whitney U-Test. Ein signifikanter Unterschied wurde bei $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Eine pulmonale Barrierestörung entsteht in der Frühphase der murinen Pneumokokkenpneumonie unabhängig vom Neutrophileninflux

Bereits 12 Stunden nach der i.n. Inokulation von *S. pneumoniae* war die pulmonale mikrovaskuläre Permeabilität, gemessen als BALF/Plasma-Quotient des intravenös applizierten humanen Serumalbumins (HSA), deutlich erhöht (Abb. 4.1 A). Interessanterweise stieg die Zahl der intrapulmonalen neutrophilen Granulozyten erst nach 24 Stunden an (Abb. 4.1 B).

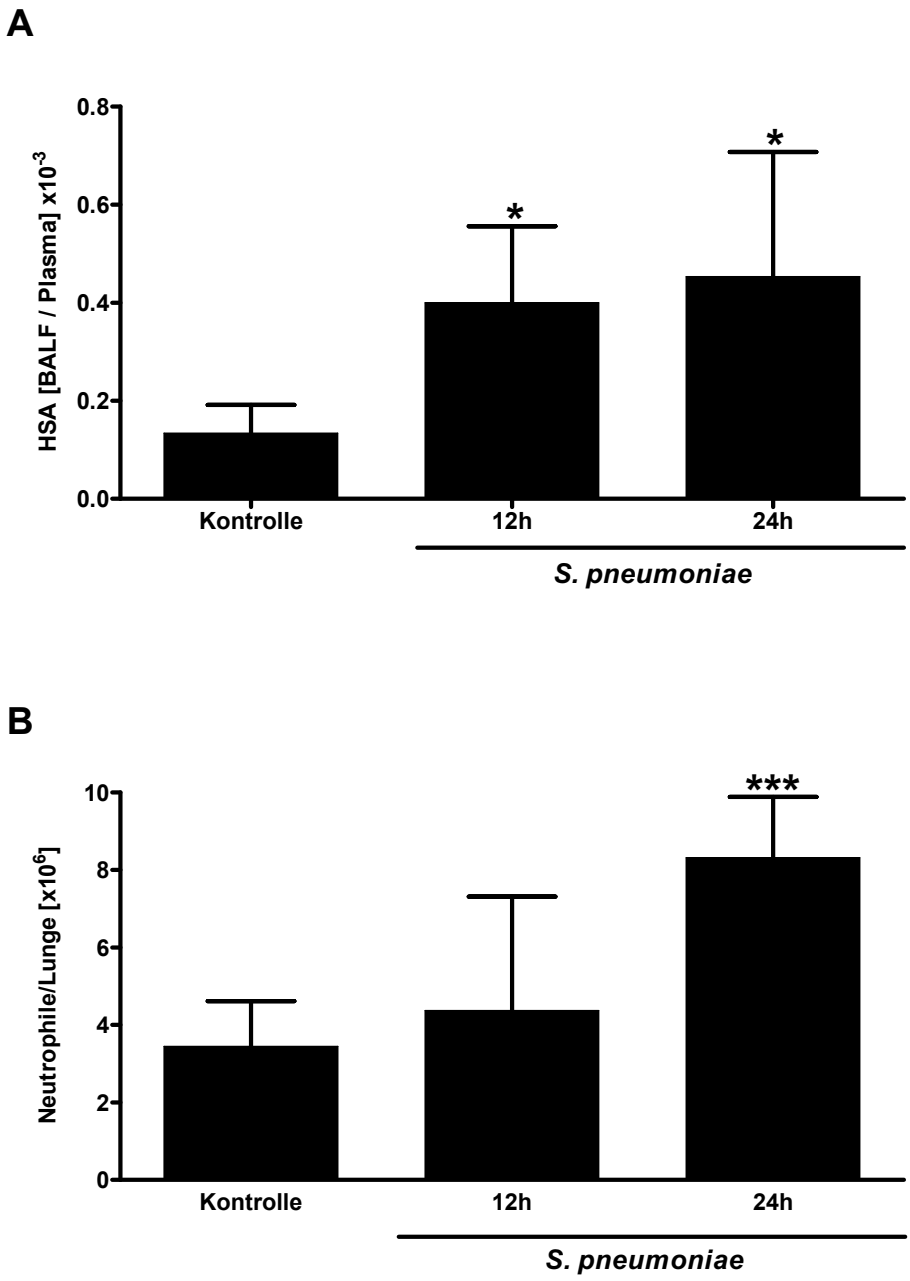


Abbildung 4.1: Ergebnisse aus dem *in vivo*-Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie
(A) Hyperpermeabilität der Lunge: 12 und 24 h nach i.n. Inokulation von *S. pneumoniae* (1 x 10^7 CFU/Tier) erfolgte eine BAL. Den Tieren wurde 1 h vorher HSA (1 mg) i.v. appliziert. Als Maß für die Permeabilität konnte das BALF/ Plasma-Verhältnis für HSA kalkuliert werden. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (n=6 für jede Versuchsgruppe; * $p<0,05$ vs. Kontrollen).
(B) Neutrophile Granulozyten des Lungengewebes: 12 und 24 h nach der i.n. Inokulation von *S. pneumoniae* (5 x 10^6 CFU/Tier) erfolgte die Organentnahme. Die Anzahl der neutrophilen Granulozyten wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (Kontrolle: n=8, 12 h: n=7, 24 h: n=7; ***$p<0,001$ vs. Kontrollen).

4.2 Aerosoliertes PLY beeinträchtigt die alveolokapilläre Barriere in der isoliert perfundierten Mauslunge

Die Applikation von aerosoliertem PLY über die Atemwege der isoliert perfundierten Mauslunge erzeugte einen raschen und ausgeprägten Anstieg der alveolokapillären Permeabilität. Diese konnte durch Messung des HSA-Gehaltes in der BALF quantifiziert werden, die 30 Minuten nach der Pneumolysinapplikation (0,25 µg oder 2,5 µg) gewonnenen wurde (Abb. 4.2 A).

In separaten Experimenten konnte gezeigt werden, dass 2,5 µg intratracheal verabreichtes PLY regelmäßig innerhalb von 30 Minuten Ödembildung verursachte, was durch eine signifikante Erhöhung des Verhältnisses zwischen Feucht- und Trockengewicht der Lunge (wet-to-dry weight ratio) widergespiegelt wurde (Abb. 4.2 B).

Weder die intratracheale Applikation von 0,9%-iger NaCl-Lösung als Kontrolle, noch die von Pneumolysin, führte zu einer deutlichen Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes. Lediglich die Applikation von 2,5 µg PLY verursachte einen sehr leichten und nicht signifikanten Anstieg (≤ 1,5 cm H_2O), der möglicherweise aus der beschriebenen Ödembildung resultierte.

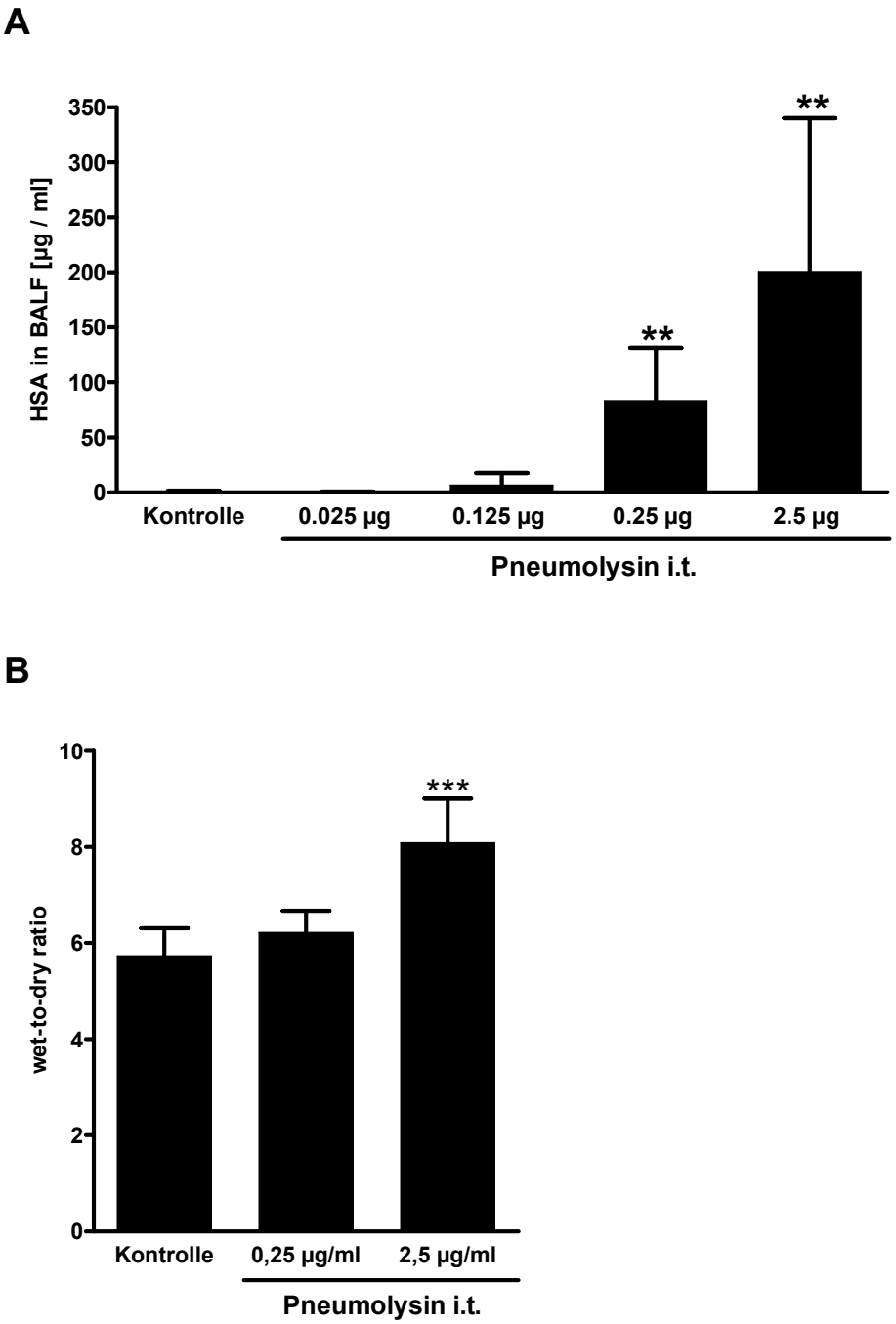


Abbildung 4.2: Intratracheal aerosoliertes PLY beeinträchtigt die alveolokapilläre Barriere.
(A) alveolokapilläre Permeabilität: Der Perfusionspuffer enthielt 0,04% humanes Serumalbumin (HSA). Die intratracheale Applikation wurde mittels Microsprayer durchgeführt. 30 Minuten später wurden die Lungen lavagiert und der HSA-Gehalt der BALF bestimmt. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (0.025 µg: n=6, 0.25 µg: n=6, alle weiteren Versuchsgruppen: n=5; **p<0,01 vs. Kontrollen).
(B) Bildung eines Lungenödems: 30 Minuten nach der Applikation mittels Microsprayer wurde die Perfusion gestoppt und die Lungen im Feuchtzustand gewogen. Anschließend wurden die Organe getrocknet, erneut das Gewicht bestimmt und das Verhältniss zwischen Feucht- und Trockengewicht errechnet (wet-to-dry weight ratio). Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (n=5 für jede Versuchsgruppe; ***p<0,001 vs. Kontrollen).

4.3 Intravaskulär verabreichtes PLY beeinträchtigt die alveolokapilläre Barriere und den pulmonalarteriellen Druck in der isoliert perfundierten Mauslunge

Neben der intratrachealen Pneumolysinapplikation führte auch die intravaskuläre Applikation des Toxins in die Arteria pulmonalis der isoliert perfundierten Mauslunge zu einem signifikanten Anstieg der Permeabilität. Diese wurde ebenfalls durch die Messung der HSA-Konzentration in der BALF quantifiziert (Abb. 4.3 A). Darüber hinaus wies die immunhistochemische Färbung des HSA in Gewebeschnitten zuvor isoliert perfundierter und intravaskulär PLY-stimulierter Lungen auf eine deutliche Extravasation von HSA hin. Es war hauptsächlich im perivaskulären Raum der pulmonalen Arterien, sowie in den Alveolarräumen lokalisiert (Abb. 4.3 B).

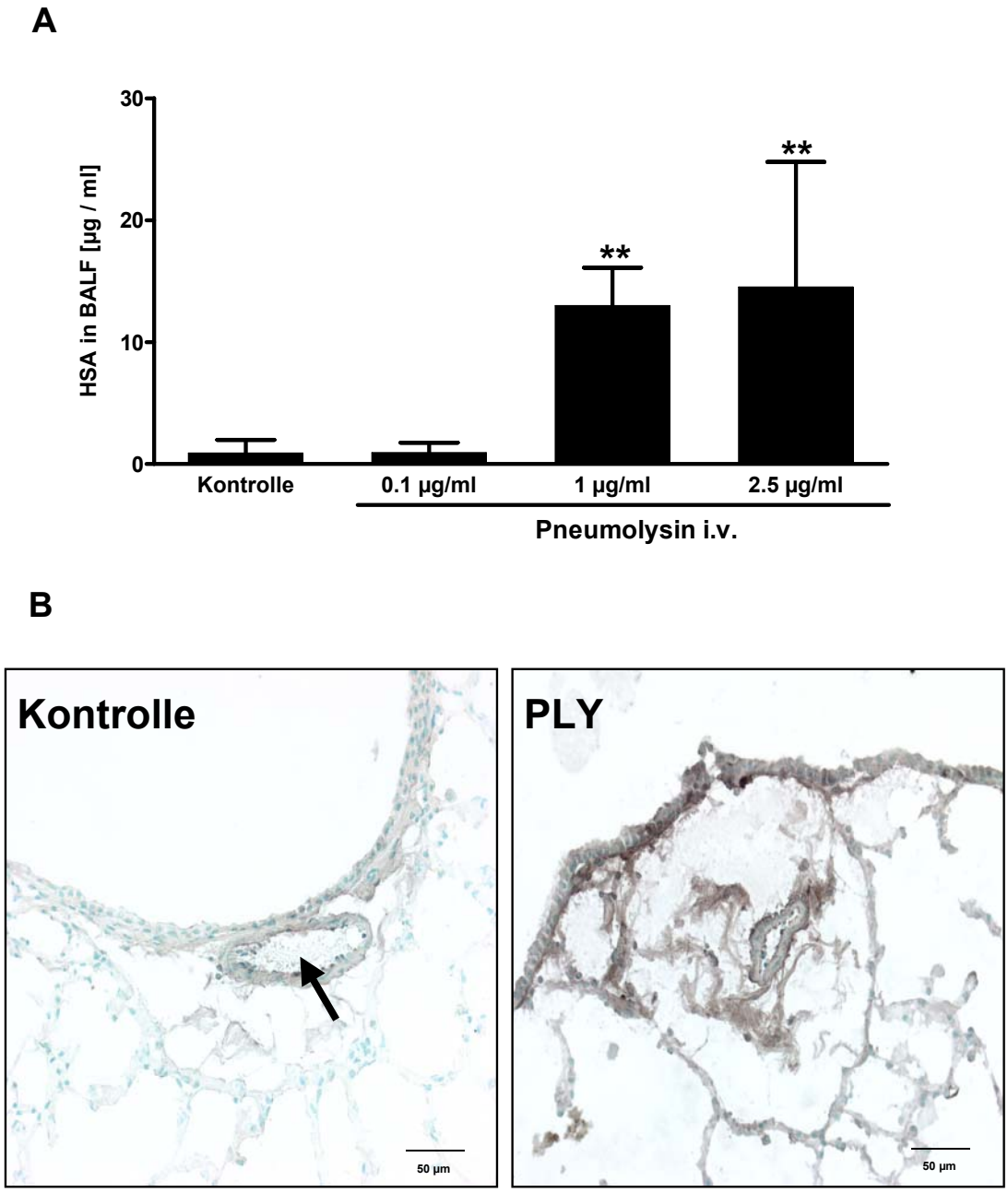


Abbildung 4.3: Intravaskulär infundiertes PLY beeinträchtigt die alveolokapilläre Barriere.
(A) Vaskuläre Permeabilität: Der Perfusionspuffer enthielt 0,04% humanes Serumalbumin (HSA). PLY wurde über 1 Minute infundiert. 30 Minuten später wurden die Lungen lavagiert und der HSA-Gehalt der BALF bestimmt. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (Kontrolle: n=6, 1 µg/ml: n=4, alle weiteren Versuchsgruppen: n=5; **p<0,01 vs. Kontrollen).
(B) HSA-Extravasation: Durch Immunhistochemische Anfärbung konnte nach intravaskulärer PLY-Applikation in isoliert perfundierten Mauslungen HSA lokalisiert werden. Reste des schwarz gefärbten HSAs liegen in den Kontrolllungen (Verabreichung von 0,9%-iger NaCl-Lösung) innerhalb der pulmonalen Arterien (Pfeil). In PLY-stimulierten Lungen war eine deutliche HSA-Extravasation in den Alveolarraum und die perivaskulären Bereiche um die pulmonalen Arterien festzustellen. Die hier gezeigten Bilder entstanden mit 200-facher Vergrößerung und sind repräsentativ für die durchgeführten Experimente (n=3).

Interessanterweise induzierte intravaskulär appliziertes PLY, im Gegensatz zu aerosoliertem PLY, zusätzlich einen unverzüglichen und deutlichen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Ppa), der sein Maximum nach 5 bis 10 Minuten erreichte (Abb. 4.4 A).

Diese Druckantwort zeigte eine klare Dosisabhängigkeit hinsichtlich des Ppa-Maximums (Abb. 4.4 A) und der errechneten Fläche unter der Druckkurve (area under the curve = AUC) (Abb. 4.4 B).

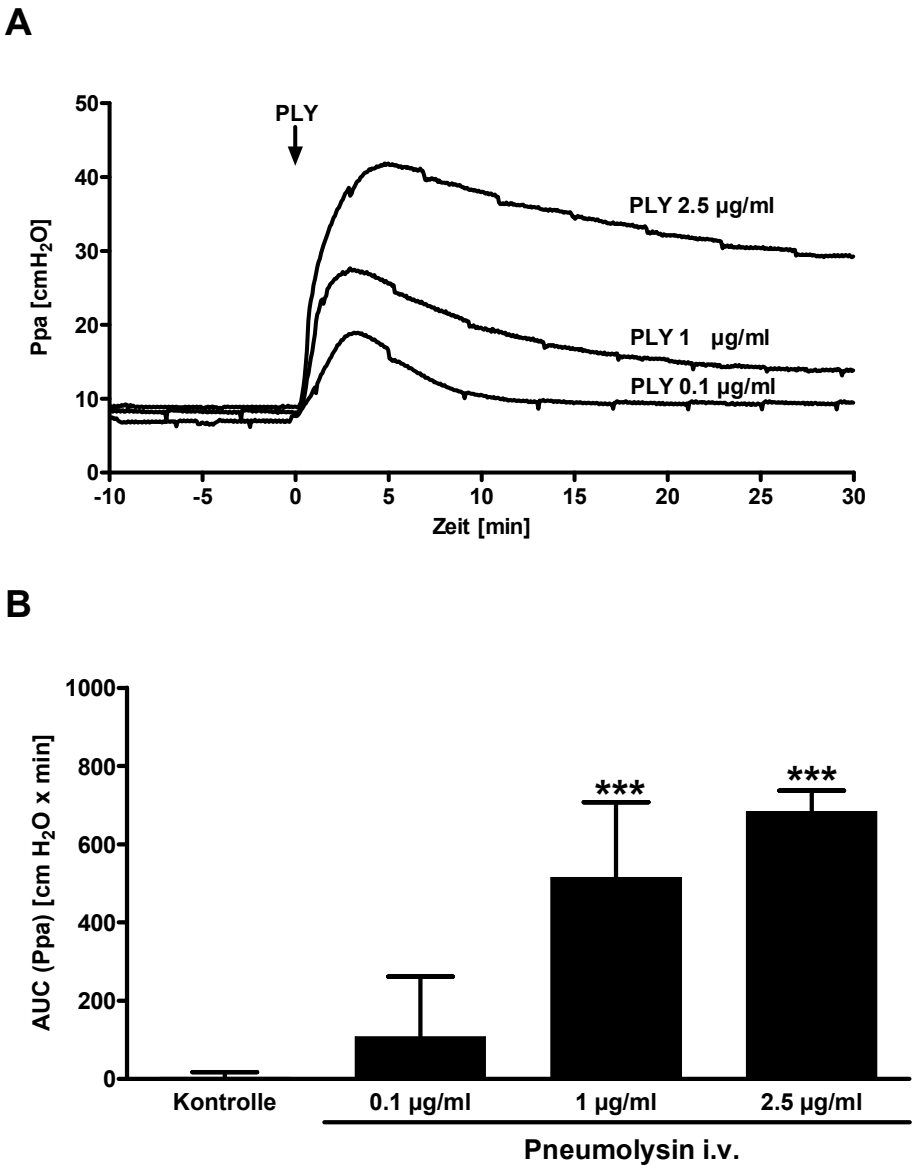


Abbildung 4.4: Intravaskulär infundiertes PLY erzeugt pulmonale Hypertonie.
(A) Verlauf des Ppa: Der Druckanstieg in der Arteria pulmonalis von isoliert perfundierten Mauslungen nach der einminütigen intravaskulären PLY-Applikation. Repräsentative Experimente sind abgebildet (1 µg/ml: n=6, alle weiteren Versuchsgruppen: n=5).
(B) Area under curve des Ppa: Der Anstieg des Druckes in der Pulmonalarterie, dargestellt als area under curve (AUC), nach der einminütigen intravaskulären PLY-Applikation. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (1 µg/ml: n=6, alle weiteren Versuchsgruppen: n=5; ***p<0,001 vs. Kontrollen).

Zur Lokalisation des Toxins im Lungengewebe mittels immunhistochemischer Färbung wurde PLY mit einer Gesamtmenge von 1 µg über 5 Minuten perfundiert, worauf eine 15-minütige Auswaschphase mit PLY-freiem Perfusat folgte, um ungebundenes PLY zu entfernen. In den so gewonnenen Gewebeproben konnte anschließend das Toxin in den Endothelzellen pulmonalarterieller Gefäße nachgewiesen werden. Gefäße mit PLY-Färbung wiesen eine ausgeprägte Vasokonstriktion auf (Abb. 4.4 C). Weiterhin wurde auch in den Alveolarsepten eine PLY-Anfärbung bemerkt, was auf das Binden von PLY an kapilläres Endothel hinweist.

Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass intravaskuläres PLY nicht nur die vaskuläre Barrierefunktion beeinträchtigt, sondern auch die Hämodynamik in der isoliert perfundierten Mauslunge beeinflusst.

C

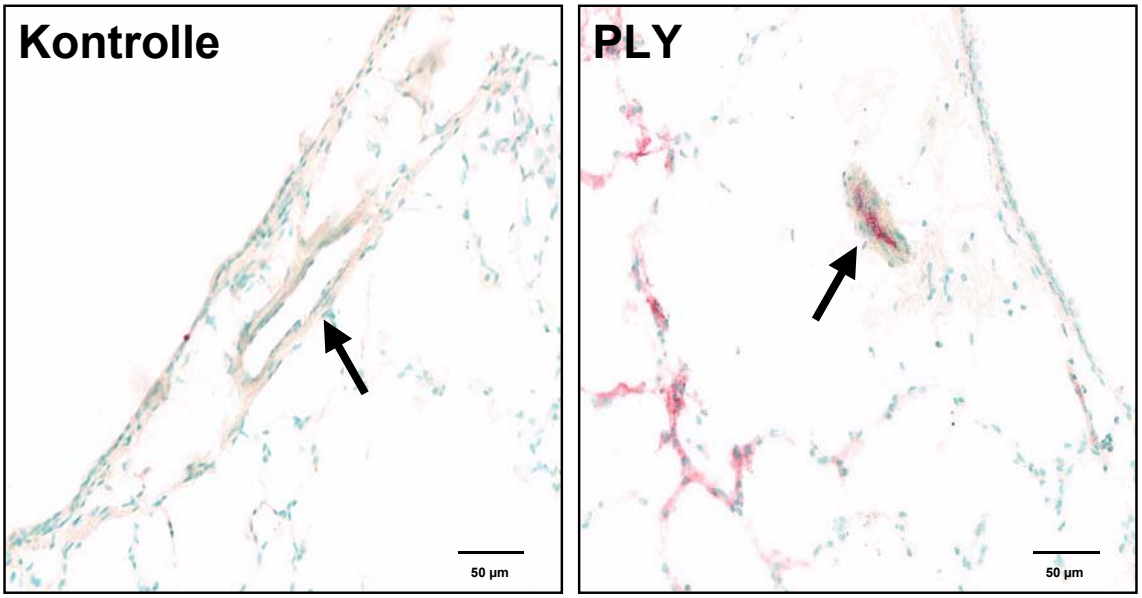


Abbildung 4.4: Intravaskulär infundiertes PLY erzeugt pulmonale Hypertonie.
(C) Lokalisation von PLY: In Gewebeproben der isoliert perfundierten Mauslunge konnte durch immunhistochemische Anfärbung PLY nachgewiesen werden. Kontrolllungen (Verabreichung von 0,9%-iger NaCl-Lösung) wiesen normal geformte Pulmonalarterien (Pfeil) und keine PLY-Färbung auf. Nach der Applikation von PLY zeigte sich in den Endothelzellen der Pulmonalarterien eine merkliche Toxinanfärbung (rot angefärbt) begleitet von einer kompletten Kontraktion der Gefäße. Die Bilder wurden um das 200-fache vergrößert. Repräsentative Schnitte aus unabhängig von einander durchgeführten Experimenten sind abgebildet (n=5).

4.4 PLY erhöht die Permeabilität von humanen Endothelzell-Monolayern *in vitro*

Um die Auswirkungen des PLY auf die Barrierefunktion von Endothelzellen noch detaillierter zu untersuchen, wurden Monolayer humaner umbilikalvenöser Endothelzellen aus Primärkulturen (HUVEC) dem Toxin ausgesetzt.

Die Permeabilität der Monolayer wurde durch Messung der hydraulischen Konduktivität quantifiziert. Diese betrug unter Normalbedingungen < 1,0 x 10^5 cm x s^{-1} x cmH_2O.

Die Applikation von 0,4 µg/ml PLY führte innerhalb von 30 Minuten zu einer dramatischen Erhöhung der Permeabilität, was durch einen Anstieg der hydraulischen Konduktivität widergespiegelt wurde (Abb. 4.5 A).

Gleichermaßen rief PLY einen dosisabhängigen Abfall des transzellulären elektrischen Widerstandes (TER) von HUVEC-Monolayern als Ausdruck erhöhter endothelialer Permeabilität hervor (Abb. 4.5 B). Interessanterweise konnte nach Applikation niedriger PLY-Dosierungen ein reversibler Effekt beobachtet werden. Sowohl 1 µg/ml als auch 0,1 µg/ml PLY führten zu einer irreversiblen Absenkung des Monolayerwiderstandes innerhalb von rund 30 Minuten, wo hingegen 0,05 µg/ml PLY eine reversible, und 0,01 µg/ml PLY keine eindeutige Widerstandssenkung verursachten (Abb. 4.5 B).

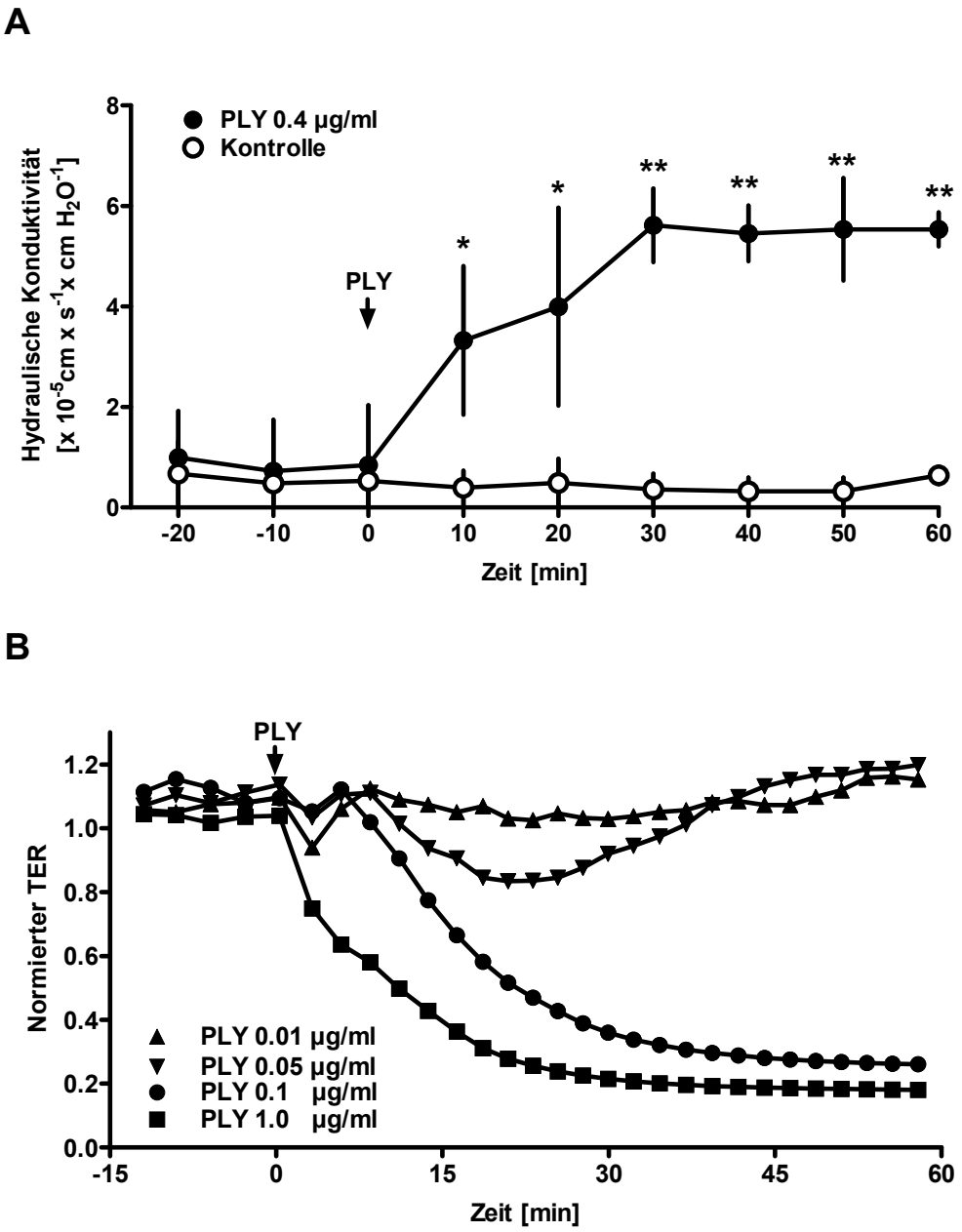


Abbildung 4.5: PLY erhöht die Permeabilität in HUVEC-Monolayern.
(A) Hydraulische Konduktivität: PLY erhöht die hydraulische Konduktivität von HUVEC-Monolayern. Eine Applikation von 0,4 µg/ml PLY zum Zeitpunkt 0 (t = 0) steigerte die hydraulische Konduktivität innerhalb von 30 Minuten auf > 5 x 10^5 cm x s^{-1} x cmH_2O. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (je Gruppe: n=5; *p<0,05, **p<0,01 vs. Kontrollen).
(B) Transzellulärer elektrischer Widerstand: PLY senkt den transzellulären elektrischen Widerstand (TER) von HUVEC-Monolayern. Vor der PLY-Applikation (t=0), während einer Baseline von 15 Minuten, war der TER der HUVEC-Monolayer weitgehend konstant. Repräsentative Experimente sind abgebildet (je Gruppe: n=4).

4.5 PLY induziert an HUVEC-Monolayern die Bildung von interzellulären Spalten und Stressfasern

In Abwesenheit von Pneumolysin wiesen HUVEC-Monolayer enge interzelluläre Kontakte auf, die sich nach Anfärbung des VE-Cadherin als „Junktion-assoziiertes“ Filamentsystem (oft als „peripheral dense bands“ bezeichnet) darstellten (Abb. 4.6 A). Die Inkubation mit PLY (0,001 µg, 0,01 µg oder 0,1 µg) über 30 Minuten führte zur dosisabhängigen Öffnung der Tight Junctions mit Ausbildung interzellulärer Lücken und zu einer moderaten Bildung von Stressfasern (Abb. 4.6 B + C, für die 0,01 µg-Dosis wird kein Bild gezeigt). Erst die Applikation von 1,0 µg PLY oder mehr verursachte ausgeprägte Zellkontraktionen und -ablösungen, offenbar begleitet vom Absterben einzelner Zellen (Abb. 4.6 D). PLY bewirkte demnach eine interzelluläre Spaltenbildung in HUVEC-Monolayern.

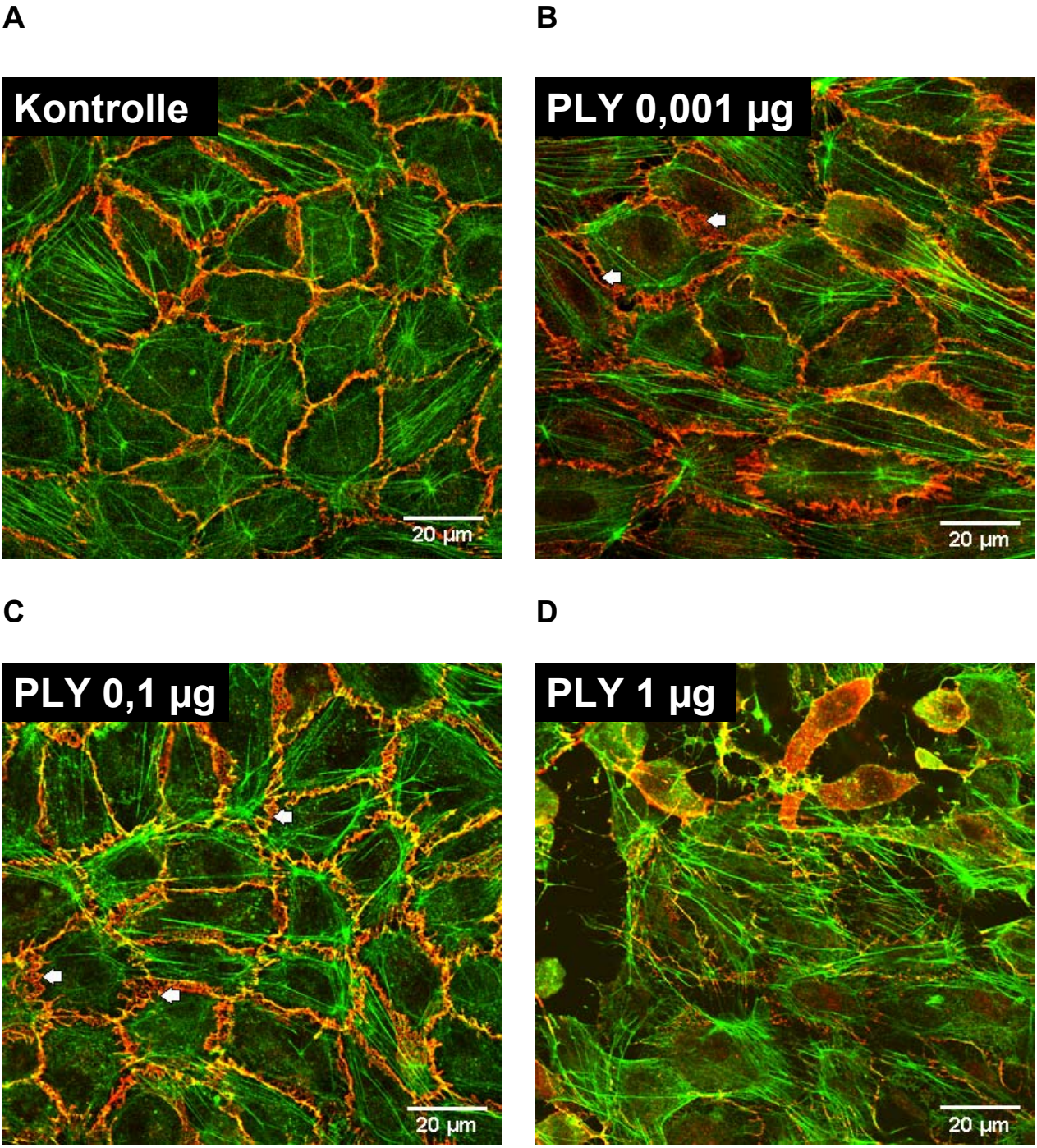


Abbildung 4.6: PLY-induzierte Bildung interzellulärer Spalten und Stressfasern an HUVEC's.
Die Monolayer wurden 30 Minuten lang der Wirkung unterschiedlicher PLY-Dosierungen ausgesetzt. Durch eine kombinierte Anfärbung von VE-Cadherin (rot = Alexa 546-Antikörper) und F-Actin (grün = Phalloidin-Alexa 488) konnten die Stressfasern und die interzelluläre Spaltenbildung (Pfeile) sichtbar gemacht werden. Repräsentative Bereiche von HUVEC-Monolayern aus unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen sind abgebildet (n=3).

4.6 PLY erhöht die Permeabilität von humanen Epithelzell-Monolayern *in vitro*

Epithelzellen haben einen wesentlichen Anteil an der alveolokapillären Barrierefunktion in der Lunge. Mit Hilfe der humanen Epithelzelllinie A549 konnte der Effekt von Pneumolysin auf diesen Teil der Barriere detailliert untersucht werden. A549-Monolayer wurden der Wirkung unterschiedlicher Pneumolysindosierungen ausgesetzt und dabei die Änderungen des transzellulären elektrischen Widerstandes (TER) jedes Monolayers analysiert.
Wie in Abbildung 4.7 gezeigt, verursachte die Applikation von PLY einen dosisabhängigen Widerstandsabfall als Ausdruck eines Permeabilitätsanstiegs des A549-Monolayers.

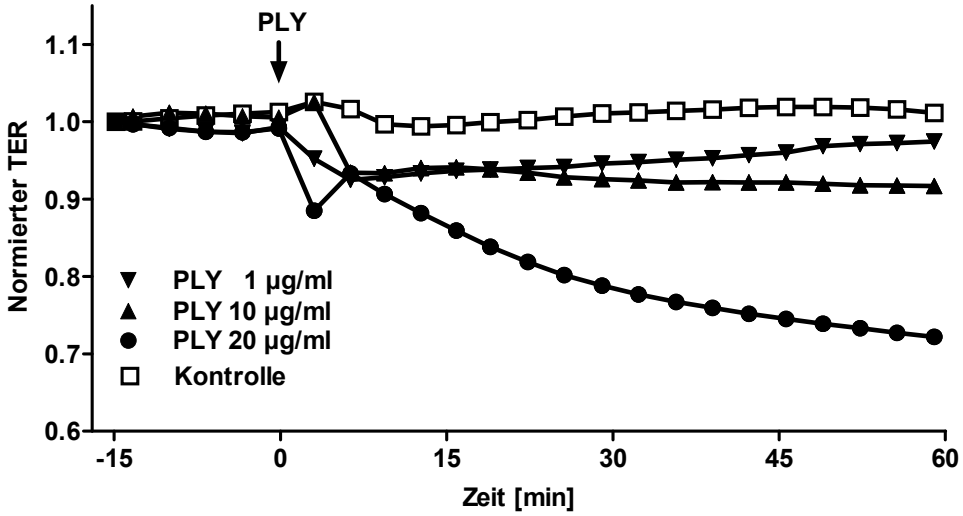


Abbildung 4.7: PLY senkt den transzellulären elektrischen Widerstand von A549-Monolayern.
Vor der Applikation von PLY in den angegebenen Dosierungen zum Zeitpunkt 0 (t=0) wurde der Widerstand des A549-Monolayers über die Dauer von 15 Minuten gemessen (Basiswert). Repräsentative Experimente sind abgebildet (je Gruppe: n=3).

4.7 Das modifizierte PLY Pd-B hat keinen Einfluss auf den pulmonalarteriellen Druck

Die Beobachtung der PLY-induzierten pulmonalarteriellen Hypertonie warf die Frage nach dem zu Grunde liegenden Mechanismus auf. Zur Untersuchung wurden Mauslungen ex vivo ventiliert und mit einem konstanten Fluss perfundiert. Die Applikation von Pneumolysin über 1 Minute in die Pulmonalarterie führte – wie bereits beschrieben – dosisabhängig zu einem raschen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (Ppa) (Abb. 4.8).

Im Gegensatz dazu beeinflusste die Perfusion mit dem Pneumolysoid Pd-B, das sich durch den Austausch der Aminosäure Nummer 433 (Phenylalanin gegen Tryptophan) von PLY unterscheidet, den Ppa nicht (Abb. 4.8).

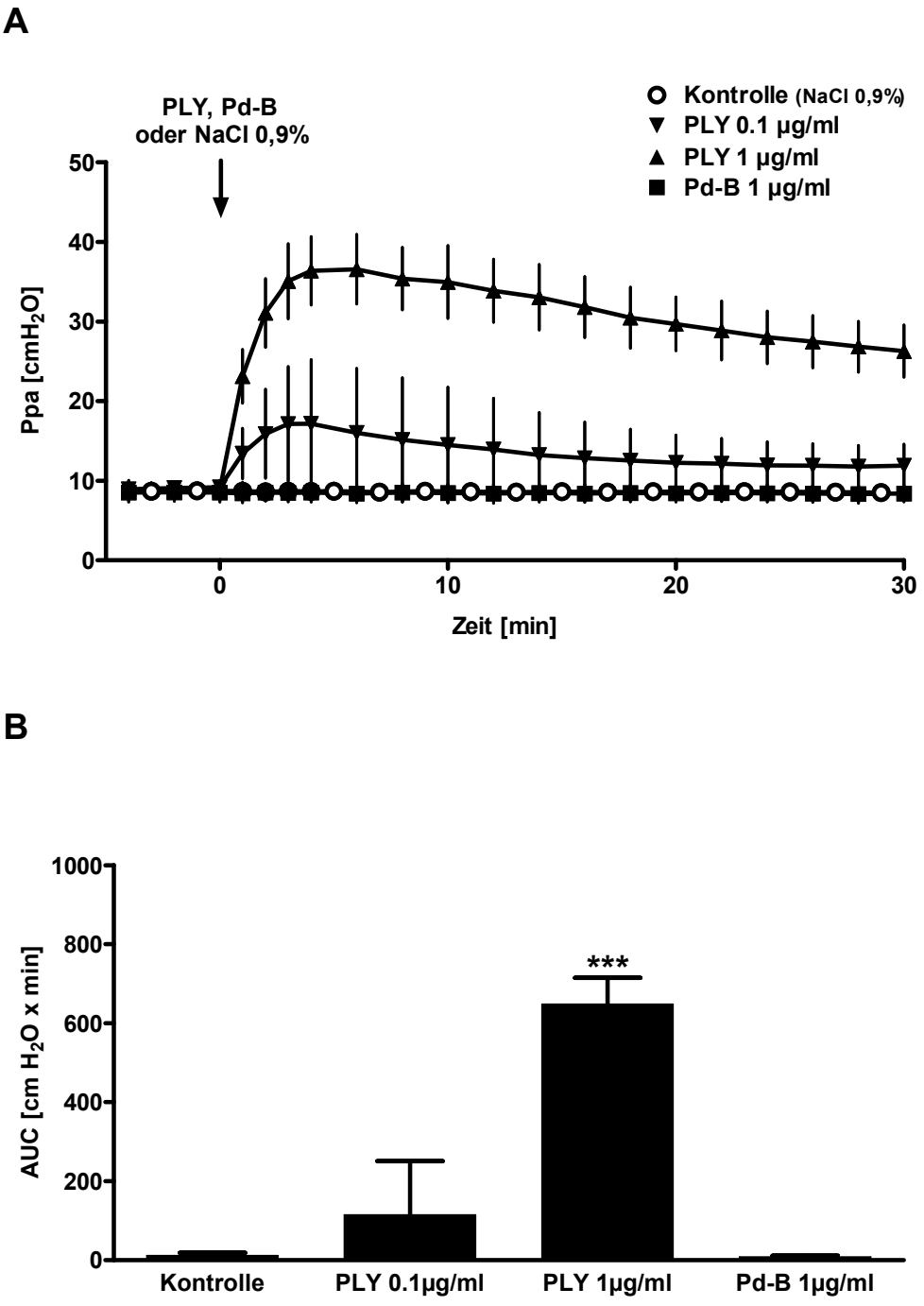


Abbildung 4.8: Modifiziertes PLY Pd-B hat keinen Einfluss auf den pulmonalarteriellen Druck.
(A) Verlauf des Ppa: Der Druckanstieg in der Arteria pulmonalis von isoliert perfundierten Mauslungen nach der einminütigen intravaskulären Applikation von PLY oder Pd-B. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (PLY 1 µg/ml: n=6, alle weiteren Versuchsgruppen: n=5, aus unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen).
(B) Area under curve des Ppa: Der Anstieg des Druckes in der Pulmonalarterie, dargestellt als area under curve (AUC), nach der einminütigen intravaskulären Applikation von PLY oder Pd-B. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (PLY 0,1 µg/ml: n=6, alle weiteren Versuchsgruppen: n=5; ***p<0,001 vs. alle übrigen Gruppen).

4.8 Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) und Thromboxan (TXA_2) sind an der PLY-induzierter pulmonaler Hypertonie beteiligt

Nach intravaskulärer PLY-Applikation war der PAF-Gehalt in homogenisiertem Gewebe isoliert perfundierter Mauslungen signifikant erhöht (Abb. 4.9 A).

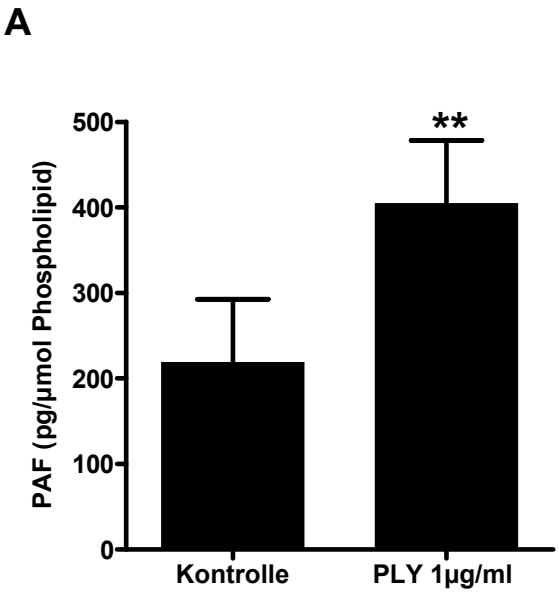


Abbildung 4.9: Intravaskulär infundiertes PLY erhöht den PAF-Gehalt im Lungengewebe.
(A) Der erhöhte PAF-Gehalt in homogenisiertem Lungengewebe, nach 5-minütiger PLY-Infusion, wurde mittels Umkehrphase („reversed phase"-)-HPLC, kombiniert mit einer Tandem-Massenspektrometrie gemessen. Der PAF-Gehalt wird relativ zum Gesamt-Phospholipidgehalt der Lunge beurteilt. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (n=7 für jede Versuchsgruppe; **p<0,01).

Um die Rolle des PAF bei der PLY-induzierten pulmonalen Druckantwort zu klären, wurden Versuche mit Lungen von PAF-Rezeptor-defizienten Mäusen (PAF-$R^{-/-}$) durchgeführt. Bei diesen Experimenten war der Anstieg des Ppa im Vergleich zu Wildtyptieren (WT) deutlich geringer ausgeprägt (Abb. 4.9 B+C).

Die Ausgangswerte des Ppa zeigten zwischen den beiden Versuchsgruppen keinen wesentlichen Unterschied (WT, 8,83 ± 0,23 cmH_2O; PAF-$R^{-/-}$, 8,30 ± 0,34 cmH_2O).

Auch die Reaktion auf das TXA_2–Analogon U46619, welches eine dosisabhängige Gefäßkontraktion verursacht, differierte nicht (das maximale delta Ppa bei einer Dosierung von 100 nM U46619: WT, 12,7 ± 0,9 cm H_2O; PAF-$R^{-/-}$, 10,85 ± 2,1 cm H_2O).

Des Weiteren schwächte eine Vorbehandlung mit dem spezifischen PAF-Rezeptor-Antagonisten BN-50730 (10 µM) die Druckantwort in Lungen von Wildtypmäusen wesentlich ab (Abb. 4.9 B+C).

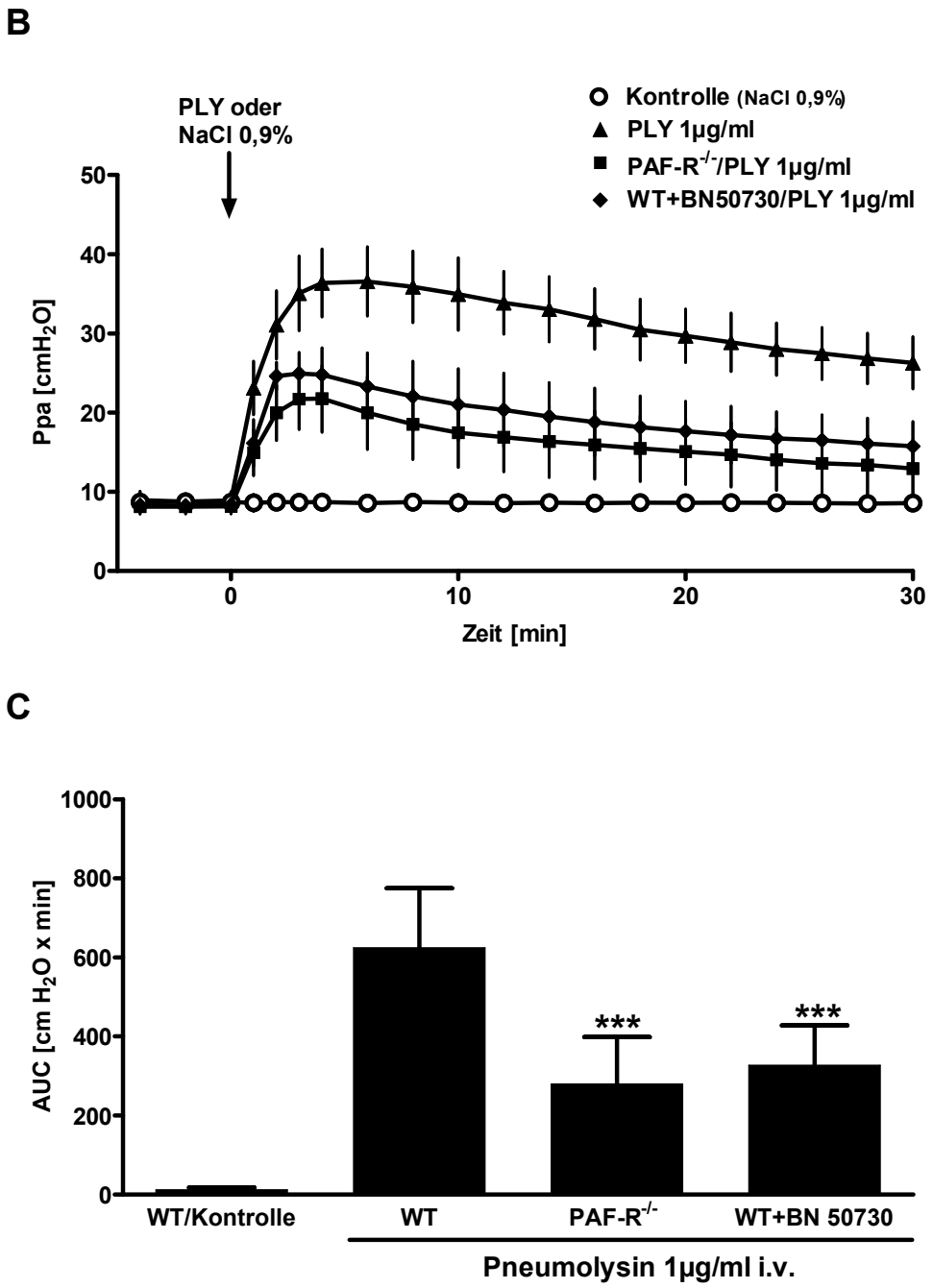


Abbildung 4.9: PAF ist an der Induktion der pulmonalen Hypertonie durch PLY beteiligt.
PLY (1 µg/ml) oder 0,9%-ige NaCl-Lösung (WT/Kontrolle) wurde zum Zeitpunkt 0 für 1 Minute intravenös infundiert. 10 Minuten vorher begann die kontinuierliche Infusion des PAF-Rezeptor-Antagonisten BN 50730 (10 µM) in der entsprechend gekennzeichneten Versuchsgruppe (WT+BN 50730). Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD.
(B) Verlauf des Ppa: (WT/Kontrolle: n=5; WT/PLY 1 µg/ml: n=6; PAF-Rezeptor-defiziente Mäuse (PAF-$R^{-/-}$)/PLY 1µg/ml: n=7; WT+BN 50730/PLY 1 µg/ml: n=5; aus unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen)
(C) Area under curve des Ppa: (WT/Kontrolle: n=6; WT: n=8; PAF-Rezeptor-defiziente Mäuse (PAF-$R^{-/-}$): n=7; WT+BN 50730: n=5; ***p<0,001 vs. WT)

In weiterführenden Experimenten wurde die mögliche Rolle von Thromboxan (TXA_2) bei der PLY-induzierten, PAF-vermittelten pulmonalen Hypertonie untersucht. Da TXA_2 sehr instabil ist, wurde das Nebenprodukt TXB_2 quantifiziert, das in konstanter Relation zu TXA_2 gebildet wird.

Nach der einminütigen Infusion von PLY (1 µg/ml) wurde ein deutlicher Anstieg des TXB_2 im pulmonalvenösen Effluat der isoliert perfundierten Mauslunge von Wildtyp- oder PAF-$R^{-/-}$ -Mäusen gemessen (Abb. 4.10 B). Die Probenentnahme erfolgte vor, sowie 2, 5, 10 und 20 Minuten nach der PLY-Stimulation. Auch die Applikation von exogenem PAF (100 nM) führte zu einem Anstieg von TXB_2, sowie zur Erhöhung des Ppa (Abb. 4.10 A+B).

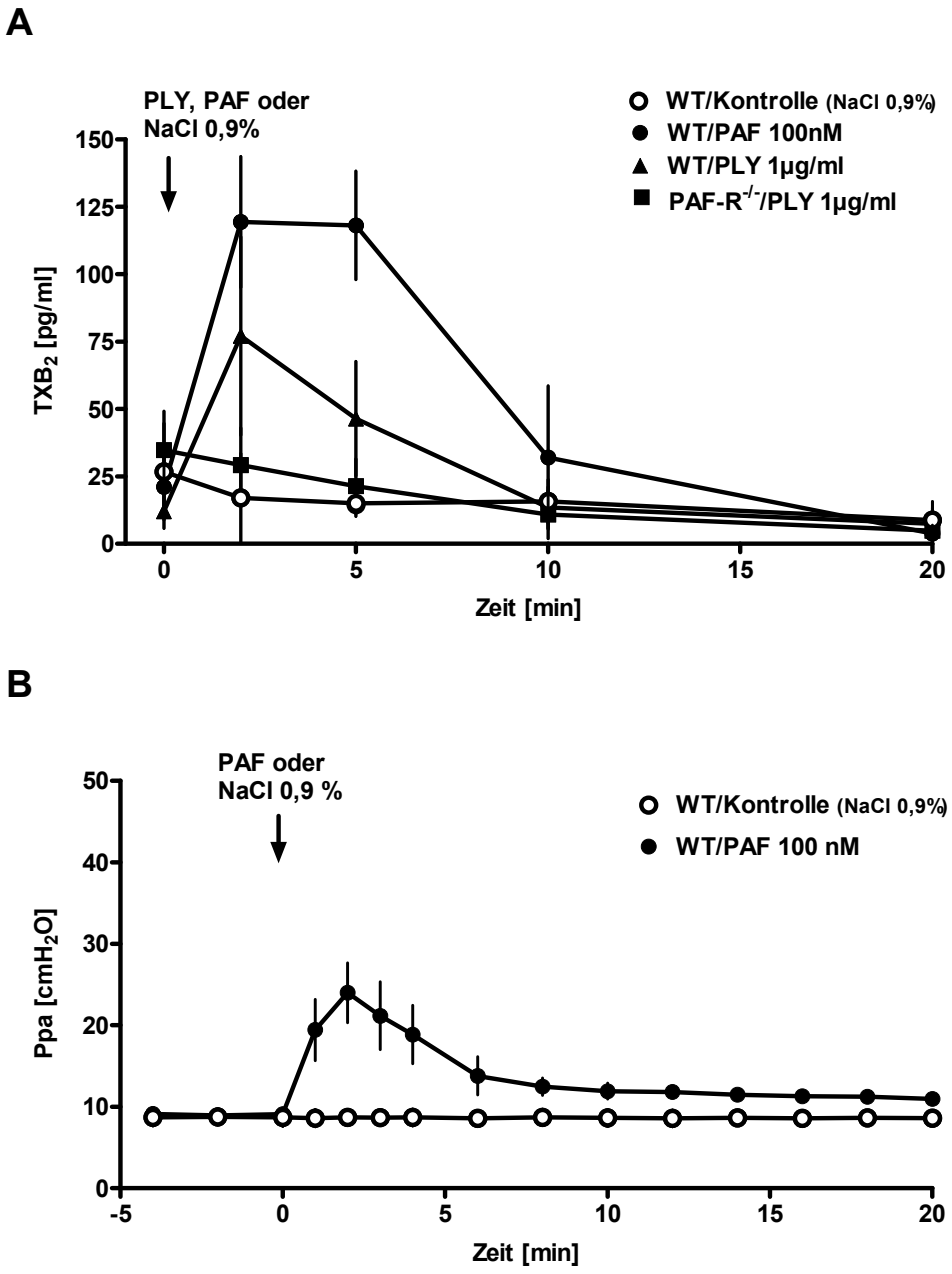


Abbildung 4.10: TXA_2 ist an der PLY- oder PAF-induzierten pulmonalen Hypertonie beteiligt.
(A) Nachweis von TXB_2 bzw. TXA_2: TXB_2, ein stabiles Abbauprodukt von TXA_2, wurde in Perfusatproben quantifiziert. Die Probenentnahme erfolgte vor, sowie 2, 5, 10 und 20 Minuten nach der einminütigen intravaskulären Applikation von PLY oder PAF. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (WT/Kontrolle: n=5, WT/PAF 100 nM: n=5, WT/PLY 1 µg/ml: n=6, PAF-$R^{-/-}$/PLY 1 µg/ml: n=7).
(B) Verlauf des Ppa: Ebenso wie PLY (Abb. 4.9 B) erzeugt exogenes PAF (100 nM) nach einminütiger intravaskulärer Applikation einen Druckanstieg in der Arteria pulmonalis von isoliert perfundierten Mauslungen. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (WT/PAF 100 nM: n=5, WT/Kontrolle: n=5).

Des Weiteren wurde die pulmonale Druckantwort der isolierten Lungen von Wildtyptieren durch Vorbehandlung mit dem spezifischen Thromboxan-Rezeptor-Antagonisten Daltroban (BM 13505; 10 µM) (Abb. 4.10 C) stark abgeschwächt. Die Vorbehandlung der Lunge mit dem Lipoxygenase Inhibitor AA-861 (10 µM) führte zu einer mäßigen Reduktion der PLY-induzierten Druckantwort (10 µM; AUC 441,1 $\pm$ 49,6 cm H_2O x min., n=5).

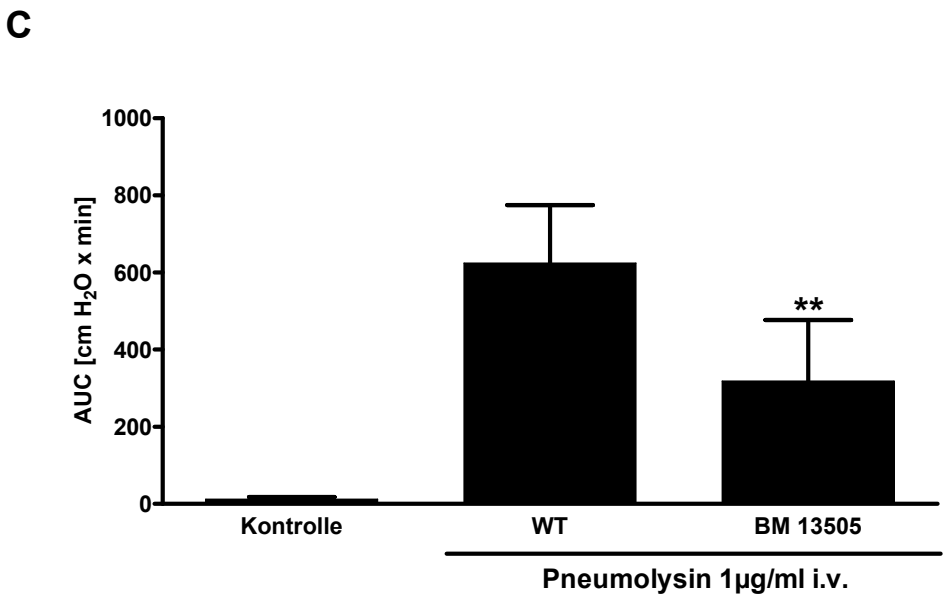


Abbildung 4.10: TXA_2 ist an der PLY-induzierten pulmonalen Hypertonie beteiligt.
(C) Area under curve des Ppa: PLY (1 µg/ml) oder 0,9%-ige NaCl-Lösung (Kontrolle) wurde zum Zeitpunkt 0 für 1 Minute intravenös infundiert. 10 Minuten vorher begann die kontinuierliche Infusion des TXA2-Rezeptor-Antagonist BM 13505 (10 µM) in der entsprechend gekennzeichneten Versuchsgruppe (BM 13505). Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (Kontrolle: n=6, WT: n=8, BM13505: n=6; **p<0,01 vs. WT).

4.9 PC-PLC und PKC sind an der PLY-induzierten Signal-transduktion beteiligt, jedoch nicht die PI-PLC und IP_3

TXA2 und Leukotriene können an einer akuten pulmonalen Vasokonstriktion beteiligt sein, da sie an G-Protein gekoppelte Rezeptoren binden, die mit der Phospholipase C (PLC) verbunden sind. Die Perfusion der Lunge mit dem PC-PLC-Inhibitor D609 (100 µM) vor und während der PLY-Applikation verhinderte weitgehend die PLY-induzierte pulmonale Druckantwort, was der PI-PLC-Inhibitor L-108 (30 µM) nicht vermochte (Abb. 4.11). Inositoltriphosphat ist eine Komponente des zu Kalzium-Influx führenden, PI-PLC abhängigen Signaltransduktionsweges. Die Inhibition des IP_3- Rezeptors mit dem Antagonisten Xestospongin C (1 µM) veränderte die PLY-induzierte Druckantwort nicht. Dem entsprechend führte auch der IP_3-Rezeptor Antagonist 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) zu keiner wesentlichen Änderung der Druckantwort (AUC = 511,7 +/- 53.8 cmH_2O x min; n=3). Die Unterbrechung des PC-PLC abhängigen Signaltransduktionsweges durch Inhibition der PKC mit dem selektiven PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIM; 10 µM) führte allerdings zu einer deutlichen Verminderung der Vasokonstriktion. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, dass PC-PLC und PKC einen Anteil an der intrazellulären Signalübertragung haben, nicht aber PI-PLC und IP_3 .

4.10 Die Rolle der Rho-Kinase in der PLY-induzierten Druckantwort

Die Blockade des kalziumabhängigen Rho-kinase-Signalweges durch den selektiven Inhibitor Y-27632 (5 µM) führte zu einer deutlichen Reduktion des pulmonalen Druckanstiegs (Abb. 4.11). Des Weiteren hatte eine Kombination von Y27632 (5 µM) mit BIM (10 µM) einen signifikant größeren Effekt als jede einzelne dieser Substanzen, und es wurde eine fast vollständige Verhinderung der PLY-induzierten Vasokonstriktion beobachtet. Dies deutete auf eine additive Rolle der Rho-Kinase zum PKC-Signalweg hin.

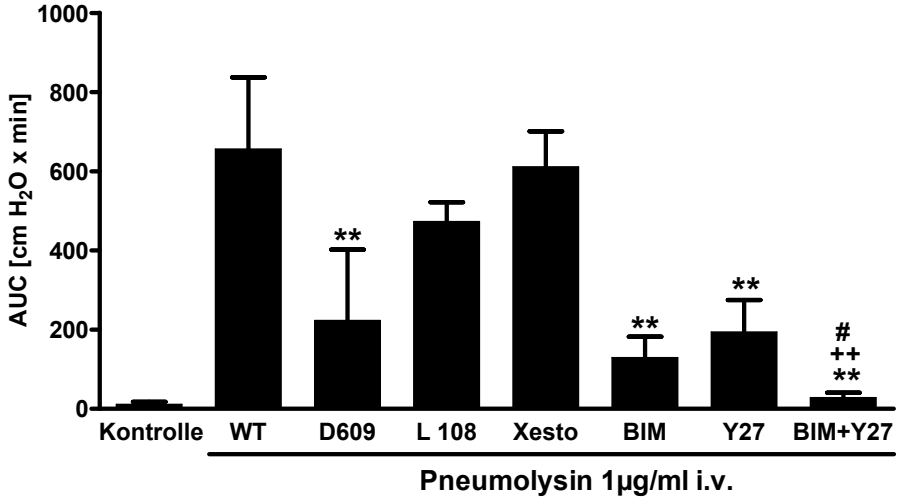


Abbildung 4.11: Beeinflussung der PLY-induzierte pulmonale Hypertonie.
Der durch PLY erzeugte Druckanstieg in der Pulmonalarterie lässt sich durch verschiedene Inhibitoren oder Antagonisten beeinflussen. Dies gibt Aufschluss über die PLY-induzierte Signaltransduktion. Isoliert perfundierte Lungen von Wildtypmäusen wurden vor und während der intravenösen PLY-Applikation (1,0 µg/ml) mit diesen Substanzen perfundiert:
PC-PLC-Inhibitor D 609 (100 µM), PKC-Inhibitor BIM (10 µM), spezifischer Rho-kinase-Inhibitor Y 27632 (5 µM), PI-PLC-Inhibitor L-108 (30 µM) und der Inositoltriphosphat-Rezeptor-Antagonisten Xestospongin C (Xesto / 1 µM). Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Der Anstieg des Druckes in der Pulmonalarterie ist hier als area under curve (AUC) dargestellt. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (Kontrolle: n=5, WT: n=8, alle weiteren Versuchsgruppen: n=5, **p<0,01 vs. PLY, #p<0,05 vs. PLY + BIM; ++p<0,01 vs. PLY + Y27).

4.11 PAF ist an der Vermittlung PLY-induzierter Hyperpermeabilität beteiligt

Die intravenöse Applikation von PLY erhöhte in isolierten Lungen die Permeabilität (Abb. 4.12 A). Auch intratracheal verabreichtes PLY führte zur Permeabilitätserhöhung (Abb. 4.12 B), beeinflusste allerdings nicht den pulmonalarteriellen Druck (AUC: Kontrolle, 17,28 $\pm$ 4,3 cmH_2O x min.; 1 µg PLY, 15,3 $\pm$ 6,1 cmH_2O x min n=6).

Bei Versuchen mit Lungen von PAF-$R^{-/-}$ Mäusen konnte, sowohl nach intravenöser als auch nach intratrachealer Applikation von PLY, ein verminderter Anstieg der Permeabilität festgestellt werden (Abb. 4.12 A+B).

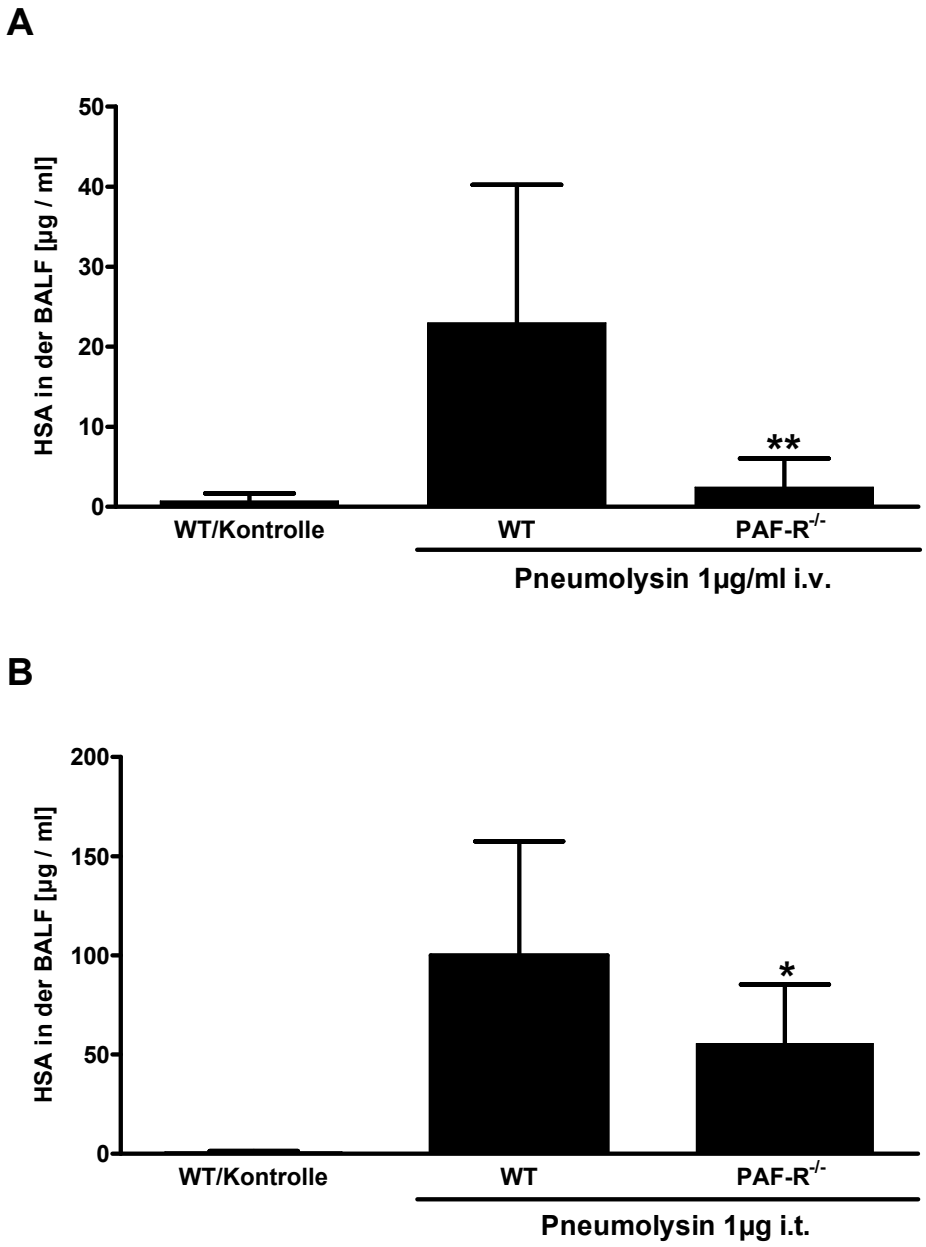


Abbildung 4.12: PAF ist an der Vermittlung PLY-induzierter Hyperpermeabilität beteiligt.
(A) vaskuläre Permeabilität: Der Perfusionspuffer enthielt 0,04% humanes Serumalbumin (HSA). PLY wurde über 1 Minute infundiert. 30 Minuten später wurden die Lungen lavagiert und der HSA-Gehalt der BALF bestimmt. Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (WT/Kontrolle: n=8, WT: n=12, PAF-$R^{-/-}$: n=5; **p<0,01 vs. WT).
(B) alveolokapilläre Permeabilität: Der Perfusionspuffer enthielt 0,04% humanes Serumalbumin (HSA). Die intratracheal Applikation von PLY (1,0 µg) in die Mäuselungen wurde mittels Microsprayer durchgeführt, 30 Minuten später die Lungen lavagiert und der HSA-Gehalt der BALF bestimmt Die Kontrollgruppe erhielt 0,9%-ige NaCl-Lösung. Die Werte sind wiedergegeben als Mittelwert ± SD (WT/Kontrolle: n=8, alle weiteren Versuchsgruppen: n=7; *p<0,05 vs. WT)

5 Diskussion

In der vorliegenden experimentellen Studie wurde die Bedeutung von Pneumolysin, eines essentiellen Virulenzfaktors von *Streptococcus pneumoniae*, für die Entstehung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie untersucht.

Im murinen Pneumokokken-Pneumonie-Modell konnte eine Schädigung der mikrovaskulären Barriere bereits 12 Stunden nach der intranasalen Inokulation von *S. pneumoniae* beobachtet werden. Hingegen wurde eine Invasion neutrophiler Granulozyten in das Lungengewebe bei Tieren, die 12 Stunden nach der Inokulation untersucht wurden, nicht festgestellt, obwohl neutrophile Granulozyten einen wesentlichen Beitrag zur pulmonalen Hyperpermeabilität bei Inflammation leisten. Offenbar entstand die 12 Stunden nach Inokulation beobachtete Barrierestörung unabhängig vom Neutrophileneinstrom in die Lunge.

Um den Beitrag von PLY zu diesem früh entstehenden akuten Lungenversagen zu analysieren, wurde zunächst die Wirkung von rekombinantem PLY in der isoliert perfundierten Mauslunge untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl intratracheal aerosoliertes, als auch intravaskulär appliziertes PLY eine ausgeprägte Störung der alveolokapillären Barriere und nachfolgend eine pulmonale Ödementstehung hervorruft. Ergebnisse aus *in vitro*-Untersuchungen unterstützten diese Beobachtungen. An Monolayern von Endothel- und Epithelzellen konnten deutliche dosisabhängige Permeabilitätserhöhungen nach PLY-Applikation beobachtet werden. Darüber hinaus verursachte intravaskulär verabreichtes PLY in der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge eine schwere akute pulmonale Hypertonie, die ebenfalls ein wichtiges Merkmal des akuten Lungenversagens ist.

In weiterführenden Experimenten konnte festgestellt werden, dass der rapide, dosisabhängige Anstieg des pulmonalen Gefäßwiderstandes nach PLY-Infusion mit einer messbaren Erhöhung der PAF-Menge im Lungengewebe einhergeht. Des Weiteren war diese PLY-induzierte Druckantwort bei PAF-Rezeptor-defizienten Mäusen (PAF-$R^{-/-}$) deutlich reduziert. Ein ähnlicher Effekt konnte erreicht werden, wenn Lungen von Wildtypmäusen mit einem spezifischen PAF-Rezeptor-Antagonisten vorbehandelt wurden.

Die weitere Untersuchung abhängiger Signalwege zeigte, dass sowohl die PLY-induzierte, als auch die durch exogenes PAF ausgelöste pulmonalvaskuläre Widerstandserhöhung von einer erhöhten ThromboxanA_2-Freisetzung (TXA_2) begleitet wird. Außerdem vermindert eine Antagonisierung des TXA_2-Rezeptors die PLY-induzierte Hypertension, so dass PLY offenbar über PAF eine TXA_2-Freisetzung bewirkt.

Die Überprüfung der nachfolgenden intrazellulären Signalwege erbrachte zudem Hinweise darauf, dass in erster Linie die phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PLC) und Proteinkinase C (PKC), sowie der Rho-Kinase-Signalweg an der Druckreaktion beteiligt sind.
Auch bei der PLY-verursachten Hyperpermeabilität spielt PAF offenbar eine zentrale Rolle als Mediator. Dies konnten Experimente mit isoliert perfundierten und ventilierten Lungen PAF-Rezeptor-defizienter Mäuse zeigen. Sowohl bei intravaskulärer als auch bei intratrachealer PLY-Stimulation war eine verringerte Permeabilität zu beobachten.
Die Ergebnisse der vorliegenden Studie deuten auf eine wichtige Rolle von PLY und dem PAF-abhängigen Signalweg bei der Entstehung des akuten Lungenversagens in der Pneumokokkenpneumonie hin.

5.1 Bedeutung von PLY im Verlauf der Pneumokokkeninfektion

Viele Bakterienspezies z.B. aus den Gattungen *Streptococcus, Clostridium, Bacillus* und *Listeria* sind in der Lage, zytolytische Proteine aus der Familie der thiolaktivierten cholesterolbindenden Zytolysine zu sezernieren. Um zytoplasmatische Membranen zu lysieren, benötigen diese Toxine membrangebundenes Cholesterol, aber keinen spezifischen Rezeptor (267;267;267). Auch PLY ist ein Mitglied dieser Toxinfamilie. Jedes klinische Isolat von *S. pneumoniae* ist in der Lage, PLY zu bilden. Dieses Toxin stellt einen wichtigen Virulenzfaktor bei der Entwicklung einer Pneumokokkeninfektion mit Pneumonie und Sepsis dar (219;233;268-270).
Im Rahmen der Pneumokokken-Meningitis vermittelt PLY vermutlich direkte inflammatorische Neurotoxizität und verursacht durch Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke ein zerebrales Ödem (233). Hierfür geben *in vitro*- (239) und *in vivo*-Untersuchungen (268) Hinweise. Bei Atemwegsinfektionen verursacht PLY zelluläre Schäden in den Atemwegen, welche zu einer Funktionseinschränkung des respiratorischen Flimmerepithels führen. Dieses kann anschließend nicht mehr ausreichend seiner reinigenden Funktion im unteren Respirationstrakt nachkommen, so dass eine Ausbreitung der Infektion bis in die Lungenperipherie erleichtert wird (219). Im weiteren Pneumonieverlauf zerstört PLY außerdem die alveolokapilläre Barriere, wodurch es zur Bildung eines eiweißreichen Ödems in den Alveolen kommt, welches einen guten Nährboden für das bakterielle Wachstum bietet. Somit wird es für die Erreger leichter, sich weiter im Lungengewebe und auch in die Blutbahn auszubreiten, was die Entstehung einer Sepsis zur Folge haben kann (233;237).
Diesem multifunktionellen Toxin kann eine Vielzahl biologischer Funktionen wie zytotoxische und komplementaktivierende Aktivitäten zugeordnet werden, die sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beschrieben sind.

Anhand von Versuchen mit mutanten Pneumokokkenstämmen konnte gezeigt werden, dass die zytotoxische ebenso wie die proinflammatorische Aktivität von PLY auf unterschiedlichem Wege bei der Pathogenese einer Lungeninfektion von großer Bedeutung sein können (271;272). Fehlt dem gebildeten PLY beispielsweise die zytotoxische oder die Komplement aktivierende Eigenschaft, ist der mutante Pneumokokkenstamm deutlich weniger virulent als der Wildtypstamm (272). Auch im chronologischen Ablauf der Pathogenese haben diese beiden Toxineigenschaften unterschiedliche Bedeutung. Zum einen korrelierte die zytotoxische Aktivität mit dem Auftreten eines akuten Lungenversagens und der Erregervermehrung drei bis sechs Stunden nach der intratrachealen Infektion im Mausmodell, und zum anderen trat die Komplementaktivierung nach 24 Stunden zusammen mit einer Bakteriämie auf (272).

Hohe Dosen (500 – 1000 Nanogramm) von gereinigtem PLY können eine akute inflammatorische Reaktion mit Anstieg von Interleukin 6 und dem inflammatorischen Makrophagenprotein 2 (MIP-2) sowie histologisch sichtbaren Pneumoniemerkmalen hervorrufen (273) und bei der Neutrophilenrekrutierung in die Lunge mitwirken (274).

In der vorliegenden Arbeit wurde im *in vivo*-Infektionsmodell ein frühes Auftreten einer schweren Lungenschädigung ohne vorherigen Neutrophileneinstrom beobachtet. Diese Beobachtung deutete darauf hin, dass unabhängig vom Influx neutrophiler Granulozyten ein akutes Lungenversagen während einer Pneumokokkenpneumonie entstehen kann, und die beobachteten Veränderungen mit der direkten Wirkung eines Pathogenitätsfaktors der Pneumokokken, beispielsweise PLY, assoziiert sein könnten. Diese Hypothese wird gestützt durch eine *in vivo*-Studie an Mäusen, die während der Durchführung der Experimente zur vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde (275). In dieser Arbeit wurde vor der PLY-Applikation die PLY-induzierte alveoläre Leukozyteneinwanderung unterbunden. Trotzdem konnte ein PLY-induzierter Anstieg der Lungenpermeabilität beobachtet werden. Die Autoren vermuteten daher, dass ein PLY-induzierter Lungenschaden bei intratrachealer Applikation auf eine direkte Pneumotoxizität von PLY zurückzuführen sein könnte (275). Um die an der Entstehung des akuten Lungenversagens beteiligten Mechanismen genauer zu charakterisieren, wurden weiterführende Experimente an der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Mauslunge durchgeführt. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, organspezifische Veränderungen detailliert und unabhängig von humoralen, metabolischen oder zentralnervösen Faktoren zu untersuchen. Veränderungen der Lungenfunktionsparameter und hämodynamische Veränderungen werden kontinuierlich registriert. Zudem kann die alveolokapilläre Permeabilität quantifiziert werden.

5.2 PLY erhöht die epitheliale Permeabilität

Zur Untersuchung der PLY-Wirkung auf das Lungenepithel wurde das Toxin an isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Mauslunge intratracheal aerosoliert. In früheren Untersuchungen waren bereits zytolytische Effekte des Pneumolysins in der Lunge beschrieben worden (276). Die lokale PLY-Menge war jedoch in den damaligen Untersuchungen höher als im Rahmen einer Pneumonie zu erwarten wäre. In der vorliegenden Arbeit wurde daher diejenige PLY-Menge eingesetzt, die näherungsweise der 6 Stunden nach Pneumokokken-Infektion *in vivo* in einer Mauslunge zu erwartenden Menge entspricht. Mittels Quantifizierung der HSA-Extravasation aus den Lungengefäßen in den Alveolarraum konnte gezeigt werden, dass die intratracheale PLY-Applikation eine ausgeprägte Schädigung der alveolokapillären Barrierefunktion mit nachfolgender Ausbildung eines Lungenödems verursacht. Besonders hervorzuheben ist, dass die Hyperpermeabilität, die durch PLY-Stimulation des Epithels entsteht, ohne pulmonalarterielle Druckänderung auftrat. Folglich spielten hydrostatische Effekte bei der Entstehung des PLY-induzierten Lungenödems keine relevante Rolle. Diese Ergebnisse aus der isoliert perfundierten Mauslunge werden durch Beobachtungen an humanen alveolären Epithelzell-Monolayern ergänzt, denn PLY erhöht die Permeabilität dieser Zell-Monolayer.

5.3 PLY erhöht die endotheliale Permeabilität und den pulmonalarteriellen Widerstand in der isolierten Mauslunge

Eine schwere Pneumokokkenpneumonie ist häufig von einer Bakteriämie begleitet, so dass auch Endothelzellen in der Lunge und in anderen Organen einen wichtigen Angriffspunkt für Pneumokokken darstellen. Beispielsweise können Pneumokokken mittels des bakteriellen Phosphorylcholin fest an den PAF-Rezeptor der Endothelzellen binden, der neben anderen Oberflächenstrukturen oft bei inflammatorischen Prozessen exprimiert wird. Mit dessen Hilfe können die Bakterien anschließend in die Zelle gelangen, was zu einer Schädigung führt (99). Eine weitere Möglichkeit der Endothelzellschädigung könnte *in vivo* auch durch eine PLY-Freisetzung der in nächster Nähe zu Endothelzellen lokalisierten oder sogar endothelial gebundenen Pneumokokken mit lokaler Wirkung des Toxins gegeben sein. Hingegen ist das Erreichen einer relevanten Toxinkonzentration im Blut unwahrscheinlich, da PLY rasch an Cholesterol bindet und inaktiviert wird.

Im Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Mauslunge konnten die Effekte von gereinigtem PLY auf die Lungengefäße und auf die alveolokapilläre Barriere genauer untersucht werden. Die Versuchsergebnisse zeigten, dass infundiertes PLY die alveolokapilläre Barriere von der vaskulären Seite aus schädigen kann, was eine schwere endotheliale Barrierestörung verursacht. Dies wurde durch die Erhöhung der Konzentration humanen Serumalbumins in der BALF und durch einen ausgeprägten Anstieg des HSA im Lungengewebe deutlich.

In Untersuchungen zur Rolle des *Escherichia coli* Hämolysins (274;277;278) und des Alpha-Toxins von Staphylokokken (279) bei der Pathogenese einer septischen Lungenschädigung wurde neben einer Erhöhung der Permeabilität auch ein Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes in isoliert perfundierten Kaninchenlungen beobachtet. In der vorliegenden Arbeit wurde beobachtet, dass intravaskulär appliziertes PLY ebenfalls – im Gegensatz zu intratracheal appliziertem PLY – neben Hyperpermeabilität einen markanten Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks bei konstanter Perfusion hervorruft. Dies könnte *per se* eine weitere Beeinträchtigung des Gasaustausches bewirken. Bei der genauen Betrachtung der PLY-Verteilung im Lungengewebe mittels Immunhistochemie konnte zudem das Toxin in den Endothelzellen der Pulmonalarterien und in den Alveolarsepten nachgewiesen werden. Pulmonalarterien, in denen PLY nachgewiesen wurde, waren kontrahiert. Dies weist darauf hin, dass der Ppa-Anstieg in direktem Zusammenhang mit der PLY-Aktivität an pulmonalarteriellen Endothelzellen steht. Möglicherweise könnte intravaskuläres PLY neben der präkapillären Widerstandserhöhung den kapillären Druck beeinflussen, was eine Störung der endothelialen Barrierefunktion zusätzlich begünstigen würde.

5.4 PLY erhöht endotheliale Permeabilität *in vitro*

Die Ergebnisse der Zellkulturversuche unterstützen die Resultate der Experimente an isoliert perfundierten und ventilierten Lungen hinsichtlich der endothelialen Permeabilitätserhöhung durch PLY. Es konnte an Monolayern humaner umbilikalvenöser Endothelzellen gezeigt werden, dass PLY sowohl einen Anstieg der hydraulischen Konduktivität als auch einen starken Abfall des transzellulären Widerstandes verursacht. Während der transzelluläre Widerstand umgekehrt proportional die Permeabilität eines ruhenden Zell-Layers widerspiegelt, wird bei der ungleich aufwendigeren Messung der hydraulischen Konduktivität zusätzlich die hydrostatische Belastung der Endothelzellen imitiert. Besonders hervorzuheben ist die Beobachtung des flüchtigen Absinkens des transzellulären Widerstandes bei einer PLY-Dosis von 0,05 µg.

Dies ließ vermuten, dass PLY in niedriger Dosis eine reversible Erhöhung der parazellulären Permeabilität hervorruft, die als Hinweis auf eine proinflammatorische PLY-Aktivität im subzytolytischen Konzentrationsbereich gewertet werden konnte.

Um den Mechanismus der PLY-induzierten endothelialen Hyperpermeabilität genauer zu analysieren, konzentrierten sich die Untersuchungen zunächst auf die Morphologie des HUVEC-Monolayers. Dabei konnten, innerhalb eines großen subzytolytischen PLY-Dosisbereichs (0,001 µg – 0,1 µg), Spalten- und Stressfaserbildung der Zellen ohne Anhaltspunkte für Zytolyse beobachtet werden. Außerdem wies die dabei entstehende Verteilung des VE-Cadherins (vascular endothelial cadherin) darauf hin, dass PLY in diesem Konzentrationsbereich den Abbau des Proteins induziert. VE-Cadherin ist ein zellspezifisches Transmembranpolypeptid der endothelialen Zonula adhaerens, welches extrazellulär die Zellen untereinander verbindet. An seinem zytoplasmatischen Ende ist es mit Proteinen der „Armadilo“-Familie verknüpft (β-Catenin, Plakoglobin, α-Catenin). Das α-Catenin bildet die Verbindungsstelle zum Zytoskelett. Der Komplex dient zur Festigung der Zellverbindungen. Daher ist VE-Cadherin ein essentielles Zell-Adhäsionsmolekül der Zonulae adherentes in Endothelzellen (280) und spielt eine bedeutende Rolle für die interzelluläre Adhärenz. Der VE-Cadherin-Catenin-Komplex ist ein Angriffspunkt für permeabilitäts-erhöhende Agenzien wie Thrombin (56) und Histamin (57). Eine Störung der VE-Cadherin-Funktion führt zu einem Anstieg der endothelialen Permeabilität im Lungenkapillarbett (54).

5.5 Das modifizierte PLY Pd-B erzeugt keine pulmonale Hypertonie in der isolierten Mauslunge

PLY kann also in der isoliert perfundierten Mauslunge zwei typische Merkmale des akuten Lungenversagens erzeugen, eine mikrovaskuläre Barrierestörung und eine pulmonale Hypertonie. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen mit Wildtyp-PLY verursachte Pd-B, eine genetisch modifizierte PLY-Variante, weder erhöhte Permeabilität noch eine Erhöhung des vaskulären Widerstandes in der isoliert perfundierten Mauslunge.

Pd-B ist an einer Sequenz, die aus elf Aminosäuren besteht, verändert. Diese 11-Aminosäure-Sequenz liegt bei allen Thiol-aktiven Toxinen in der Nähe des C-terminalen Endes des Proteins und ist maßgeblich an der toxischen Aktivität beteiligt. Erfolgt an dieser Stelle eine einzelne Aminosäuresubstitution durch Veränderung der entsprechenden Gensequenz, wird die Aktivität des entstehenden Toxins deutlich vermindert. Beim PD-B-Molekül wurde an Position 433 dieser 11-Aminosäure-Sequenz das Tryptophan gegen Phenylalanin ersetzt (281). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass diese Aminosäuresequenz des PLY maßgeblich an den schädigenden Effekten in der Lunge beteiligt ist.

5.6 PLY-induzierte pulmonale Hypertonie wird über PAF vermittelt

Pulmonale Endothelzellen können eine Vielzahl vasoaktiver Mediatoren, einschließlich dem proinflammatorische Phospholipid PAF, synthetisieren und speichern. PAF wird beispielsweise von kultivierten Endothelzellen nach Thrombinstimmulation synthetisiert und führt zu einer Erhöhung der Adhärenz polymorphkerniger Leukozyten an die Endothelzellen (66;86;282). Außerdem erhöht PAF die vaskuläre Permeabilität, lockt Leukozyten an und beeinflusst ihre sekretorische Antwort. Eine neuere *in vivo*-Studie mit PAF-Rezeptor-tg- und PAF-Rezeptor-defizienten Mäusen demonstrierte zudem, dass PAF bei der Entwicklung des akuten Lungenversagens involviert ist (247). Es wurde gezeigt, dass Exotoxine pathogener Erreger, z.B. das Hämolysin von *Escherichia coli* oder das Alpha-Toxin von *Staphylococcus aureus*, neben der Adhärenz von polymorphkernigen Leukozyten an Endothelzellen auch die PAF-Synthese in diesen steigern, so dass eine inflammatorische Reaktion verursacht wird (115;283). Außerdem wurden im Lungenhomogenat von Ratten nach systemischer Verabreichung des Lipopolysaccharids B von *Salmonella enteritidis* hohe PAF-Spiegel nachgewiesen, die systemische und pulmonale hämodynamische Veränderungen hervorriefen (284).

Exogenes PAF kann Kontraktionen der glatten Gefäßmuskulatur in der Lunge hervorrufen, was unter anderem eine pulmonale Hypertonie in Kaninchen- und Rattenlungen auslöste (178;285).

Interessanter Weise war bei PAF-Rezeptor-defizienten Mäusen die Mortalität und die pulmonale Inflammation im Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie wesentlich geringer als bei Wildtyp-Mäusen (286). Diese Beobachtung konnte nicht allein durch die tiereigene Immunantwort auf die Pneumokokken erklärt werden. Gründe für die abgeschwächte inflammatorische Antwort der Lungen von PAF-Rezeptor-defizienten Mäusen könnte die fehlende Interaktion zwischen Pneumokokken-Phosphorylcholin und PAF-Rezeptor oder das Fehlen der endogenen PAF-Aktivität sein. Bei dieser Studie wurden allerdings die pulmonale Hämodynamik und die eventuell entstandenen Lungenschäden nicht im Detail untersucht (286).

In der vorliegenden Arbeit konnte an der isolierten Mauslunge beobachtet werden, dass eine Perfusion mit PLY zu einem Anstieg des PAF-Gehaltes in der Lunge führt.

Frühere Untersuchungen konnten zeigen, dass endothelial synthetisiertes PAF nicht freigesetzt wird, sondern nahezu vollständig zellassoziiert bleibt (89;287;288). Dies erklärt auch die hier gemachten Beobachtungen, dass in den pulmonalvenösen Perfusatproben trotz erhöhter Synthese kein PAF nachzuweisen war (die Ergebnisse der PAF-Bestimmungen im Perfusat wurden nicht im Detail gezeigt). Weitere Hinweise für die wichtige Rolle von PAF bei der PLY vermittelten pulmonalen Hypertonie ergaben Experimente mit Lungen von PAF-Rezeptor-defizienten Mäusen. Diese zeigten nach intravaskulärer PLY-Applikation eine deutlich reduzierte Druckantwort im Vergleich zu Lungen von Wildtypmäusen.

In Einklang mit diesen Ergebnissen steht die deutliche Abnahme des Ppa-Anstieges in Wildtyplungen, die vor der PLY-Applikation mit dem PAF-Rezeptorantagonisten BN-50730 behandelt wurden.

5.7 Die Beteiligung von TXA2 bei der PLY-induzierten und PAF-vermittelten pulmonalen Hypertonie

Frühere Untersuchungen zur Signaltransduktion bei der PAF-induzierten pulmonalen Vasokonstriktion wiesen bereits auf eine Rolle des Thromboxan hin. Unter anderem konnte durch einen Thromboxanrezeptorantagonist die PAF-induzierte pulmonale Druckantwort in isolierten Kaninchenlungen vermindert werden (285). Zudem wurde festgestellt, dass die PAF-induzierte Kontraktion der glatten Muskulatur in Rattenlungen hauptsächlich durch Thromboxan A_2 (TXA_2) und zu einem geringen Teil durch Leukotriene (LT) vermittelt wird (157). In dem hier verwendeten Modell der isolierten Mauslunge wiesen die Ergebnisse ebenfalls auf eine Rolle von TXA_2 als Mediator der PLY-induzierten und PAF-vermittelten Ppa-Erhöhung hin. Sowohl intravaskulär verabreichtes PLY, als auch exogenes PAF erhöhten nicht nur den pulmonalarteriellen Druck, sondern auch den Gehalt an TXB_2 im venösen Perfusatabfluss. TXB_2 wurde an Stelle von TXA_2 quantifiziert, da TXA_2 äußerst instabil ist und das stabile Nebenprodukt TXB_2 in konstanter Relation zu TXA_2 gebildet wird. Außerdem reduzierte eine Vorbehandlung mit dem TXA_2-Rezeptorantagonisten BM-13505 signifikant die PLY-induzierte Druckantwort in der isolierten Mauslunge. Eine geringe Reduktion der Druckantwort konnte auch bei der Anwendung des Lipoxygenaseinhibitors AA-861 beobachtet werden, was mit den erwähnten Beobachtungen an Rattenlungen (157) konform gehen würde.

5.8 Der Signalweg der PLY-induzierten pulmonalen Hypertonie verläuft hauptsächlich über PC-PLC und PKC

Die Aktivität von TXA_2 wird über den G-Protein gekoppelten Thromboxanrezeptor vermittelt, der unter anderem im vaskulären glatten Muskelgewebe vorkommt (289). Diese G-Protein gekoppelten Rezeptoren können einerseits die phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase C (PI-PLC) und andererseits die phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C (PC-PLC) aktivieren (290). Die PI-PLC verursacht hauptsächlich einen Anstieg des zytosolischen Inositol-tri-Phosphats (IP3) (289;290), und zu einem wesentlich geringeren Teil die Bildung von Diacylglycerol (DAG) (290) Die PC-PLC hingegen steigert nur die DAG-Produktion (290).

Im weiteren Verlauf des Signalweges induziert IP3 einen zytosolischen Ca^{2+}-Anstieg mit Bildung des Ca^{2+}-Calmodulinkomplexes, gefolgt von einer Phosphorylierung der Myosin-Leichte-Kette (myosin light chain = MLC) durch die entsprechende Kinase und anschließender Kontraktion der glatten Muskeln (290).

DAG aktiviert hingegen die Proteinkinase C (PKC). Dies führt über mehrere Mechanismen zu einer vermehrten Phosphorylierung der MLC (290;291). Darüber hinaus kann die PKC durch den Ca^{2+}-Calmodullinkomplex inhibiert werden, was den Einfluss anderer Faktoren auf dieses Enzym maskieren kann (290).

Durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren konnte in der hier durchgeführten Studie gezeigt werden, dass die PLY-induzierte Ppa-Erhöhung in der isolierten Mauslunge in erster Linie von der PC-PLC abhängig ist. Die Inhibition der PC-PLC mit D609 erzeugte eine deutliche Druckminderung. Die Blockierung der PI-PLC durch L108 hatte hingegen nur einen sehr geringen Einfluss auf den Ppa-Anstieg.

Eine Inhibition der PC-PLC-abhängigen PKC mittels Bisindolylmaleimid (BIM) reduzierte ebenfalls die Druckantwort, was die Relevanz dieses Signaltransduktionsweges unterstreicht. Die Inhibition der PI-PLC-abhängigen IP3-Wirkung durch den potenten IP3-Rezeportantagonist Xestospongin C hatte hingegen in dem hier verwendeten Modell keinen Einfluss auf die Druckreaktion. Passend zu diesen Beobachtungen ist das Ergebnis einer anderen Studie an isoliert perfundierten Rattenlungen. Dort konnte die initiale Vasokonstriktion durch den Thromboxanrezeptoragonisten U46619 mittels Xestospongin C oder L-108 nicht verhindert werden (178).

Die in der hier vorliegenden Untersuchung eingesetzte Konzentration von Xestospongin C betrug ca. das Dreifache der angegebenen IC50 (=358 nM) und dürfte damit ausreichend hoch gewählt worden sein (292). In dieser Konzentration verhinderte Xestospongin C das Acetylcholin-vermittelte Kalziumsignal im ex-vivo Modell vitaler Maus–Lungenschnitte („precision cut lung slices“) (293) und verminderte die PAF-vermittelte Ödembildung in isolierten Rattenlungen (294).

Ergebnisse früherer Untersuchungen weisen allerdings darauf hin, dass Xestospongin eventuell keine ausreichende Selektivität für den IP_3-Rezeptor haben könnte, sondern beim Einsatz dieser Substanz auch mit einer Inhibition der Ca^{2+}-Pumpe des endoplasmatischen Retikulums gerechnet werden muss (295). Eine weitere kürzlich publizierte Studie zeigte, dass Xestospongin-C in permeabilisierten Zellen selektiv den IP_3-Rezeptor blockiert, nicht aber in Zellen mit intakter Plasmamembran (296). Daher erfolgten für die hier vorliegende Arbeit orientierende Versuche mit dem nach heutigem Kenntnisstand spezifischen IP_3-Rezeptorantagonist 2-Aminoethyl-diphenylborinat (2-APB) (297).

Die Ergebnisse waren mit denen der Xestosponginversuche vergleichbar. Daher wurden keine weiteren Untersuchungen mit 2-APB durchgeführt und die Daten hier nicht im Einzelnen gezeigt.

5.9 Die Signalvermittlung bei der PLY-induzierten pulmonalen Hypertonie involviert den Rho-Kinase Weg

Über IP_3 und PKC hinaus kann die Phosphorylierung der MLC, der determinierende Faktor der Kontraktion glatter Muskelzellen, auch unabhängig von der Ca^{2+}-Konzentration moduliert werden, zum Beispiel durch eine Aktivierung der Rho-Kinase (298). Der Signalweg läuft dabei wie folgt ab: Rho p21A, ein Mitglied der kleinen G-Proteine, aktiviert die Rho-Kinase, was zur Inhibition der Myosinphosphatase (SMPP-1M) führt. Dadurch steigt, bei gleichzeitig bestehender Aktivität der MLC-Kinase, die Phosphorylierungsrate der MLC an und es kommt zur Muskelkontraktion (299). Die Rho-Kinase steigert daher ohne eine Änderung der Kalziumkonzentration zusätzlich die kontraktilen Kräfte der Myofilamente (298;300;301). Durch den Rho-Kinase Inhibitor Y-27632 kann diese Signalkette spezifisch unterbrochen und eine Kontraktion vermindert oder sogar verhindert werden (183;299;302).

Eine Vorbehandlung mit Y-27632 verminderte den PLY-induzierten Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes in der vorliegenden Arbeit signifikant. Interessanter Weise wurde die PLY-induzierte Erhöhung des Gefäßwiderstandes durch kombinierte Inhibition der PKC und der Rho-Kinase fast vollständig aufgehoben. Dies verdeutlicht, dass beide Signalwege an der PLY-induzierten pulmonalen Hypertonie maßgeblich und weitgehend exklusiv beteiligt sind. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die noch sehr junge Beobachtung, dass sublytische Konzentrationen von PLY eine Aktivierung von Rho- und Rac GTPase in Neuroblastenzellen bewirken (303).

Wenngleich die zur PLY-induzierten pulmonalvaskulären Druckantwort führende Signaltransduktion in der vorliegenden Arbeit weitgehend geklärt werden konnte, muss noch genauer untersucht werden, ob eine TXA_2-unabhängige Rho-kinase Aktivierung durch PLY in der Lunge eine Rolle spielt.

5.10 Die PLY-induzierte pulmonale Hyperpermeabilität wird über PAF vermittelt

Um die Rolle von PAF auch bei der PLY-verursachten Hyperpermeabilität zu untersuchen, wurden Lungen von PAF-Rezeptor-defizienten Mäusen intravaskulär oder intratracheal mit PLY stimuliert. In beiden experimentellen Ansätzen konnte eine signifikant verringerte Permeabilität beobachtet werden. Besonders hervorzuheben ist, dass diese Permeabilitätsverminderung nicht allein der abgeschwächten Druckantwort zuzuschreiben war, denn aerosoliertes PLY erhöht die Permeabilität ohne Veränderung der pulmonalen Hämodynamik.

In wegweisenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die PAF-induzierte Veränderung der vaskulären Permeabilität durch zeitgleiche Aktivierung der Cyclooxygenase und der sauren Sphingomyelinase vermittelt wird. Dieser Aktivierung folgt eine Prostaglandin E2- und Ceramidsynthese (130;146). Um den Zusammenhang dieser Mechanismen mit der PLY-induzierten Hyperpermeabilität genauer zu charakterisieren, werden weiterführende Studien benötigt.

5.11 Die Bedeutung von PLY und PAF für die Entstehung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie

Zusammenfassend nimmt PLY eine zentrale Rolle bei der Entstehung des akuten Lungenversagens während der Frühphase einer Pneumokokkenpneumonie ein.

PLY kann auch in subzytolytischen Konzentrationen (0,001 µg - 0,1 µg) die alveolokapilläre Barriere schädigen und eine pulmonale Hypertonie hervorrufen und somit zur Entstehung des akuten Lungenversagens beitragen. Gegen PLY gerichtete therapeutische Strategien könnten somit zur Prävention und Behandlung einer schweren Pneumokokkenpneumonie von Nutzen sein. Beispielsweise vermindert eine Therapie mit PLY-Antikörpern die Mortalität bei Pneumokokkenpneumonie im Mausmodell (304).

Die in der vorliegenden Untersuchung beobachtete Rolle des PAF und der involvierten Signaltransduktionswege für das PLY-induzierte akute Lungenversagen demonstrieren außerdem die Schlüsselrolle von PAF in der PLY-induzierten pulmonalen Hypertonie und mikrovaskulären Schrankenstörung bei Mäusen. Beide sind Kennzeichen eines akuten Lungenversagens.

Die Auswirkungen von PAF bei pulmonalen Erkrankungen wurden schon mehrfach in unterschiedlichen Tiermodellen gezeigt (67). Beim Menschen können erhöhte PAF-Spiegel bei Pneumonie (305), ARDS (306) und Sepsis (122;307) festgestellt werden.

Über den Signalweg, der für die PAF-Reaktion im Menschen verantwortlich ist, sind bisher nur wenige Informationen vorhanden. Zum Beispiel stimuliert eine PAF-Inhalation beim Menschen die Produktion von Leukotrienen und Thromboxan A_2 (308). In HUVEC's und humanen epidermalen Karzinomzellen aktiviert PAF die PKC (309;310). In humanen monozytären Leukämiezellen werden hingegen Proteine der Rho-Familie stimuliert. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass beim Menschen eine potentielle Beteiligung von PAF bei der Pneumokokkenpneumonie ähnliche Mechanismen auslösen könnte, wie sie in der vorliegenden Studie an Mäusen gezeigt wurden.
Für das pneumokokkeninduzierte akute Lungenversagen könnten daher der PAF-Rezeptor und die nachfolgenden Signalwege neue Perspektiven für spezielle pharmakologische Interventionen eröffnen.

Ausblicke für weiterführende Untersuchungen in der Grundlagenforschung:

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass PAF nicht nur in der Signaltransduktion der PLY-induzierten pulmonalen Hypertonie eine Rolle spielt sondern auch bei der Entstehung der PLY-induzierten pulmonalen Hyperpermeabilität. Allerdings sind die genauen Mechanismen der Hyperpermeabilität nicht im Einzelnen untersucht worden. Eine mögliche Signaltransduktion ist die zeitgleiche Aktivierung der Cyclooxygenase und der sauren Sphingomyelinase mit nachfolgender Prostaglandin E2- und Ceramidsynthese. Dieser Weg ist in der Literatur bisher für die PAF-induzierte Veränderung der vaskulären Permeabilität beschrieben (130). Weiterführende Studien im Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge sind sinnvoll, um den Zusammenhang dieser Mechanismen mit der PLY-induzierten Hyperpermeabilität charakterisieren zu können.
Im Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie besteht die Möglichkeit, eine Permeabilitätsentstehung im Verlauf der Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen. Die Rolle des PAF-Rezeptors und der nachfolgenden Signaltransduktioswege in vivo könnte mit PAF-Rezeptor-defizienten Mäusen und mittels kontinuierlicher Behandlung mit entsprechenden Inhibitoren der Signalkaskaden im Pneumoniemodell untersucht werden.

Die Bedeutung von Pneumolysin für die Entstehung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie

6 Zusammenfassung

Einleitung und Aufgabenstellung

In Deutschland erfolgen ca. 4% aller Klinikeinweisungen aufgrund einer ambulant erworbenen Pneumonie. Die Letalität dieser Erkrankung ist bei schweren Verläufen mit 5%-29% hoch (188). Weltweit ist die Pneumonie beim Menschen die häufigste Infektionskrankheit. Besonders Menschen mit geschwächtem Immunsystem und mit einer chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung sind gefährdet, an einer Pneumonie zu erkranken. Ein komplizierter Pneumonieverlauf kann zum akuten Lungenversagen führen, dessen Charakteristika die Bildung eines Lungenödems durch Schädigung der alveolokapillären Barriere und die Entstehung einer pulmonalarteriellen Hypertonie sind. Die hierfür relevanten Pathomechanismen sind derzeit noch nicht hinreichend bekannt

Streptococcus pneumoniae ist weltweit mit 16-24% und in Deutschland mit fast 50% der häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (1;191). Das zytolytische und proinflammatorische Toxin Pneumolysin ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor der Pneumokokken. Die Rolle des Pneumolysin bei Pneumokokkenpneumonie und Entstehung des akuten Lungenversagens ist noch unzureichend bekannt.

Ziel der vorliegenden Dissertationsarbeit war es, die Rolle des Pneumolysin für die Entstehung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie zu untersuchen und die an der Pneumolysin-induzierten Lungenschädigung beteiligten Effektorsysteme zu identifizieren. Im Fokus der Studie standen insbesondere Untersuchungen zum Einfluss von Pneumolysin auf die alveolokapilläre Barriere und auf die pulmonalvaskuläre Hämodynamik.

Material und Methoden

Bei Mäusen wurde eine Pneumokokkenpneumonie induziert um, *in vivo* Störungen der alveolokapillären Barrierefunktion und die zelluläre Immunantwort im Krankheitsverlauf untersuchen zu können. Im *ex vivo*- Modell der isoliert ventilierten und blutfrei perfundierten Mauslunge fand zudem eine detaillierte Charakterisierung der Wirkung von rekombinantem Pneumolysin statt. Mit dieser Methode konnte das native, intakte Organ unabhängig von humoralen, metabolischen oder zentralnervösen Faktoren des Gesamtorganismus untersucht werden.

Dabei bestand die Möglichkeit, nach Pneumolysin-Provokation hämodynamische Veränderungen der pulmonalen Strombahn, Änderungen der endothelialen Permeabilität, Anreicherung von Thromboxan B_2 im venösen Perfusionsmedium und Mediatoren im Lungengewebe zu erfassen.

Ergänzend wurden *in vitro*-Untersuchungen an humanen Endothel- und Epithelzellmonolayern zur Charakterisierung Toxin-induzierter Veränderungen auf zellulärer Ebene eingesetzt.

Ergebnisse

In der murinen Pneumokokkenpneumonie wurde eine pulmonale Hyperpermeabilität bereits 12 Stunden post inoculationem beobachtet und damit deutlich früher registriert, als der Einstrom neutrophiler Granulozyten in die Lunge. Die frühe Schädigung der alveolokapillären Barriere erfolgte somit offenbar unabhängig von einem pulmonalen Neutrophileneinstrom.

Am Modell der isoliert perfundierten Mauslunge wurde der Beitrag von Pneumolysin an der Lungenschädigung detailliert analysiert. Aerosoliertes Pneumolysin verursachte eine mikrovaskuläre Permeabilitätserhöhung und intravaskuläres Pneumolysin sowohl eine mikrovaskuläre Permeabilitätserhöhung, als auch eine pulmonale Hypertonie. Des Weiteren erhöhte Pneumolysin dosisabhängig die endo- und epitheliale Permeabilität *in vitro*.

Ferner konnte demonstriert werden, dass Plättchen-aktivierender Faktor (PAF) bei der Entstehung der Pneumolysin-induzierten pulmonalen Schädigungen eine Schlüsselrolle einnimmt. Exogenes PAF erhöhte ebenso wie Pneumolysin den pulmonalarteriellen Druck in isolierten Mauslungen. Pneumolysin erhöhte den PAF-Gehalt im Lungengewebe und den Thromboxan-Gehalt im pulmonalvenösen Perfusionsmedium. In Lungen PAF-Rezeptor-defizienter Mäuse führte die Perfusion mit Pneumolysin zu deutlich verringerter pulmonalvaskulärer Druckreaktion und Thromboxan-Freisetzung verglichen mit Wildtyp-Lungen. Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren wurde gezeigt, dass am weiteren Signalweg hauptsächlich der Thromboxan-Rezeptor und intrazellulär die phosphatidylcholin-spezifische Phospholipase C, sowie der Rho-Kinase Weg beteiligt sind. Weitere Experimente mit Lungen PAF-Rezeptor-defizienter Mäuse demonstrierten darüber hinaus auch eine wesentliche Beteiligung des PAF an der Pneumolysin-induzierten pulmonalen Hyperpermeabilität.

Schlussfolgerung

Zusammenfassend sprechen die Ergebnisse für eine wichtige Bedeutung des Pneumolysin für die Enstehung des akuten Lungenversagens bei Pneumokokkenpneumonie. Plättchen-aktivierender Faktor ist hierfür ein zentraler Mediator. Diese Erkenntnisse könnten zur Entwicklung neuer pharmakologischer Interventionsstrategien zur therapeutischen Beeinflussung des akuten Lungenversagens bei schwerer Pneumonie führen.

The role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia

7 Summary

Introduction and aim

In Germany, community-acquired pneumonia (CAP) leads to approximately 4% of admissions to hospitals. In severe cases, lethality is still high (5%- 29%). Worldwide, pneumonia is the most common infectious disease. Especially people with immunodeficiency or with chronic obstructive pulmonary disease are at risk to acquire pneumonia.

A major complication of severe pneumonia is acute respiratory failure, which is characterised by impairment of pulmonary microvascular barrier function (resulting in pulmonary edema) and pulmonary hypertension. The relevant pathways and mechanisms are not yet adequately described.

Streptococcus pneumoniae is the most prevalent causal pathogen identified in community-acquired pneumonia worldwide.

Pneumolysin (PLY), a cytolytic and proinflammatory toxin, is an important virulence factor of *S. pneumoniae*. The role of PLY in the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia has still to be defined.

The primary objective of the current study was to investigate the role of pneumolysin in the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia and to analyse the pathways contributing to PLY-induced pulmonary impairment. The main focus of the study lay on the characterization of PLY-evoked alterations of alveolo-capillary barrier function and pulmonary hemodynamics.

Material and methods

Pneumococcal pneumonia was induced in mice in order to investigate the impairment of the alveolo-capillary barrier function and the cellular immune response in the course of the disease *in vivo*. To characterise the impact of recombinant PLY in detail, an ex vivo model of isolated ventilated and blood-free perfused mouse lungs was employed. The model allowed monitoring of lung parameters in intact organs, unaltered by systemic humoral, metabolic or central nervous influences. This experimental setup allowed for collection of data on changes in lung hemodynamics and fluid balance, on accumulation of thromboxane in the venous buffer effluate and on the concentration of mediators in the lung established after PLY-challenge.

Furthermore, *in vitro* endothelial and epithelial cell monolayers were used to characterise morphologic changes induced by PLY.

Results

In murine pneumococcal pneumonia, lung hyperpermeability was already observed 12 hours after infection, which was considerably earlier than the migration of neutrophils into the lung. The early impairment of the alveolo-capillary barrier was therefore independent of pulmonary neutrophil influx.

The model of isolated perfused mouse lung was used to analyse in detail the contribution of PLY to lung damage. Aerosolized PLY led to an increase of microvascular permeability and intravascular PLY caused an increase in microvascular permeability as well as pulmonary hypertension. Further PLY dose-dependently increased the permeability of endothelial and epithelial cells *in vitro*.

In addition, platelet-activating factor (PAF) played a key role in PLY-induced pulmonary impairment. Both exogenous PAF and PLY increased the pulmonary arterial pressure in isolated mouse lungs. PLY increased the concentration of PAF in lung tissue and the concentration of thromboxane in venous buffer effluate.

Perfusion with PLY evoked less pulmonary vascular pressure response and less release of thromboxan in isolated lungs of PAF receptor-deficient mice. Application of specific inhibitors demonstrated that in the downstream signaling pathway mainly the thromboxan receptor, the intracellular phosphatidylcholine-specific phospholipase C and the Rho/Rho-kinase were involved.

Further experiments with lungs of PAF receptor-deficient mice also demonstrated a significant influence of PAF on PLY-induced pulmonary hyperpermeability independent from the pressor response.

Conclusion

In summary, the results demonstrate an important role for PLY in the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia, with PAF being a central mediator. The PAF-R and its downstream signalling pathways may thus provide perspectives for specific pharmacological interventions in severe pneumococcal pneumonia.

8 Literaturliste

1. **CAPNETZ.** "Definition CAP, Epidemiologie": Kompetenznetz Ambulant Erworbene Pneumonie. CAPNETZ STIFTUNG, Vorstand und Geschäftsführung Geschäftsstelle Hannover Medizinische Hochschule 30625 Hannover URL:http://www.capnetz.de. *CAPNETZ für Ärzte, [*9-7-2008].

2. **Lorenz J.** Ambulant erworbene Pneumonie häufige Erreger und Antibiotikaresistenz. *Pneumologe* 2: 17-27, 2005.

3. **Welte T, Marre R, Suttorp N.** CAPNet--network of competence for community acquired pneumonia: structures and aims. *Pneumologie* 57: 34-41, 2003.

4. **File TM Jr.** Streptococcus pneumoniae and community-acquired pneumonia: a cause for concern. *Am J Med* 117 Suppl 3A: 39S-50S, 2004.

5. **Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Gruneberg RN.** The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 52: 229-46, 2003.

6. **Pallares R, Fenoll A, Linares J.** The epidemiology of antibiotic resistance in Streptococcus pneumoniae and the clinical relevance of resistance to cephalosporins, macrolides and quinolones. *Int J Antimicrob Agents* 22 Suppl 1: S15-S24, 2003.

7. **Kohlhammer Y, Schwartz M, Raspe H, Schafer T.** Risk factors for community acquired pneumonia (CAP). A systematic review. *Dtsch Med Wochenschr* 130: 381-6, 2005.

8. **Roson B, Carratala J, Fernandez-Sabe N, Tubau F, Manresa F, Gudiol F.** Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 164: 502-8, 2004.

9. **Hartung W.** Anatomie, allgemeine Pathologie und Pathomorphologie. In: Ferlinz R, ed. Pneumologie in Praxis und Klinik. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1. Auflage*: 1-23, 1994.

10. **Kaplan HM, Brewer NR, Blair WH**
Physiology In: Foster HL, Small JD, Fox JG, ed. The mouse in biomedical research. *Academic Press New York, London* 247-92, 1983.

11. **Schwarte LA, Zuurbier CJ, Ince C.** Mechanical ventilation of mice. *Basic Res Cardiol* 95: 510-20, 2000.

12. **Warner BB, Stuart LA, Papes RA, Wispe JR.** Functional and pathological effects of prolonged hyperoxia in neonatal mice. *Am J Physiol* 275: L110-L117, 1998.

13. **Mitzner W, Lee W, Georgakopoulos D, Wagner E.** Angiogenesis in the mouse lung. *Am J Pathol* 157: 93-101, 2000.

14. **Klinke R, Silbernagel S.** Atmung. In: Klinke R, Silbernagel S, eds. Lehrbuch der Physiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York* 4. Auflage: 217-86, 2005.

15. **Schmidt RF, Thews G.** Physiologie des Menschen. *Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg, New York* 28. Auflage: 565-641, 2000.

16. **Gros G.** Atmung. In: Engelhardt W, Breves G, eds. Physiologie der Haustiere. *Enke Verlag* 2. Auflage, 2005.

17. **Gottlieb AI, Lowell Langille BL, Wong MK, Kim DW.** Structure and function of the endothelial cytoskeleton. *Lab Invest* 65: 123-37, 1991.

18. **Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD.** Das Cytoskelett. Lehrbuch der molekularen Zellbiologie. *VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany* 3. Auflage: 607-43, 2005.

19. **Drenckhahn D, Ness W.** The endothelial contractile cytoskeleton. In: Born GVR, Schwarz CV, ed. Vascular endothelium: Physiology, pathology, and therapeutic opportunities. *Schattauer Stuttgart Germany* 1-26, 19979.

20. **Suttorp N, Habben E.** Effect of staphylococcal alpha-toxin on intracellular Ca2+ in polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* 56: 2228-34, 1988.

21. **Suttorp N, Nolte A, Wilke A, Drenckhahn D.** Human neutrophil elastase increases permeability of cultured pulmonary endothelial cell monolayers. *Int J Microcirc Clin Exp* 13: 187-203, 1993.

22. **Ishizaki T, Morishima Y, Okamoto M, Furuyashiki T, Kato T, Narumiya S.** Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol* 3: 8-14, 2001.

23. **Kolodney MS, Elson EL.** Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 10252-6, 1995.

24. **Zhang D, Wang Z, Jin N et al.** Microtubule disruption modulates the Rho-kinase pathway in vascular smooth muscle. *J Muscle Res Cell Motil* 22: 193-200, 2001.

25. **Lum H, Malik AB.** Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol* 267: L223-L241, 1994.

26. **Wong AJ, Pollard TD, Herman IM.** Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo. *Science* 219: 867-9, 1983.

27. **Bershadsky A, Chausovsky A, Becker E, Lyubimova A, Geiger B.** Involvement of microtubules in the control of adhesion-dependent signal transduction. *Curr Biol* 6: 1279-89, 1996.

28. **Alexander JS, Hechtman HB, Shepro D.** Phalloidin enhances endothelial barrier function and reduces inflammatory permeability in vitro. *Microvasc Res* 35: 308-15, 1988.

29. **Ermert L, Bruckner H, Walmrath D et al.** Role of endothelial cytoskeleton in high-permeability edema due to botulinum C2 toxin in perfused rabbit lungs. *Am J Physiol* 268: L753-L761, 1995.

30. **Schnittler HJ, Wilke A, Gress T, Suttorp N, Drenckhahn D.** Role of actin and myosin in the control of paracellular permeability in pig, rat and human vascular endothelium. *J Physiol* 431: 379-401, 1990.

31. **Burridge K.** Are stress fibres contractile? *Nature* 294: 691-2, 1981.

32. **Langanger G, Moeremans M, Daneels G, Sobieszek A, De Brabander M, De Mey J.** The molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells. *J Cell Biol* 102: 200-9, 1986.

33. **Drenckhahn D, Wagner J.** Stress fibers in the splenic sinus endothelium in situ: molecular structure, relationship to the extracellular matrix, and contractility. *J Cell Biol* 102: 1738-47, 1986.

34. **Franke RP, Grafe M, Schnittler H, Seiffge D, Mittermayer C, Drenckhahn D.** Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature* 307: 648-9, 1984.

35. **Garcia JG, Davis HW, Patterson CE.** Regulation of endothelial cell gap formation and barrier dysfunction: role of myosin light chain phosphorylation. *J Cell Physiol* 163: 510-22, 1995.

36. **Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimor D, Darnell J.** Zellbewegung und Zellgestaltung: Mikrofilamente. In: Lange Ch, Mahlke K, ed. Molekulare Zellbiologie. *Gustav Fischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York 4. Auflage*: 813-55, 2001.

37. **Shasby DM, Shasby SS, Sullivan JM, Peach MJ.** Role of endothelial cell cytoskeleton in control of endothelial permeability. *Circ Res* 51: 657-61, 1982.

38. **Wysolmerski RB, Lagunoff D.** Involvement of myosin light-chain kinase in endothelial cell retraction. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 16-20, 1990.

39. **Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimor D, Darnell J.** Zellbewegung u. Zellgestaltung II: Mikrotubuli und Intermediärfilamente. In: Lange Ch, Mahlke K, ed. Molekulare Zellbiologie. *Gustav Fischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York* 4. Auflage: 861-911, 2001.

40. **Maccioni RB, Cambiazo V.** Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev* 75: 835-64, 1995.

41. **McIntosh JR, Euteneuer U.** Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and an evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. *J Cell Biol* 98: 525-33, 1984.

42. **Mitchison T, Kirschner M.** Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237-42, 1984.

43. **Liu BP, Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K.** Microtubule depolymerization induces stress fibers, focal adhesions, and DNA synthesis via the GTP-binding protein Rho. *Cell Adhes Commun* 5: 249-55, 1998.

44. **Enomoto T.** Microtubule disruption induces the formation of actin stress fibers and focal adhesions in cultured cells: possible involvement of the rho signal cascade. *Cell Struct Funct* 21: 317-26, 1996.

45. **Verin AD, Birukova A, Wang P et al.** Microtubule disassembly increases endothelial cell barrier dysfunction: role of MLC phosphorylation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L565-L574, 2001.

46. **Griffith LM, Pollard TD.** Evidence for actin filament-microtubule interaction mediated by microtubule-associated proteins. *J Cell Biol* 78: 958-65, 1978.

47. **Griffith LM, Pollard TD.** The interaction of actin filaments with microtubules and microtubule-associated proteins. *J Biol Chem* 257: 9143-51, 1982.

48. **Selden SC, Pollard TD.** Phosphorylation of microtubule-associated proteins regulates their interaction with actin filaments. *J Biol Chem* 258: 7064-71, 1983.

49. **Sattilaro RF.** Interaction of microtubule-associated protein 2 with actin filaments. *Biochemistry* 25: 2003-9, 1986.

50. **Cross D, Vial C, Maccioni RB.** A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines. *J Cell Sci* 105 (Pt 1): 51-60, 1993.

51. **Dejana E, Lampugnani MG, Martinez-Estrada O, Bazzoni G.** The molecular organization of endothelial junctions and their functional role in vascular morphogenesis and permeability. *Int J Dev Biol* 44: 743-8, 2000.

52. **Dejana E, Spagnuolo R, Bazzoni G.** Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration. *Thromb Haemost* 86: 308-15, 2001.

53. **Navarro P, Caveda L, Breviario F, Mandoteanu I, Lampugnani MG, Dejana E.** Catenin-dependent and -independent functions of vascular endothelial cadherin. *J Biol Chem* 270: 30965-72, 1995.

54. **Corada M, Mariotti M, Thurston G et al.** Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9815-20, 1999.

55. **Gotsch U, Borges E, Bosse R et al.** VE-cadherin antibody accelerates neutrophil recruitment in vivo. *J Cell Sci* 110 (Pt 5): 583-8, 1997.

56. **Rabiet MJ, Plantier JL, Rival Y, Genoux Y, Lampugnani MG, Dejana E.** Thrombin-induced increase in endothelial permeability is associated with changes in cell-to-cell junction organization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16: 488-96, 1996.

57. **Andriopoulou P, Navarro P, Zanetti A, Lampugnani MG, Dejana E.** Histamine induces tyrosine phosphorylation of endothelial cell-to-cell adherens junctions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 2286-97, 1999.

58. **Smedly LA, Tonnesen MG, Sandhaus RA et al.** Neutrophil-mediated injury to endothelial cells. Enhancement by endotoxin and essential role of neutrophil elastase. *J Clin Invest* 77: 1233-43, 1986.

59. **Hippenstiel S, Tannert-Otto S, Vollrath N et al.** Glucosylation of small GTP-binding Rho proteins disrupts endothelial barrier function. *Am J Physiol* 272: L38-L43, 1997.

60. **Suttorp N, Polley M, Seybold J et al.** Adenosine diphosphate-ribosylation of G-actin by botulinum C2 toxin increases endothelial permeability in vitro. *J Clin Invest* 87: 1575-84, 1991.

61. **Seybold, J.** Das Zytoskelett der Endothelzelle: Regulation der Aktinfilamente unter dem Einfluss von bakteriellen Toxinen und Tumor-Nekrose-Faktor. *Dissertation,* 1994.

62. **Ren Y, Li R, Zheng Y, Busch H.** Cloning and characterization of GEF-H1, a microtubule-associated guanine nucleotide exchange factor for Rac and Rho GTPases. *J Biol Chem* 273: 34954-60, 1998.

63. **Sheridan BC, McIntyre RC, Jr., Meldrum DR et al.** Microtubules regulate pulmonary vascular smooth muscle contraction. *J Surg Res* 62: 284-7, 1996.

64. **Suttorp N, Neuhof H, Grimminger F, Seeger W.** Biochemie und Pathobiochemie der Lunge. In: Ferlinz R, ed. Pneumologie in Praxis und Klinik. *Georg Thieme Verlag Stuttgar, New York* 1. Auflage: 67-119, 1994.

65. **Hanahan DJ.** Platelet activating factor: a biologically active phosphoglyceride. *Annu Rev Biochem* 55: 483-509, 1986.

66. **Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM.** Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* 69:419-45, 2000.

67. **Uhlig S, Goggel R, Engel S.** Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung. *Pharmacol Rep* 57 Suppl:206-21, 2005.

68. **Chao W, Olson MS.** Platelet-activating factor: receptors and signal transduction. *Biochem J* 292 (Pt 3): 617-29, 1993.

69. **Hanahan DJ, Demopoulos CA, Liehr J, Pinckard RN.** Identification of platelet activating factor isolated from rabbit basophils as acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *J Biol Chem* 255: 5514-6, 1980.

70. **Mueller HW, O'Flaherty JT, Greene DG, Samuel MP, Wykle RL.** 1-O-alkyl-linked glycerophospholipids of human neutrophils: distribution of arachidonate and other acyl residues in the ether-linked and diacyl species. *J Lipid Res* 25: 383-8, 1984.

71. **McManus LM, Woodard DS, Deavers SI, Pinckard RN.** PAF molecular heterogeneity: pathobiological implications. *Lab Invest* 69: 639-50, 1993.

72. **Prescott S, McIntyre T, Zimmermann G.** In: JI Gallin RS, ed. Inflammation:Basic Principles and Clinical Correlates. *Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins* 387-96, 1999.

73. **Wykle RL, Malone B, Snyder F.** Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. *J Biol Chem* 255: 10256-60, 1980.

74. **Fujishima H, Sanchez Mejia RO, Bingham CO, III et al.** Cytosolic phospholipase A2 is essential for both the immediate and the delayed phases of eicosanoid generation in mouse bone marrow-derived mast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4803-7, 1999.

75. **Bonventre JV, Huang Z, Taheri MR et al.** Reduced fertility and postischaemic brain injury in mice deficient in cytosolic phospholipase A2. *Nature* 390: 622-5, 1997.

76. **Uozumi N, Kume K, Nagase T et al.** Role of cytosolic phospholipase A2 in allergic response and parturition. *Nature* 390: 618-22, 1997.

77. **Leslie CC, Voelker DR, Channon JY, Wall MM, Zelarney PT.** Properties and purification of an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A2 from a macrophage cell line, RAW 264.7. *Biochim Biophys Acta* 963: 476-92, 1988.

78. **Ramesha CS, Pickett WC.** Fatty acid composition of diacyl, alkylacyl, and alkenylacyl phospholipids of control and arachidonate-depleted rat polymorphonuclear leukocytes. *J Lipid Re* 28: 326-31l, 1987.

79. **Baker RR, Chang HY.** Neuronal nuclear acetyltransferases involved in the synthesis of platelet-activating factor are located in the nuclear envelope and show differential losses in activity. *Biochim Biophys Acta* 1345: 197-206, 1997.

80. **Holland MR, Venable ME, Whatley RE, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM.** Activation of the acetyl-coenzyme A:lysoplatelet-activating factor acetyltransferase regulates platelet-activating factor synthesis in human endothelial cells. *J Biol Chem* 267: 22883-90, 1992.

81. **Nieto ML, Velasco S, Sanchez CM.** Modulation of acetyl-CoA:1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine (lyso-PAF) acetyltransferase in human polymorphonuclears. The role of cyclic AMP-dependent and phospholipid sensitive, calcium-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 263: 4607-11, 1988.

82. **Lee TC.** Biosynthesis of platelet activating factor. Substrate specificity of 1-alkyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine:acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen microsomes. *J Biol Chem* 260: 10952-5, 1985.

83. **Nakagawa Y, Sugai M, Karasawa K et al.** Possible influence of lysophospholipase on the production of 1-acyl-2-acetylglycerophosphocholine in macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1126: 277-85, 1992.

84. **Sturk A, Schaap MC, Prins A, ten Cate JW, van den Bosh H.** Synthesis of platelet-activating factor by human blood platelets and leucocytes. Evidence against selective utilization of cellular ether-linked phospholipids. *Biochim Biophys Acta* 993: 148-56, 1989.

85. **Graham RM, Strahan ME, Norman KW, Watkins DN, Sturm MJ, Taylor RR.** Platelet and plasma platelet-activating factor in sepsis and myocardial infarction. *J Lipid Mediat Cell Signal* 9: 167-82, 1994.

86. **Prescott SM, Zimmerman GA, McIntyre TM.** Human endothelial cells in culture produce platelet-activating factor (1-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) when stimulated with thrombin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 3534-8, 1984.

87. **Lynch JM, Henson PM.** The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor. *J Immunol* 137: 2653-61, 1986.

88. **Sisson JH, Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA.** Production of platelet-activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Correlation of synthesis with release, functional events, and leukotriene B4 metabolism. *J Immunol* 138: 3918-26, 1987.

89. **McIntyre TM, Zimmerman GA, Satoh K, Prescott SM.** Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate. *J Clin Invest* 76: 271-80, 1985.

90. **Elstad MR, Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman GA.** Synthesis and release of platelet-activating factor by stimulated human mononuclear phagocytes. *J Immunol* 140: 1618-24, 1988.

91. **Cluzel M, Undem BJ, Chilton FH.** Release of platelet-activating factor and the metabolism of leukotriene B4 by the human neutrophil when studied in a cell superfusion model. *J Immunol* 143: 3659-65, 1989.

92. **Miwa M, Sugatani J, Ikemura T et al.** Release of newly synthesized platelet-activating factor (PAF) from human polymorphonuclear leukocytes under in vivo conditions. Contribution of PAF-releasing factor in serum. *J Immunol* 148: 872-80, 1992.

93. **Honda Z, Nakamura M, Miki I et al.** Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. *Nature* 349: 342-6, 1991.

94. **Kunz D, Gerard NP, Gerard C.** The human leukocyte platelet-activating factor receptor. cDNA cloning, cell surface expression, and construction of a novel epitope-bearing analog. *J Biol Chem* 267: 9101-6, 1992.

95. **Nakamura M, Honda Z, Izumi T et al.** Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. *J Biol Chem* 266: 20400-5, 1991.

96. **Ye RD, Prossnitz ER, Zou AH, Cochrane CG.** Characterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet activating factor. *Biochem Biophys Res Commun* 180: 105-11, 1991.

97. **Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G.** Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev* 80: 1669-99, 2000.

98. **Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM.** The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* 30: S294-S301, 2002.

99. **Cundell DR, Gerard NP, Gerard C, Idanpaan-Heikkila I, Tuomanen EI.** Streptococcus pneumoniae anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* 377: 435-8, 1995.

100. **Lemjabbar H, Basbaum C.** Platelet-activating factor receptor and ADAM10 mediate responses to Staphylococcus aureus in epithelial cells. *Nat Med* 8: 41-6, 2002.

101. **Wagner F, Rottem S, Held HD, Uhlig S, Zahringer U.** Ether lipids in the cell membrane of Mycoplasma fermentans. *Eur J Biochem* 267: 6276-86, 2000.

102. **Ali H, Richardson RM, Tomhave ED, DuBose RA, Haribabu B, Snyderman R.** Regulation of stably transfected platelet activating factor receptor in RBL-2H3 cells. Role of multiple G proteins and receptor phosphorylation. *J Biol Chem* 269: 24557-63, 1994.

103. **Honda Z, Takano T, Gotoh Y, Nishida E, Ito K, Shimizu T.** Transfected platelet-activating factor receptor activates mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP kinase kinase in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 269: 2307-15, 1994.

104. **Ishii I, Izumi T, Tsukamoto H, Umeyama H, Ui M, Shimizu T.** Alanine exchanges of polar amino acids in the transmembrane domains of a platelet-activating factor receptor generate both constitutively active and inactive mutants. *J Biol Chem* 272: 7846-54, 1997.

105. **Carlson SA, Chatterjee TK, Fisher RA.** The third intracellular domain of the platelet-activating factor receptor is a critical determinant in receptor coupling to phosphoinositide phospholipase C-activating G proteins. Studies using intracellular domain minigenes and receptor chimeras. *J Biol Chem* 271: 23146-53, 1996.

106. **Takano T, Honda Z, Sakanaka C et al.** Role of cytoplasmic tail phosphorylation sites of platelet-activating factor receptor in agonist-induced desensitization. *J Biol Chem* 269: 22453-8, 1994.

107. **Richardson RM, Haribabu B, Ali H, Snyderman R.** Cross-desensitization among receptors for platelet activating factor and peptide chemoattractants. Evidence for independent regulatory pathways. *J Biol Chem* 271: 28717-24, 1996.

108. **Ali H, Fisher I, Haribabu B, Richardson RM, Snyderman R.** Role of phospholipase Cbeta3 phosphorylation in the desensitization of cellular responses to platelet-activating factor. *J Biol Chem* 272: 11706-9, 1997.

109. **Dagenais P, Thivierge M, Parent JL, Stankova J, Rola-Pleszczynski M.** Augmented expression of platelet-activating factor receptor gene by TNF-alpha through transcriptional activation in human monocytes. *J Leukoc Biol* 61: 106-12, 1997.

110. **Mutoh H, Ishii S, Izumi T, Kato S, Shimizu T.** Platelet-activating factor (PAF) positively auto-regulates the expression of human PAF receptor transcript 1 (leukocyte-type) through NF-kappa B. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 1137-42, 1994.

111. **Thivierge M, Parent JL, Stankova J, Rola-Pleszczynski M.** Modulation of human platelet-activating factor receptor gene expression by protein kinase C activation. *J Immunol* 157: 4681-7, 1996.

112. **Wang H, Tan X, Chang H, Gonzalez-Crussi F, Remick DG, Hsueh W.** Regulation of platelet-activating factor receptor gene expression in vivo by endotoxin, platelet-activating factor and endogenous tumour necrosis factor. *Biochem J* 322: 603-8, 1997.

113. **Marrache AM, Gobeil F Jr., Bernier SG et al.** Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor. *J Immunol* 169: 6474-81, 2002.

114. **Bunting M, Lorant DE, Bryant AE et al.** Alpha toxin from Clostridium perfringens induces proinflammatory changes in endothelial cells. *J Clin Invest* 100: 565-74, 1997.

115. **Krull M, Dold C, Hippenstiel S, Rosseau S, Lohmeyer J, Suttorp N.** Escherichia coli hemolysin and Staphylococcus aureas alpha-toxin potently induce neutrophil adhesion to cultured human endothelial cells. *J Immunol* 157: 4133-40, 1996.

116. **Nagase T, Ishii S, Kume K et al.** Platelet-activating factor mediates acid-induced lung injury in genetically engineered mice. *J Clin Invest* 104: 1071-6, 1999.

117. **Patel KD, Zimmerman GA, Prescott SM, McEver RP, McIntyre TM.** Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 112: 749-59, 1991.

118. **Prescott SM, McIntyre TM, Zimmerman G.** Two of the usual suspects, platelet-activating factor and its receptor, implicated in acute lung injury. *J Clin Invest* 104: 1019-20, 1999.

119. **Ishii S, Kuwaki T, Nagase T et al.** Impaired anaphylactic responses with intact sensitivity to endotoxin in mice lacking a platelet-activating factor receptor. *J Exp Med* 187: 1779-88, 1998.

120. **Chung KF.** Platelet-activating factor in inflammation and pulmonary disorders. *Clin Sci (Lond)* 83: 127-38, 1992.

121. **Anderson BO, Bensard DD, Harken AH.** The role of platelet activating factor and its antagonists in shock, sepsis and multiple organ failure. *Surg Gynecol Obstet* 172: 415-24, 1991.

122. **Bussolino F, Porcellini MG, Varese L, Bosia A.** Intravascular release of platelet activating factor in children with sepsis. *Thromb Res* 48: 619-20, 1987.

123. **Fink A, Geva D, Zung A, Konichezky S, Eliraz A, Bentwich Z.** Adult respiratory distress syndrome: roles of leukotriene C4 and platelet activating factor. *Crit Care Med* 18: 905-10, 1990.

124. **Graham RM, Stephens CJ, Silvester W, Leong LL, Sturm MJ, Taylor RR.** Plasma degradation of platelet-activating factor in severely ill patients with clinical sepsis. *Crit Care Med* 22: 204-12, 1994.

125. **Nakos G, Pneumatikos J, Tsangaris I, Tellis C, Lekka M.** Proteins and phospholipids in BAL from patients with hydrostatic pulmonary edema. *Am J Respir Crit Care Med* 155: 945-51, 1997.

126. **Ohar JA, Waller KS, Pantano J, Demello DE, Dahms TE.** Chronic platelet-activating factor induces a decrease in pulmonary vascular compliance, hydroxyproline, and loss of vascular matrix. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 1628-34, 1994.

127. **Lou YP, Takeyama K, Grattan KM et al.** Platelet-activating factor induces goblet cell hyperplasia and mucin gene expression in airways. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1927-34, 1998.

128. **Ishii S, Shimizu T.** Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. *Prog Lipid Res* 39: 41-82, 2000.

129. **Balsinde J, Balboa MA, Dennis EA.** Inflammatory activation of arachidonic acid signaling in murine P388D1 macrophages via sphingomyelin synthesis. *J Biol Chem* 272: 20373-7, 1997.

130. **Göggel R, Winoto-Morbach S, Vielhaber G et al.** PAF-mediated pulmonary edema: a new role for acid sphingomyelinase and ceramide. *Nat Med* 10: 155-60, 2004.

131. **Lang PA, Kempe DS, Tanneur V et al.** Stimulation of erythrocyte ceramide formation by platelet-activating factor. *J Cell Sci* 118: 1233-43, 2005.

132. **Farrukh IS, Sciuto AM, Spannhake EW, Gurtner GH, Michael JR.** Leukotriene D4 increases pulmonary vascular permeability and pressure by different mechanisms in the rabbit. *Am Rev Respir Dis* 134: 229-32, 1986.

133. **Uhlig S, Wendel A.** Lipid mediators in perfused lung. In: von Wichert P, Siegenthaler W, eds. Interdisziplinäre Aspekte der Pneumologie. *Georg Thieme Verlag* 66-74, 1995.

134. **Burghuber O, Mathias MM, McMurtry IF, Reeves JT, Voelkel NF.** Lung edema due to hydrogen peroxide is independent of cyclooxygenase products. *J Appl Physiol* 56: 900-5, 1984.

135. **Björk J, Smedegard G.** Acute microvascular effects of PAF-acether, as studied by intravital microscopy. *Eur J Pharmacol* 96: 87-94, 1983.

136. **Humphrey DM, McManus LM, Hanahan DJ, Pinckard RN.** Morphologic basis of increased vascular permeability induced by acetyl glyceryl ether phosphorylcholine. *Lab Invest* 50: 16-25, 1984.

137. **Walther A, Yilmaz N, Schmidt W et al.** Role of platelet-activating factor in leukocyte-independent plasma extravasation and mast cell activation during endotoxemia. *J Surg Res* 93: 265-71, 2000.

138. **Longphre M, Zhang LY, Paquette N, Kleeberger SR.** PAF-induced airways hyperreactivity is modulated by mast cells in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14: 461-9, 1996.

139. **Clavijo LC, Carter MB, Matheson PJ, Wilson MA, Wead WB, Garrison RN.** PAF increases vascular permeability without increasing pulmonary arterial pressure in the rat. *J Appl Physiol* 90: 261-8, 2001.

140. **Falk S, Goggel R, Heydasch U et al.** Quinolines attenuate PAF-induced pulmonary pressor responses and edema formation. *Am J Respir Crit Care Med* 160: 1734-42, 1999.

141. **Kubes P, Suzuki M, Granger DN.** Modulation of PAF-induced leukocyte adherence and increased microvascular permeability. *Am J Physiol* 259: G859-G864, 1990.

142. **Sirois MG, de Lima WT, Brum Fernandes AJ, Johnson RJ, Plante GE, Sirois P.** Effect of PAF on rat lung vascular permeability: role of platelets and polymorphonuclear leucocytes. *Br J Pharmacol* 111: 1111-6, 1994.

143. **Evans TW, Chung KF, Rogers DF, Barnes PJ.** Effect of platelet-activating factor on airway vascular permeability: possible mechanisms. *J Appl Physiol* 63: 479-84, 1987.

144. **O'Donnell SR, Barnett CJ.** Microvascular leakage to platelet activating factor in guinea-pig trachea and bronchi. *Eur J Pharmacol* 138: 385-96, 1987.

145. **Pirotzky E, Page CP, Roubin R et al.** PAF-acether-induced plasma exudation in rat skin is independent of platelets and neutrophils. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 1: 107-22, 1984.

146. **Göggel R, Hoffman S, Nusing R, Narumiya S, Uhlig S.** Platelet-activating factor-induced pulmonary edema is partly mediated by prostaglandin E(2), E-prostanoid 3-receptors, and potassium channels. *Am J Respir Crit Care Med* 166: 657-62, 2002.

147. **Gulati OP, Malmsten C, Ponard G, Gulati N.** The local edemogenic effects of leukotriene C4 and prostaglandin E2 in rats. *Prostaglandins Leukot Med* 10: 11-7, 1983.

148. **Narumiya S, FitzGerald GA.** Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *J Clin Invest* 108: 25-30, 2001

149. **Stevens T, Garcia JG, Shasby DM, Bhattacharya J, Malik AB.** Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L419-L422, 2000.

150. **Grassme H, Jekle A, Riehle A et al.** CD95 signaling via ceramide-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 276: 20589-96, 2001.

151. **Huwiler A, Kolter T, Pfeilschifter J, Sandhoff K.** Physiology and pathophysiology of sphingolipid metabolism and signaling. *Biochim Biophys Acta* 1485: 63-99, 2000.

152. **Lindner K, Uhlig U, Uhlig S.** Ceramide alters endothelial cell permeability by a nonapoptotic mechanism. *Br J Pharmacol* 145: 132-40, 2005.

153. **Claus RA, Bunck AC, Bockmeyer CL et al.** Role of increased sphingomyelinase activity in apoptosis and organ failure of patients with severe sepsis. *FASEB J* 19: 1719-21, 2005.

154. **Baldwin AL, Thurston G.** Mechanics of endothelial cell architecture and vascular permeability. *Crit Rev Biomed Eng* 29: 247-78, 2001.

155. **Hudry-Clergeon H, Stengel D, Ninio E, Vilgrain I.** Platelet-activating factor increases VE-cadherin tyrosine phosphorylation in mouse endothelial cells and its association with the PtdIns3'-kinase. *FASEB J* 19: 512-20, 2005.

156. **Tan XD, Chang H, Qu XW, Caplan M, Gonzalez-Crussi F, Hsueh W.** Platelet-activating factor increases mucosal permeability in rat intestine via tyrosine phosphorylation of E-cadherin. *Br J Pharmacol* 129: 1522-9, 2000.

157. **Uhlig S, Wollin L, Wendel A.** Contributions of thromboxane and leukotrienes to PAF-induced impairment of lung function in the rat. *J Appl Physiol* 77: 262-9, 1994.

158. **Claing A, Bkaily G, Berthiaume N, Sirois P, Rola-Pleszczynski M, D'Orleans-Juste P.** Role of R-type calcium channels in the response of the perfused arterial and venous mesenteric vasculature of the rat to platelet-activating factor. *Br J Pharmacol* 112: 1202-8, 1994.

159. **Collins LC, Roberts AM.** Effects of platelet-activating factor on arteriolar and venular tone in rat trachea. *Microvasc Res* 53: 63-72, 1997.

160. **Akagi M, Nishioka E, Kanoh R, Tachibana M, Fukuishi N.** Inhibitor effect of apafant on bronchopulmonary responses to platelet activating factor and to antigen in rats. *Arzneimittelforschung* 47: 1364-9, 1997.

161. **Lefort J, Rotilio D, Vargaftig BB.** The platelet-independent release of thromboxane A2 by Paf-acether from guinea-pig lungs involves mechanisms distinct from those for leukotriene. *Br J Pharmacol* 82: 565-75, 1984.

162. **Olson NC, Kruse-Elliott KT, Johnson LW.** Effect of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase blockade on porcine hemodynamics during continuous infusion of platelet-activating factor. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 49: 549-59, 1993.

163. **Tokuyama K, Lotvall JO, Morikawa A, Barnes PJ, Chung KF.** Role of thromboxane A2 in airway microvascular leakage induced by inhaled platelet-activating factor. *J Appl Physiol* 71: 1729-34, 1991.

164. **Underwood DC, Kriseman T, McNamara DB, Hyman AL, Kadowitz PJ.** Blockade of thromboxane responses in the airway of the cat by SQ 29,548. *J Appl Physiol* 62: 2193-200, 1987.

165. **Davidson D, Singh M, Wallace GF.** Role of leukotriene C4 in pulmonary hypertension: platelet-activating factor vs. hypoxia. *J Appl.Physiol* 68: 1628-33, 1990.

166. **Nagase T, Ishii S, Katayama H, Fukuchi Y, Ouchi Y, Shimizu T.** Airway responsiveness in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor. Roles of thromboxanes and leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1621-7, 1997.

167. **Voelkel NF, Worthen S, Reeves JT, Henson PM, Murphy RC.** Nonimmunological production of leukotrienes induced by platelet-activating factor. *Science* 218: 286-9, 1982.

168. **Hamasaki Y, Mojarad M, Saga T, Tai HH, Said SI.** Platelet-activating factor raises airway and vascular pressures and induces edema in lungs perfused with platelet-free solution. *Am Rev Respir Dis* 129: 742-6, 1984.

169. **Norel X, de M, V, Brink C.** Vasoconstriction induced by activation of EP1 and EP3 receptors in human lung: effects of ONO-AE-248, ONO-DI-004, ONO-8711 or ONO-8713. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 74: 101-12, 2004.

170. **Walch L, de M, V, Brink C, Norel X.** Prostanoid EP(1)- and TP-receptors involved in the contraction of human pulmonary veins. *Br J Pharmacol* 134: 1671-8, 2001.

171. **Norel X, Walch L, Labat C, Gascard JP, Dulmet E, Brink C.** Prostanoid receptors involved in the relaxation of human bronchial preparations. *Br J Pharmacol* 126: 867-72, 1999.

172. **Walch L, Labat C, Gascard JP, de M, V, Brink C, Norel X.** Prostanoid receptors involved in the relaxation of human pulmonary vessels. *Br J Pharmacol.* 126: 859-66, 1999.

173. **Uhlig S, Nusing R, von Bethmann A et al.** Cyclooxygenase-2-dependent bronchoconstriction in perfused rat lungs exposed to endotoxin. *Mol Med* 2: 373-83, 1996.

174. **Walterscheid JP, Ullrich SE, Nghiem DX.** Platelet-activating factor, a molecular sensor for cellular damage, activates systemic immune suppression. *J Exp Med* 195: 171-9, 2002.

175. **Oshiro T, Kakuta Y, Shimura S, Nara M, Shirato K.** Characterization of platelet-activating factor-induced cytosolic calcium mobilization in human eosinophils. *Clin Exp Allergy* 30: 699-705, 2000.

176. **Randriamampita C, Trautmann A.** Biphasic increase in intracellular calcium induced by platelet-activating factor in macrophages. *FEBS Lett.* 249: 199-206, 1989.

177. **Shukla SD.** Inositol phospholipid turnover in PAF transmembrane signalling. *Lipids* 26: 1028-33, 1991.

178. **Martin C, Goggel R, Ressmeyer AR, Uhlig S.** Pressor responses to platelet-activating factor and thromboxane are mediated by Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L250-L257, 2004.

179. **Ding X, Murray PA.** Cellular mechanisms of thromboxane A2-mediated contraction in pulmonary veins. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289: L825-L833, 2005.

180. **Liu F, Wu JY, Beasley D, Orr JA.** TxA2-induced pulmonary artery contraction requires extracellular calcium. *Respir Physiol* 109: 155-66, 1997.

181. **Somlyo AP, Somlyo AV.** Ca2+ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83: 1325-58, 2003

182. **Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K.** Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* 22: 32-9, 2001.

183. **Uehata M, Ishizaki T, Satoh H et al.** Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389: 990-4, 1997.

184. **Lorenz J, Ferlinz R.** Pneumonien und Lungenmykosen / allg. Teil. In: Ferlinz R, ed. Pneumologie in Praxis und Klinik. *Mainz: Georg Thieme Verlag Stuttgart New York* 1. Auflage: 329-69, 1994.

185. **Morgenroth K.** Pneumonien. In: Doerr W, Seifert G, eds. Spezielle pathologische Anatomie. Bd. XVI/1. *Springer Verlag Berlin*; 1983.

186. **Pschyrembel W.** Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. *de Gruyter Berlin* 260. Auflage; 2004.

187. **Huntemann I, Lorenz J.** Ambulant erworbene Pneumonie (AEP), Comunity Acquired Pneumonia (CAP). *Kompetenznetz Ambulant Erworbene Pneumonie*, 2004.

188. **Heizmann W, Heizmann P.** Pneumonie/ Einteilung d. Pneumonien. *VADEMECUM, Infektiologie 2005/2006*: 40-2, 2005.

189. **Georges H, Leroy O, Vandenbussche C et al.** Epidemiological features and prognosis of severe community-acquired pneumococcal pneumonia. *Intensive Care Med* 25: 198-206, 1999.

190. **Hoffken G, Halank M, Gillissen A.** Treatment of severe pneumonia-community-acquired and "early onset" nosocomial. *Med Klin (Munich)* 99: 362-71, 2004.

191. **Sopena N, Pedro-Botet ML, Sabria M, Garcia-Pares D, Reynaga E, Garcia-Nunez M.** Comparative study of community-acquired pneumonia caused by Streptococcus pneumoniae, Legionella pneumophila or Chlamydia pneumoniae. *Scand J Infect Dis* 36: 330-4, 2004.

192. **Johanson WG, Pierce AK, Sanford JP, and Thomas GD.** Nosocomial respiratory infections with gramnegative bacilli: the significance of colonization of the respiratory tract. *Ann imter Med* 77: 701, 1972.

193. **Daschner F, Scherer E, Klein S, Langmaack H, and Vogel W.** Krankenhausinfektionen in einer operativen Intensivtherapiestation. *Anaesthesist* 31: 188, 1982.

194. **Schlegel H.** Allgemeine Mikrobiologie. *Georg Thieme Verlag Stuttgart* 7. Auflage, 1992.

195. **Hahn H, Falke D, aufmann S, Ilmann U.** Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. *Springer Verlag* 5. Auflage, 2004.

196. **Köhler W, Eggers B, Fleischer B, Marre R, Pfister H, Pulverer G.** Medizinische Mikrobiologie. *Urban & Fischer Verlag*, 2001.

197. **Murray P, Drew W, Kobayashi G, Thompson J.** Medical Microbiology International. *Student Edition Wolfe Education Ltd,* 1990.

198. **Lund E, Henrichsen J.** Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of Streptococcus pneumoniae. In: Bergan T, Norris J, eds. Methods in Microbiology. *New York: Academic Press* 241-61, 1987.

199. **Henrichsen J.** Six newly recognized types of Streptococcus pneumoniae. *J Clin Microbiol* 33: 2759-62, 1995.

200. **Austrian R.** Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother* 18 Suppl A: 35-45, 1986.

201. **Musher D.** Infektionskrankheiten: Erkrankungen durch grampositive Bakterien / Pneumokokkeninfektionen. In: Dietel M, Dudenhausen J, Suttorp N, eds. Harrisons Innere Medizin 1. *ABW Wissenschaftsverlag* 15 Auflage: 974-80, 2002.

202. **Tuomanen EI, Austrian R, Masure HR.** Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* 332: 1280-4, 1995.

203. **Feldman C, Mitchell TJ, Andrew PW et al.** The effect of Streptococcus pneumoniae pneumolysin on human respiratory epithelium in vitro. *Microb Pathog* 9: 275-84, 1990.

204. **McCullers JA, Tuomanen EI.** Molecular pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Front Biosci* 6: D877-D889, 2001.

205. **Bussolino F, Camussi G, Tetta C, Garbarino G, Bosia A, Baglioni C.** Selected cytokines promote the synthesis of platelet-activating factor in vascular endothelial cells: comparison between tumor necrosis factor alpha and beta and interleukin-1. *J Lipid Mediat* 2 Suppl: S15-S22, 1990.

206. **Ring A, Weiser JN, Tuomanen EI.** Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. Molecular analysis of a novel bidirectional pathway. *J Clin Invest* 102: 347-60, 1998.

207. **Mason CM, Nelson S.** Pulmonary host defenses. Implications for therapy. *Clin Chest Med* 20: 475-88, vii, 1999.

208. **Twigg HL, III.** Pulmonary host defenses. *J Thorac Imaging* 13: 221-33, 1998.

209. **Ewig S, Reinert RR, Wiedemann B et al.** The role of antimicrobial resistance in community acquired respiratorytract infections. *Chemoter* 11: 12-26, 2002.

210. **Woodhead M.** Community-acquired pneumonia guidelines - an international comparison: a view from Europe. *Chest* 113: 183S-7S, 1998.

211. **Klugman KP.** The successful clone: the vector of dissemination of resistance in Streptococcus pneumoniae. *J Antimicrob Chemother* 50: 1-6, 2002.

212. **Avery O, Dubois R.** The protective action of a specific enzyme against type III pneumococcal infection in mice. *J.Exp.Med* 54, 73-89, 1931.

213. **Watson DA, Musher DM.** Interruption of capsule production in Streptococcus pneumonia serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun* 58: 3135-8, 1990.

214. **Fine DP.** Pneumococcal type-associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect Immun* 12: 772-8, 1975.

215. **Chudwin DS, Artrip SG, Korenblit A, Schiffman G, Rao S.** Correlation of serum opsonins with in vitro phagocytosis of Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* 50: 213-7, 1985.

216. **Alonso De Velasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H.** Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* 59: 591-603, 1995.

217. **Johnston RB, Jr.** Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev Infect Dis* 13 Suppl 6:S509-17.: S509-S517, 1991.

218. **Geelen S, Bhattacharyya C, Tuomanen E.** The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* 61: 1538-43, 1993.

219. **Jedrzejas MJ.** Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 65: 187-207, 2001.

220. **Yother J, McDaniel LS, Briles DE.** Transformation of encapsulated Streptococcus pneumoniae. *J Bacteriol* 168: 1463-5, 1986.

221. **Crain MJ, Waltman WD, Turner JS et al.** Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* 58: 3293-9, 1990.

222. **Mitchell TJ, Alexander JE, Morgan PJ, Andrew PW.** Molecular analysis of virulence factors of Streptococcus pneumoniae. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser* 26: 62S-71S, 1997.

223. **Lock RA, Hansman D, Paton JC.** Comparative efficacy of autolysin and pneumolysin as immunogens protecting mice against infection by Streptococcus pneumoniae. *Microb Pathog* 12: 137-43, 1992.

224. **Johnson MK.** Cellular localisation of pneumolysin. *FEMS Microbiol Let* 2, 243-245, 1977.

225. **Rosenow C, Ryan P, Weiser JN et al.** Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of Streptococcus pneumoniae. *Mol Microbiol* 25: 819-29, 1997.

226. **Hammerschmidt S, Bethe G, Remane PH, Chhatwal GS.** Identification of pneumococcal surface protein A as a lactoferrin-binding protein of Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* 67: 1683-7, 1999.

227. **Hammerschmidt S, Tillig MP, Wolff S, Vaerman JP, Chhatwal GS.** Species-specific binding of human secretory component to SpsA protein of Streptococcus pneumoniae via a hexapeptide motif. *Mol Microbiol* 36: 726-36, 2000.

228. **Childers NK, Bruce MG, McGhee JR.** Molecular mechanisms of immunoglobulin A defense. *Annu Rev Microbiol* 43: 503-36, 1989.

229. **Underdown BJ, Schiff JM.** Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. *Annu Rev Immunol* 4: 389-417, 1986.

230. **Andersson B, Dahmen J, Frejd T et al.** Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J Exp Med* 158: 559-70, 1983.

231. **Humphrey JH.** Hyaluronidase production by pneumococci. *J Pathol Bacterio* 55, 273-275, 1948.

232. **Boulnois GJ.** Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by Streptococcus pneumoniae. *J Gen Microbiol* 138: 249-59, 1992.

233. **Cockeran R, Anderson R, Feldman C.** The role of pneumolysin in the pathogenesis of Streptococcus pneumoniae infection. *Curr Opin Infect Dis* 15: 235-9, 2002.

234. **Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ.** Molecular analysis of the pathogenicity of Streptococcus pneumoniae: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol* 47: 89-115, 1993.

235. **Baba H, Kawamura I, Kohda C et al.** Essential role of domain 4 of pneumolysin from Streptococcus pneumoniae in cytolytic activity as determined by truncated proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 281: 37-44, 2001.

236. **Balachandran P, Hollingshead SK, Paton JC, Briles DE.** The autolytic enzyme LytA of Streptococcus pneumoniae is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacterio.* 183: 3108-16, 2001.

237. **Rubins JB, Janoff EN.** Pneumolysin: a multifunctional pneumococcal virulence factor. *J Lab Clin Med* 131: 21-7, 1998.

238. **Bonev BB, Gilbert RJ, Andrew PW, Byron O, Watts A.** Structural analysis of the protein/lipid complexes associated with pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *J Biol Chem* 276: 5714-9, 2001.

239. **Zysk G, Schneider-Wald BK, Hwang JH et al.** Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by Streptococcus pneumoniae. *Infect Immun* 69: 845-52, 2001.

240. **Wellmer A, Zysk G, Gerber J et al.** Decreased virulence of a pneumolysin-deficient strain of Streptococcus pneumoniae in murine meningitis. *Infect Immun* 70: 6504-8, 2002.

241. **van Ginkel FW, McGhee JR, Watt JM, Campos-Torres A, Parish LA, Briles DE.** Pneumococcal carriage results in ganglioside-mediated olfactory tissue infection. *Proc Natl Acad Sci U.S A* 100: 14363-7, 2003.

242. **Tuomanen EI.** Pathogenesis of pneumococcal inflammation: otitis media. *Vaccine* 19 Suppl 1:S38-40.: S38-S40, 2000.

243. **Houldsworth S, Andrew PW, Mitchell TJ.** Pneumolysin stimulates production of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta by human mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 62: 1501-3, 1994.

244. **Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE.** Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2: 319-23, 1967.

245. **Bernard GR.** Acute respiratory distress syndrome: a historical perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 172: 798-806, 2005.

246. **Bernard GR, Artigas A, Brigham KL et al.** The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 818-24, 1994.

247. **Bhatia M, Moochhala S.** Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol* 202: 145-56, 2004.

248. **Bernard GR, Artigas A, Brigham KL et al.** Report of the American-European consensus conference on ARDS: definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The Consensus Committee. *Intensive Care Med* 20: 225-32, 1994.

249. **Schuster DP.** What is acute lung injury? What is ARDS? 17. *Chest* 107: 1721-6, 1995.

250. **Schulz V.** Respiratorische Insuffizienz durch Lungenversagen / ARDS. In: Ferlitz R, ed. Pneumologie in Praxis und Klinik. *Georg Thieme Verlag Stuttgart New York* 809-18, 1994.

251. **Suttorp N.** Zellbiologische Untersuchungen zur Pathogenese des akuten Atemnotsyndroms des Erwachsenen (ARDS). *Habilitationsschrift Gießen*, 1988.

252. **Uhlig S.** The isolated perfused lung. In: Uhlig S, Taylor A, eds. Methods in Pulmonary Research. *Birkhaeuser, Boston* 29-53, 1998.

253. **von Bethmann AN, Brasch F, Nusing R et al.** Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 263-72, 1998.

254. **Cima-Cabal MD, Vazquez F, De IT, Jr., Mendez FJ.** Rapid and reliable identification of Streptococcus pneumoniae isolates by pneumolysin-mediated agglutination. *J Clin Microbiol* 37: 1964-6, 1999.

255. **Ermert L, Hocke AC, Duncker HR, Seeger W, Ermert M.** Comparison of different detection methods in quantitative microdensitometry. *Am J Pathol* 158: 407-17, 2001.

256. **Owen JS, Wykle RL, Samuel MP, Thomas MJ.** An improved assay for platelet-activating factor using HPLC-tandem mass spectrometry. *J Lipid Res* 46: 373-82, 2005.

257. **Rouser G, A.Siakotos, S.Fleischer.** Quantitative analysis of phospholipids by thin-layer chromatography and phosphorus analysis of spots. *Lipids* 1: 85-6, 1996.

258. **Clay KL.** Quantitation of platelet-activating factor by gas chromatography-mass spectrometry. *Methods Enzymol* 187:134-42, 1990.

259. **Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75, 1951.

260. **Hippenstiel S, Witzenrath M, Schmeck B et al.** Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 91: 618-25, 2002.

261. **Hippenstiel S, Schmeck B, N'Guessan PD et al.** Rho protein inactivation induced apoptosis of cultured human endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283: L830-L838, 2002.

262. **Suttorp N, Weber U, Welsch T, Schudt C.** Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J Clin Invest* 91: 1421-8, 1993.

263. **Suttorp N, Hippenstiel S, Fuhrmann M, Krull M, Podzuweit T.** Role of nitric oxide and phosphodiesterase isoenzyme II for reduction of endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol* 270: C778-C785, 1996.

264. **Garcia JG, Schaphorst KL, Shi S et al.** Mechanisms of ionomycin-induced endothelial cell barrier dysfunction. *Am J Physiol* 273: L172-L184, 1997.

265. **Giaever I, Keese CR.** A morphological biosensor for mammalian cells. *Nature* 366: 591-2, 1993.

266. **Tiruppathi C, Malik AB, Del Vecchio PJ, Keese CR, Giaever I.** Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7919-23, 1992.

267. **Palmer M.** The family of thiol-activated, cholesterol-binding cytolysins. *Toxicon* 39: 1681-9, 2001.

268. **Hirst RA, Kadioglu A, O'Callaghan C, Andrew PW.** The role of pneumolysin in pneumococcal pneumonia and meningitis. *Clin Exp Immunol* 138: 195-201, 2004.

269. **Mitchell TJ.** Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by Streptococcus pneumoniae. *Res Microbiol* 151: 413-9, 2000.

270. **Paton JC.** The contribution of pneumolysin to the pathogenicity of Streptococcus pneumoniae. *Trends Microbiol* 4: 103-6, 1996.

271. **Jounblat R, Kadioglu A, Mitchell TJ, Andrew PW.** Pneumococcal behavior and host responses during bronchopneumonia are affected differently by the cytolytic and complement-activating activities of pneumolysin. *Infect Immun* 71: 1813-9, 2003.

272. **Rubins JB, Charboneau D, Fasching C et al.** Distinct roles for pneumolysin's cytotoxic and complement activities in the pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1339-46, 1996.

273. **Feldman C, Munro NC, Jeffery PK et al.** Pneumolysin induces the salient histologic features of pneumococcal infection in the rat lung in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 416-23, 1991.

274. **Rijneveld AW, van den Dobbelsteen GP, Florquin S et al.** Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *J Infect Dis* 185: 123-6, 2002.

275. **Maus UA, Srivastava M, Paton JC et al.** Pneumolysin-induced lung injury is independent of leukocyte trafficking into the alveolar space. *J Immunol* 173: 1307-12, 2004.

276. **Rubins JB, Duane PG, Clawson D, Charboneau D, Young J, Niewoehner DE.** Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 61: 1352-8, 1993.

277. **Schutte H, Rosseau S, Czymek R et al.** Synergism between endotoxin priming and exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 819-24, 1997.

278. **Walmrath D, Ghofrani HA, Rosseau S et al.** Endotoxin "priming" potentiates lung vascular abnormalities in response to Escherichia coli hemolysin: an example of synergism between endo- and exotoxin. *J Exp Med* 180: 1437-43, 1994.

279. **Walmrath D, Scharmann M, Konig R, Pilch J, Grimminger F, Seeger W.** Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J Appl Physiol* 74: 1972-80, 1993.

280. **Dejana E.** Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J Clin Invest* 98: 1949-53, 1996.

281. **Paton JC, Lock RA, Lee CJ et al.** Purification and immunogenicity of genetically obtained pneumolysin toxoids and their conjugation to Streptococcus pneumoniae type 19F polysaccharide. *Infect Immun* 59: 2297-304, 1991.

282. **Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM.** Thrombin stimulates the adherence of neutrophils to human endothelial cells in vitro. *J Clin Invest* 76: 2235-46, 1985

283. **Suttorp N, Buerke M, Tannert-Otto S.** Stimulation of PAF-synthesis in pulmonary artery endothelial cells by Staphylococcus aureus alpha-toxin. *Thromb Res* 67: 243-52, 1992.

284. **Chang SW, Feddersen CO, Henson PM, Voelkel NF.** Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest* 79: 1498-509, 1987.

285. **Salzer WL, McCall CE.** Primed stimulation of isolated perfused rabbit lung by endotoxin and platelet activating factor induces enhanced production of thromboxane and lung injury. *J Clin Invest* 85: 1135-43, 1990.

286. **Rijneveld AW, Weijer S, Florquin S et al.** Improved host defense against pneumococcal pneumonia in platelet-activating factor receptor-deficient mice. *J Infect Dis* 189: 711-6, 2004.

287. **Camussi G, Aglietta M, Malavasi F et al.** The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. *J Immunol* 131: 2397-403, 1983.

288. **McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM.** Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83: 2204-8, 1986.

289. **Coleman RA, Smith WL, Narumiya S.** International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev* 46: 205-29, 1994.

290. **Harnett KM, Biancani P.** Calcium-dependent and calcium-independent contractions in smooth muscles. *Am J Med* 115 Suppl 3A:24S-30S, 2003.

291. **Morgan KG, Leinweber BD.** PKC-dependent signalling mechanisms in differentiated smooth muscle. *Acta Physiol Scand* 164: 495-505, 1998.

292. **Gafni J, Munsch JA, Lam TH et al.** Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Neuron* 19: 723-33, 1997.

293. **Bergner A, Sanderson MJ.** Acetylcholine-induced calcium signaling and contraction of airway smooth muscle cells in lung slices. *Journal of General Physiology* 119: 187-98, 2002.

294. **Göggel R, Uhlig S.** The inositol trisphosphate pathway mediates platelet-activating-factor-induced pulmonary oedema. *Eur Respir J* 25: 849-57, 2005.

295. **De Smet P, Parys JB, Callewaert G et al.** Xestospongin C is an equally potent inhibitor of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca(2+) pumps. *Cell Calcium* 26: 9-13, 1999.

296. **Ozaki H, Hori M, Kim YS et al.** Inhibitory mechanism of xestospongin-C on contraction and ion channels in the intestinal smooth muscle. *Br.J Pharmacol.* 137: 1207-12, 2002.

297. **Ma HT, Patterson RL, Van Rossum DB, Birnbaumer L, Mikoshiba K, Gill DL.** Requirement of the Inositol Trisphosphate Receptor for Activation of Store-Operated Ca2+ Channels. *Science* 287: 1647-51 2000.

298. **Somlyo AP, Somlyo AV.** Signal transduction and regulation in smooth muscle. *Nature* 372: 231-6, 1994.

299. **Fu X, Gong MC, Jia T, Somlyo AV, Somlyo AP.** The effects of the Rho-kinase inhibitor Y-27632 on arachidonic acid-, GTPgammaS-, and phorbol ester-induced Ca2+-sensitization of smooth muscle. *FEBS Let.* 440: 183-7, 1998.

300. **Gong MC, Iizuka K, Nixon G et al.** Role of guanine nucleotide-binding proteins--ras-family or trimeric proteins or both--in Ca2+ sensitization of smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U.S A* 93: 1340-5, 1996.

301. **Hirata K, Kikuchi A, Sasaki T et al.** Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 267: 8719-22, 1992.

302. **Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P.** Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351: 95-105, 2000.

303. **Iliev AI, Djannatian JR, Nau R, Mitchell TJ, Wouters FS.** Cholesterol-dependent actin remodeling via RhoA and Rac1 activation by the Streptococcus pneumoniae toxin pneumolysin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 2897-902, 2007

304. **Musher DM, Phan HM, Baughn RE.** Protection against bacteremic pneumococcal infection by antibody to pneumolysin. *J Infect Dis* 183: 827-30, 2001.

305. **Nakos G, Tsangaris H, Liokatis S, Kitsiouli E, Lekka ME.** Ventilator-associated pneumonia and atelectasis: evaluation through bronchoalveolar lavage fluid analysis. *Intensive Care Med* 29: 555-63, 2003.

306. **Nakos G, Kitsiouli EI, Tsangaris I, Lekka ME.** Bronchoalveolar lavage fluid characteristics of early intermediate and late phases of ARDS. Alterations in leukocytes, proteins, PAF and surfactant components. *Intensive Care Med* 24: 296-303, 1998

307. **Sorensen J, Kald B, Tagesson C, Lindahl M.** Platelet-activating factor and phospholipase A2 in patients with septic shock and trauma. *Intensive Care Med* 20: 555-61, 1994.

308. **Taylor IK, Ward PS, Taylor GW, Dollery CT, Fuller RW.** Inhaled PAF stimulates leukotriene and thromboxane A2 production in humans. *J Appl Physiol* 71: 1396-402, 1991.

309. **Bussolino F, Silvagno F, Garbarino G et al.** Human endothelial cells are targets for platelet-activating factor (PAF). Activation of alpha and beta protein kinase C isozymes in endothelial cells stimulated by PAF. *J Biol Chem* 269: 2877-86, 1994.

310. **Tripathi YB, Lim RW, Fernandez-Gallardo S, Kandala JC, Guntaka RV, Shukla SD.** Involvement of tyrosine kinase and protein kinase C in platelet-activating-factor-induced c-fos gene expression in A-431 cells. *Biochem J* 286 (Pt 2): 527-33, 1992.

9 Anhang

9.1 Studiendesign

9.1.1 Untersuchung im in vivo Modell der murinen Pneumokokkempneumonie

	Gruppe 1 pulmonale Permeabilität (BAL/ Plasma-Quotient f. HSA)	**Gruppe 2** Quantifizierung d. neutrophilen Granulozyten
WT / Kontrolle	n=6	n=6
WT / 12 h	n=6	n=6
WT / 24 h	n=6	n=6

9.1.2 Untersuchung im ex vivo Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge

Intratracheale PLY-Applikation

	Gruppe 1 Permeabilität (HSA-Quantifizierung in d. BAL)	**Gruppe 2** Beurteilung d. Ödems (wet-to-dry weight ratio)
WT / Kontrolle (0,9% NaCl)	n=5	n=5
WT / 0,025 µg PLY	n=6	-
WT / 0,125 µg PLY	n=5	-
WT / 0,25 µg PLY	n=6	n=5
WT / 2,5 µg PLY	n=5	n=5
Eigenständige Versuchsreihe mit PAF-R$^{-/-}$-Mäusen		
WT / Kontrolle (0,9% NaCl)	n=8	-
WT / 1,0 µg PLY	n=7	-
PAF-R$^{-/-}$-Mäuse/ 1,0 µg PLY	n=7	-

Intravaskuläre PLY-Applikation

	Gruppe1 Permeabilität (HSA-Quantifizierung in BAL)	**Gruppe2** Ppa (Tiere sind aus Gruppe 1)	**Gruppe 3** TXA_2 im Perfusat (Kontrollen sind aus Gruppe 1, die anderen Tiere aus Gruppe 2)	**Gruppe4** PAF im Lungengewebe
WT/ Kontrolle 0,9% NaCl	n=6	n=6 (PLY-Dosisreihe) _____ n=5 +1 (Versuche im Zusammenhang mit der Ppa-Signalwegsstudie durchgeführt)	n=5	n=7
WT / 0,1 µg/ml PLY	n=5	n=5	-	-
WT / 1,0 µg/ml PLY	n=4	n=6 (für PLY-Dosisreihe, 4 aus Gruppe 1) _____ 8 (Versuche im Zusammenhang mit der Ppa-Signalwegsstudie durchgeführt)	n=6	n=7
WT / 2,5 µg/ml PLY	n=5	n=5	-	-
WT / 1 µg/ml PD-B-PLY	-	n=5	-	-
PAF-$R^{-/-}$-Mäuse / 1,0 µg/ml PLY	n=5	n=7 (5 aus Gruppe 1)	n=7	-
100 nM PAF-C_{16}	-	n=5	n=5	-
WT+BN50730 / 1,0 µg/ml PLY	-	n=5	-	-
WT+BM13505/ 1,0 µg PLY	-	n=6	-	-
WT+D 609 / 1,0 µg/ml PLY	-	n=5	-	-
WT+L108 / 1,0 µg/ml PLY	-	n=5	-	-
WT+Xesto. / 1,0 µg/ml PLY	-	n=5	-	-
WT+BIM / 1,0 µg/ml PLY	-	n=5	-	-
WT+Y 27. / 1,0 µg/ml PLY	-	n=5	-	-
WT+Y27+BIM / 1,0 µg/ml PLY	-	n=5	-	-

	Gruppe5 Immunhistochemie (HSA-Extravasation)	**Gruppe6** Immunhistochemie (PLY-Lokalisation)
WT/ Kontrolle 0,9% NaCl	n=3	n=3
WT / 1,0 µg/ml PLY	n=3	n=3

9.2 Material für das in vivo Modell der murinen Pneumokokken-pneumonie

9.2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Sicherheitsarbeitsbank (Heraeus Sorvall, Typ HS12)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Brutschrank (Heraeus, Typ BB6220 O_2)	Kendro Laboratory Product (Hanau)
Photometer (UVIKON $_{xs}$)	Bio-Tek Instruments (Winooski, VT, USA)
Zentrifuge (Heraeus Instruments, Megafuge 1.0R)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Rektalsonde (physitemp Model BAT-12)	Physitemp Instruments Inc (Clifton, NJ, USA)
Waage (Model CS200)	Ohaus Corporation (NY, USA) über VWR

9.2.2 Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Streptococcus pneumoniae (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978)	PD Dr. Sven Hammerschmidt, Universität Würzburg, Zentrum für Würzburg
Columbia Agarplatten mit 5% Schafblut	Becton Dickinson (Heidelberg)
Sterile Einmal-Impfschlingen (farblos, 1µl)	Nunc (Wiesbaden)
Steriles Nährmedium:THY (Todd-Hewitt-Bouillion)	Becton Dickinson (Heidelberg)
0,5% Yeast Extract (Hefeextract)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Steriles Fötales Kälberserum (Foetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Phosphat Buffered Saline (Dulbecco's PBS (1x))	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Hyaluronidase	Sigma (Deisenhofen)
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid 100mg/ml)	Pfizer Pharmacia GmbH (Karlsruhe)
Rompun 2%® (Xylazinhydrochlorid 20mg/ml)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)

9.2.3 Herstellung eines Arbeitsstocks von *Streptococcus pneumoniae*

- Verdünnungsausstrich von *Streptococcus pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC 7978) auf Columbia Blutagar mit 5% Schafblut
- Inkubation (37°C, 5% CO_2,10-12 h)
- Entnahme von 2-3 Einzelkolonien mit steriler Öse, erneuter Verdünnungsausstrich Inkubation (37°C, 5% CO_2, 10-12 h)
- Alle Kolonien mit sterilem Wattestab von der Platte abnehmen und in Kryoröhrchen, gefüllt mit 1,5 ml Einfriermedium (80% THY + 20% Glycerol) übertragen
- Arbeitsstock bei –80°C lagern

9.2.4 Herstellung der Nährlösung zur Anzucht von *Streptococcus pneumoniae*

- 30 g Todd Hewitt-Bouillon + 5 g Yeast Extrakt / 1 l Aqua dest. lösen
- Medium autoklavieren (115°C, 10 min)
- Fetale Kälberserum (FCS) hitzeinaktivieren (56°C für 30 min)
- Vor Gebrauch entsprechende Menge steril filtriert (gebrauchsfertige Filtereinheit 30/0,45)

9.3 Material für die Durchflusszytometrie

9.3.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
FACS Calibur	BD Biosciences (Heidelberg)
Neubauer Zählkammer (Bright-Line)	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)
Schüttelwasserbad GFL Typ 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel)
BD Falcon™ 5ml Polypropylen Round-BottomTube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon™ 5ml Polystyrene Round-BottomTube	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Trucount™ Tubes	BD Biosciences (Heidelberg)
Gebrauchsfertige Filtereinheit FP 30/0,45 CA-S	Schleicher&Schuell GmbH (Dassel)

9.3.2 Substanzen und Antikörper

Substanzen	Hersteller
RPMI-Medium	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Kollagenase (Typ CLS II)	Worthington Biochemical Corporation (Lakewood, NJ, USA)
DNase I	Roche Diagnostics GmbH (Manheim)
Cellwash	BD Biosciences (Heidelberg)
Facs™ Lysing Solution	BD Biosciences (Heidelberg)
Methylviolett	Merck (Darmstadt)
Rat Anti-Mouse GR-1 PE (neutrophil granulocytes, clone RB6-8C5)	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)
Rat Anti-Mouse CD45 PerCP (pan-leucocytes, clone 145-2C11)	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)
Rat Anti-Mouse F4-80 APC (alveola macrophages, clone BM8)	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)
Mouse BD Fc-Block™ (alveola macrophages, clone BM8)	BD Biosciences Pharmingen (Heidelberg)

9.4 Material für das ex vivo Modell der isoliert perfundierten und ventilierten Mauslunge

9.4.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Unterdruckkammer (Isolated Lung, size 1, Typ 839)	Hugo Sachs Elektronik HavardApparatus GmbH (March)
Peristaltikpumpe (Reglo-Analog, Ismatec SA)	ISMATEC (Glattbrugg, Schweiz)
Einhängethermostat (ecoline E 100)	Lauda Dr. R. Wolzer GmbH u. Co KG (Lauda-Königshofen)
Perfusor (Perfusor F, Typ 871332/4)	BRAUN AG (Melsungen)
Beatmungsgas (5% CO_2, 20% O_2, 75% N_2)	Abteilung Technische Gase (Charité, Berlin)
Microsprayer	Penn-Century (Philadelphia, PA, USA)
Messmodule (CFBA,TAM-A, VCM, TCM)	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus GmbH (March)
Differenzial-Druckaufnehmer (Differential pressure Transducer Validyne DP45-14)	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus GmbH (March)
Druckaufnehmer (Pressure Transducer MPX/Typ 399/2 und P75/Typ 379)	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus GmbH (March)
Software (Pulmodyn)	Hugo Sachs Elektronik Havard Apparatus GmbH (March)

9.4.2 Substanzen

Folgende Substanzen wurden für das Vorhaben von den genannten Personen freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

Substanzen	Hersteller
Rekombinantes Pnemolysin	Prof. Timothy J Mitchell, Division of Infection and Immunity, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow (United Kingdom)
Pneumolysoid PD-B	Prof. Timothy J Mitchell, Division of Infection and Immunity, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, United Kingdom
BM 13505 (Daltroban)	Dr. Wolters, Boehringer (Mannheim)
BN-50730	Prof. Thureau, Institut Henri Beaufour, Les Ulis (Frankreich)

Alle weiteren Substanzen wurden käuflich erworben:

Substanzen	Hersteller
Ketavet® (Ketaminhydrochlorid 100mg/ml)	Pfizer Pharmacia GmbH (Karlsruhe)
Rompun 2%® (Xylazinhydrochlorid 20mg/ml)	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Braunol® (Povidon-Jod-Lösung)	BRAUN AG (Melsungen)
Liquemin® N25000 (Heparin-NaCl 5000I.E./ml)	Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen)
Krebs-Henseleit-Hydroxyethylamylopectin Puffer	Serag-Wiessner KG (Naila)
Natriumhydrogencarbonat- Lösung 8,4%	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg)
Human Albumin Grifols® 20% (200g Alb./1000ml)	Grifols Deutschland GmbH (Langen)
Natrium-Chlorid-Lösung 0,9%	BRAUN AG (Melsungen)
Xestospongin C	Biomol (Hamburg)
1-O-Octadecyl-2-O-methyl-sn- glycero-3-phosphorylcholine (L-108)	Biomol (Hamburg)
Bisindolylmaleimide (BIM)	Calbiochem / Merck Biosciences GmbH (Schwalbach/Ts.)
(R)-(+)-trans-N-(4-Pyridyl)-4-(1-aminoethyl)-cyclohexanecarboxamide (Y-27632)	Calbiochem / Merck Biosciences GmbH (Schwalbach/Ts.)
O-Tricyclo[5.2.1.0 ^{2,6}] dec-9-yl dithiocarbonat potassium salt (D-609)	Sigma (Deisenhofen)
β-Acetyl-γ-O-hexadecyl-L-α-phosphatidylcholine (PAF- C_{16})	Sigma (Deisenhofen)
5-Lipoxygenase Inhibitor AA-861 minimum HPLC 98%	Sigma (Deisenhofen)
2-Aminoethyldiphenylborat (2APB)	Sigma (Deisenhofen)
Thromboxan A_2-Analogon (U46619)	Calbiochem / Merck Biosciences GmbH (Schwalbach/Ts.)

Zur Präparation wurden Pinzetten und Scheren der Fine Science Tools GmbH (Heidelberg) verwendet, und die benötigten Glasgefäße konnten von den Firmen SIMAX (Tschechische Republik) und TGI (Technische Glaswerke Ilmenau, Deutschland) erworben werden.

9.5 Material für Zellkulturversuche, die immunohistochemische Färbung des Lungengewebes und die PAF-Bestimmung

9.5.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Zellkultur Deckgläser (Thermanox 13mm)	Nunc (Wiesbaden)
Polycarbonatfiltermembranen (∅ 25mm, Porengröße 5µm)	Nucleopore GmbH (Tübingen)
Zellkulturflaschen T75	Nunc (Wiesbaden)
Impedanz-Analysator mit Kontakthalterung (Electrical cell-substrate impedance system, ECIS)	Applied Biophysics (Troy, NY, USA)
8-Well Elektrodenarray	Applied Biophysics (Troy, NY, USA)
Gefriermikrotom (Micron HM560)	Microm GmbH (Walldorf)
Pascal-5 confocal Laser Mikroskop	Zeiss (Jena)
AxioCam HRC	Zeiss (Jena)

9.5.2 Zellen, Substanzen und Antikörper

Material	Hersteller
Humane Alveolarepithelzellen, (A549:Humanes Lungenkarzinom)	ATCC (Rockville, MD, USA)
Humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)	Isolierung s. „Methoden“
HAM’S F12 mit L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Steriles Fötales Kälberserum (Foetal Bovine Serum Gold)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Phosphat Buffered Saline (Dulbecco’s PBS +Ca/+Mg)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Kollagenase (Typ CLS II)	Worthington Biochemical Corp. (Lakewood, NJ, USA)
Endothel-Basal-Medium	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
L-Glutamin	Gibco (Karlsruhe)
Humaner rekombinanter Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF)	Gibco (Karlsruhe)
Endothelial Cell Growth Medium	PromoCELL GmbH (Heidelberg)
Amphotericin B	Boehringer (Mannheim)
Streptomycin	Boehringer (Mannheim)
Penicillin	Boehringer (Mannheim)
Medium 199	Gibco (Karlsruhe)
Hanks balanced salt solution +Ca/Mg (HBSS)	Gibco (Karlsruhe)
Rekombinantes Pneumolysin	Prof. Timothy Mitchell, Division of Infection and Immunity, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, (United Kingdom)

Material	Hersteller
Tissue-Tek O.C.T.^{TM}Compound (O.C.T.=Optimal Cutting Temperature)	Sakura Finetek Europe B.V. (Zoeterwoude, Niederlande)
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma (Deisenhofen)
Tween 20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma (Deisenhofen)
Albumin bovine serum , Fracti0n V, ≥ 96%	Sigma (Deisenhofen)
Triton X-100	Sigma (Deisenhofen)
H_2O_2	Merck (Darmstadt)
Methylgrün	Sigma (Deisenhofen)
mouse anti human vascular endothelial (VE)-Cadherin-AK	Chemicon (Hofheim)
Alexa Fluor546 F(ab)2 goat anti mouse IgG (H+L)	Molecular Probes (Leiden,Niederlande)
Alexa488 Phalloidin	Molecular Probes (Leiden,Niederlande)
rabbit anti-PLY-Ak	Prof. Juan R. de losToyos, Area de Immunologia, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo (Spain)
goat anti rabbit F(ab)2 purified IgG AP (AP= Alkalische Phosphatase)	Rockland (Gilbertsville, USA)
Vector Red Substrate Kit	Vector Laboratories (Burlingame, CA,USA)
goat anti-Human Albumin-HRP conjugated-AK (HRP= Horseradish Peroxidase)	Bethyl Laboratories (Montgomery, TX, USA)
DAB substrat kit (DAB=3,3'- diaminobenzidine)	Vector (Peterborough, United Kingdom)
Goat Serum	Sigma (Deisenhofen)
PAF-Standard, unmarkiert 16:0	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, USA)
PAF-Standard, unmarkiert 18:0 und 18:1	Bachem Bioscience (King of Prussia, Pennsylvania, USA)
Interne Standard (PAF C-16 omega -d3)	Cayman (AnnArbor, MI, USA)

9.6 Immunoassays

Zur Quantifizierung von humanem Serumalbumin in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) und im Plasma diente ein Human Albumin ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories, Montgomery, Texas, USA). Die dafür verwendeten Puffer mussten nach folgendem Protokoll hergestellt werden:

- Coating Puffer: (0,05 M, pH 9,6)

  2,63 g Natrium Carbonat / 500 ml Aqua dest.

- 10x Grundpuffer: (500 mM Tris Base, 1,4 M NaCl , pH 8,0)

  60,5 g Tris Base /l Aqua dest. + 81,8 g NaCl / l Aqua dest.

  Für den Gebrauch wurde der Puffer 1:10 (50 ml + 450 ml Aqua dest.) verdünnt.

- Waschpuffer: (50 mM Tris Base, 0,14 M NaCl , 0,05% Tween20)

  500 ml 1x Grundpuffer + 250 µl Tween20

- Postcoat Puffer: (50 mM Tris Base, 0,14 M NaCl, 1% BSA)

  500 ml 1x Grundpuffer + 5 g BSA

- Probenpuffer: (50 mM Tris Base, 0,14 M NaCl, 1% BSA, 0,05% Tween20)

  500 ml 1x Grundpuffer + 5 g BSA + 250 µl Tween20

- 2 Mol Schwefelsäure: 98,1 g/l → 1 Mol (d.h. 100 ml/l → 1 Mol)

  200ml/l → 2 Mol (200 ml auf 800 ml A.dest)

Die weitere Durchführung dieses ELISA's erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Konzentration von Thromboxan B2, eines stabilen Abbauproduktes von Thromboxan A2, wurde mit einem TXB_2-Enzym-Immunoassay (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) gemessen. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.
Zur Messung der optischen Dichte (OD) diente ein Anthos ht2 Mikroplatten Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH, Krefeld) mit zugehöriger Software (WinRead Anthos).

9.7 Allgemeine Geräte, Substanzen und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Tischzentrifuge (Galaxy Mini)	VWR (Darmstadt)
Zentrifuge (Heraeus, Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Vortex (Vortex-2-Genie)	Scientific Industries (Bohemia, NY,USA)
Rüttelplatte (IKA-Schüttler, Typ MT S2)	KIKA-Werke (Staufen)
Analysewaage (Sartorius, MC 5(-OCE))	Sartorius AG (Göttingen)
Trockenschrank (Heraeus, Function Line)	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Pipetten (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Multipette (Eppendorf Multipette plus)	Eppendorf (Hamburg)
Multi-Channel-Pipette (Eppendorf Research)	Eppendorf (Hamburg)
Magnetrührer (Variomag Electronicrührer Mno)	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
pH-Meter (766 Calimatic, Typ 766)	Knick (Berlin)
Homogenisator für Organe	Eigenbau
Kühlschrank/ klein 4°C (MED-85)	Kirsch (Offenburg)
Kühlschrank/ groß 4°C (Liebherr Profiline)	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Gefrierschrank/ klein –20°C (Froster-Med-70)	Kirsch (Offenburg)
Gefrierschrank/ groß –20°C (Liebherr Comfort)	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Gefrierschrank –80°C	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Autoklav (tuttnauer Systec 2540EL)	Systec GmbH Labor-Systemtechnik (Wettenberg)
Dampfsterilisator (Varioklav, Typ 755)	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
TMB (Tetramethylbenzidine Liquid Substrat)	Sigma (Deisenhofen)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Schwefelsäure	Merck (Darmstadt)
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Merck (Darmstadt)

Weiteres Verbrauchsmaterial (Spritzen, Kanülen, Reaktionsgefäße, Röhrchen, Multititerplatten etc) wurde von Braun (Melsungen), Becton Dickinson (Heidelberg), Eppendorf (Hamburg), Falcon (Le Pont De Claix, Frankreich), Sarstedt (Nümbrecht) und Nunc (Wiesbaden) bezogen.

Danksagung

So vielseitig wie diese Doktorarbeit, so vielseitig sind auch die Personen, die mit ihrer tatkräftigen Unterstützung zum Gelingen beigetragen haben. Dabei hat sich gezeigt, wie wichtig es ist, ein Team zu bilden. An dieser Stelle ist nun Platz einigen Personen ganz besonders für ihre Hilfe zu danken!

Im Forschungslabor der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie, Charité, Universitätsmedizin Berlin, wurde mir die Möglichkeit gegeben, mit anspruchsvollen methodischen Modellen arbeiten zu dürfen. Für diese guten Arbeitsbedingungen und für die Überlassung des sehr interessanten und vielseitigen Promotionsthemas möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. N. Suttorp, dem Direktor der Klinik, ganz herzlich bedanken.

Ein ganz besonderes großes Dankeschön möchte ich Herrn Dr. M. Witzenrath aussprechen, der mich fachlich und methodisch sehr gut betreut hat. Angefangen von einer guten und geduldigen Einarbeitung, über sein Engagement, mich bei der Bewerbung um ein Stipendium zu unterstützen, bis hin zu häufigen Gesprächen und Diskussionen. Dank seiner guten und strukturierten Erklärungen von Sachverhalten wurde dabei vieles auf den Punkt gebracht, was eine große Hilfe war. Trotz der eigenen vielseitigen Forschungsarbeit, zu der später noch die Arbeit als Stationsarzt kam, nahm er sich dafür immer wieder Zeit. Das ist auf keinen Fall selbstverständlich und bestimmt nicht immer einfach.

Bei Herrn Professor Dr. H. Hartmann möchte ich mich für die Übernahme der veterinärmedizinischen Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit der Einreichung der Dissertation über das Institut für Veterinär-Physiologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin bedanken.

Bei den Personen, die ihr methodisches Know How oder besondere Materialien für dieses Projekt zur Verfügung stellten, möchte ich mich an dieser Stelle bedanken. Das gilt besonders für:

- Professor T. J. Mitchell und sein Team, Division of Infection and Immunity, Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, United Kingdom, für die Bereitstellung des rekombinanten Pneumolysins und des Pneumolysoids PD-B.
- Dr. John Owen und seinen Mitarbeitern, Department of Biochemistry, Wake Forest University School of Medicine, Winston-Salem, NC 27157, USA, für die Durchführung der aufwendigen Isolierung und Quantifizierung des Plättchen-aktivierenden Faktors aus dem Lungengewebe mittels HPLC.

- Frau Katrin Wricke, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie u. Pneumologie, für die Durchführung der FACS-Analyse.
- Herrn Dr. A. Hocke, Charité, Universitätsmedizin Berlin, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie u. Pneumologie, für die immunhistochemische Untersuchung der Lungen.
- Frau Katharina Berger und Frau Kerstin Möhr für die Untersuchungen in der Zellkultur.
- Herrn Professor Thureau, Institut Henri Beaufour, Les Ulis, Frankreich, für die Bereitstellung des Thromboxan-Rezeptor Antagonisten Daltroban (BM-13505).
- Herrn Dr. Wolters von der Firma Boehringer in Mannheim, der uns den PAF-Rezeptor Antagonisten BN-50730 zur Verfügung stellte.

Ohne MTA's geht im Labor fast nichts. Viel Organisatorisches wird von ihnen erledigt und ihr Wirken im Hintergrund ist nicht zu unterschätzen. Ein großes Dankeschön daher an Frau Stefanie Preising, insbesondere für die Weitergabe ihres methodischen Wissens. Ferner an Frau Jenny Thiele, die sich immer Zeit für Beratungsgespräche jeglicher Art nahm und auf deren Engagement und Kreativität man zählen konnte, auch außerhalb der Arbeitszeit.

Alle Mitdoktoranden hatten ebenfalls großen Anteil am guten Arbeitsklima, was zum Gelingen dieser Arbeit sehr entscheidend war. Durch die gegenseitige Hilfe bei der Versuchsdurchführung, den regen Austausch von methodischen Tipps oder das gemeinsame Durchschreiten von Höhen und Tiefen, ging der Spaß an der Sache nie verloren. Dafür an dieser Stelle ein ganz großes Dankeschön an Euch Mitstreiter: Steffi Kube, Sandra Lüke, Maren Zemlin, Holger Müller, Katrin Reppe, Franziska Runge, Jan Doehn, Christoph Tabeling und viele andere.

Einen ganz besonderen Dank möchte ich meinen Eltern aussprechen, denn auf ihre Unterstützung und Hilfe konnte ich mich immer verlassen, was vieles leichter gemacht hat. Es ist bestimmt nicht einfach, Kinder auf ihrem Weg zu begleiten, ihnen einerseits Entfaltungsmöglichkeiten zu geben, andererseits auch Grenzen zu zeigen, ohne sie dabei zu sehr einzuschränken. Euch ist es auf jeden Fall gelungen, dafür meine ganze Anerkennung!

Zuletzt ein großes Dankeschön an meine Geschwister und alle guten Freunde. Auch ihr habt dazu beigetragen, dass diese Zeit gemeistert werden konnte, auch wenn es dem ein oder anderen vielleicht nicht so bewusst ist.

Publikationen

Witzenrath, M., **B. Gutbier**, A. C. Hocke, B. Schmeck, S. Hippenstiel, K. Berger, T. J. Mitchell, I. T. de, Jr., S. Rosseau, N. Suttorp, and H. Schutte. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. ***Crit Care Med.*** 2006. 34:1947-1954.

Witzenrath, M., **B. Gutbier**, J.S. Owen, B. Schmeck, T.J. Mitchell, K. Mayer, M.J. Thomas, S. Ishii, S. Rosseau, N. Suttorp, and H. Schutte. Role of PAF in Pneumolysin-induced Acute Lung Injury. ***Crit Care Med.*** 2007. 35(7):1756-62.

Witzenrath M, **B. Gutbier** , B. Schmeck, H. Tenor, J. Seybold, R. Kuelzer, G. Grentzmann, A. Hatzelmann, TJ. Mitchell, C. Schudt, S. Rosseau, N. Suttorp, H. Schütte. Phosphodiesterase 2 Inhibition Diminished Acute Lung Injury in Murine Pneumococcal Pneumonia. ***Crit Care Med.*** 2009. 37(2):642-649

Reppe K, T. Tschernig, A. Lührmann, V. van Laak, M.V. Zemlin, **B. Gutbier**, H. Müller, H. Schütte, S. Rosseau, R. Pabst, N. Suttorp, M. Witzenrath. Pulmonary Host Defense Stimulation with MALP-2 Increased Survival in Murine Pneumococcal Pneumonia. ***Am J Respir Cell Mol Biol.*** 40:474-481

Witzenrath, M., B. Schmeck, J. M. Doehn, T. Tschernig, J. Zahlten, J. M. Loeffler, M. Zemlin, H. Muller, **B. Gutbier**, H. Schutte, S. Hippenstiel, V. A. Fischetti, N. Suttorp, and S. Rosseau. 2009. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. ***Crit Care Med.*** 37:642-649.

Haberberger, R. V., C. Tabeling, S. Runciman, **B. Gutbier**, P. Konig, M. Andratsch, H. Schutte, N. Suttorp, I. Gibbins, and M. Witzenrath. 2009. Role of sphingosine kinase 1 in allergen-induced pulmonary vascular remodeling and hyperresponsiveness. ***J.Allergy Clin.Immunol.*** in press

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Birgitt Gutbier